

抑制性差减杂交 (SSH) 技术在柑桔逆境胁迫研究中的应用

程春振^{1,2}, 阳佳位^{1,2}, 钟广炎^{1,2}

(1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400715; 2 中国农业科学院柑桔研究所)

摘要:抑制性差减杂交 (SSH) 技术作为一种稳定、高效、简单的富集和分离差异表达基因方法, 为研究植物生长发育及病虫害和其他一些生物或非生物逆境胁迫下的特异基因的表达和相关基因的分子克隆提供了有力的工具。介绍了 SSH 技术的基本原理、技术要点, 并对 SSH 技术在其他植物和柑桔逆境生理研究中的应用现状和前景进行了探讨。

关键词:抑制性差减杂交; 柑桔; 胁迫; 差异表达基因克隆。

中图分类号: S 666 文章标志码: A 文章编号: 1007-1431(2010)02-0011-04

柑桔是世界上最重要的水果之一, 也是我国南方最主要的果树。作为世界第一的柑桔生产大国和重要的柑桔原生中心, 中国的柑桔业已经成为广大南方地区农业发展的重要经济支柱产业。然而近年来由于气候变迁, 我国柑桔生产受到各种自然灾害和病虫害的严重影响, 如何控制这些生物和非生物胁迫已成为柑桔业健康发展中迫切需要解决的问题。在这种情况下, 相关科学问题比如逆境生理及相应调控基因的研究已成为柑桔科学研究的热点。近年来, 作为研究逆境胁迫下植物基因表达的重要手段, 抑制性差减杂交 (SSH) 技术在柑桔逆境生理研究上获得了较为广泛的应用。SSH 技术是一种可用于分离两个 mRNA 样本间差异表达基因的高效简便的生物学手段, 由于该技术在研究基因差异表达、基因克隆及基因功能方面有着特殊的优势^[1], 因而自 1996 年 Diatchenko 等^[2]报道以来, 在许多研究领域得到了广泛的应用。

本文旨在对 SSH 技术的原理及其在柑桔逆境生理研究中的应用现状及前景进行综述。

1 SSH 技术概况

SSH 技术的主要步骤: (1) 分别从处理和对照或其他任何两个要对比的不同器官或组织中提取 RNA, 合成 cDNA, 用钝端核酸内切酶处理; (2) 将处理或感兴趣材料的 cDNA (受试方, tester) 分成两

份, 与两个不同的接头连接; (3) 分别与过量的对照 cDNA (驱动方, driver) 杂交; (4) 选择性 PCR 扩增与接头相连的受试方 cDNA 分子; (5) 克隆 PCR 产物, 构建差减文库以及筛选文库。该技术运用了杂交二级动力学原理, 使得受试方和驱动方的 cDNA 在变性后再复性的过程中, 原来在丰度上有差别的单链 cDNA 达到均一化。当采用与两个不同接头序列互补的引物进行 PCR 扩增时, 非目标序列 (无差异表达基因的 cDNA) 因两端存在反向重复序列, 退火时易产生类似“锅柄”的结构, 无法与引物配对, 从而使扩增受到抑制, 而目标序列 (差异表达基因的 cDNA) 则可以得到有效扩增。采用 SSH 技术构建的 cDNA 文库有假阳性率低^[3]、特异性较高、灵敏度较高、效率高^[4]、背景低、操作简单及试验结果易分析^[5]等优点, 但也有对 mRNA 量要求较大和有表达丰度差异的 cDNA 很可能被驱动方过量的 cDNA 掩盖的缺点, 也无法筛选到酶切位点较少或无酶切位点的基因的样品, 以及差异较大的样品不适于应用该技术。

在应用过程中, SSH 技术中存在的假阳性^[6,7]、转录效率^[8]等一系列问题得到了改进。目前, 在生物技术领域得到广泛应用的可以有效减少文库中假阳性克隆的 MOS^[9] (Mirror Orientation Selection) 技术就是由 SSH 技术衍生而来的。SSH 技术与其

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 重庆市科技攻关项目“柑桔重要功能基因克隆与功能分析” (编号 CSTTC, 2007AA1018) 资助。

作者简介: 程春振 (1986-), 男, 硕士研究生, 现主要从事植物分子生物学方向的研究。电话: (023) 68349027, E-mail: 1d0532cheng@126.com

通信作者: 钟广炎, 研究员, 主要从事柑桔种质资源学和分子生物学研究。E-mail: gy_zhong@163.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www

他一些技术方法如与 cDNA 芯片技术^[10] 等的联合应用也正在日益增加。

2 SSH技术在其他植物研究中的应用

自 1999 年 Birch^[11] 等在对马铃薯晚疫病的研究中第一次将 SSH 技术成功运用于植物学领域后, SSH 技术也开始被广泛应用于研究植物在各种逆境胁迫条件下的表达差异。如了解植物在各种胁迫条件下的反应及信号传导途径, 研究植物对逆境反应的分子机理等。这些研究为植物抗逆性遗传改良奠定了基础。目前, 该方法已经被应用于包括小麦^[12-14]、水稻^[15-16]、玉米^[17-18] 和大豆^[19] 等主要农作物在内的多种植物。在特异性表达基因研究方面, SSH 技术应用成果显著。如利用该技术成功地克隆了辣椒素的生物合成相关基因^[20]、苜蓿菌根形成相关基因^[21]、甜菜根特异性表达基因^[22-23] 等。在植物抗逆性研究方面, 骆蒙等构建了一个白粉菌侵染初期的 SSH 技术文库, 获得已知功能的 EST 271 条, 通过分析, 推测苯丙烷代谢途径、细胞壁结构修饰作用、细胞保卫机制参与了小麦对白粉病的抗病过程^[24]; Zheng 等利用 SSH 技术对淹水胁迫下玉米幼苗基因进行了研究, 构建了 960 个重组克隆, 从中鉴定出 533 个和淹水胁迫有关的基因克隆, 经测序和序列比对共得到 190 个唯一表达的序列标签^[25]; Ruisheng Gu 等以 300 mM NaCl 高盐胁迫下胡杨为材料, 利用 SSH 技术和基因芯片对高盐逆境条件下转录情况进行了分析^[26]; Sung 等用 SSH 技术构建了创伤诱导的野生水稻差减文库, 并应用含 960 个随机克隆的 cDNA 芯片对文库进行反向 Northern 检测, 得到 371 个阳性克隆^[27]; Chong 等在研究水稻抗稻瘟病的机制时, 用 SSH 技术从接种有水稻稻瘟病原体的抗病突变株中分离到了 26 个差异表达的基因^[28]。类似的研究还有很多。由此可见, SSH 技术是克隆时空表达有差异基因的重要手段。

3 SSH技术在柑桔逆境胁迫研究中的应用

利用 SSH 技术来研究柑桔抗逆性已经极为普遍。目前, 该技术在柑桔逆境生理研究领域的应用主要体现在逆境条件下特异性表达基因的筛选、重要基因的克隆、转录谱变化等。其中, 应用最多的是在特异性表达基因的筛选上。Gao 等应用 SSH 技术对导致形成果斑的特异性表达基因进行了一系列的筛选和表达分析研究^[29]; Marcos 等通过将 SSH 技术和基因芯片技术的结合对感染青霉病后柑桔特异性表达基因进行了分析, 从中随机挑选了 331 个克隆进行测序和对比分析, 定位出 211 个唯一表达的 EST, 并指出乙烯是与各种感染途径相关

的重要因子^[30]; Silva-Pinhati 等以感染了柑桔球座菌(*Guignardia citricarpa*) 后表现出黑点病症状的柑桔为材料, 应用 SSH 技术分别构建了正向和反向差减文库, 经过挑选克隆、测序对比分析, 得到 90 个唯一表达的 EST^[31]; 龙桂友采用 SSH 技术和蛋白质组技术, 以枳为主要材料, 从转录水平和翻译水平分离柑桔低温诱导差异表达的相关基因和蛋白^[32]; 谈安群等以椪柑为试材, 利用 SSH 技术构建了干旱胁迫下兴春椪柑(*Citrus reticulata*) 的正向差减文库, 得到了干旱胁迫相关的基因 20 多条^[33]。应用 SSH 技术进行的柑桔逆境生理、特异性表达基因的研究还有很多, 其应用范围也开始逐步从以特异性表达基因的筛选为主转移到和抗逆相关的重要功能基因的克隆和功能解析上。在柑桔重要功能基因的克隆研究方面, 焦徕以枳为材料, 采用 SSH 技术对柑桔抗寒相关基因的表达进行了研究, 并将筛选到的差异表达 cDNA 克隆加以鉴定, 获得 1 个首次在柑桔上发现的、编码冷相关 COR413 蛋白基因的 EST 序列及多个功能未知的相关 EST^[34]。

在其他一些方面 SSH 技术也得到了一系列的应用。如 Liu 等^[35] 以甜橙为材料, 应用 SSH 技术对甜橙果实成熟过程相关的突变与对照在基因转录水平上的差异进行了分析; Koutsoumari 等^[36] 以两个柠檬品种的为材料, 应用 SSH 技术构建了冷害及感染了枝枯病后的差减文库, 并对这两种柠檬的基因差异表达进行了对比; 高雪等^[37] 以奉节脐橙为材料, 构建了果皮褐变差减文库并进行了初步分析; 叶庆亮等^[38] 以“岩溪晚声”椪柑为材料, 以果皮作为受试方, 以果肉为驱动方, 构建了“岩溪晚声”椪柑果皮与果肉差减 cDNA 文库, 筛选得到分属于 126 个基因的 377 个 EST, 并对这些 EST 进行了初步分析。

4 展望

自 SSH 技术被正式提出并开始有试剂盒批量生产以来, 其应用范围日趋广泛。我国柑桔产区主要分布在自然灾害发生比较频繁的地区, 时常受到冻害、干旱、洪涝、病虫害等自然灾害的影响, 导致柑桔单产下降, 果品品质受损, 给柑桔产业带来巨大的经济损失。为保障柑桔产业的健康发展, 增强其抵御自然灾害的能力, 除了加强基础设施建设外, 还必须通过栽培和育种技术增强柑桔自身的抵抗能力。可以预见, SSH 技术在研究柑桔抗性生理方面将会有更广泛的应用, 并主要集中在以下几个方面: (1) 利用 SSH 方法研究病虫害等生物因子及一些非生物因素如洪涝、干旱、高温和冻害等发生过程中相关基因的动态表达, 获得一些包括转录因子、信号转导原件等关键蛋白的控制基因, 这必将有助于从分子

水平上探明柑桔的抗逆机理,并为定向培育抗寒、抗旱、耐盐等具有良好环境耐受性的柑桔新种质提供理论和材料依据。(2)利用 SSH 技术研究柑桔的抗虫和抗病机理。如柑桔被病原侵染和昆虫为害后的转录谱变化,以及抗性信号分子乙烯、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)等^[39]的合成及信号传导途径相关基因的表达情况,对探讨病变机理和过程,克隆发病和抗病相关基因,进而进行抗病育种等具有重要价值。(3)利用 SSH 技术研究柑桔果实的衰老,对了解柑桔果实的衰老机制、延长贮藏时间、延长货架期、提高经济效益等方面具有重要意义。

综上所述,SSH 技术操作上并不复杂,所需试验仪器也不昂贵,试验流程比较简单且假阳性率低,为鉴别和分离差异表达基因提供了一种强有力的工具。随着 SSH 技术的不断改进、发展和应用,将在柑桔新基因的筛选与克隆、基因的时空表达,柑桔衰退病、黄龙病、溃疡病、潜叶蛾和粉虱等病虫害为害,以及水分、温度等环境胁迫等研究中发挥积极作用。

参 考 文 献

- [1] 顾克余, 翟虎渠. 抑制性扣除杂交技术 (SSH 技术) 及其在基因克隆上的研究进展[J]. 生物技术通报, 1999, 15(2): 13-16
- [2] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P. Suppression Subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030
- [3] Von Stein O D, Thies W G, Hormann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 2598-2602
- [4] Ji W, Wright MB, Cai L, et al. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes[J]. BMC Genomics, 2002, 3(1): 12
- [5] Rebrikov D V, Desai SM, Siebert P D, et al. Suppression subtractive hybridization [J]. Methods Mol Biol, 2004, 258: 107-134
- [6] Rebrikov D V, Britanova O V, Gurskaya N G, et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(20): 90
- [7] Desai S, Hill J, Trelogan S, et al. Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization, in Functional Genomics (Hunt, S. P. and Livesey, F. J., eds.) [M]. London: Oxford University Press, 2000, 81-111
- [8] Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization [J]. Nucleic Acids Research 2000, 28(20): 90
- [9] Careta F de P, Azevedo BM, Vianna BA, et al. Oncogene induced transcriptional patterns in established cell lines as a model for in vitro analysis of tumor biology[J]. Genet Mol Res. 2004, 3(3): 410-420
- [10] George P Yang, Douglas T Ross. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 1517-1523
- [11] Brich PRJ, Avrova A O, Duncan JM, et al. Translation of potato genes that are induced during an early stage of hypersensitive response to Phyto phthora infestans [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1999, 12(4): 356-361
- [12] 骆 蒙, 孔秀英, 刘 越, 等. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 814-819
- [13] 王 转, 贾晋平, 景蕊莲, 等. 用抑制性差减杂交技术法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA [J]. 生物技术通报, 2003(5): 36-39
- [14] KaiXIAO, Gui Hua BAI, Brerr F. CARVER. Nylon Filter Array Reveal Differential Expression of Expressed Sequence Tags in Wheat Roots Under Aluminum Stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology Formerly Acta Botanica Sinica. 2005, 47(4): 839-848
- [15] WANG X, Wu P, Xia M, et al. Identification of genes enriched in rice root soft the local nitrate treatment and the their expression patterns in split root treatment[J]. Gene, 2002, 297(12): 93-102
- [16] XIA Ming, Wang Shou-feng, Wang Xiao-bing, et al. Identification of phosphorus starvation induction genes in rice by suppression subtractive hybridization [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(6): 736-741
- [17] GAO Peng, Wang Guo-ying, Zhao Hu-ji, et al. Isolation and identification of submergence induced genes in maize (Zeamays) seedlings by suppression subtractive hybridization [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(4): 479-483
- [18] LI Hui-yong, HUANG Shu-hua, SHI Yun-su, et al. Isolating Soil Drought-Induced Genes from Maize Seedling Leaves Through Suppression Subtractive Hybridization [J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(6): 647-651
- [19] Kee Young Kim, Seong-Whan Park, Young-Soo Chung, et al. Molecular cloning of low-temperature inducible ribosomal proteins from soybean [J]. Jour-

- nal of Experimental Botany, 2004, 55: 1153-1155
- [20] Kim M., Kim S. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization[J]. Mol Cells, 2001, 11(2): 213-219
- [21] Brechenmacher L., Weidmann S., Vantuinen D., et al. Expression profiling of up regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula* - *Glomus mosseae* interactions [J]. Mycorrhiza, 2004, 14(4): 253-262
- [22] Dorothee U K., Heiko O., Christiane D., et al. Isolation and molecular analysis of six tap root expressed genes from sugar beet [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(373): 1533-1534
- [23] Stanhl D J., Kloos D U., Hehl R. A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet [J]. BMC Biotechnol, 2004, 4(1): 31
- [24] 骆蒙, 孔秀英, 霍纳新, 等. 小麦抗白粉侵染初期的表达序列标签分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 525-530
- [25] Zheng J., Zhao J., Tao Y., et al. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. Plant Mol. Bio., 2004, 55(6): 807-823
- [26] Ruisheng Gu, Sandra Fonseca, L. szl G. Puskas, L. szl Hackler, et al. Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica* [J]. Tree Physiol (2004) 24: 265-276
- [27] Sung Ki Cho, Ji Ung Jeung, Kyung Ho Kang, et al. Identification of genes induced in wound treated wild rice (*oryzaminuta*) [J]. Mol Cells, 2004, 17(2): 230-236
- [28] CHONG U HAN, CHAN HU ILEE, KYOUNG SOO JANG, et al. Identification of rice genes induced in a rice blast resistant mutant [J]. Mol Cells, 2004, 17(3): 462-468
- [29] X. Gao, Z. G. Li, J. Fan, Y. W. Yang. Screening and expression of differentially expressed genes for peel pitting of citrus fruit [J]. Planta. 2003, 218(1): 65-70
- [30] Marcos J F, Sanchez Torres P, Alamar S, et al. High throughput approaches to the identification of citrus genes involved in fruit response to *Penicillium digitatum* infection [J]. Acta Horticulturae. 2007 (No. 738)
- [31] Silva-Pinhati A C O., Goes A., Machado M A. Identification of differentially expressed genes of sweet orange associated to the infection of *Guignardia citri-carpa*. Causal agent of citrus black spot [C]. Second international citrus biotechnology symposium. 2009: 50
- [32] 龙桂友. 柑桔低温诱导相关基因的克隆与表达分析 [D]. 湖南: 湖南农业大学, 2007
- [33] 谈安群, 钟广炎, 江 东, 等. 用抑制性差减杂交法分离离春桧柑干旱胁迫诱导表达的 cDNA [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(3): 33-35
- [34] 焦 侠. 柑桔抗寒相关基因的鉴定与表达分析 [D]. 湖南: 湖南农业大学, 2007
- [35] Qing Liu, Andan Zhu, Lijun Chai, et al. Transcriptome analysis of a spontaneous mutant in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] during fruit development [J]. Journal of Experimental Botany. 2009, 60(3): 801-813
- [36] Koutsoumari E. M., Voloudakis A. E. Cloning of differentially constitutively expressed genes in stem tissue of two lemon cultivars exhibiting difference in cold and phoma tracheiphila resistance [C]. Second international citrus biotechnology symposium. 2009: 51
- [37] 高 雪, 李正国, 樊 晶, 等. 奉节脐橙果皮褐变差减文库的构建及初步分析 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33(1): 71-76
- [38] 叶庆亮, 江 东, 彭爱红. “岩溪晚芦”桧柑果皮与果肉差减 cDNA 文库的构建及初步分析 [J]. 园艺学报, 2009, 36(7): 967-974

(责任编辑: 鲁玉洋; 英文编辑: 董朝菊)

书 讯

由中国农业科学院果树研究所赵进春副研究员主编的《21 世纪果树优良新品种》一书已由中国林业出版社出版。全书约 30 万字, 200 余幅彩图。书中详细介绍了近 10 年来我国新选育的 23 个树种 204 个果树新品种, 内容包括: 选育经过、果实经济性状、生长结果习性、物候期、适应性及选育单位。该书收集的树种较全面, 品种多, 可供广大果树育种工作者、果树技术人员、果农、果树育苗户及农业院校师生参考。单价 25 元, 需挂号邮寄, 则每件另加挂号费 3 元。

汇款地址: 辽宁省兴城市兴海南街 98 号中国农业科学院果树研究所《中国果树》编辑部

收款人: 赵进春

邮编: 125100

电话: (0429) 3598131