

用少量样本进行抑制性消减杂交*

孙晓阳 谈寅飞 唐 爽 王雁玲**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 利用根据 cap-finder 方法建立的全长 cDNA 合成技术, 扩增获得了恒河猴着床点子宫内膜组织表达 mRNA 的双链 cDNA, 通过抑制性消减杂交, 成功地构建了恒河猴着床点消减文库。随机挑选文库中的阳性克隆, 经点杂交证明 27% 为着床点差异表达的克隆。由此表明抑制性消减杂交结合 cap-finder 扩增全长 cDNA 的方法, 可以有效地从少量而珍贵的样本中获得高质量的消减文库。

关键词 抑制性消减杂交, cap-finder 法, 全长 cDNA 扩增, 恒河猴着床点, 消减文库

学科分类号 Q7

基因表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制, 分离并克隆差异表达的基因不仅有助于揭示生命的奥秘, 而且还能为疾病诊断与治疗提供重要的理论依据。

1996 年, Diatchenko 等^[1]首次报道用抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 的方法筛选差异表达的基因, 随后, 由于 SSH 具有假阳性率低、高敏感性、效率高及不需要昂贵的实验仪器等特点, 被广泛应用于筛选差异表达的基因^[2-4]。但因该方法至少需要 5 μ g mRNA, 这使得它的应用常常由于试验材料不足而受到限制。

我们用根据 cap-finder 方法^[5]创立的全长 cDNA 扩增技术, 利用少量而难以取得的恒河猴妊娠第九天着床点子宫内膜材料, 成功地构建了着床点消减文库。

1 材料与方法

1.1 材料

恒河猴第九天着床点及非着床点材料取自福州计划生育研究所非人灵长类实验中心。对健康的雌猴连续观察两个月经周期, 选取月经周期稳定在 27~30 天的雌猴与雄猴同笼, 排卵后第九天解剖取子宫, 快速取下着床点子宫内膜材料 (直径约 0.5 mm)。非着床点材料取自子宫上着床点旁边的子宫内膜部分。取材后迅速冻存于液氮中备用。

PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒和 Advantage 2 PCR 试剂盒购自 Clontech 公司; Taq DNA 聚合酶、DNase I、pGEM-T Easy 载体及 JM109 感受态细菌购自 Promega 公司; Superscript II 反转录酶和 TRIzol RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司;

QIAquick PCR 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司; [α -³²P]-dCTP 购自北京亚辉公司; 引物由上海申能博彩生物公司合成; Hybond N⁺ 尼龙膜、NICK 纯化柱和紫外分光光度计购自 Pharmacia 公司; PCR 仪 PE480、PE2400 购自 PE 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和纯化: 根据 TRIzol 试剂的说明, 提取着床点和非着床点子宫内膜的总 RNA。随后用无 RNase 的 DNase I 于 37℃ 消化 15 min, 去除掺杂的基因组 DNA 片段, 以酚/氯仿/异丙醇 (25:24:1) 抽提, 酒精沉淀, 溶于适量 DEPC 水。紫外分光光度计定量, 并取少量电泳检测质量。余者冻存于 -80℃ 备用。

1.2.2 单链 cDNA (sscDNA) 及双链 cDNA (dscDNA) 的合成: 根据 cap-finder 方法, 各取 1 μ g 着床点和非着床点总 RNA 于 10 μ l 体系 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 75 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L dNTPs, 1 μ mol/L 引物, 200 U Superscript II 反转录酶) 42℃ 反转录 1.5 h。反转录时采用带锚定序列的反转录引物, 序列为 5'-AAGCAGT-GGTAACAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N-3', 5' 锚定引物序列为 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACG-CGGG-3', 转录完成后, 得到一条两端带有锚定序

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999055903) 和中国科学院知识创新工程项目 (KSCX-Z-SW-201 和 KSCX-IOZ-07)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2003-04-03, 接受日期: 2003-04-26

列的 *sscDNA*。向体系中加入 40 μl TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 7.6), -20°C 保存备用。

dscDNA 的合成是通过 PCR 反应进行的, 引物与反转录引物中的锚定序列相同, 即为 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'。PCR 反应体系 (100 μl) 为 *sscDNA* 稀释液 2 μl , 10 $\times$ Advantage 2 聚合酶缓冲液 10 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 2 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 2 μl , Advantage 2 聚合酶 2 μl , Milli-Q 水 82 μl 。PCR 反应在 PCR 仪 PE480 上进行, 反应条件为 95°C 预变性 1 min; 然后循环进行 95°C 15 s, 65°C 30 s, 68°C 6 min, 共 17 个循环。产物保存于 -20°C 备用。

1.2.3 抑制性消减杂交 (SSH): *dscDNA* 产物经过 QIAquick PCR 纯化柱纯化后, 用 *Rsa* I 内切酶 37°C 酶切 3 h, 再一次纯化并用 4 mol/L 醋酸铵沉淀, 随后根据 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒说明, 以着床点的 *dscDNA* 酶切片段为试验方 (tester), 分别连接接头 1、2R (adaptor 1, 2R), 而后非着床点 *dscDNA* 酶切片段为参照方 (driver), 进行两次消减杂交后, 向产物中加入 200 μl 缓冲液 (20 mmol/L HEPES-HCl pH 8.3, 50 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA) 稀释。

取 1 μl 上述杂交产物, 利用试剂盒提供的两对引物在 PE2400 上进行两轮 PCR 反应, 第一轮 PCR 的条件是: 94°C 预变性 25 s, 而后 94°C 10 s, 66°C 30 s, 72°C 90 s, 共进行 27 个循环; 第二轮 PCR 的条件是: 94°C 10 s, 68°C 30 s, 72°C 90 s, 共进行 10 个循环。与此同时进行非消减对照的相应 PCR 扩增。

1.2.4 消减效率分析: 对消减和非消减的第二轮 PCR 产物中的 GAPDH 进行 PCR 扩增, 引物由 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒提供, 反应条件为 94°C 30 s, 60°C 30 s, 68°C 2 min, 共 33 个循环。分别在第 18、23、28 和 33 循环取样, 于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳比较。

1.2.5 cDNA 消减文库的构建: 用 QIAquick PCR 纯化柱对消减的第二轮 PCR 产物纯化后, 取 2 μl PCR 产物与 1 μl pGEM-T Easy 载体 4°C 连接过夜。取 1 μl 连接的质粒加入 100 μl JM109 感受态菌中, 经热休克后, 加入 900 μl 冷的 SOC 培养基, 于 37°C 225 r/min 振荡 1 h, 即以每块板 100 μl 菌液

的 IPTG 的 LB 板) 上, 37°C 培养 14~16 h。另外以同样方法用参照质粒转化感受态菌, 用以计算转化率。

1.2.6 插入片段的 PCR 鉴定: 从培养板上随机挑取 96 个白色克隆, 接种至 96 孔板, 每孔含 100 μl Amp⁺ LB 培养液, 37°C 振荡培养过夜后, 各取 1 μl 在 20 μl 体系 (10 $\times$ PCR 缓冲液 2 μl , 25 mmol/L Mg^{2+} 1.6 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 0.4 μl , 消减的第二轮 PCR 引物各 0.6 μl , Taq DNA 聚合酶 0.3 μl , Milli-Q 水 13.5 μl) 进行 PCR 反应, 反应条件为: 95°C 预变性 1 min, 随后于 94°C 30 s, 68°C 3 min 循环 23 次, 68°C 延伸 5 min。取 5 μl PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 点杂交分析: 各取 5 μl 上述 PCR 产物, 加入等量的 0.6 mol/L NaOH, 混匀 5 min, 按 96 孔板上克隆的顺序各转移 2 μl 到 Hybond N⁺ 尼龙膜上, 对没有扩增出插入片段的克隆, 在尼龙膜对应的位置点上阴性对照 (人睾丸特异蛋白 cDNA 和人 semenogelin II cDNA)。每张膜上共点 96 个点, 重复制备两张膜, 紫外交联。用 [α - ^{32}P] -dCTP 分别标记着床点和非着床点 cDNA 各 50 ng 为探针, NICK 纯化柱纯化。于 5 ml 预杂交液 (6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denharts, 0.1% SDS 及 100 mg/L 剪切的鲑精 DNA) 中 72°C 预杂交 2 h 后, 换新鲜的杂交液 (含有标记探针的预杂交液), 于 72°C 杂交过夜。将杂交后的尼龙膜分别用 2 $\times$ SSC-0.5% SDS 缓冲液 68°C 洗 4 次, 每次 20 min; 0.2 $\times$ SSC-0.5% SDS 缓冲液 68°C 洗 2 次, 每次 20 min。随后用 Kodak BioMax MS 胶片在 -70°C 曝光过夜。

2 结 果

2.1 总 RNA 的定性分析

对总 RNA 进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 经凝胶图像分析, 着床点和非着床点总 RNA 中 28 S 和 18 S rRNA 的亮度比值均大于 1.5。

2.2 Cap-finder 法合成 *dscDNA* 的电泳检测

在具有 5'、3' 锚定引物情况下反转录得到 *sscDNA*, 以此为模板进行了 17 循环的 PCR 扩增, 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳显示其 PCR 产物为弥散状, 分布于 0.5~7 kb 之间 (图 1 中 1)。Rsa I 酶切后弥散 *dscDNA* 群体下移, 分布于 0.5~3.5 kb 之间 (图 1 中 2)。

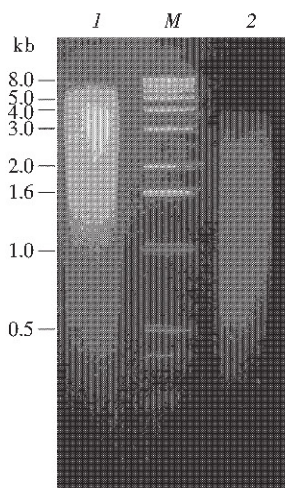


Fig. 1 Electrophoresis analysis of dscDNA synthesized with cap-finder

1: dscDNA; 2: dscDNA digested by *Rsa* I;
M: molecular mass marker.

2.3 抑制性消减杂交产物的分析

消减和非消减杂交产物经过二次 PCR 扩增后, 2% 凝胶电泳显示 (图 2): 扩增后的 PCR 产物都为一弥散的 cDNA 群体. 消减的杂交产物主要集中在 400 ~ 800 bp 之间 (2); 非消减的 PCR 产物主要集中在 0.4 ~ 3 kb 之间, 与 cap-finder 合成的 dscDNA 的酶切后大小类似 (1).

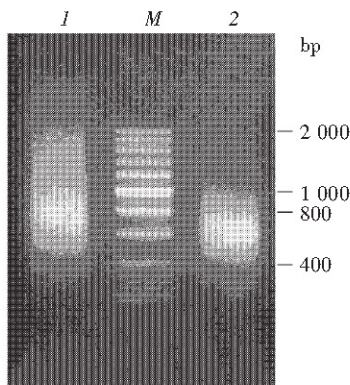


Fig. 2 Electrophoresis analysis of the SSH products amplified with two-round PCR

1: products of unsubtracted hybridization after the secondary PCR; 2: products of subtracted hybridization after the secondary PCR; M: 200 bp molecular mass markers.

2.4 消减效率的鉴定

对消减的和非消减的 PCR 产物进行 GAPDH 扩增, 于不同循环取样, 电泳结果 (图 3) 显示, 消减杂交 GAPDH 的条带在 28 循环出现, 而非消减杂交的 GAPDH 条带在 23 循环就出现, 这表明消减杂交后 GAPDH 的含量至少减少至原来的 3%.

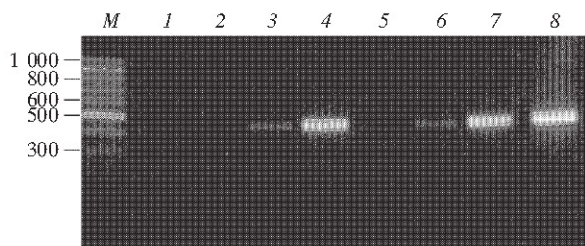


Fig. 3 Reduction of GAPDH abundance by PCR-select subtraction

PCR amplification of GAPDH was performed with the subtracted (1~4) or unsubtracted (5~8) products as templates. 1, 5: 18 cycles; 2, 6: 23 cycles; 3, 7: 28 cycles; 4, 8: 33 cycles; M: 100 bp molecular mass markers.

2.5 消减文库的转化率

用连接质粒同样的转化方法, 取 0.1 ng 参照质粒转化 JM109 感受态菌, 经 37℃ 振荡培养, 取 100 μ l 以 SOC 培养基 10 倍稀释后, 取 100 μ l 即 0.001 ng 接种培养板, 培养板上共长出 81 个克隆, 由此计算得到转化率为 8×10^7 个/ μ g (每微克质粒转化的菌落数).

2.6 消减文库插入片段的 PCR 鉴定

随机挑选的 96 个克隆, 94 个能经 PCR 扩增出有效产物, 占 98%. 电泳显示插入片段大小主要分布在 300 ~ 800 bp 之间.

2.7 点杂交分析

为了进一步检测消减文库的质量, 我们分别用着床点和非着床点的 cDNA 标记探针进行杂交, 结果如图 4 显示, 箭头指示共有 25 个差异阳性克隆, 占全部克隆的 27%. 其中 H7、H9 为阴性参照, 没有显示出任何杂交信号.

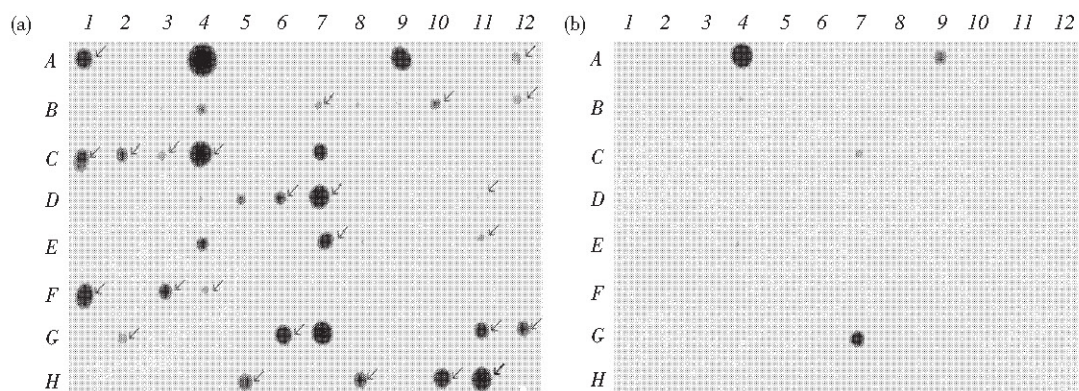


Fig. 4 Dot-blot hybridization of the subtracted cDNA at the implantation site

Two identical membranes were hybridized with radioactively labeled cDNA probes prepared from rhesus monkey endometrium at the implantation site (a) and non-implantation site (b) respectively.

3 讨 论

本工作中的实验材料——恒河猴妊娠9天着床点子宫内膜是难于获得、且数量极少的组织，难于满足常规的SSH法所要求的组织用量。我们采用cap-finder技术和SSH相结合，成功地构建了恒河猴着床点的消减杂交文库。

Superscript II 反转录酶催化的反转录反应进行到mRNA 5'端时，能够在产生的单链cDNA 3'端加上数个C碱基，cap-finder方法则根据此原理，向转录体系加入了额外的3'端含有几个G碱基的锚定引物，这样G:C的配对促使反转录模板由mRNA向锚定引物转换，从而使得反转录产物3'端具有了引物结合的位点。这种模板转换的方式已被应用于分子生物学的多种技术，如RACE^[6]、cDNA的消减杂交^[7]等。在反转录初始阶段，若在寡聚T引物的5'端也加上一段特殊序列，则所获得的sscDNA两端都具有了引物结合的位点，可以进行PCR扩增，由此即可得到大量的dscDNA。已有报道表明，用这种方法扩增得到的dscDNA可用来代替RNA进行RNA印迹检测^[8]，而我们实验室曾将同等量的小鼠总RNA分别通过cap-finder法合成dscDNA和常规反转录合成cDNA，随后用PCR法比较多种小鼠基因在其中的含量，证实cap-finder法可以成倍地扩大单个基因的量，但其相对含量没有发生变化（未发表数据）。

通过这种方法扩增dscDNA并进一步进行消减杂交时，有几个需要特别注意的影响因素。首先是

RNA的质量。由于mRNA的质量较难检测，采用cap-finder方法的一个优点就是可以直接从少量的总RNA开始反转录，而总RNA的性能指标较mRNA易于检测。一般情况下，总RNA在没有降解的情况下，琼脂糖凝胶电泳显示其28S与18SrRNA的亮度比值为(1.5~2):1。其次，高效、保真、长距离的DNA聚合酶是PCR反应所必需的。此外，要严格控制PCR扩增的循环次数，PCR反应一般在产物量达到平台期之前的一个循环停止，过多的循环产生高分子质量（大于7kb）的弥散状cDNA，这样将导致随后的消减杂交产生假阳性，因此摸索最佳的循环次数对减少以后杂交结果的假阳性具有重要意义。我们用1 μg总RNA为起始材料，预实验发现PCR反应在18循环到达平台期，因此我们实验中采用17个循环，此时扩增得到的弥散状dscDNA范围在0.5~7 kb之间。

用cap-finder法合成的dscDNA进行消减杂交，发现消减后GAPDH含量较非消减者下降至少至原来的3%，表明本实验的消减效果很好。而消减文库对感受态菌的转化率也达到每微克质粒转化 8×10^7 个菌落。进一步通过点杂交发现，在消减文库中随机挑选的具有插入片段的94个克隆中，着床点差异表达的克隆为27%。上述实验表明，cap-finder法和SSH结合能够有效地对少量样本进行差异表达基因的筛选。虽然在本实验过程中合成了多种引物，花费较大，但由于SSH方法得到的只是差异表达的基因片段，这些引物可用于随后的RACE实验，以获得全长cDNA序列。

实践证明, 用这种方法扩增得到的 dscDNA, 维持了原有遗传信息的复杂性, 弥补了实验材料的不足, 用它建立的消减文库质量较好, 可以用于差异基因筛选. SSH 与 cap-finder 扩增 cDNA 的方法联用, 拓宽了其原有的应用范围, 使其可以应用于一些较少的并难以得到的样本, 如流式细胞仪分离的细胞、激光捕获的细胞、临床上活检标本及幼小的胚胎等, 从而有效地筛选其中差异表达的基因.

致谢 本文经庄临之教授悉心修改, 特此致谢!

参 考 文 献

- 1 Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A, *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (18): 6025 ~ 6030
- 2 顾克余, 翟虎渠. 抑制性扣除杂交技术 (SSH) 及其在基因克隆上的研究进展. *生物技术通报*, 1999, **15** (2): 13 ~ 16
- Gu K Y, Zhai H Q. *Biotechnology Information*, 1999, **15** (2): 13 ~ 16

- 3 Zheng Y, James R C. Identification of iron responsive genes by screening cDNA libraries from suppression subtractive hybridization with antisense probes from three iron conditions. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (8): 1802 ~ 1807
- 4 张 强, 毛泽彬, 张志文, 等. 胃癌相关基因克隆——胃癌 cDNA 消减文库的构建. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (3): 301 ~ 304
- Zhang Q, Mao Z B, Zhang Z W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (3): 301 ~ 304
- 5 Peliska J A, Benkovic S J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 1992, **258** (5085): 1112 ~ 1118
- 6 王春丽, 张成岗. 人脑红蛋白 (NGB) 全长 cDNA 序列的克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (6): 946 ~ 951
- Wang C L, Zhang C G. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (6): 946 ~ 951
- 7 刘 燕, 周 健, 刘新平, 等. 一种用少量标本快速构建老年性白内障消减 cDNA 文库的方法. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (6): 952 ~ 954
- Liu Y, Zhou J, Liu X P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (6): 952 ~ 954
- 8 Franz O, Bruchhaus I I, Roeder T. Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (11): e3

A Strategy to Perform Suppression Subtractive Hybridization From Small Amount of Specimens *

SUN Xiao-Yang, TAN Yin-Fei, TANG Shuang, WANG Yan-Ling **

(The State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract A full-length cDNA amplification technique based on the cap-finder method was used to obtain amplified amount of double strand cDNAs of the endometrial mRNAs at the implantation site from pregnant rhesus monkey. Then a subtractive library of the implantation site was successfully constructed by suppression subtractive hybridization (SSH). Of the randomly selected clones from the library, 27% were proved by dot blot analysis to be differentially expressed ones at the implantation site. The data demonstrated that a subtractive library with high quality could be constructed from small amount of rare specimens by the combination of suppression subtractive hybridization (SSH) with full-length cDNA amplification technique based on the cap-finder method.

Key words suppression subtractive hybridization (SSH), cap-finder method, full-length cDNA amplification, rhesus monkey implantation site, subtractive library

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research Project (G1999055903) and The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX-2-SW-201 and KSCX-IOZ-07).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62631832, E-mail: wangyl@panda.ioz.ac.cn

Received: April 3, 2003 Accepted: April 26, 2003