

# 抑制性消减杂交技术及其应用研究进展

周变华, 王宏伟, 杨自军, 王国永, 郝雪琴, 孔 涛

(河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 抑制性消减杂交(SSH)技术是结合抑制性 PCR 和消减杂交技术发展起来的一种高效分离差异表达基因的方法, 具有特异性高、假阳性率低、操作简便、速度快、效率高等优点。利用 SSH 技术进行不同状态下基因的表达变化分析、差异基因的克隆和鉴定对了解基因表达调控有着重要意义。为此, 综述了 SSH 技术的原理及其在发育调控基因、疾病发生机制、药物研发、性状筛选及环境生物修复等方面的应用研究进展。

**关键词:** 抑制性消减杂交技术; 抑制性 PCR; 分子生物学

**中图分类号:** R394.3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2011)12-0040-03

## Suppression Subtractive Hybridization Technique and Its Application

ZHOU Bian-hua, WANG Hong-wei, YANG Zi-jun, WANG Guo-yong, HAO Xue-qin, KONG Tao

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Suppression subtractive hybridization (SSH) is a technique of high efficiency for isolation differential expressed genes at transcriptional level, which is based on the use of subtractive hybridization in combination with suppression PCR. Because of its characteristics of high specificity, low false positive rate, simple operation and high efficiency, SSH is widely used to study differential gene expression in two differential conditions, playing an important role in cloning and identifying gene expression difference. The principle and use of SSH technique in the aspects of mechanism of development-related gene regulation, molecule mechanism of disease, mechanism of drug action, selection of fine breed and environmental pollutant biodegradation were analyzed in this review.

**Key words:** Suppression subtractive hybridization (SSH); Suppression PCR; Molecular biology

早在 1996 年, Diatchenko 等<sup>[1]</sup>以抑制性 PCR 和消减杂交技术为基础, 设计出了一种寻找差异基因的新方法, 即抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术。该技术在新基因的分离鉴定中起到了重要的作用<sup>[2]</sup>, 是现代生命科学研究的有效研究工具, 具有操作简便、快速、高效, 同时假阳性率低、特异性和灵敏度高等优点。在未知基因序列的前提下, 应用 SSH 技术可以开展发育调控基因、疾病发生机制、药物研发、性状筛选及环境生物修复等方面的研究。为此, 就 SSH 技术的基本原理以及应用方面做一简要介绍, 为研究已知基因的生物学新

功能和寻找未知基因提供帮助。

### 1 SSH 技术的原理及操作

SSH 技术通过利用消减杂交技术的消减富集来去除试验组和对照组之间的同源序列, 又利用抑制性 PCR 技术进行高效率的动力学富集, 可有效地分离出丰度较低的特异性非同源片段。具体操作如下:

第 1 步: cDNA 双链的合成和双链的 *Ras*I 酶切。为了提高消减杂交过程中相同分子的杂交机会, 增加消除效率, 防止长链片段形成的复杂结构对消减杂交的干扰。SSH 技术引入一种能够识别四碱基序列的

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101855); 国家自然科学基金专项基金项目(3104081); 河南科技大学博士启动经费资助项目(09001513); 河南省教育厅自然科学研究项目(2010B230002)

作者简介: 周变华(1980-), 女, 山西霍州人, 讲师, 博士, 主要从事兽医药理学研究。E-mail: haustzbh@yahoo.cn

限制性内切酶 *Rsa*I, 将检测子 cDNA (Tester) 和驱动子 cDNA (Driver) 消化形成平均长度大约为 500 bp 的 cDNA 片段。

第 2 步: 接头 (adaptor) 的连接。为了利于后续 PCR 的筛选扩增, 该技术的核心步骤是引入 2 种特殊的接头序列片段。接头的外侧具有与第 1 次 PCR 引物相同的序列, 内侧具有与第 2 次 PCR (巢式 PCR) 引物相同的序列, 这一巧妙的设计为后续 PCR 的筛选扩增提供了前提。

第 3 步: 两轮消减杂交。将步骤 2 中 2 份连有接头的 Tester cDNA 样品与过量的 Driver cDNA 样品进行消减杂交, 第 1 次使 Tester cDNA 中差异表达基因得到富集, 然后将 2 份杂交样品混合, 留在 Tester cDNA 中的经扣除丰度均等化的单链 cDNA 再次与新变性的 Driver cDNA 进行 2 次消减杂交, 形成经过杂交的双链分子, 进一步富集了差异表达的 cDNA, 并且还形成了 2 个 5' 端分别连接不同接头的双链分子。

第 4 步: 两次 PCR。第 1 次 PCR 使两端连接有 2 个不同接头的双链 cDNA 片段得到指数扩增, 第 2 次巢式 PCR 扩增保证差异基因富集的特异性。这种抑制性与特异性的结合更加提高了试验结果的可靠性。随后对扩增 PCR 产物进行纯化并克隆, 筛选阳性克隆, 进行测序、分析与鉴定。

## 2 SSH 技术的应用

### 2.1 SSH 技术在发育调控基因研究中的应用

基因表达量的变化是细胞生命活动过程调控的核心机制。多细胞生物的正常生长、发育和衰老等归根结底是基因在一定时间上和空间上选择性表达的结果。李玉昌等<sup>[3]</sup>应用 SSH 技术构建大鼠肝再生 cDNA 正向消减文库, 筛选出特异性表达的序列标记, 为进一步研究参与肝再生基因功能提供了依据。Yang 等<sup>[4]</sup>将显微镜技术和 SSH 技术相接合获得细胞壁形成相关基因, 为细胞发育和分化的研究提供理论依据。颜克亮等<sup>[5]</sup>在利用 SSH 技术进行大豆种子形态建成期与成熟期差异基因表达研究中, 获得影响大豆种子形态建成、蛋白质、油脂合成代谢调控的重要基因, 为其进一步的应用研究提供了重要信息。了解不同条件下基因表达差异, 建立相关功能的基因表达谱, 对于从整体水平研究代谢机制、了解基因的相互关系至关重要。

### 2.2 SSH 技术在疾病发生机制研究中的应用

疾病的发生是一系列基因综合作用的结果。疾病发生相关基因的筛选及编码蛋白功能的阐明, 将为从分子生物学水平深入研究疾病的发生、诊断和治疗

提供理论依据。在利用酵母双杂交及生物信息学技术获得乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 蛋白结合蛋白 HBEBP36 (E36) 后, 武会娟等<sup>[6]</sup>利用 SSH 技术筛选并克隆 E36 蛋白反式激活的靶基因, 为了解该基因的反式调节机制及其 HBeAg 在 HBV 致病中的重要作用提供了依据。张强等<sup>[7]</sup>采用 SSH 技术研究肾癌发生相关基因, 为临床上肾癌的预防、早期特异性诊断、基因治疗提供了重要工具。鲍朗等<sup>[8]</sup>利用 SSH 技术筛选获得钩端螺旋体致病相关基因, 寻找出致病赖型钩端螺旋体新的功能基因, 进而为阐明赖型钩端螺旋体特异表型的分子机制提供了有力的依据, 为中国致病微生物基因资源的开发提供重要信息。在兽医临床实践中, 奶牛乳房炎是危害养牛生产的一种常见疾病, 研究表明, 奶牛乳房炎的发生与乳腺的免疫密切相关, 由于白细胞在奶牛乳腺免疫中发挥着极为关键的作用, 曹随忠等<sup>[9]</sup>利用 SSH 技术构建了患乳房炎奶牛与健康奶牛外周血白细胞消减 cDNA 文库, 分离鉴定奶牛乳房炎抗性相关基因, 为了解奶牛乳房炎抗性的分子遗传机制及奶牛的育种提供了理论依据。在植物抗性研究方面 SSH 技术也得到了大量的应用。利用 SSH 技术进行玉米抗病基因研究, 对于分析获得的抗性候选基因进行后续功能的研究, 将为阐述玉米对纹枯病的抗性机制提供理论依据, 为培育抗病玉米新品种及研制防治玉米病害的有效药剂奠定基础。王慧梅等<sup>[11]</sup>利用 SSH 技术构建了干旱胁迫下黄檗幼苗的消减文库并对其进行了 EST 序列分析, 为抗逆基因的克隆和系统研究干旱胁迫下黄檗基因的表达奠定了重要的理论和研究基础。

### 2.3 SSH 技术在药物研发中的应用

药物在体内的具体作用是一个非常复杂的过程, 从浩瀚的信息库中筛选出有价值的差异表达基因, 寻找药物的作用靶位点, 是药物开发的先决条件, 也是药物筛选及药物定向合成的关键因素之一。Zhou 等利用 SSH 技术筛选获得地克珠利作用于柔嫩艾美耳球虫的相关基因, 进一步对差异基因的功能进行研究, 为地克珠利抗球虫作用机制的阐述及抗球虫新药的研发提供了理论依据<sup>[12-13]</sup>。

### 2.4 SSH 技术在性别发育及肌肉品质研究中的应用

在动物生产中, 动物性别发育及肌肉品质的控制研究一直广受重视。性别控制的实现必须依赖于性别决定和性别分化基因调控, 俸艳萍等<sup>[14]</sup>利用 SSH 技术构建性分化早期雌、雄鸡胚性腺的消减 cDNA 文库, 筛选获得雌雄鸡胚间的差异表达基因, 为进一步研究鸡胚早期性腺发育过程中基因的表达调控奠定了重要的基础。徐德全等<sup>[15]</sup>首次将 SSH 技术用来进行猪品种间的差异研究, 对探讨肌肉生长机制和肉质

决定因素以及猪的分子育种具有重要意义,进而满足现代养殖业的发展和消费者的膳食需要。

### 2.5 SSH 技术在环境胁迫及生物修复研究中的应用

外界环境是生物细胞生活的大环境,环境的改变会对生物体的生命活动带来剧烈的变化。张跃新等<sup>[16]</sup>在探讨砷对淋巴细胞生长抑制作用和诱导细胞凋亡的分子机制中,采用 SSH 技术筛选克隆得到 *HMG 2* 基因,提示 *HMG 2* 基因产物在淋巴细胞抗砷损伤的分子机制中可能起着重要的作用。李建祥等<sup>[17]</sup>应用国内惟一的多功能染毒室,观察动物染毒后外周血细胞基因的差异表达情况,寻找可反映砷危害效应的分子机制,为砷对机体的健康危害效应提供检测分子标志。

由于环境污染,人们生态保护意识日益增强,环境生物修复以低成本、无污染、高效率等特点得到广泛应用。Susan 等<sup>[2]</sup>通过建立甲苯污染模型,以降解微生物假单胞菌(*Pseudomonas putidam*-2)为研究对象,采用改进的 SSH 技术筛选参与溶解废水中甲苯的生物降解途径中的特异基因表达,这一研究结果将为构建具有降解功能的微生物进入处理系统,更有效地达到处理效果,实现环境的改善奠定良好的基础。

### 3 展望

SSH 技术以其快速有效分离差异表达基因的特点在许多研究领域得到了广泛的应用,但是 SSH 技术本身也存在不足之处。分子生物学领域新技术的不断发展,逐渐弥补了原有 SSH 技术的欠缺。Li 等<sup>[18]</sup>采用反向消减链(negative subtraction chain, NSC)技术与 SSH 技术相结合,为更加准确地筛选差异表达基因提供平台;镜像定向筛选技术与 SSH 技术相结合,有效地排除消减文库中的假阳性克隆,利于筛选准确率的提高<sup>[19]</sup>;cDNA 微阵列技术的出现,使大规模快速筛选差异基因成为可能,并且增加了基因网络间协调分析的可能,促进了生物学问题的科学阐明<sup>[20]</sup>。总之,基因克隆手段的逐步完善将为基因功能的研究及各研究领域的飞速发展提供保证。

#### 参考文献:

- [1] Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell AP, *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.
- [2] Susan K, De L, Kerry A, *et al.* Prokaryotic suppression subtractive hybridization PCR cDNA subtraction, a targeted method to identify differentially expressed genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (1): 225-232.
- [3] 颜克亮,陈波,姚家玲,等. 大豆种子形态建成期与成熟期正反抑制消减文库构建及差异表达基因分析[J]. *武汉大学学报:理学版*, 2008, 54(2): 202-208.
- [4] Yang X Y, Tu L L, Zhu L F, *et al.* Expression profile analysis of genes involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(13): 3661-3674.
- [5] 李玉昌,徐存拴,张云汉. 应用抑制性消减杂交技术克隆大鼠肝再生过程中特异表达基因[J]. *遗传*, 2002, 24 (2): 152-154.
- [6] 武会娟,成军,张丽娟,等. 应用抑制性消减杂交技术筛选 HBeAg 蛋白结合蛋白 E36 的上调基因[J]. *医学分子生物学杂志*, 2006, 3(5): 339-343.
- [7] 张强,毛泽彬,张志文,等. 肾癌相关基因克隆——肾癌 cDNA 消减文库的构建[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(3): 301-304.
- [8] 鲍朗,胡昌华,李学敏,等. 利用抑制消减杂交技术研究钩端螺旋体致病相关基因[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(5): 574-577.
- [9] 曹随忠,李宏滨,王爱华,等. 抑制性消减杂交构建奶牛乳房炎抗性相关 cDNA 文库[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 526-530.
- [10] 张志明,赵茂俊,马永毅,等. 抑制性消减杂交技术及其在玉米抗病基因研究中的应用[J]. *玉米科学*, 2006, 14(3): 42-45, 48.
- [11] 王慧梅,王延兵,祖元刚,等. 干旱胁迫下黄檗幼苗 cDNA 消减文库的构建和分析[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 198-202.
- [12] Zhou B H, Wang H W, Wang X Y, *et al.* *Eimeria tenella*: Effect of diclazuril treatment on microneme genes expression in second-generation merozoite and pathological changes of caeca in parasitized chickens[J]. *Experimental Parasitology*, 2010, 125: 264-270.
- [13] Zhou B H, Wang H W, Xue F Q, *et al.* Actin-depolymerizing factor of second-generation merozoite in *Eimeria tenella*: clone, prokaryotic expression and diclazuril-induced mRNA expression[J]. *Parasitology Research*, 2010, 106: 571-576.
- [14] 俸艳萍,彭秀丽,李世军,等. 应用抑制消减杂交分离雌、雄鸡胚性分化早期的差异表达基因[J]. *动物学报*, 2007, 53(2): 315-324.
- [15] 徐德全,张义兵,熊远著,等. 梅山猪与长白猪肌肉组织间正反向消减 cDNA 文库的构建[J]. *遗传学报*, 2003, 30(7): 668-672.
- [16] 张跃新,刘妍,刘开泰,等. 砷诱导人 T 淋巴细胞表达 *HMG 2* 基因的克隆研究[J]. *地方病通报*, 2004, 19 (1): 1-4.
- [17] 李建祥,傅春玲,陈锐,等. 氢染毒小鼠外周血细胞差异表达 cDNA 文库的构建和初步鉴定[J]. *科学技术与工程*, 2007, 7(3): 273-276.
- [18] Li L, Techel D, Gretz N, *et al.* A novel transcriptome subtraction method for the detection of differentially expressed genes in highly complex eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(16): 136.
- [19] 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 Research*, 2000, 28(20): E90.
- [20] Ouyang B, Yang T, Li H X, *et al.* Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(3): 507-520.