

# PCR-Select cDNA subtraction Kit

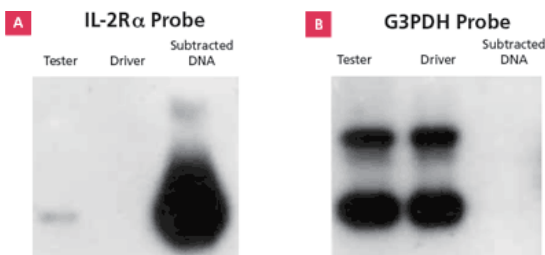
## 研究基因表現變化的利器 – 抑制性扣除雜交法

抑制性扣除雜交法 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 是一個很簡單且廣泛應用在比較兩相似樣本中表現量有變化之基因群的方法。將欲分析的 cDNA 樣本分別稱為 Tester (被減項) 及 Driver (減項)，利用多重雜交及抑制性 PCR 後可以得到 (Tester – Driver) 的基因群 (Subtracted cDNA pool)。如此可以除去大量表現無差異的基因，並且放大表現有差異的基因。放大倍率可高達 1000 倍。由於技術門檻低，自 1996 年的原始文章發表後，目前已有超過 4000 篇的文獻利用這項技術發表論文。Clontech 推出的 PCR-Select 也是唯一將此技術商品化的產品。

### PCR Select 的優勢

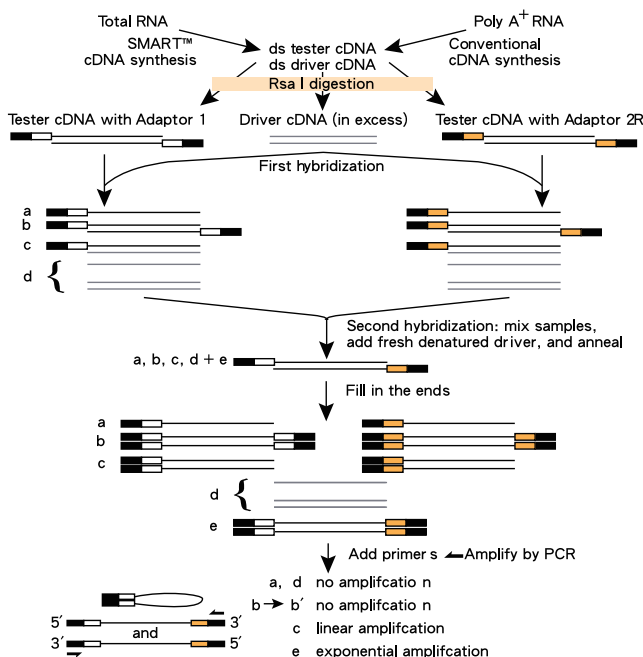
- 市面唯一 SSH 商品化的產品
- 詳細操作手冊及專業的技術支援
- 能高效放大表現量有差異的基因
- 放大倍率可高達 1000 倍
- 操作時間僅 3-4 天
- 完整配套組合，能幫您找到 Novel genes

PCR-Select 可以有效放大 PHA/PMA 處理後的 Jurkat T cell 表達有差異的基因



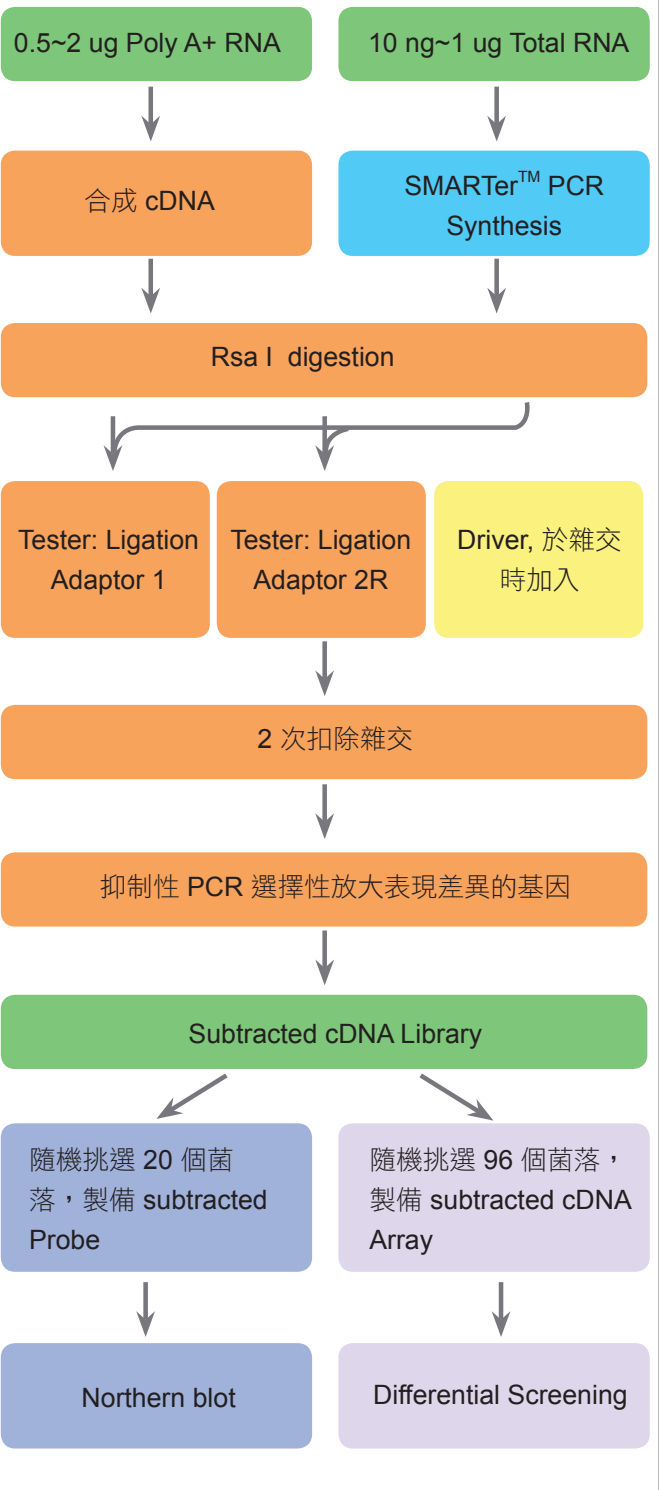
Northern blot 實驗證實 PCR-Select subtraction kit 能有效扣除表現無差異的基因並放大表現有差異的基因。圖以經 PHA/PMA 處理過細胞的 cDNA 作為 Tester，未經處理的作為 Driver，subtracted DNA 表示基因經 PHA/PMA 處理後表現量增加的基因。雖然 IL-2Ra 表現量僅略為上升，但經過扣除雜交後，大幅放大其差異，而 GAPDH 由於兩者表現量相同，經扣除後等於沒有表現。

### SSH 原理簡圖



### 操作流程簡圖

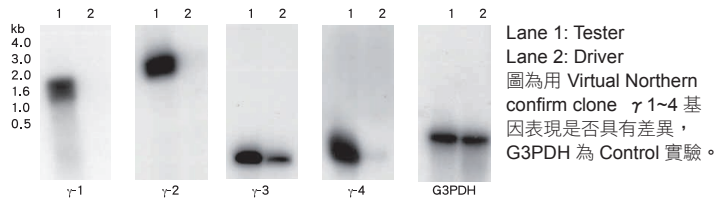
試劑組提供橙色步驟所需材料



## Subtracted cDNA library 的兩種分析方式

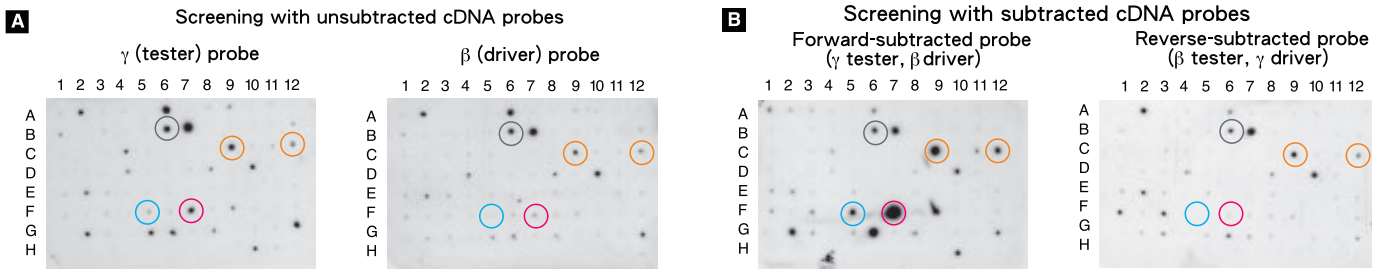
### 方法 1 Northern Blot :

隨機挑選 10-20 顆菌落，於 96 孔盤中培養後，再進行 PCR Labeling，製備 subtracted probes。接著以 Northern blot 的方式 confirm 每一個 clone 是否為表現有差異的基因。



### 方法 2 Differential Screening :

隨機挑選 96 個菌落於 96 孔盤中培養後，以 PCR 放大 insert 片段，接著將 PCR 產物點在尼龍膜上製成 subtracted cDNA Array。並利用四組 probes (forward/ reverse subtracted cDNA, tester, driver) 找到真的表現有差異的基因。



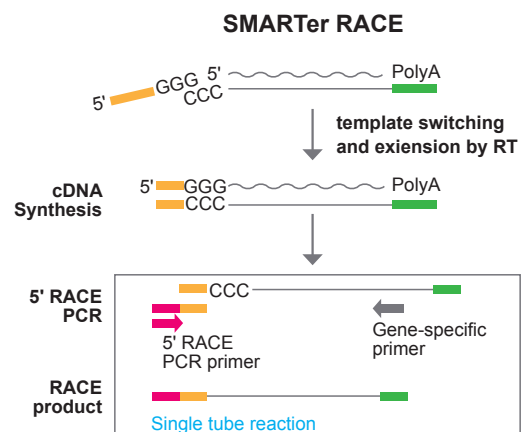
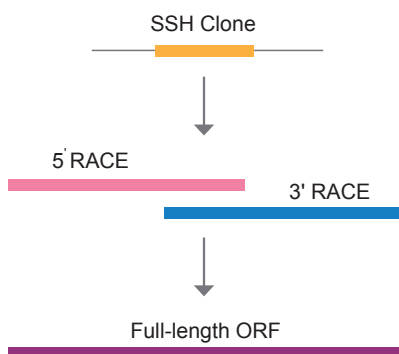
Unsorted probe (Ligation 前的 cDNA 樣本)		Sorted probe		代表 Clone	意義
Tester ( $\gamma$ )	Driver ( $\beta$ )	Forward ( $\gamma$ - $\beta$ )	Reverse ( $\beta$ - $\gamma$ )		
+	-	+	-	F7	表現有差異 (Mid/ High-abundance transcript)
-	-	+	-	F5	表現有差異 (Low-abundance transcript)
+	+	+	-	None	需再 confirm
+	+ or -	++	+	C12/ C9	可能為表現差異較低基因，也可能為未扣除乾淨之背景
+	+	+	+	B6	表現無差異 (未扣除乾淨之背景)

## 利用 SSH Clone 得到的序列，配合 SMARTer RACE 得到全長的基因序列

由於 SSH Clone 只含有部份序列，因此，若要得到全長基因序列還需要一次 Cloning 步驟。若以現有資料庫中有此基因的全長序列，僅需設計 Primer 進行全長的 PCR Cloning 即可。但若無法得知全長序列時，可以利用 SMARTer RACE 幫您 Clone 全長的 ORF (Open reading frame)。

RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 是用來確認 5 端及 3 端 ORF 的序列或是用來 Clone 全長基因的方法。簡單的來說，利用部份已知序列設計 Primer，配合 5 端或 3 端 Adaptor 序列就可以得到專一性 5' -RACE 或 3' -RACE 產物。再利用一次 Overlapping PCR 即可得到完整的 ORF。而 Clontech 專利產品 SMARTer RACE 是唯一可以讓您在單管反應中一次完成反轉錄及合成出 Adaptor 的 RACE Kit，不但省去麻煩，更大幅提高成功率。

利用部份已知的序列 (SSH Clone) 進行 5 端及 3 端 RACE，再取得全長 ORF Clone



貨號	品名	包裝
637401	ClontechPCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	7 rxns
637403	Clontech PCR-Select™ Differential Screening Kit	each
637404	Clontech PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit	7 rxns
634925	SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	10 rxns
634923	SMARTer RACE cDNA Amplification Kit	10 rxns