



УДК 577.22.037

© 1994 Е. Д. Свердлов, О. Д. Ермолаева

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЫЧИТАЮЩЕЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ТРАНСКРИПТОВ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

Ключевые слова: кДНК, вычитающая гибридизация, обогащение.

Проведен теоретический анализ кинетики вычитающей гибридизации кДНК для двух случаев. В первом избыток двухцепочечной кДНК (драйвер) гибридизуется с двухцепочечной кДНК (трейсер), содержащей некоторые последовательности (мишени), не имеющиеся в драйвере.

Во втором случае двухцепочечный трейсер гибридизуется с драйвером, не способным к саморенатурации. Показано, что при первой стратегии для достаточного обогащения трейсера последовательностями мишени, относящейся к низкопредставленной фракции мРНК, необходимо несколько раундов вычитания, в первом из которых отбрасывается ренатурировавшая фракция и для последующих стадий используется оставшаяся одноцепочечной кДНК. Во всех последующих раундах следует отбирать ренатурировавшую фракцию.

При реализации второй стратегии в ренатурировавшей фракции трейсера достаточное обогащение по минорным компонентам мишени может быть достигнуто за один раунд вычитания.

Метод вычитающей гибридизации играет важную роль в исследованиях функций генов, регуляции их экспрессии и в исследованиях генов, вовлеченных в различные заболевания, например наследственные болезни, в раковое перерождение клетки с последующим ее переходом к метастазирующему состоянию и т. д. (для краткого обзора см. [1, 2]).

Однако, несмотря на очевидные успехи метода и на множество методических вариантов, используемых для целей вычитания [3—21], анализ литературы, посвященной этой проблеме, показывает, что, как правило, не учитываются или учитываются не полностью особенности кинетики процесса гибридизации, лежащего в основе всех этих методик. Это приводит зачастую к результатам, существенно худшим, чем могли бы быть получены при адекватном, с точки зрения теории, планировании экспериментов.

Наиболее распространено применение вычитающей гибридизации для выделения транскриптов (в виде мРНК или кДНК), присутствующих в одной и отсутствующих в другой близкородственных клетках [3—11]. И хотя проблема вычитания транскриптов выглядит на первый взгляд проще, чем проблема вычитания полных геномов, поскольку в транскриптах представлена лишь незначительная доля всех геномных последовательностей, в ней заложены подводные камни, связанные с неравнопредставленностью различных мРНК в клетке.

Ранее мы рассматривали теорию вычитающей гибридизации главным образом

Представленность различных мРНК в клетках печени мыши [23]

| Обозначение (<i>j</i>) | Класс мРНК | Доля мРНК каждого класса | Число последовательностей каждого класса | Число молекул каждой последовательности | Доля молекул каждой последовательности* (f_j) |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|--|---|---|
| 1 | Высокопредставленные | 0,29 | 12 | 7200 | 0,024 |
| 2 | Среднепредставленные | 0,27 | 330 | 250 | $8,24 \cdot 10^{-4}$ |
| 3 | Низкопредставленные | 0,44 | 6400 | 21 | $6,92 \cdot 10^{-5}$ |

* В расчете на клетку.

для случая геномных ДНК [22]. Учитывая важность и растущий интерес к проблеме вычитания транскриптов, представляется целесообразным разработать теоретические схемы, которые давали бы исследователям, при решении этой проблемы, готовые для использования формулы. В этой статье дается теоретический анализ для наиболее распространенного способа вычитания, когда двухцепочечная кДНК из одного типа клеток, взятая в избытке (драйвер), гибридизуется с двухцепочечной кДНК из сравниваемого типа клеток (трейсер) для выделения последовательностей (мишени), которые присутствуют в трейсере, но отсутствуют в драйвере. Кроме того, анализируется также схема, в которой драйвер используется в виде, не способном к саморенатурации.

Для гибридизации драйвер и трейсер смешивают, денатурируют и позволяют ренатурировать. При этом последовательности трейсера образуют гибриды с комплементарными цепями драйвера, за исключением последовательностей мишеней, которые в процессе реакции только самореассоциируют. В каждый момент времени в реакционной смеси присутствуют одноцепочечные драйвер и трейсер (в том числе одноцепочечная мишень), гибриды, образованные драйвером и трейсером, и двухцепочечный драйвер (в случае, когда драйвер способен к саморенатурации), двухцепочечный трейсер (в том числе двухцепочечная мишень).

В применении к кДНК теория должна учитывать, что в эукариотической клетке экспрессируется около 7000 различных генов, которые дают от 250 000 до 500 000 молекул мРНК [23].

Все они условно могут быть разделены на три класса: высокопредставленные, среднепредставленные и низкопредставленные (табл. 1). К первому из них относятся мРНК, каждая из которых содержится в клетке в количестве нескольких тысяч копий. Число генов, дающих такие мРНК, невелико — от 10 до 20.

Во втором классе количество молекул мРНК, соответствующих определенному гену, исчисляется в клетке сотнями и число генов, продуцирующих этот класс, также равно нескольким сотням.

В третьем классе каждая мРНК содержится в количестве от одной до десятков копий. Основное количество генов продуцируют именно такие низкопредставленные мРНК.

Для расчетов примем, что в каждом классе различные мРНК равнопредставлены так, как это показано в табл. 1.

Тогда в клетке доля молекул мРНК, соответствующих определенному гену и относящихся к классу j (f_j), будет соответствовать цифрам, приведенным в последней графе табл. 1.

Мишень может представлять собой мРНК (кДНК), относящуюся к любому из трех классов, и, как будет показано ниже; ее обогащение зависит от того, к какому из них она принадлежит. Мы будем рассматривать для простоты случай, когда мишень в трейсере является единственной.

Введем следующие общие обозначения:

D , T , U — молярные концентрации драйвера, трейсера и мишени соответственно;

d, s — индексы, соответствующие двухцепочечной и одноцепочечной ДНК, например U^s, T^d, D^s ;

$j = 1, 2, 3$ — символы, обозначающие принадлежность к высоко-, средне- и низкопредставленным последовательностям соответственно: U^{s1}, T^{d2}, D^{s3} ;

i — подстрочные индексы, обозначающие индивидуальный компонент реакционной смеси, за исключением мишени (например, T_i^{s1} — это молярная концентрация одноцепочечной высокопредставленной последовательности i , входящей в состав трейсера).

Концентрации являются функцией от времени: $U^{s1}(t), D_i^{s2}(t)$.

Концентрации одноцепочечной ДНК в начальный момент времени обозначаются следующим образом: U_0^1, T_{0i}^3 .

E_s', E_s'' — обогащение в одноцепочечной фракции после первого и второго циклов вычитания;

E_d', E_d'' — обогащение в двухцепочечной фракции после первого и второго циклов вычитания;

Ясно, что доли мишени в исходной смеси равны долям других индивидуальных мРНК (кДНК), относящихся к тому же классу, что и мишень: $U_0^1 = T_{0i}^1, U_0^2 = T_{0i}^2, U_0^3 = T_{0i}^3$.

$R, M^{-1} \cdot c^{-1}$ — константа скорости реассоциации цепей. $R \cong 10^6 M^{-1} \cdot c^{-1}$ для фрагментов длиной ≈ 500 звеньев в 0,18 М NaCl при оптимальной температуре, равной т. пл. $-25^\circ C$.

Ранее [22] мы вывели формулы зависимости от времени концентраций трейсера, мишени и обогащения для вычитания геномных ДНК.

Эти формулы применимы и к каждому из индивидуальных типов кДНК при их вычитании.

Для гибридизации двухцепочечных драйвера и трейсера:

$$T_i^s(t) = \frac{T_{0i}}{1 + RD_{0i}t} \quad (1); \quad U^s(t) = \frac{U_0}{1 + RU_0t} \quad (2);$$

$$T_i^d(t) = \frac{R(T_{0i})^2 t}{1 + RD_{0i}t} \quad (3); \quad U^d(t) = \frac{R(U_0)^2 t}{1 + RU_0t} \quad (4).$$

Для взаимодействия несаморенатурирующего драйвера с двухцепочечным трейсером концентрации мишени меняются в соответствии с формулами (2) и (4), тогда как для последовательностей трейсера, совпадающих с последовательностями драйвера, справедливы выражения (5) и (6).

$$T_i^s(t) = T_{0i} e^{-RD_{0i}t} \quad (5); \quad T_i^d(t) = \frac{(T_{0i})^2}{2D_{0i}} (1 - e^{-2RD_{0i}t}) \quad (6).$$

Все эти уравнения действительны при условии большого избытка драйвера.

Для смеси мРНК, характеризующейся соотношениями, приведенными в табл. 1, суммарная концентрация молекул трейсера к моменту времени t может быть представлена как сумма концентраций индивидуальных молекул в каждом из трех классов.

Если суммарная исходная концентрация молекул трейсера равна T_0 , а драйвера D_0 , то формулы 1—6 выражаются через доли f_j индивидуальных мРНК от суммарных:

$$T_i^{s/j}(t) = \frac{f_j T_0}{1 + Rf_j D_0 t} \quad (1'); \quad U^{s/j}(t) = \frac{f_j U_0}{1 + Rf_j U_0 t} \quad (2');$$

$$T_i^{d/j}(t) = \frac{R(f_j T_0)^2 t}{1 + Rf_j D_0 t} \quad (3'); \quad U^{d/j}(t) = \frac{R(f_j U_0)^2 t}{1 + Rf_j U_0 t} \quad (4');$$

$$T_i^{sj}(t) = f_j T_0^s e^{-Rf_j D_0^s t} \quad (5'); \quad T_i^{dj}(t) = \frac{(f_j T_0^s)^2}{2f_j D_0^s} (1 - e^{-2Rf_j D_0^s t}) \quad (6').$$

Здесь $f_j = 0,024; 8,24 \cdot 10^{-4}; 6,92 \cdot 10^{-5}$ для высоко- ($j=1$), средне- ($j=2$) и низкопредставленных ($j=3$) мРНК соответственно (см. табл. 1). Тогда в случае двухцепочечного драйвера:

$$\sum_{ij} T_i^{dj}(t) = \sum_j n_j \frac{R (f_j T_0^s)^2 t}{1 + Rf_j D_0^s t},$$

где n_j — число различных РНК в классе j .

Для случая, отраженного в табл. 1,

$$\sum_{ij} T_i^{dj}(t) = 12 \frac{R(0,024T_0^s)^2 t}{1+0,024RD_0^s t} + 330 \frac{R(8,24 \cdot 10^{-4}T_0^s)^2 t}{1+8,24 \cdot 10^{-4}RD_0^s t} + 6400 \frac{R(6,92 \cdot 10^{-5}T_0^s)^2 t}{1+6,92 \cdot 10^{-5}RD_0^s t}.$$

Если определить обогащение как отношение долей мишени в трейсере до и после вычитающей гибридизации, то обогащение мишени, принадлежащей j -й фракции после гибридизации, выражается так:

$$E_s' = \frac{U^{sj}(t)}{U^{sj}(t) + \sum_{ij} T_i^{sj}(t)} : \frac{U_0^j}{T_0} \quad (7'); \quad E_d' = \frac{U^{dj}(t)}{U^{dj}(t) + \sum_{ij} T_i^{dj}(t)} : \frac{U_0^j}{T_0} \quad (8').$$

Если обогащенная двухцепочечная фракция используется для повторной гибридизации с драйвером, то обогащение выражается теми же формулами (7') и (8'), в которых концентрации мишени и трейсера в нулевой момент времени U_0^j, T_0 — начальные концентрации перед вторым раундом вычитания.

Итоговое обогащение равно произведению обогащений, достигнутых при первой и второй гибридизациях.

Для модельных вычислений определим величины T_0 и D_0 . Концентрации T_0, D_0 будем выражать в молях цепей в 1 л и ее величину оценивать, принимая среднюю длину молекулы кДНК равной 2000 (для сравнительных расчетов точные значения несущественны). Довольно типичные для экспериментов по вычитающей гибридизации концентрации драйвера и трейсера 4 и 0,2 мг/мл соответственно будут при этих условиях означать $D_0 = 3,33 \cdot 10^{-6}$ и $T_0 = 1,67 \cdot 10^{-7}$ М.

Рассмотрим три случая, когда в трейсере содержится три варианта мишеней: высоко-, средне- и низкопредставленные.

После первого цикла вычитания при времени реассоциации 20 ч (72 000 с) формулы 1'—8' дадут приведенные в табл. 2, 4 значения концентраций компонентов, долей мишеней трех типов в смеси и обогащений этих мишеней в одноцепочечной (нереассоциировавшей) и двухцепочечной (реассоциировавшей) фракциях.

Анализ этих величин в случае использования двухцепочечных драйвера и трейсера незамедлительно показывает, что двухцепочечная фракция трейсера в этих условиях будет сильно обогащена высокопредставленной мишенью, если таковая существует. Ее доля в этой фракции превышает 30%.

Доля же низкопредставленной мишени, хотя и выросла в 9 раз по сравнению с исходной, остается низкой.

В одноцепочечной фракции доля высокопредставленных молекул упала примерно в 10 раз, обогащение низкопредставленной мишени в 2 раза выше, чем в двухцепочечной фракции, и концентрации всех типов мишеней в этой фракции выровнялись. Произошла ожидаемая нормализация [24].

С практической точки зрения это означает, что после первого раунда вычитающей гибридизации двухцепочечную и одноцепочечную фракции целесообразно разделить.

Двухцепочечную фракцию можно непосредственно клонировать или исполь-

Численное моделирование концентраций мишени и трейсера в процессе вычитающей гибридизации двухцепочечного трейсера и двухцепочечного драйвера

1-й цикл гибридизации, $t = 20$ ч, исходная концентрация трейсера $T_0 = 1,67 \cdot 10^{-7}$ М, концентрация драйвера $D_0 = 3,3 \cdot 10^{-6}$ М

| Индивидуальный компонент | T_{0i}^j | T_i^j | $T_i^{d_i}$ | U_0^j | U^j | U^{d_i} | $\frac{U_0^j}{T_0}$ | $\frac{U^j}{U^j + \sum_{i,j} T_i^j}$ | $\frac{U^{d_i}}{U^{d_i} + \sum_{i,j} T_i^{d_i}}$ | E_s' | E_d' |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|--|--------|--------|
| $j=1$ | $4,01 \cdot 10^{-9}$ | $6,96 \cdot 10^{-13}$ | $2,01 \cdot 10^{-10}$ | $4,01 \cdot 10^{-9}$ | $1,38 \cdot 10^{-11}$ | $3,99 \cdot 10^{-9}$ | 0,024 | $3,11 \cdot 10^{-3}$ | $3,34 \cdot 10^{-1}$ | 0,13 | 13,9 |
| $j=2$ | $1,38 \cdot 10^{-10}$ | $6,93 \cdot 10^{-13}$ | $6,87 \cdot 10^{-12}$ | $1,38 \cdot 10^{-10}$ | $1,26 \cdot 10^{-11}$ | $1,25 \cdot 10^{-10}$ | $8,24 \cdot 10^{-4}$ | $2,83 \cdot 10^{-3}$ | $1,51 \cdot 10^{-2}$ | 3,45 | 18,3 |
| $j=3$ | $1,16 \cdot 10^{-11}$ | $6,57 \cdot 10^{-13}$ | $5,47 \cdot 10^{-13}$ | $1,16 \cdot 10^{-11}$ | $6,31 \cdot 10^{-12}$ | $5,25 \cdot 10^{-12}$ | $6,92 \cdot 10^{-5}$ | $1,42 \cdot 10^{-3}$ | $6,42 \cdot 10^{-4}$ | 20,6 | 9,30 |
| $\sum_{i,j}$ | $1,67 \cdot 10^{-7}$ | $4,44 \cdot 10^{-9}$ | $8,18 \cdot 10^{-9}$ | | | | | | | | |

Таблица 3

Численное моделирование концентраций мишени и трейсера в процессе вычитающей гибридизации двухцепочечного трейсера и двухцепочечного драйвера

2-й цикл гибридизации, $t = 20$ ч, исходная концентрация трейсера $T_0 = 8,35 \cdot 10^{-9}$ М, концентрация драйвера $D_0 = 3,3 \cdot 10^{-6}$ М

| Индивидуальный компонент | T_{0i}^j | T_i^j | $T_i^{d_i}$ | U_0^j | U^j | U^{d_i} | $\frac{U_0^j}{T_0}$ | $\frac{U^j}{U^j + \sum_{i,j} T_i^j}$ | $\frac{U^{d_i}}{U^{d_i} + \sum_{i,j} T_i^{d_i}}$ | E_s'' | E_d'' |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|--|---------|---------|
| $j=1$ | $1,31 \cdot 10^{-12}$ | $2,27 \cdot 10^{-16}$ | $2,14 \cdot 10^{-17}$ | $2,59 \cdot 10^{-11}$ | $9,05 \cdot 10^{-12}$ | $1,69 \cdot 10^{-11}$ | $3,11 \cdot 10^{-3}$ | $1,96 \cdot 10^{-2}$ | $2,96 \cdot 10^{-1}$ | 6,32 | 95,3 |
| $j=2$ | $1,30 \cdot 10^{-12}$ | $6,56 \cdot 10^{-15}$ | $6,15 \cdot 10^{-16}$ | $2,37 \cdot 10^{-11}$ | $8,76 \cdot 10^{-12}$ | $1,49 \cdot 10^{-11}$ | $2,84 \cdot 10^{-3}$ | $1,90 \cdot 10^{-2}$ | $2,71 \cdot 10^{-1}$ | 6,71 | 95,5 |
| $j=3$ | $1,24 \cdot 10^{-12}$ | $7,02 \cdot 10^{-14}$ | $6,24 \cdot 10^{-15}$ | $1,19 \cdot 10^{-11}$ | $6,40 \cdot 10^{-12}$ | $5,46 \cdot 10^{-12}$ | $1,42 \cdot 10^{-3}$ | $1,40 \cdot 10^{-2}$ | $1,20 \cdot 10^{-1}$ | 9,84 | 84,3 |
| $\sum_{i,j}$ | $8,35 \cdot 10^{-9}$ | $4,52 \cdot 10^{-10}$ | $4,02 \cdot 10^{-11}$ | | | | | | | | |

зовать как гибридизационную пробу. В ней будет содержаться очень высокая доля мишени, относящейся к высокопредставленной фракции, и очень низкая доля низкопредставленной в исходной смеси мишени.

Для более высокого обогащения последнюю отделенную (или иным путем дискриминированную от двухцепочечной фракции) одноцепочечную фракцию следует подвергнуть дополнительному циклу обогащения.

Возьмем для повторного вычитания суммарную концентрацию трейсера в 20 раз меньшую, чем исходная, с тем, чтобы концентрация низкопредставленной мишени в ней равнялась той, которая была в исходном трейсере.

Концентрацию драйвера возьмем такую же, как в первом случае.

Из данных табл. 2 легко рассчитать новые концентрации компонентов смеси после 20 ч гибридизации, пользуясь теми же формулами, что и раньше (табл. 3).

Полученные цифры показывают, что на этот раз доли мишеней любого класса существенно больше в двухцепочечной фракции трейсера, которая оказывается сильно обогащенной последовательностями мишеней: 30% всех последовательностей в этой фракции может принадлежать высокопредставленной мишени, 27% — средне- и 12% — низкопредставленной. Последняя мишень, хотя и обогатилась по сравнению с ее первоначальным содержанием в 1800 раз, по-прежнему сравнительно малопредставлена. Поэтому для дальнейшего обогащения можно использовать третий раунд вычитания.

Тем не менее уже на этой стадии двухцепочечную фракцию можно клонировать или использовать в качестве гибридизационной пробы. Можно ожидать, что концентрация низкопредставленных ДНК в такой пробе достаточна, чтобы обеспечить позитивный сигнал, поскольку нижний предел содержания индивидуальной кДНК в смеси, достаточный для обнаружения соответствующей ей колонии в библиотеке клонов, оценивается в 0,2% [22].

Таким образом, двух или трех циклов вычитающей гибридизации, по-видимому, достаточно, чтобы создать библиотеки кДНК с высокой представленностью минорных компонентов, содержащихся в ДНК трейсера и не содержащихся в ДНК драйвера.

Для этого следует в первом раунде гибридизации отделить фракцию нерассоциировавших одноцепочечных молекул кДНК и использовать ее для последующих циклов вычитания, в каждом из которых следует отбирать двухцепочечную фракцию.

В случае использования несаморенатурирующего драйвера и двухцепочечного трейсера (см. табл. 4) уже при первом раунде вычитания в одноцепочечной фракции доли мишени, принадлежащей к любому из трех классов, близки к единице.

При этом теоретические величины обогащений и содержание различных типов мишеней могут быть очень велики. С этой точки зрения такая стратегия вычитания предпочтительна. Однако на практике такие величины труднодостижимы вследствие ряда причин. Одной из них является несовершенство методик отделения гибридов драйвера и трейсера от непрореагировавшего трейсера. Другая причина может заключаться в несовершенстве методов отделения одноцепочечной фракции трейсера от двухцепочечной.

Эти две причины носят технический характер.

В ряде случаев причины отличий значений обогащений от теоретических могут заключаться в том, что мишень не является «абсолютной» и присутствует в драйвере либо в меньшем количестве, чем в трейсере (это часто имеет место, когда под действием того или иного фактора экспрессия некоторых генов трейсера увеличивается), либо последовательности мишени имеют гомологичные, хотя и различающиеся, последовательности в драйвере.

В последнем случае мишень будет реассоциировать с этими последовательностями, хотя и с меньшей скоростью. Такая ситуация имеет место в случае сравнения гибридных клеток, содержащих определенные хромосомы или фраг-

менты хромосом человека на фоне набора хромосом хомяка с исходными клетками хомяка.

Оба этих случая требуют специального рассмотрения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Myers R. M.//Science. 1993. V. 259. P. 942—943.
2. Nicolson G. L.//BioEssays. 1991. V. 13. P. 337—342.
3. Wang Z., Brown D. D.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 24. P. 11505—11509.
4. Timblin C., Battey J., Kuehl W. M.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 6. P. 1587—1593.
5. Hampson I. N., Pope L., Cowling G. J., Dexter T. M.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 11. P. 2899.
6. Gulick P. J., Dvorak J.//Gene. 1990. V. 95. № 2. P. 173—177.
7. Swaroop A., Xu J., Agarwal N., Weissman S. M.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 8. P. 1954.
8. Rubenstein J. L. R., Brice A. E. J., Ciaranello R. O., Denney D., Porteus M. H., Usdin T. B.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 16. P. 4833—4842.
9. Hara E., Kato T., Nakada S., Sekiya S., Oda K.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 25. P. 7097—7104.
10. Swaroop A., Gieser L.//Genomics. 1992. V. 13. P. 873—876.
11. Jones K. W., Shapero M. H., Chevrette M., Fournier R. E. K.//Cell. 1991. V. 66. № 5. P. 861—872.
12. Kunkel L. M., Monaco A. P., Middlesworth W., Ochs H. D., Latt S. A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 14. P. 4778—4782.
13. Shiloh Y., Rose E., Colletti-Feener C., Korf B., Kunkel L. M., Latt S. A.//Gene. 1987. V. 51. № 1. P. 53—59.
14. Nussbaum R. L., Lesco J. G., Lewis R. A., Ledbetter S. A., Ledbetter D. H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 18. P. 6521—6525.
15. Mor O., Messinger Y., Rotman G., Bar-Am I., Ravia Y., Eddy R. L., Shows T. B., Park J. G., Gazdar A. F., Shiloh Y.//Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 1. P. 117—123.
16. Wieland I., Bolger G., Asouline G., Wigler M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 7. P. 2720—2724.
17. Lamar E., Palmer R.//Cell. 1984. V. 37. P. 171—177.
18. Wieland I., Bohm M., Bogatz S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 20. P. 9705—9709.
19. Lisitsyn N. A., Rosenberg M. V., Launer G. A., Wagner L. L., Potapov V. K., Kolesnik T. V., Sverdlov E. D.//Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1993. № 3. С. 26—29.
20. Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M.//Science. 1993. V. 259. P. 946—951.
21. Сverdlov E. D.//Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология. 1993. № 6. С. 3—12.
22. Сverdlov E. D., Ермолаева О. Д.//Биоорганич. химия. 1993. Т. 19. № 11. С. 1081—1088.
23. Galau G. A., Klein W. H., Britten R. J., Davidson E. H.//Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 179. P. 584—599.
24. Ko S. H. M.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 19. P. 5705—5711.
27. Patanjali S., Parimoo S., Weissman S. M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 5. P. 1943—1947.

Поступила в редакцию
5.X.1993

E. D. Sverdlov, O. D. Ermolayeva

**KINETIC ANALYSIS OF SUBTRACTIVE HYBRIDISATION
OF TRANSCRIPTS**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A theoretical analysis of kinetics of two subtractive cDNA hybridisations has been carried out: hybridisation of an excess of denaturated double-stranded cDNA (driver) with denaturated double-stranded cDNA (tracer) containing some sequences (targets) missing from the driver, and hybridisation of denaturated double-stranded tracer with denaturated double-stranded driver unable to renature.

Our calculations show that the first strategy requires several rounds of hybridisation for sufficient enrichment of tracer with target sequences of the low-abundant mRNA: in the first round the renatured fraction is removed, and in subsequent rounds the remaining single-stranded fraction cDNA is used and renatured fraction is collected. The second strategy makes it possible to sufficiently enrich non-reassociated fraction of tracer with minor fractions of target sequences in a single round of subtractive hybridisation.