



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.215.037

© 1994 С. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская, К. А. Лукьянов,
В. С. Тарабыкин, Е. Д. Сverdлов

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ВЫЧИТАЮЩАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ кДНК

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

Ключевые слова: кДНК, вычитающая гибридизация.

Вычитающая гибридизация кДНК является распространенным методом выделения транскриптов, отличающих одну линию клеток от другой близкородственной (для обзора см. [1]). В частности, метод используется для идентификации мРНК, появляющихся, исчезающих или меняющих свое относительное содержание в клетке при ее опухолевой трансформации или дифференцировке.

Несмотря на множество впечатляющих результатов, полученных с помощью этого метода [1], он не адаптирован для идентификации транскриптов с низким (1—10 молекул) содержанием в клетке [2]. В предыдущей работе [1] мы провели математический анализ различных моделей вычитающей гибридизации и пришли к выводу о целесообразности разделения процесса вычитания на две стадии, в первой из которых отделяется незагибридизованная одноцепочечная фракция трейсера*, используемая далее для повторного вычитания с избытком драйвера во второй стадии.

При этом в одноцепочечной фракции, образующейся после первой гибридизации, различные молекулы кДНК оказываются приблизительно равно представленными — нормализованными. Это повышает вероятность обнаружения редких транскриптов в библиотеках кДНК, получаемых в результате гибридизации.

Сегрегация одноцепочечной фракции может осуществляться многими способами — начиная с прямого физического разделения одно- и двухцепочечных ДНК после гибридизации и кончая различными вариантами специфической амплификации оставшейся незагибридизованной кДНК, не затрагивающими двухцепочечные гибриды.

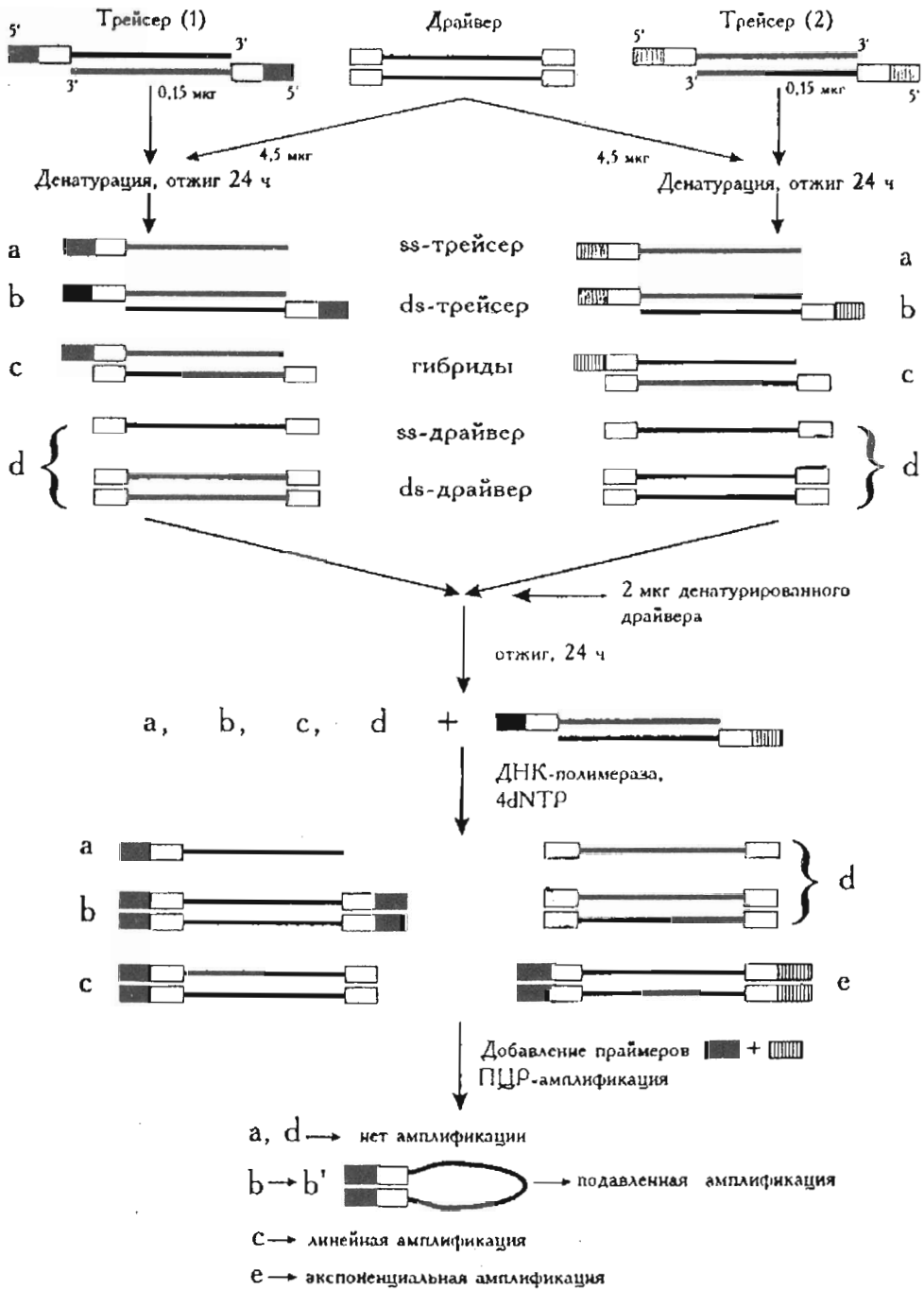
Один из вариантов последнего подхода является предметом данной работы. Описываемый способ использует специфическую амплификацию одноцепочечной фракции трейсера после вычитания за счет специально сконструированных праймеров для ПЦР-амплификации (см. схему).

Для вычитания используется кДНК трейсера, приготовленная путем

* Термины «трейсер», «драйвер» и «мишень» определены в работе [1].

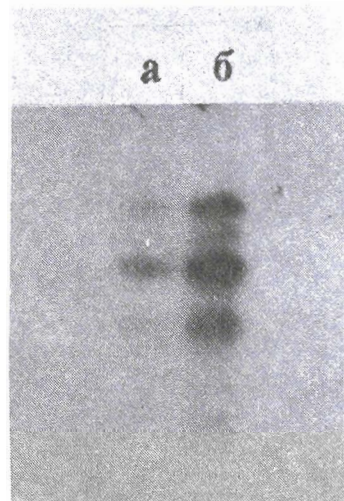
Адрес для переписки: 117871 ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН.

Схема вычитающей гибридизации кДНК



Прямоугольники на концах молекул кДНК обозначают последовательности праймеров, фланкирующих эти молекулы, а также комплементарные им последовательности. Белый прямоугольник — oligo(dT)-содержащий праймер, черный — 5'-концевой модуль праймера (1), фланкирующего кДНК трейсера (1). Заштрихованный прямоугольник обозначает 5'-концевой модуль праймера (2), фланкирующего кДНК трейсера (2). 3'-Концевые модули праймеров (1) и (2) представляют собой oligo(dT)-содержащий праймер

Радиоавтограф Саузерн-блот-гибридизации с использованием [32 P]ДНК фага фх174 в качестве специфического зонда. Соотношение сигналов, полученных от образцов кДНК до и после вычитающей гибридизации, оценивали денситометрически: а — 1 мкг амплифицированной кДНК трейсера, содержащей 100 пг ДНК фага фх174, гидролизованной *Hae*III; б — 10 нг амплифицированной кДНК после вычитающей гибридизации



амплификации первой цепи кДНК. Первая цепь синтезируется с обратной транскрипцией мРНК трейсерных клеток в двух разных пробирках с двумя разными бимодальными праймерами, 3'-концевой модуль которых представляет собой oligo(dT), а 5'-концевые модули различны для образцов трейсера (1) и (2). В целом праймеры для трейсера (1) и трейсера (2) имеют структуру (5')- AG-SACTSTCCAGCCTCTCACCGCAGTCGACCG - (dT)₁₃ и (5')- ACCGACGTG-GACSTATCCATGAACGCAGTCGACCG (dT)₁₃ соответственно. Первая цепь удлиняется далее с помощью концевой олигонуклеотидилтрансферазы в присутствии dATP, после чего проводится амплификация.

Образующиеся в результате такой амплификации совершенные дуплексы обрабатываются экзонуклеазой III *E. coli* в условиях неполного расщепления [3], так что у получающихся молекул трейсера 5'-концы одноцепочечны, как это показано на схеме. Драйвер получается путем аналогичной амплификации драйверной мРНК с oligo(dT)-содержащим праймером (5') CGCAGTCGACCG (dT)₁₃.

После первого раунда вычитающей гибридизации в обеих смесях трейсерная кДНК представлена одноцепочечными молекулами (а), двухцепочечными молекулами с 5'-выступающими одноцепочечными концами (б) и гибридами с драйверной кДНК (с). Полученные две смеси объединяются, и гибридизация продолжается в присутствии добавочного количества денатурированного драйвера. При этом продолжается образование двухцепочечных молекул типов (б) и (с), но наряду с ними возникают двухцепочечные молекулы трейсера (е) с различными выступающими одноцепочечными концами за счет реассоциации одноцепочечных молекул (тип а) из трейсеров (1) и (2). Молекулы типа (е) характерно отличают продукты, образованные одноцепочечным трейсером после первого цикла гибридизации. Они должны примерно равно представлять различные по содержанию в клетке классы мРНК.

После достройки 5'-выступающих концов с помощью Taq-ДНК-полимеразы (как это делалось нами [4] и другими [5] ранее) и добавления двух праймеров, идентичных по структуре 5'-модулям праймеров, используемых для подготовки трейсера, осуществляется 20—25 циклов ПЦР-амплификации смеси.

При этом не амплифицируется трейсер, оставшийся одноцепочечным; линейной амплификации подвергаются двухцепочечные гибриды типа (с); двухцепочечные молекулы, образованные комплементарными цепями в трейсере (1) или трейсере (2) (б), при денатурации и ренатурации в процессе амплификации образуют структуры типа (б'), которые предотвращают ассоциацию с праймерами и амплификацию. Экспоненциальной амплификации подвергаются только молекулы типа (е), у которых концевые участки комплементарных цепей несамокомплементарны. Эта амплификация селективно увеличивает концентрацию тех молекул трейсера, которые после первого раунда вычитания остались одноцепочечными. Структуры типа (б') являются ловушкой [6] для тех молекул, которые после первого раунда гибридизации реассоциировали.

Эффективность предложенной в настоящей работе схемы проверялась в мо-

дельных экспериментах. В качестве драйвера была использована кДНК клеток линии HeLa. Трейсер был приготовлен на основе образца кДНК драйвера, к которому добавляли ДНК-мишени в количествах, соответствующих 1—10 копиям мРНК на клетку. Мишень представляла собой ДНК фага ϕ x 174, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции *Hae*III и фланкированную соответствующим oligo(dT)-содержащим праймером.

На рисунке показан результат обогащения модельной мишени. Оценка степени обогащения [1] дает ее величину в интервале 500—1000. Это обогащение достигается в процессе простых операций без промежуточных стадий физического отделения гибридов от негибридных молекул трейсера, используемых в обычных методах, что позволяет существенно ускорить методику и уменьшить количество исходного материала для гибридизации.

Авторы благодарят О. Л. Васильева за участие в обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Свердлов Е. Д., Ермолаева О. Д. // Биоорганическая химия. 1994. (в печати).
2. Galan G., Klein W., Britten R., Davidson E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 179. P. 584—599.
3. Weiss B. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 1896.
4. Lisitsyn N. A., Rosenberg M. V., Launer G. A., Wagner L. L., Potapov V. K., Kolesnik T. B., Sverdlov E. D. // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1993. № 3. С. 26—29.
5. Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M. // Science. 1993. V. 259. P. 946—951.
6. Свердлов Е. Д., Ермолаева О. Д. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 1081—1087.

Поступило в редакцию
27.1.1994

S. A. Lukyanov, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. S. Tarabykin,
E. D. Sverdlov

HIGHLY EFFICIENT SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION OF cDNA

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow V-437, 117871, Russia

Key words: cDNA, subtractive hybridization.

A scheme for subtractive hybridization is described allowing for a 500—1000 fold enrichment of low abundant cDNA. The scheme is based on the previously described principle of normalization of an initial mixture of differently represented cDNAs in the single-stranded portion of a tracer after the first round of subtraction [1] and the principle of a trapper [6] excluding the fraction of the double-stranded cDNAs formed during the first round from the subsequent PCR-amplification. The technique is simple and makes unnecessary the separation of the tracer, driver and hybrids formed after the subtraction.

Технический редактор Н. Н. Беляева

Сдано в набор 18.03.94 Подписано к печати 27.04.94 Формат бумаги 70 × 100¹/₁₆
Офсетная печать Усл. печ. л. 11,7 Усл. кр.-отт. 6,4 Уч.-изд. л. 12,6 Бум. л. 4,5
Тираж 536 экз. Зак. 1015

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 504
Телефон: 330-60-38
Московская типография № 2 ВО «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6