БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 1996, том 22, № 12, с. 894–899

УДК 577.215.037

НОВЫЙ МЕТОД ВЫЧИТАЮЩЕЙ ГИБРИДИЗАЦИИ кДНК, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ КЛОНИРОВАТЬ ГЕНЫ, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕСЯ В МИКРОПОПУЛЯЦИЯХ КЛЕТОК

© 1996 г. О. Л. Васильев#, С. А. Лукьянов, А. В. Белявский*, О. В. Казанская, А. Г. Зарайский

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

Поступила в редакцию 10.04.96 г.

Предложен новый, эффективный и простой метод получения обогащенной кДНК, совмещающий вычитающую гибридизацию с кинетическим обогащением. Принципиальной особенностью метода является использование набора специальных праймеров, что позволяет селективно амплифицировать с помощью ПЦР только дифференциально распределенные последовательности. С помощью предложенного метода клонирована кДНК нового гена, названного *XEp-1*, специфически экспрессирующегося в презумптивном эпидермисе шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, начиная со стадии средней гаструлы.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, вычитающая гибридизация, кДНК.

В процессе гаструляции эмбриональная эктодерма африканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* подвергается индукционным воздействиям со стороны подстилающей ее дорсальной и вентральной мезодермы, в результате чего она дает начало двум новым типам ткани: нейроэктодерме и эпидермису [1, 2]. Для понимания молекулярных механизмов индукции важно выделить гены, специфично экспрессирующиеся в этих двух эктодермальных производных на самых ранних этапах их дифференцировки. В настоящее время идентифицировано уже довольно много генов, специфично экспрессирующихся в нейроэктодерме [3–8]. Существенно меньше известно маркеров эпидермальной дифференцировки [9, 10].

Одним из методов поиска дифференциально экспрессирующихся генов является скрининг кДНК-библиотек, обогащенных последовательностями искомых генов, с помощью вычитающей гибридизации. Важно, что в отличие от большинства других методов поиска гомологичных или новых генов метод вычитающей гибридизации не требует никакой дополнительной информации об их первичной структуре, а также молекулярной массе и биологической активности соответствующих белков. Более широкому использованию данного метода в биологии развития препятствует главным образом невозможность получить достаточное количество исходной РНК из очень маленьких объемов эмбриональных тканей. Ранее мы показали, что обойти это препятствие можно, используя ПЦР для амплификации кДНК. В этом случае реально получить библиотеки кДНК исходя всего из нескольких микрограммов суммарной РНК [11, 12]. Важно подчеркнуть, что ПЦР не искажает соотношение в представленности мРНК, наблюдаемое для разных популяций клеток, а потому амплифицированные кДНК могут быть использованы в дальнейшем для поиска дифференциально экспрессирующихся генов. Подтверждением этому служит клонирование нами с помощью оригинальной методики вычитающей гибридизации ранее не известного гомеобокссодержащего гена *XANF-1* [12]. В настоящей работе мы описываем более эффективный и простой метод вычитающей гибридизации амплифицированной с помощью ПЦР кДНК, позволивший клонировать новый ранний маркер эпидермальной дифференцировки.

Получение суммарной кДНК, обогащенной специфическими для эпидермиса последовательностями показано на схеме. Для вычитающей гибридизации были использованы суммарные кДНК нейроэктодермы и эпидермиса, амплифицированные с помощью ПЦР в присутствии bio-dUTP* [12] (см. схему). Для синтеза трейсера биотинилированную

Автор для переписки (e-mail: zar@humgen.siobc.ras.ru).

* bio-dUTP – препарат biotin-21-dUTP фирмы Clontech (США).

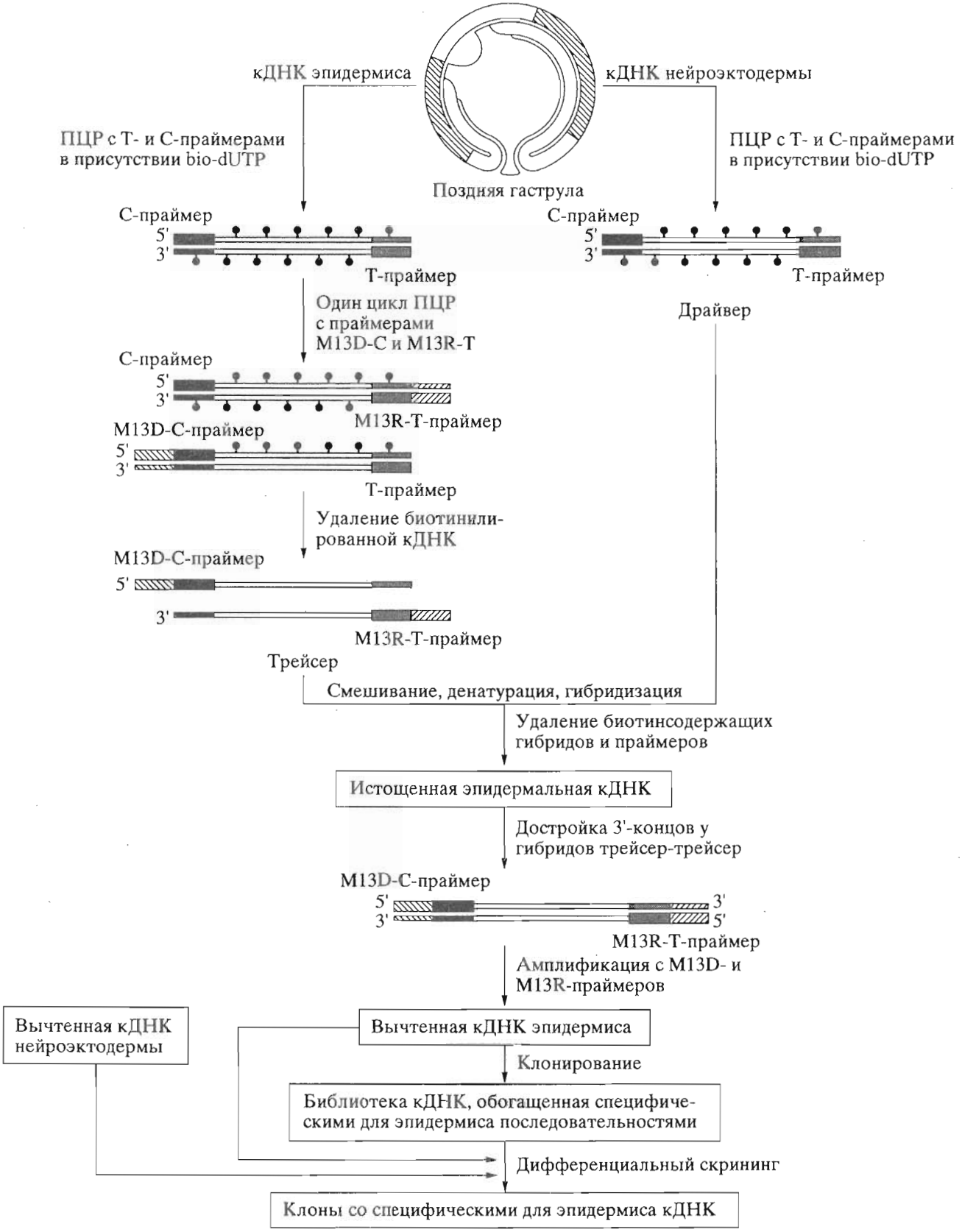
кДНК эпидермиса
кДНК нейроэктодермы
ПЦР с Т- и С-праймерами в присутствии bio-dUTP
ПЦР с Т- и С-праймерами в присутствии bio-dUTP
Поздняя гаструла
С-праймер
5'
3'
Т-праймер
С-праймер
5'
3'
Т-праймер
Один цикл ПЦР с праймерами M13D-C и M13R-T
Драйвер
С-праймер
5'
3'
M13R-Т-праймер
M13D-C-праймер
5'
3'
Т-праймер
Удаление биотинилированной кДНК
M13D-C-праймер
5'
3'
M13R-Т-праймер
Трейсер
Смешивание, денатурация, гибридизация
Удаление биотинсодержащих гибридов и праймеров
Истощенная эпидермальная кДНК
Достройка 3'-концов у гибридов трейсер-трейсер
M13D-C-праймер
5'
3'
3'
5'
M13R-Т-праймер
Амплификация с M13D- и M13R-праймеров
Вычтенная кДНК нейроэктодермы
Вычтенная кДНК эпидермиса
Клонирование
Библиотека кДНК, обогащенная специфическими для эпидермиса последовательностями
Дифференциальный скрининг
Клоны со специфическими для эпидермиса кДНК

Схема.

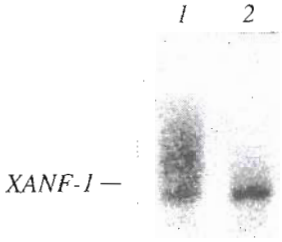

Рис. 1. Оценка степени обогащения по специфической для нейроэктодермы кДНК гена *XANF-1* после двух циклов вычитающей гибридизации. Саузерн-гибридизация радиоактивно меченной кДНК *XANF-1* с 1 мкг исходной (*1*) и 10 нг вычтенной (2) кДНК.

суммарную кДНК эпидермиса подвергли одному циклу ПЦР с праймерами M13D-C и M13R-T. После денатурации и последующего связывания со стрептавидином исходные биотинсодержащие цепи удаляли с помощью фенол-хлороформной экстракции [13]. На следующем этапе 100 нг полученного трейсера гибридизовали в течение ночи с 20-кратным избытком биотинилированной суммарной кДНК нейроэктодермы (драйвер). Биотинсодержащие гибриды после связывания со стрептавидином удалили фенол-хлороформной экстракцией. Затем цикл вычитания повторили с новой порцией биотинилированного драйвера.

Амплификацию двухцепочечных небиотинилированных молекул трейсера после достройки их 3'-концов осуществляли с помощью *Taq*-полимеразы в течение 30 циклов ПЦР в присутствии M13D- и M13R-праймеров. Одноцепочечная ДНК трейсера, так же как гибриды трейсер – драйвер, не способны к амплификации из-за отсутствия на 3'-концах этих молекул последовательностей, комплементарных M13R- и M13D-праймерам. кДНК, обогащенную специфическими для эпидермиса последовательностями, клонировали в вектор pGEM1 по методике, описанной нами ранее [11]. Аналогичным образом проводили вычитающую гибридизацию в обратном направлении: в качестве трейсера использовали кДНК нейроэктодермы, а драйвером служила кДНК эпидермиса.

Отличительная черта приведенной методики получения обогащенных кДНК библиотек состоит в селективной амплификации полученных вычитающей гибридизацией двухцепочечных молекул трейсера, содержащих разные последовательности на 5'-концах. Как показал анализ, за два раунда вычитающей гибридизации (кДНК нейроэктодермы в качестве трейсера; кДНК эпидермиса в качестве драйвера) с последующей селективной амплификацией полученного двухцепочечного трейсера было достигнуто 100-кратное обогащение по специфической для нейроэктодермы кДНК гена *XANF-1* (рис. 1). Отметим, что сходная стратегия вычитания была недавно предложена для поиска делеций в геноме [14].

Для дифференциального скрининга готовили две эквивалентные реплики, содержащие по 100 колоний, из библиотеки кДНК, обогащенной по специфичным для эпидермиса последовательностям, и гибридизовали их с ^{32}P-мечеными вычтенными кДНК нейроэктодермы и эпидермиса. В результате скрининга был выявлен клон, названный нами *XEp-1*, давший положительный сигнал гибридизации с суммарной вычтенной кДНК эпидермиса, но не с аналогичной кДНК нейроэктодермы. Последующая гибридизация ^{32}P-меченого фрагмента ДНК найденного клона с исходными кДНК нейроэктодермы и эпидермиса выявила для тканей более чем 80-кратную разницу в экспрессии гена *XEp-1* (данные не приведены).

Нозерн-гибридизацией было установлено, что полная длина *XEp-1* мРНК составляет около 650 н.о. (данные не приведены). На рис. 2 представлена нуклеотидная последовательность и соответствующая ей аминокислотная последовательность *XEp-1* (регистрационный номер в GenBank Data Library L10987). В 5'-концевой части гена расположены два ATG-кодона: в положении 45–47 и 136–138. Известно, что для старта трансляции предпочтительно, чтобы ATG-кодон находился в некотором специфическом нуклеотидном окружении: пурин – в положении –3, A и C – в позициях –1, –2, –4 и –5, а также G – в позиции –6 и –9 [15–17]. Из двух ATG-триплетов второй имеет окружение, более близкое к вышеуказанному, и кодирует наиболее длинный белок (136 аминокислотных остатков). Примечательно, что этот белок начинается с гидрофобного лидерного пептида MetArgValLeuProPheLeuAlaIleThrValAlaCysValPheSerThrGlySerGly-. Характерная особенность белка XEp-1 – обилие остатков цистеина (7). Все это, вместе взятое, позволяет предположить, что данный белок является секретируемым фактором.

Анализ ранней экспрессии гена *XEp-1* проводился двумя способами: с помощью ПЦР и гибридизацией in situ на гистологических срезах. В результате было установлено, что впервые в эмбриогенезе мРНК *XEp-1* выявляется на ранних стадиях гаструляции, причем во всей эктодерме (рис. 3). Однако к концу гаструляции и в процессе нейруляции мРНК *XEp-1* исчезает в нейроэктодерме и присутствует только в эпидермисе, где ее концентрация возрастает по сравнению с началом

```
  1  attccactgagcaaggttgtcactgggagagttttcatctgggggATGttattgctttca
 61  aagtagcctgacttgggactcaacggaatcagggactactgtgtcagctgctgtggttcc

121  acttcggctaaaaactATGAGGGTACTTCCCTTCCTGGCTCTCACTGTCGCCTGCGTCTTC
  1                  M  R  V  L  P  F  L  A  I  T  V  A  C  V  F

181  AGCACTGGGTCTGGAGATAATGGAGATTGCTTCTTCTATGATCAGGTCTACAAAGATGGA
 17   S  T  G  S  G  D  N  G  D  C  F  F  Y  D  Q  V  Y  K  D  G

241  GATACTATTAAATATGATTGCCAAATCTGTGAATGTACCAATGGAAGAATTACAGACTGT
 37   D  T  I  K  Y  D  C  Q  I  C  E  C  T  N  G  R  I  T  D  C

301  GCACGTGATGCGAACTGCATCTTTAAAAAGGTGGCTACACCTGAGCAGAATACTGATGCG
 57   A  R  D  A  N  C  I  F  K  K  V  A  T  P  E  Q  N  T  D  A

361  ATAGTCTATGATGATGATGATCCAAATATCATTGAAAGCAGCGAGAGCAAGGGGAATGTT
 77   I  V  Y  D  D  D  D  P  N  I  I  E  S  S  E  S  K  G  N  V

421  CGAGCGAAACGGGCTGCGTCTGGGGACATAAGAAGAACCCCAGTGCTTATGAGACAAACA
 97   R  A  K  R  A  A  S  G  D  I  R  R  T  P  V  L  M  R  Q  T

481  ATAAATTCAAGCCAAACCAAAGCAACCGTAATGATAATGATGACTCAGCAAGGAACTCAA
117   I  N  S  S  Q  T  K  A  T  V  M  I  M  M  T  Q  Q  G  T  Q

541  GGATAGtaacaaagggaaaggacagaaaatcaacaatgtattgtcaaaggattcatctga
      G  TerTer

601  agaaaatgcatctaaagaaaaatggagtcatgaaaagaatgataaaatgaaggacaaaag
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность кДНК и соответствующая ей аминокислотная последовательность белка XEp-1. Подчеркнут лидерный пептид и нуклеотиды, совпадающие с консенсусом окружения для инициирующего триплета ATG. Ter – сигнал терминации трансляции. Жирным шрифтом выделены первые стоп-кодоны и инициирующие триплеты ATG.

гаструляции. Гибридизация in situ показала, что на стадии ранней нейрулы кДНК гена *XEp-1* выявляется только в наружном слое эпидермиса и полностью отсутствует в нейроэктодерме (рис. 4).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага T4, терминальная транскриптаза, Taq-ДНК-полимераза, плазмида pGEM1 (Promega, США). Все олигонуклеотиды были синтезированы Н.С. Быстровым на синтезаторе ASM-102U (Россия).

Выделение РНК. Стадии развития эмбрионов *X. laevis* определяли согласно [18]. Эксплантаты вырезали после удаления зародышевых оболочек в буфере Niu-Twitty [19] на чашке Петри, покрытой слоем 1% агарозы. Суммарную РНК выделяли из 3–6 эксплантатов по стандартной методике с использованием 4 М гуанидинизотиоцианата [2]. Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием реактивов и по протоколу фирмы Amersham в общем объеме 25 мкл.

Вычитающая гибридизация. Образцы кДНК, полученные из 4 эксплантатов презумптивного эпидермиса или нейроэктодермы на стадии поздней гаструлы (стадия 12), амплифицировали с помощью ПЦР, как описано в работе [12]. По 5 нг амплифицированной кДНК подвергали дополнительным 20 циклам ПЦР с Т-праймером (5')GGGAGGCCCC$(T)_{13}$ и С-праймером (5')AAGGAATT$(C)_{13}$

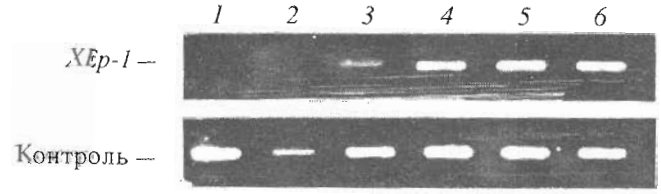

Рис. 3. Гель-электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов амплификации фрагмента гена *XEp-1*., полученных на ранних стадиях развития *X. laevis*: *1* – ооцит, *2* – бластула (стадии 8–9), *3* – ранняя гаструла (10–10.5), *4* – средняя гаструла (11–12), *5* – ранняя нейрула (13–14), *6* – поздняя нейрула (18–20). В качестве контроля проводили амплификацию фрагмента гена α-субъединицы Na, K-ATP-азы, равномерно продуцируемой на ранних стадиях развития.

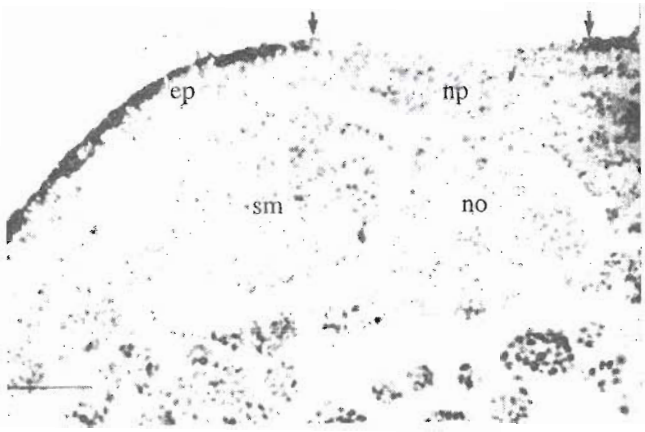

Рис. 4. Микрофотография среза дорсальной стороны зародыша *X. laevis* на стадии ранней нейрулы (×240). Гибридизация in situ с дигоксигенинмеченой РНК, комплементарной гену *XEp-1*. ep – эпидермис, np – нервная пластинка, no – нотохорд, sm – сомиты. Стрелками отмечена граница между эпидермисом и нейроэктодермой. Длина маркера 50 мкм.

в суммарном объеме 1 мл смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 8.3), 50 мМ хлорид калия, 3 мМ хлорид магния, 0.01% желатин, 0.5 мМ dNTP (каждый), по 40 пмоль каждого праймера, 0.05 мМ bio-dUTP и 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы. После экстракции смесью фенол–хлороформ (1 : 1) и переосаждения с этанолом кДНК очищали от Т- и С-праймеров с помощью фракционирования в легкоплавкой агарозе, как это описано ранее [11]. 1 мкг очищенной кДНК использовали для синтеза трейсера в одиночном цикле ПЦР с праймерами M13R-T (5')GAGGAAACAGCTATGACCCGG-GAGGCCCC$(T)_{13}$ и M13D-C (5')GTAAAACGACG-GCCAGTGAATTCCTTAA$(C)_{13}$.

Далее ДНК трейсера денатурировали при 96°C в течение 2 мин и исходную биотинилированную матрицу удаляли после связывания со стрептавидином с помощью фенол-хлороформной экстракции [13]. После очистки от праймеров в агарозном геле трейсер смешивали с 20-кратным избытком биотинилированного драйвера и осаждали этанолом. Осадок растворяли в 5 мкл гибридизационной смеси (0.05 М HEPES, 0.25 мМ EDTA, 0.5 М NaCl, 0.1% SDS, 10 мкг тРНК, по 100 пмоль Т- и С-праймеров) и после денатурации (2 мин при 95°C) подвергали гибридизации при 65°C в течение ночи [20]. После окончания гибридизации к смеси добавляли 100 мкл ТЕ-буфера* с 0.1 М NaCl и биотинилированную ДНК удаляли после связывания со стрептавидином с помощью фенол-хлороформной экстракции. К оставшейся ДНК добавляли 2 мкг драйвера и повторяли цикл гибридизации и удаления биотинилированных гибридов. Амплификацию двухцепочечных молекул трейсера после достройки их 3'-концов осуществляли с помощью *Taq*-полимеразы в течение 30 циклов ПЦР в присутствии M13D-праймера (5')GTAAAACGACGGCCAGTGA и M13R-праймера (5')GAGGAAACAGCTATGACCC. Продукт амплификации разводили в 1000 раз и снова амплифицировали в течение 17 циклов ПЦР с Т- и С-праймерами. Полученную кДНК клонировали в вектор pGEM1 по методике, описанной нами ранее [11].

Секвенирование ДНК гена *XEp-1* в составе ДНК фага M13 проводили по методу Сэнгера [21]. Ошибки в первичной структуре найденного клона исправляли после секвенирования трех независимых перекрывающихся фрагментов кДНК гена *XEp-1*, полученных за 25 циклов ПЦР с первой цепи кДНК.

Уровень экспрессии гена *XEp-1* анализировали методом ПЦР с использованием специфических праймеров (5')GACTTGGGACTCAACGGAATC и (5')GCCCGTTTCGCTCGAACAT, фланкирующих центральную часть кДНК длиной 348 п.о. В качестве матрицы для амплификации использовали первую цепь кДНК, синтезированную с 1 мкг суммарной РНК анализируемых образцов. В контрольном опыте амплифицировали фрагмент (410 п.о.) гена α-субъединицы Na,K-АТР-азы, равномерно экспрессирующего во всей эктодерме. Для амплификации этого фрагмента использовали праймеры (5')ACCGGGACCCTAACGCA-GA и (5')ACGCTCAGGGGCTCCTTTCA [22]. ПЦР проводили в 50 мкл смеси (10 мМ трис-HCl, pH 8.3; 50 мМ хлорид калия; 3 мМ хлорид магния; 0.01% желатин; 0.5 мМ dNTP (каждый); 40 пмоль каждого праймера и 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы) по следующей программе: денатурация ДНК (94°C, 10 с); отжиг праймеров (58°C, 30 с); синтез кДНК (72°C, 30 с). После 25–30 циклов ПЦР продукты анализировали в 1.2% агарозном геле.

Гибридизацию in situ выполняли на эмбрионах альбиносов *X. laevis* с использованием дигоксигенинмеченой РНК, комплементарной (опыт) и гомологичной (контроль) гену *XEp-1*, по методике [23].

Нозерн-блот-гибридизация. Poly(A)-РНК (10 мкг), выделенную из целых зародышей на стадии ранней нейрулы, фракционировали в 1% агарозном геле с формальдегидом [24]. РНК переносили на нейлоновую мембрану Hybond-N (Amersham). В качестве зонда для нозерн-гибридизации использовали ^{32}P-меченый в процессе ПЦР фрагмент гена *Xep-1*.

Саузерн-гибридизацию проводили по стандартной методике [24].

Авторы признательны Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, а также Е.Д. Свердлову и О.Ю. Чертову за помощь в работе и обсуждение полученных результатов.

* 10 мМ трис-HCl, 1 мМ EDTA (pH 8.0).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы "Геном человека" и Российского фонда фундаментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spemann H.* Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale Univ. Press, 1938.
2. *Slack J.M.W.* From Eggs to Embryo. Determinative Events in Early Development. London; New York: Cambridge Univ. Press, 1983.
3. *Kintner C.R., Melton D.A.* // Development. 1987. V. 99. P. 311–325.
4. *Sharpe C.R., Fritz A., De Robertis E.M., Gurdon J.B.* // Cell. 1987. V. 50. P. 749–758.
5. *Sharpe C.R.* // Development. 1988. V. 103. P. 269–277.
6. *Sharpe C.R., Pluck A., Gurdon J.B.* // Development. 1989. V. 107. P. 701–714.
7. *Brivanlou A.M., Harland R.M.* // Development. 1989. V. 106. P. 611–617.
8. *Ruis i Altaba A., Jessel T.M.* // Development. 1992. V. 116. P. 81–93.
9. *Jamrich M., Sargent T.D., Dawid I.B.* // Genes Dev. 1987. V. 1. P. 124–132.
10. *Savage R., Phillips C.R.* // Dev. Biol. 1989. V. 133. P. 157–168.
11. *Belyavsky A., Vinogradova T., Raevsky K.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 2919–2932.
12. *Zaraisky A.G., Lukyanov S.A., Vasiliev O.L., Smirnov Y.V., Belyavsky A.V., Kazanskaya O.V.* // Dev. Biol. 1992. V. 152. P. 373–382.
13. *Barr F.G., Emanuel B.S.* // Anal. Biochem. 1990. V. 186. P. 369–373.
14. *Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M.* // Science. 1993. V. 259. P. 946–951.
15. *Kozak M.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 19867–19871.
16. *Cavener D.R., Ray S.C.* // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 3185–3192.
17. *Tate W.P., Brown C.M.* // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 2443–2450.
18. *Nieuwkoop P.D., Faber J.* Normal Table of Xenopus laevis. 2nd ed. Amsterdam, 1975.
19. *Niu M.E., Twitty V.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1953. V. 39. P. 985–989.
20. *Chomczynski P., Sacchi N.* // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
21. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
22. *Verrey F., Kairous P., Shaerer E., Fuentes P., Geering K., Rossier B.C., Kraehenbuchl G.P.* // Am. J. Physiol. 1989. V. 256. P. 1034–1043.
23. *Harland R.M.* // Methods Cell Biol. 1991. V. 36. P. 685–695.
24. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

A Novel Technique of Subtractive Hybridization of cDNA Permitting the Cloning of Genes Specifically Expressed in Cell Micropopulations

O. L. Vasil'ev*, S. A. Luk'yanov*, A. V. Belyavskii, O. V. Kazanskaya*, and A. G. Zaraiskii***

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia*

Abstract—A novel, efficient and simple technique that combines subtractive hybridization with kinetic enrichment is proposed for obtaining enriched cDNA. The method is based on the use of a set of special primers that allow for the selective amplification by PCR only of differentially distributed sequences. Using the proposed technique, cDNA of a new gene *XEp-1*, specifically expressed in the presumptive epidermis of *Xenopus laevis*, was cloned, starting with the stage of midgastrula.

Key words: polymerase chain reaction, subtractive hybridization, cDNA.