



УДК 577.215.037

## МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ НОРМАЛИЗОВАННЫХ БИБЛИОТЕК кДНК, ОСНОВАННЫЙ НА ЭФФЕКТЕ СУПРЕССИИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 1996 г. К. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская, М. В. Матц, Г. Л. Хаспекон\*,  
Л. Б. Дьяченко\*\*, А. А. Ченчик\*\*, С. Г. Ильевич-Стучков\*, С. А. Лукьянов#

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

\* Кардиологический научный центр РАМН, Москва;

\*\* "Клонтек", Пало Альто, Калифорния, США

Поступила в редакцию 03.04.96 г.

Предложен новый эффективный метод, позволяющий получать библиотеки кДНК с приблизительно равной представленностью всех видов кДНК (так называемые нормализованные библиотеки) всего за один раунд нормализации. Метод основан на различиях в кинетике ренатурации двухцепочечных кДНК разных генов и позволяет производить отбор нормализованной одноцепочечной фракции, образовавшейся в ходе неполной реассоциации образца суммарной кДНК, без использования трудоемких и низкоэффективных стадий физического разделения. Этот отбор происходит в процессе полимеразной цепной реакции (PCR), в ходе которой селективно амплифицируются молекулы, входящие в нормализованную одноцепочечную фракцию. Подавление амплификации остальных молекул достигается с помощью описанного нами ранее эффекта супрессии PCR, состоящего в ингибировании амплификации молекул ДНК, фланкированных длинными инвертированными концевыми повторами, в PCR с праймером, соответствующим внешней половине повтора. Эффективность методики показана на примере создания нормализованной библиотеки кДНК на основе мРНК из активированной клеточной линии Jurkat T-лимфоцитов человека.

*Ключевые слова:* кДНК, представленность мРНК, нормализация.

Подсчитано, что в геноме человека закодировано около 100000 генов, а в разных типах клеток экспрессируется 10000–50000 различных генов [1]. Уровень их экспрессии может варьировать в пределах от 200000 до 1 и менее копий на клетку. По уровню экспрессии гены можно условно разделить на 3 класса: мажорные, средние и минорные. Обычно в клетке экспрессируется: 10–20 мажорных генов (мРНК каждого из которых содержится в количестве нескольких тысяч копий); несколько сотен средних генов (по несколько сотен молекул мРНК каждого вида) и несколько тысяч минорных генов (от одной до нескольких десятков копий каждой мРНК) [2]. Столь большая разница в представленности мРНК чрезвычайно усложняет задачу анализа библиотек кДНК, особенно при работе с редкими генами. Так, интенсивно разрабатываемый в настоящее время про-

ект секвенирования всех кДНК человека требует анализа  $10^6$ – $10^8$  клонов из каждой библиотеки для того, чтобы обнаружить и секвенировать редкопредставленные последовательности, в то время как высоко- и среднепредставленные последовательности окажутся секвенированы по многу раз. Для решения этой проблемы необходимы так называемые нормализованные библиотеки, т. е. библиотеки, в которых разные виды кДНК имеют приблизительно равную представленность. Наиболее эффективный подход к созданию нормализованных библиотек основан на том, что реассоциация денатурированной двухцепочечной ДНК является реакцией второго порядка, и, следовательно, мажорные последовательности реассоциируют значительно быстрее, чем минорные. Таким образом, если образец двухцепочечной кДНК денатурировать и оставить ренатурировать, то основная масса высокопредставленных молекул перейдет в двухцепочечную (ds) форму и одноцепочечная (ss) фракция кДНК станет в значительной мере нормализованной [2]. Отбор этой ss-фракции представляет наибольшую проблему при создании нормализованных библиотек. В ранее опубликованных работах эта проблема

Сокращения:  $\beta$ -act –  $\beta$ -актин,  $\beta_2$ M –  $\beta_2$ -микроглобулин, G3PDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, HEPES – N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота], IL2R – рецептор интерлейкина 2, ITR – инвертированные концевые повторы, PCR – полимеразная цепная реакция, TR – рецептор трансферрина.

# Автор для переписки.

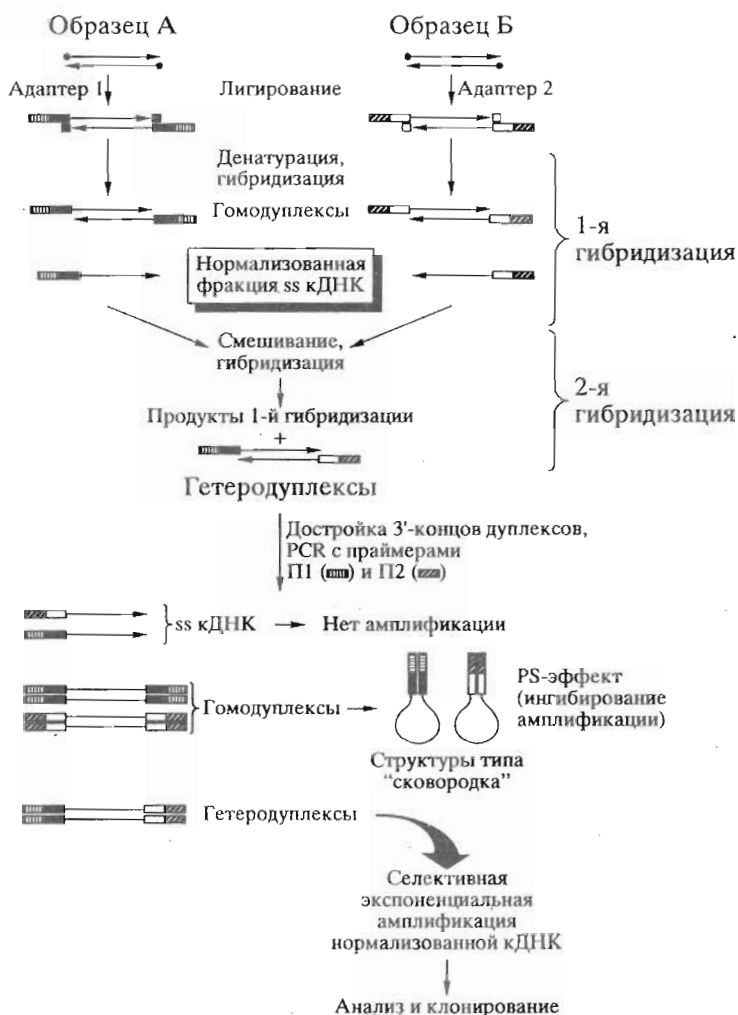


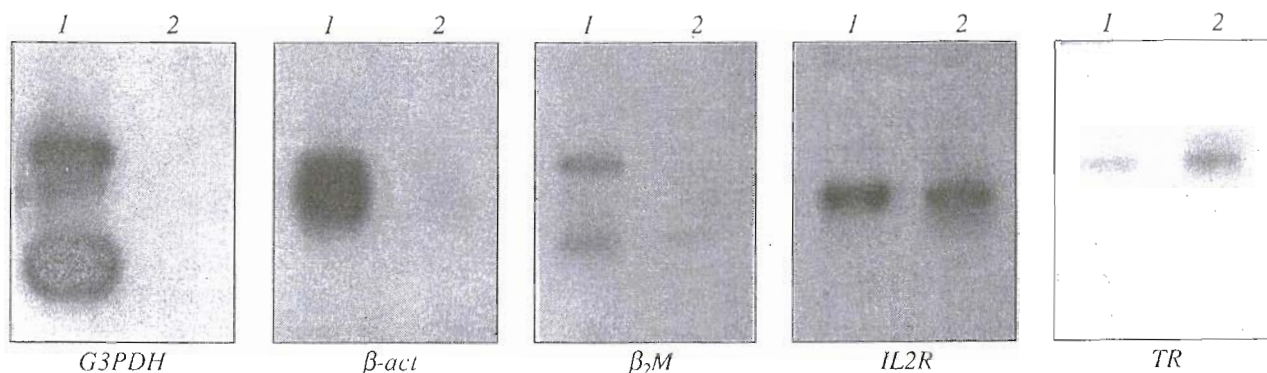
Схема процедуры создания нормализованных библиотек кДНК. Прямоугольники на концах молекул кДНК обозначают последовательности олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих эти молекулы, а также комплементарные им последовательности. Вертикально и наклонно заштрихованные прямоугольники – праймеры П1 и П2 соответственно, а также 5'-концевые (внешние) части адаптеров CA1 и CA2 соответственно. Черный и белый прямоугольники – 3'-концевые (внутренние) части адаптеров CA1 и CA2 соответственно. Стрелками обозначены 3'-концы молекул ДНК.

решалась физическим разделением ss- и ds-фракций с помощью гидроксипатитовых колонок [3–5] или парамагнитных шариков [6]. Подход с применением рестриктаз для уничтожения ds-фракции оказался низкоэффективным [7].

Предлагаемый в данной работе метод основывается на селективной амплификации нормализованной ss-фракции, образовавшейся после частичной реассоциации денатурированной двухцепочечной кДНК. Метод не включает стадий физической сепарации ss- и ds-фракций. Амплификация молекул, оставшихся в ss-фракции, происходит в результате PCR, тогда как молекулы ds-фракции не амплифицируются благодаря эффекту супрессии PCR (PCR Suppression, PS), описанному нами ранее и примененному при создании методов вычитающей гибридизации кДНК

[8–11], “прогулки” по геномной ДНК [12], идентификации последовательностей, окружающих известный фрагмент кДНК [13], и отбора эволюционно консервативных последовательностей [14]. PS-эффект состоит в ингибировании амплификации молекул ДНК, фланкированных инвертированными концевыми повторами (Inverted Terminal Repeats, ITR), в PCR с праймером, соответствующим внешней части ITR, при условии, что длина праймера значительно меньше длины ITR.

Нормализованная библиотека кДНК создавалась по приведенной схеме (на схеме не показаны этапы подготовки кДНК: синтез двухцепочечной кДНК, обработка мелкоцепящей рестриктазой, лигирование адаптера, PCR-амплификация кДНК и повторная обработка той же рестриктазой для удаления последовательности адаптера. Следует



Оценка эффективности процесса нормализации с помощью блот-гибридизации образцов кДНК с фрагментами пяти маркерных генов различной представленности. 1 и 2 – образцы исходной (ненормализованной) и нормализованной кДНК.

отметить, что в зависимости от конкретных задач стадии рестрикции и/или амплификации кДНК могут быть опущены).

кДНК разделяют на два образца (А и В), один из которых лигируют с супрессионным адаптером СА1, а другой – с супрессионным адаптером СА2. Каждый из этих адаптеров формируется двумя олигонуклеотидными цепями неравной длины, причем короткая цепь комплементарна 3'-концевой части длинной. Поскольку олигонуклеотиды не фосфорилированы, лигируется только длинный олигонуклеотид своим 3'-концом к 5'-концу каждой цепи кДНК. Длина адаптеров (43 нуклеотида) позволяет использовать их в дальнейшем в качестве ITR, супрессирующих амплификацию фланкированных ими молекул в PCR с праймером, соответствующим внешним 20 нуклеотидам СА1 или СА2 (PS-эффект). После лигирования образцы А и В денатурируют и оставляют ренатурировать в разных пробирках (первая гибридизация). Поскольку скорость ренатурации индивидуальной последовательности пропорциональна квадрату ее концентрации, мажорные последовательности реассоциируют быстрее, чем минорные, и в результате ss-фракция кДНК становится нормализованной. Ds-фракция после первой гибридизации представлена только гомодуплексами – молекулами, несущими на 5'-концах обеих цепей одинаковые последовательности (СА1 или СА2).

Далее образцы кДНК А и В смешивают (без денатурации) и оставляют ренатурировать совместно (вторая гибридизация). Участвовать во второй гибридизации могут только молекулы, принадлежащие нормализованной ss-фракции. Так как в растворе присутствуют молекулы из обоих образцов, наряду с гомодуплексами формируются гетеродуплексные молекулы, фланкированные с одной стороны последовательностью СА1, а с другой – последовательностью СА2. Таким образом, нормализованная ss-фракция кДНК, образовавшаяся в результате первой гибридизации,

после второй гибридизации частично переходит во фракцию гетеродуплексов. После достройки 3'-концов гетеродуплексные молекулы в отличие от всех остальных могут быть селективно амплифицированы с помощью PCR с праймерами П1 и П2, соответствующими внешней части СА1 и СА2. Амплификация гомогибридных молекул, фланкированных ITR (последовательности СА1 или СА2), будет подавлена образованием в процессе PCR структур типа "сковородка" (PS-эффект). Молекулы, оставшиеся одноцепочечными, не содержат сайта отжига праймера и также не амплифицируются. В результате мы получаем образец селективно амплифицированной нормализованной кДНК.

В качестве модельной системы мы взяли кДНК клеточной линии Jurkat Т-лимфоцитов человека, активированной к иммунному ответу инкубацией с фитогемагглютинином (РНА) и фобол-12-миристаном, 13-ацетатом (РМА). Эффективность процедуры нормализации была проверена блот-гибридизацией образцов амплифицированной кДНК до и после нормализации с радиоактивно мечеными фрагментами пяти маркерных генов: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*G3PDH*),  $\beta$ -актина ( *$\beta$ -act*) (мажорные гены),  $\beta_2$ -микроглобулина ( *$\beta_2M$* ),  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина 2 (*IL2R*) (средние гены) и рецептора трансферрина (*TR*) (редкий ген). Блот-гибридизация (рисунок) показала резкое падение гибридационного сигнала в нормализованной кДНК для *G3PDH* и  *$\beta$ -act*. Представленность  *$\beta_2M$*  уменьшилась в несколько раз, а *IL2R* не изменилась. Гибридационный сигнал для *TR* в несколько раз сильнее в нормализованной кДНК, чем в исходной.

Если принять, что в клетке экспрессируется 10000 генов, то в нормализованной библиотеке представленность каждого гена должна быть около 0.01%. Следовательно, теоретически процесс нормализации должен привести к падению

представленности мажорных последовательностей в несколько десятков или сотен раз, представленность средних генов должна снизиться в несколько раз или вообще не измениться, а представленность редких последовательностей должна в несколько раз возрасти. Таким образом, результаты экспериментальной проверки эффективности предлагаемой методики согласуются с теоретически ожидаемыми.

В отличие от ранее опубликованных наш метод позволяет получать нормализованные библиотеки кДНК всего за один раунд нормализации. Применение PS-эффекта для селективной амплификации нормализованной ss-фракции вместо трудоемкой и низкоэффективной процедуры физического разделения ss- и ds-фракций кДНК на гидроксипатитовых колонках делает методику простой в исполнении и воспроизводимой. Следует отметить, что предлагаемая техника обладает большой гибкостью в отношении стартового материала. Необходимо только наличие двух образцов библиотеки кДНК, в которых молекулы несут на 5'-конце достаточно длинные синтетические последовательности, разные для этих образцов, и не несут на 3'-конце комплементарные им последова-

тельности. Так, в случае кДНК библиотек, синтезированных с использованием концевого присоединения oligo(dA)-последовательности и последующей амплификации с oligo(dT)-содержащим праймером [15], введение таких концевых структур в кДНК удобнее производить не лигированием адаптеров, а либо одним циклом PCR с длинными oligo(dT)-содержащими праймерами (разными для двух образцов) [14], либо многими циклами PCR с этими праймерами и последующей обработкой продукта амплификации экзонуклеазой III [8,9].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание клеточной культуры Jurkat и ее активацию, выделение poly(A)+ РНК, синтез кДНК, обработку кДНК эндонуклеазой рестрикции *RsaI*, лигирование амплификационного *RsaI*-адаптера, амплификацию кДНК, повторную обработку *RsaI* для удаления последовательности адаптера проводили как описано ранее [10].

По 500 нг амплифицированной кДНК в отдельных пробирках лигировали с супрессионными адаптерами CA1:

5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGT  
3' GCCTCCCGCCA

и CA2:

5' AGCAGCGAACTCAGTACAACAАCTCTCCGACCTCTCACCGAGT  
3' GAGAGTGGCTCA

Реакцию проводили при 16°C в течение 15 ч в 50 мкл однократного лигазного буфера (Promega) в присутствии 2 мкМ CA1 или CA2 и 5 ед. акт. ДНК-лигазы (Promega). После этого полученные образцы кДНК А и Б прогревали 5 мин при 70°C для инактивации лигазы и пересаживали этанолом.

Каждый образец затем растворяли в 1 мкл гибридационного буфера (50 мМ HEPES, pH 7.5; 0.5 М NaCl) и закрывали минеральным маслом. После этого образцы кДНК денатурировали (96°C, 1 мин) и оставляли ренатурировать при 68°C в течение 20 ч. После первой гибридизации образцы А и Б объединяли (без денатурации) и опять оставляли ренатурировать в тех же условиях. После второй гибридизации полученный образец разводили 250 мкл буфера (50 мМ HEPES, pH 7.5; 20 мМ NaCl), прогревали (70°C, 5 мин) и хранили при -20°C.

**Селективная амплификация нормализованной кДНК.** К 50 мкл буфера для PCR (20 мМ трис-НСl, pH 8.5; 16 мМ сульфат аммония; 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; 3 мМ MgCl<sub>2</sub>; 250 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфаты) добавляли 1 мкл кДНК, полученной на предыдущей

стадии, доводили температуру до 72°C, после чего добавляли 1 мкл смеси термостабильных ДНК-полимераз [16], приготовленной добавлением 1 мкл *Pfu*-ДНК-полимеразы (2.5 ед. акт./мкл, Stratagene) к 15 мкл *KlenTaq*-ДНК-полимеразы (25 ед. акт./мкл, АВ Peptides). Выдерживали смесь 5 мин при 72°C для достройки 3'-концов дуплексов ДНК, затем поднимали температуру до 85°C и добавляли олигонуклеотидные праймеры П1 (5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAA) и П2 (5' AGCAGCGAACTCAGTACAACA) до концентрации каждого 400 нМ. Далее проводили 25 циклов амплификации на приборе OmniGene (Hybaid) в режиме: 94°C – 3 с; 65°C – 10 с; 72°C – 1 мин. Затем образец обрабатывали смесью фенол-хлороформ (1 : 5) для удаления минерального масла и инактивации ферментов, пересаживали этанолом и растворяли в 50 мкл буфера трис-EDTA [17]. Полученный образец использовали в качестве стартового материала для препаративной амплификации нормализованной кДНК, которую проводили в тех же условиях, но без "горячего" старта.

Для анализа эффективности процедуры нормализации использовали саузерн-блот-гибридизацию продуктов PCR. Образцы амплифицированной

кДНК до и после нормализации фракционировали электрофорезом в 1.5% агарозном геле (по 300 нг на дорожку) и осуществляли перенос на нейлоновые фильтры Hybond-N (Amersham). Фильтры гибридизовали с  $^{32}\text{P}$ -мечеными фрагментами кДНК маркерных генов, полученными с помощью Human Control Amplimer Sets (Clontech) для *G3PDH*,  *$\beta$ -act*,  *$\beta$ 2M*, *IL2R* и *TR*. Амплифицированные фрагменты кДНК этих генов очищали от невключенных нуклеозидтрифосфатов на колонках Wizard PCR Preps (Promega) и затем радиоактивно метили с помощью Prime-a-Gene Labeling System (Promega). Гель-электрофорез, перенос на фильтры и гибридизацию проводили в соответствии со стандартными методиками [17].

Авторы выражают глубокую благодарность Е.Д. Свердлову (ИБХ РАН) за поддержку работы и критическое обсуждение результатов, О.Л. Васильеву (ИБХ РАН) за обсуждение стратегии метода, а также Е.А. Богдановой (ИБХ РАН) за помощь в оформлении статьи. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 94-04-11257-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bishop J.O., Morton J.G., Rosebach M., Richardson M. // *Nature*. 1974. V. 250. P. 199–204.
2. Galau G.A., Klein W.H., Britten R.J., Davidson E.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1977. V. 179. P. 584–599.
3. Ko M.S.H. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 5705–5711.
4. Patanjali S.R., Parimoo S., Weissman S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 1943–1947.
5. Soares M.B., Bonaldo M.F., Jelene P., Su L., Lawton L., Efstratiadis A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 9228–9232.
6. Sasaki Y.F., Ayusava D., Oishi M. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 987–992.
7. Coche Th., Dewez M. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4545–4546.
8. Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарыбыкин В.С., Свердлов Е.Д. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 701–704.
9. Гурская Н.Г., Шагин Д.А., Лукьянов К.А., Вагнер Л.Л., Штутман М.С., Мусаткина Е.А., Моимова Е.В., Татосян А.Г., Лукьянов С.А., Свердлов Е.Д. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 425–431.
10. Gurskaya N.G., Diachenko L., Chenchik A., Siebert P.D., Khaspekov G.L., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Ermolaeva O.D., Lukyanov S.A., Sverdlov E.D. // *Anal. Biochem.* 1996. In press.
11. Diachenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A., Gurskaya N.G., Sverdlov E.D., Siebert P.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 6025–6030.
12. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1087–1088.
13. Chenchik A., Diachenko L., Tarabykin V.S., Lukyanov S.A., Siebert P.D. // *BioTechniques*. 1996. In press.
14. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Копанцев Е.П., Лукьянов С.А. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 49–54.
15. Lukyanov K.A., Launer G.A., Tarabykin V.S., Zarskiy A.G., Lukyanov S.A. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 229. P. 198–202.
16. Barnes W.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 2216–2220.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, 1989.

## A Method for Obtaining Equalized cDNA Libraries Based on Polymerase Chain Reaction Suppression

K. A. Luk'yanov\*, N. G. Gurskaya\*, M. V. Matts\*, G. L. Khaspekov\*\*, L. B. D'yachenko\*\*\*, A. A. Chenchik\*\*\*, S. G. Ipevich-Stuchkov, and S. A. Luk'yanov\*

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

\*\*Cardiological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

\*\*\*Clontech, Palo Alto, California, USA

**Abstract**—A new efficient method for obtaining cDNA libraries with equal representation of all cDNA types (equalized libraries) in a single round of equalization was developed. The method is based on differences in the renaturation kinetics of double-stranded cDNAs of different genes and allows the selection of the equalized single-stranded fraction resulted from the incomplete reassociation of the total cDNA without laborious and inefficient physical separation. The equalized single-stranded fractions are selectively amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplification of other DNA molecules is inhibited due to PCR suppression, i.e. the suppression of amplification of the DNA molecules flanked with long inverted terminal repeats in PCR with a primer corresponding to the external moiety of the repeat. The efficiency of the developed method was estimated in obtaining an equalized cDNA library based on mRNA from the activated human T lymphocyte Jurkat cell line.

*Key words:* cDNA, representation of mRNA, equalization.