



УДК 577.215.037

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ДНК *in vitro* ЗА ОДНУ ПОЛИМЕРАЗНУЮ ЦЕПНУЮ РЕАКЦИЮ

© 1997 г. К. А. Лукьянов, С. А. Лукьянов[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 16.04.97 г. Принята к печати 09.06.97 г.

Предложен улучшенный вариант метода клонирования *in vitro*, описанного нами ранее. Метод позволяет амплифицировать с помощью ПЦР индивидуальные молекулы ДНК, имеющие неизвестные нуклеотидные последовательности, с возможностью их последующего секвенирования. Описанные в данной работе модификации делают возможным клонирование *in vitro* за 40–45 циклов одной ПЦР (исходный протокол требовал две последовательные амплификации). Кроме того, предложено проведение клонирования *in vitro* в специальных 96-луночных планшетах с добавлением в реакционную смесь бромистого этидия. При облучении ультрафиолетовым светом лунки, содержащие амплифицированную ДНК, флуоресцируют, что избавляет от необходимости анализа всех 96 лунок. Улучшенный протокол существенно упрощает и удешевляет получение индивидуальных *in vitro*-клонов.

Ключевые слова: клонирование in vitro, супрессия ПЦР, вычитающая гибридизация кДНК, дифференциальный скрининг, бромистый этидий, 96-луночный планшет.

В последние годы ряд классических методов генной инженерии был улучшен или даже полностью вытеснен методиками, использующими полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Благодаря этому методические процедуры стали гораздо удобнее и быстрее. К тому же технологии, основанные на ПЦР, обычно легче поддаются автоматизации, что в настоящее время становится особенно важным. Однако в области молекулярного клонирования ДНК старые методы сохраняют ведущую роль (клонирование в бактериальных, фаговых и других *in vivo*-системах).

Недавно мы описали новый метод, который позволяет амплифицировать с помощью ПЦР и затем секвенировать индивидуальные молекулы ДНК неизвестной последовательности без использования клонирования *in vivo* [1]. Предложенный метод, названный клонированием *in vitro*, основан на эффекте селективной супрессии ПЦР (ССП-эффекте), который был описан нами ранее [2–4]. ССП-эффект состоит в ингибировании амплификации молекул ДНК, фланкированных инвертированными концевыми повторами (ИКП), в ПЦР с праймером, соответствующим

внешней половине ИКП. Этот эффект, по-видимому, объясняется предпочтительной внутримолекулярной гибридизацией ИКП с образованием структуры типа “сковородка”, закрывающей место посадки праймера.

Метод клонирования *in vitro* включает в себя следующие основные этапы:

1) лигирование подлежащих клонированию фрагментов двухцепочечной ДНК одновременно с двумя разными адаптерами длиной около 40 п. о., которые в дальнейшем могут играть роль ИКП, супрессирующих амплификацию (так называемыми супрессионными адаптерами),

2) многократное разведение полученного образца до получения единичных молекул ДНК в объеме, который будет взят для амплификации,

3) амплификация путем ПЦР индивидуальных молекул ДНК с использованием праймеров, комплементарных внешним 20 нуклеотидам адаптеров.

Полученные таким образом продукты ПЦР, названные *in vitro*-клонами, соответствуют единичным молекулам ДНК, отобранным в результате разведения. Благодаря ССП-эффекту эти фрагменты ДНК обязательно фланкированы последовательностями разных адаптеров, поскольку амплификация молекул, несущих один и тот же адаптер на обоих концах, оказывается подавленной. Наличие уникальной последовательности адаптера позволяет определять нуклеотидную последовательность клонированного фраг-

Сокращения: ИКП – инвертированные концевые повторы, ССП-эффект – эффект селективной супрессии полимеразной цепной реакции, NERES – N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота], SSH (suppression subtractive hybridization) – супрессионная вычитающая гибридизация.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-70-29, факс: (095) 330-65-38, электронная почта: luk@ibch.siobc.ras.ru).

мента ДНК любым методом секвенирования продуктов ПЦР.

Одним из недостатков описанной методики является невозможность получения единичных *in vitro*-клонов в каждой реакции из-за флуктуаций распределения молекул ДНК в растворе [1]. Даже если степень разведения подобрана правильно, единичные *in vitro*-клоны возникают только в 20–30% пробирок. Остальные пробирки или содержат два и более продуктов ПЦР, или остаются пустыми. Это вызывает необходимость анализировать все продукты ПЦР с помощью гель-электрофореза. Кроме того, предложенный ранее [1] протокол клонирования *in vitro* требовал две последовательные амплификации для получения каждого *in vitro*-клона (продукт, полученный в первой ПЦР с использованием праймеров, соответствующих внешним половинам адаптеров, реамплифицировали во второй ПЦР с праймерами, соответствующими внутренним половинам адаптеров). Все это делало получение *in vitro*-клонов достаточно трудоемким и дорогостоящим.

В данной работе мы предлагаем улучшенный протокол клонирования *in vitro* со следующими модификациями:

1) использование пары супрессионных адаптеров с идентичными внешними половинами вместо совершенно отличающихся друг от друга адаптеров. Это позволяет воспроизводимо проводить клонирование *in vitro* за 40–45 циклов одной ПЦР. Амплификация проводится с использованием одного праймера, а не двух, чем, по-видимому, и объясняется воспроизводимость получения продукта [5, 6];

2) осуществление ПЦР в специальных 96-луночных планшетах с добавлением в реакционную смесь бромистого этидия. При облучении ультрафиолетовым светом лунки, содержащие амплифицированную ДНК, флуоресцируют. Это избавляет от необходимости анализировать содержимое всех 96 лунок.

Предлагаемый метод был использован для клонирования *in vitro* и последующего дифференциального скрининга образцов обогащенных кДНК, полученных в результате вычитающей гибридизации. Вычитание проводилось по методу, разработанному нами ранее и названному супрессионной вычитающей гибридизацией (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) [2, 7, 8]. SSH включает в себя следующие основные стадии:

1) присоединение к образцу кДНК трейсера двух супрессионных адаптеров (термины “трейсер”, “драйвер” и “мишень” определены в работе [9]),

2) проведение вычитающей гибридизации трейсера с избытком драйвера,

3) амплификация фракции молекул кДНК трейсера, несущих на своих концах разные суп-

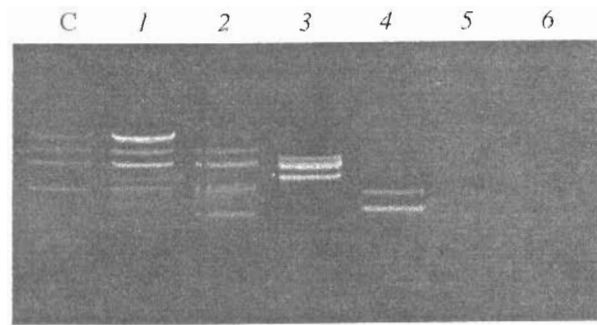


Рис. 1. Эксперимент по подбору разведений образца амплифицированной кДНК для клонирования *in vitro*. Приведен электрофоретический анализ в 2% агарозном геле продуктов амплификации последовательных 3-кратных разведений обогащенной кДНК, полученной в результате модельного вычитания (кДНК скелетной мышцы человека с искусственно добавленной ДНК фага ϕ X174 против исходной кДНК). Дорожка С (здесь и на рис. 2) – образец суммарной обогащенной кДНК (все отчетливо видимые полосы соответствуют фрагментам ДНК ϕ X174/*Hae*III). Дорожки 1–6 – ПЦР с 100, 33, 11, 3.7, 1.2 и 0.4 μ г обогащенной кДНК соответственно (1 μ г = 10^{-18} г).

рессионные адаптеры (эта фракция содержит обогащенную мишень).

Таким образом, после проведения SSH подлежащие клонированию молекулы уже содержат последовательности супрессионных адаптеров, что значительно упрощает клонирование *in vitro*. Следует отметить, что клонированию *in vitro* могут подвергаться образцы кДНК, полученные как на стадии 2 (после вычитающей гибридизации, но до амплификации), так и на стадии 3 (после амплификации суммарного обогащенного образца).

Для проверки эффективности применения клонирования *in vitro* для анализа обогащенных образцов было проведено следующее модельное вычитание. Трейсером служила кДНК скелетной мышцы человека с добавленной в качестве мишени ДНК фага ϕ X174 в количестве 0.05%, драйвером – кДНК скелетной мышцы человека (оба образца были обработаны эндонуклеазной рестрикции *Hae*III). Вычитание проводили по методу SSH [7] с использованием супрессионных адаптеров, имеющих идентичную внешнюю часть. Электрофоретический анализ показал, что после проведения вычитания полосы, соответствующие ДНК ϕ X174/*Hae*III, стали хорошо видны (рис. 1 и 2, дор. С). По данным денситометрического сканирования, эти полосы составляли около 50% обогащенного образца. Следовательно, около половины клонов, полученных при клонировании данного образца, должны содержать ДНК ϕ X174/*Hae*III.

В качестве исходного материала для клонирования *in vitro* были взяты два образца: “а” – неамплифицированная кДНК после вычитающей

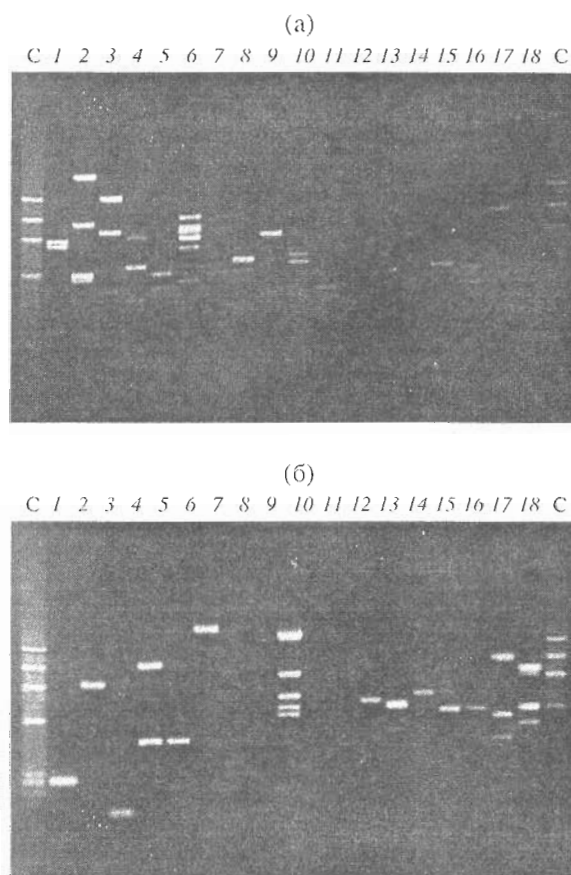


Рис. 2. Электрофорез в 2% агарозном геле панелей клонов, полученных клонированием *in vitro* образцов неамплифицированной (а) и амплифицированной (б) обогащенной кДНК (модельное вычитание). Дорожка С – см. рис. 1. Дорожки 1–18 – панели *in vitro*-клонов.

гибридизации (стадия 2 SSH); “б” – амплифицированная кДНК после вычитающей гибридизации (стадия 3 SSH). Для отбора индивидуальных молекул кДНК была приготовлена серия последовательных разведений обоих образцов. Концентрация способных к амплификации молекул кДНК была определена с помощью амплификации аликвоты каждого разведения.

Типичный результат такой ПЦР выглядит следующим образом (в качестве иллюстрации на рис. 1 приведен электрофоретический анализ продуктов амплификации последовательных разведений образца “б”). Продукты амплификации исходного образца и начальных разведений практически не отличаются друг от друга (на рисунке не показано). Начиная с определенного разведения продукты амплификации начинают выглядеть как отличные друг от друга наборы полос или одиночные полосы (дорожки 1–4). Эти полосы соответствуют индивидуальным молекулам кДНК, попавшим в данное разведение. Амплификация дальнейших разведений не дает продуктов, по-

скольку во взятую аликвоту не попадает ни одной молекулы кДНК (дорожки 5, 6). Таким образом, можно легко подсчитать количество молекул кДНК, присутствующих в единице объема каждого разведения и исходного образца. Для удобства были выбраны разведения, содержащие 5–10 способных к амплификации молекул на 1 мкл, и из них в дальнейшем производился отбор нужного числа молекул кДНК для получения *in vitro*-клонов.

Панели *in vitro*-клонов для образцов “а” и “б” были получены следующим образом. Для каждого образца 180 мкл смеси, содержащей все необходимое для ПЦР и около 50 молекул кДНК, были разделены на 18 пробирок (по 10 мкл в каждую). Таким образом, на каждую пробирку приходилось в среднем по 3 молекулы кДНК и, следовательно, после амплификации пробирки содержали смесь нескольких *in vitro*-клонов. Эту смесь разделяли с помощью агарозного гель-электрофореза (рис. 2). Если считать, что *in vitro*-клоны, совпадающие по электрофоретической подвижности с фрагментами фХ174/*Hae*III, содержат соответствующие фрагменты ДНК фХ174, то в панелях “а” и “б” присутствует 44% (34 из 78) и 45% (20 из 44) таких *in vitro*-клонов соответственно. Выборочная проверка специфичности фрагментов с помощью блот-гибридизации по Саузерну с радиоактивно меченной ДНК фХ174 подтвердила правильность проведенной оценки (не показано).

Поскольку полученные данные о содержании фХ174/*Hae*III в образцах “а” и “б” хорошо совпадают между собой, а также с денситометрической оценкой, можно сделать вывод о воспроизводимости и высокой точности технологии клонирования *in vitro* в приложении к анализу вычитенных образцов. Очевидно, что подвергать клонированию *in vitro* лучше образцы, полученные на стадии 2 SSH (т.е. после вычитающей гибридизации, но до амплификации), поскольку в ходе амплификации на стадии 3 происходит конкуренция между различными видами кДНК, а также накопление нуклеотидных замен.

После модельных экспериментов было проведено клонирование *in vitro* и последующей дифференциальный скрининг реального обогащенного образца. Вычитание (которое будет подробно описано в другой публикации) было сделано по методу SSH [7] с использованием вышеупомянутых супрессионных адаптеров. После вычитающей гибридизации была приготовлена серия 3-кратных последовательных разведений кДНК. Для определения концентрации способных к амплификации молекул кДНК, образовавшихся в ходе вычитающей гибридизации, 1 мкл каждого разведения был амплифицирован. Результат этой ПЦР приведен на рис. 3. В нескольких первых разведениях амплифицированная кДНК выглядит как шмир (от немецкого *schmiere* – мазня) с полосами (дор. 1–3)

или как большое число полос на фоне едва заметного шмира (дор. 4). В последующих разведениях продуктом ПЦР являются отличающиеся друг от друга наборы полос (дор. 5, 6), каждая из которых соответствует индивидуальной молекуле кДНК, попавшей в данное разведение. Таким образом, в разведении № 6 (дор. 6) присутствует около 8 молекул кДНК на 1 мкл.

Чтобы получить одиночные *in vitro*-клоны, анализировать и секвенировать которые значительно проще, чем смесь клонов, была выбрана стратегия, отличающаяся от описанной выше (ср. рис. 2). Если для модельной системы в каждой пробирке амплифицировалось несколько *in vitro*-клонов, то здесь для амплификации было взято столько молекул кДНК, чтобы в каждой пробирке содержалось не более одной молекулы. В этом случае амплификацию удобно проводить в специальных 96-луночных планшетах в присутствии бромистого этидия в составе смеси. Тогда после амплификации лунки, содержащие кДНК, при облучении ультрафиолетовым светом флуоресцируют. Это избавляет от необходимости геле-электрофоретического анализа содержимого всех лунок.

Типичный результат получения *in vitro*-клонов в 96-луночном планшете показан на рис. 4а. Смесь для ПЦР (500 мкл), содержащая приблизительно 30 молекул кДНК (3.5 мкл разведения № 6), была разделена на 96 лунок (по 5 мкл в каждую лунку). После 42 циклов амплификации пробы в 19 лунках флуоресцировали. Электрофоретический анализ показал, что большая часть этих проб (16 из 19) содержит одиночные *in vitro*-клоны (рис. 4б), которые являются удобным материалом для дифференциального скрининга и секвенирования.

На двух 96-луночных планшетах было получено 26 индивидуальных *in vitro*-клонов, которые были подвергнуты дифференциальному скринингу с помощью дот-блот-гибридизации с радиоактивно меченной кДНК трейсера и драйвера (рис. 5). Клоны, которые преимущественно гибридизовались с кДНК трейсера, были успешно напрямую секвенированы с помощью AmpliCycle sequencing kit (Perkin-Elmer).

Следует отметить несколько очевидных преимуществ клонирования *in vitro* по сравнению с клонированием *in vivo*.

1. Для клонирования *in vitro* используется только ПЦР вместо продолжительных процедур клонирования в бактериях или фагах и последующего выделения ДНК или амплификации вставок путем ПЦР (при дифференциальном скрининге использование чистой ДНК вместо бактериальных колоний или фаговых бляшек дает значительный выигрыш в чувствительности).

2. Хотя клонирование *in vitro* требует более чем 40 циклов ПЦР, точковые нуклеотидные замены, внесенные термостабильной ДНК-полиме-

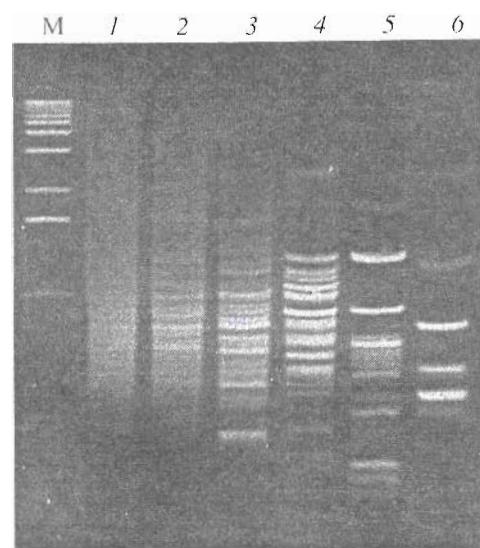


Рис. 3. Электрофорез в 2% агарозном геле продуктов ПЦР последовательных 3-кратных разведений не-амплифицированной вычтенной кДНК. Дорожка М – маркер длин (1 kb ladder, Gibco BRL). Дорожки 1–6 – ПЦР с 100, 33, 11, 3.7, 1.2 и 0.4 пг исходной кДНК трейсера соответственно.

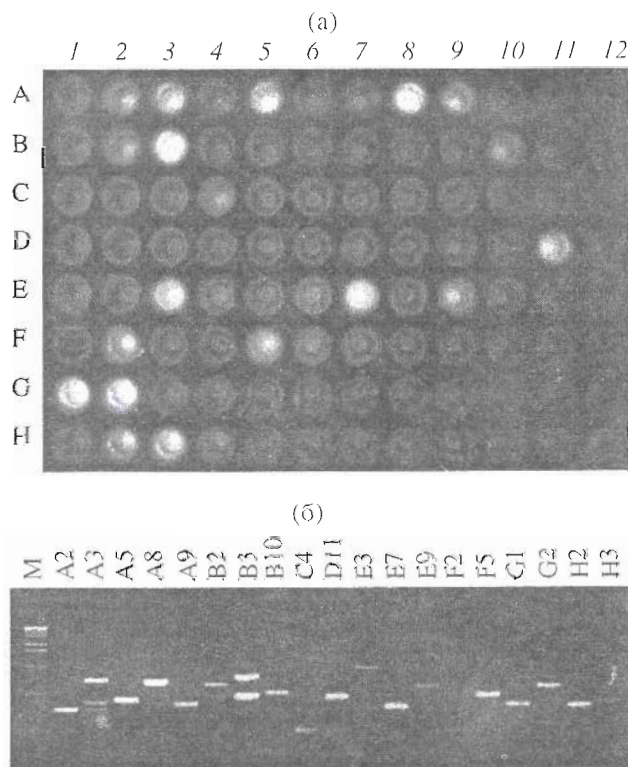


Рис. 4. Типичный результат клонирования *in vitro* в 96-луночном планшете в присутствии бромистого этидия: (а) – планшет в проходящем ультрафиолетовом свете после ПЦР; (б) – электрофорез в 2% агарозном геле продуктов ПЦР из окрашенных бромистым этидием проб (2 мкл из каждой пробы). Дорожка М – маркер длин (1 kb ladder, Gibco BRL). Над остальными дорожками указаны номера соответствующих лунок планшета.

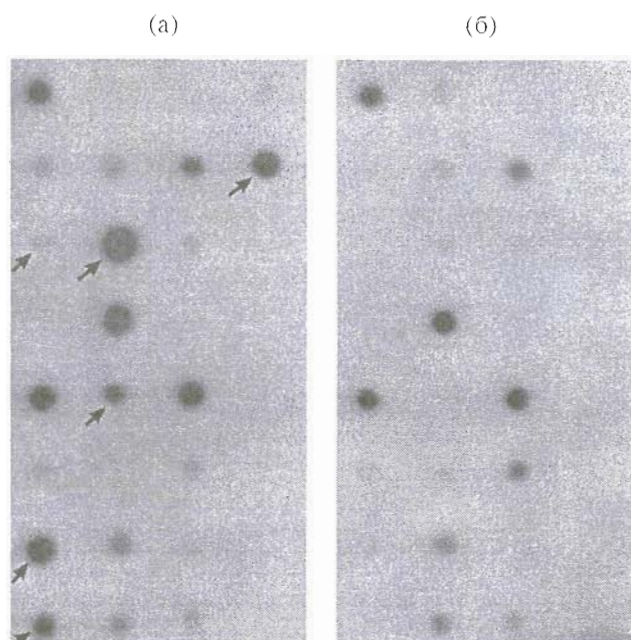


Рис. 5. Результат гибридизации 26 *in vitro*-клонов из вычтенного образца кДНК с радиоактивно меченой кДНК трейсера (а) и драйвера (б). Дифференциальные сигналы указаны стрелками.

разой, не выявляются прямым секвенированием *in vitro*-клонов по причине случайного распределения этих замен между молекулами ДНК в каждой образце *in vitro*-клона. В то же время обычное клонирование вычтенных образцов, полученных с помощью ПЦР (метод SSH требует около 40 циклов амплификации), приводит к выявлению нуклеотидных замен.

3. Клонирование *in vitro* решает проблему конкуренции в скорости амплификации и в эффек-

тивности клонирования между разными последовательностями в составе сложных смесей кДНК. Например, частой причиной артефактов при обычном клонировании сложных образцов амплифицированной кДНК является избыточное количество циклов ПЦР. После насыщения амплификации в ходе последующих температурных циклов из-за нехватки праймеров кДНК остается денатурированной. После окончания ПЦР только частопредставленные виды кДНК успевают ренатурировать и перейти, таким образом, в подходящую для клонирования форму. Редкие виды кДНК преимущественно остаются в одноцепочечной форме и поэтому элиминируются из клонированной библиотеки. В результате представленность полученной библиотеки не соответствует таковой исходного образца.

Метод клонирования *in vitro* может применяться для решения широкого ряда задач молекулярной биологии вместо обычного клонирования в бактериальных, фаговых и других *in vivo*-системах. Предлагаемый метод особенно удобен в тех случаях, когда необходимо получить не более чем несколько десятков клонов (например, для дифференциального скрининга, субклонирования длинных фрагментов ДНК, клонирования продуктов ПЦР с низкой сложностью и др.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез двухцепочечной кДНК на основе poly(A) + РНК, обработку *Hae*III, лигирование псевдодвухцепочечных супрессионных адаптеров, вычитающую гибридизацию и последующую амплификацию обогащенного образца проводили как описано ранее [7], используя другие супрессионные адаптеры (идентичные внешние части адаптеров подчеркнуты):

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

3'CGGCTCCA

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT

3'CCCGTCCA

Разведение кДНК для клонирования *in vitro* проводили в буферном растворе, содержащем 10 мМ HEPES (pH 7.5) и 50 мМ NaCl.

Амплификацию кДНК проводили в смеси для ПЦР, содержащей 40 мМ трицин-КОН (pH 9.2 при 22°С), 3.5 мМ Mg(OAc)₂, 10 мМ KOAc, 75 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 200 мкМ нуклеозидтрифосфаты, 0.5 мкМ праймер, соответствующий внешней части супрессионных адаптеров (5'GTAATACGACTCACTATAGGGC), 2 мкг/мл бромистого этидия (только для ПЦР в

96-луночных планшетах) и смесь термостабильных полимераз Advantage KlenTaq Polymerase Mix (CLONTECH), которая включает в себя KlenTaq-1 [10] и DeepVent ДНК-полимеразы, а также анти-тела TaqStart (CLONTECH), обеспечивающие горячий старт амплификации [11]. Достройка 3'-концов кДНК, в результате которой возникает место отжига амплификационного праймера, происходила во время нагревания реакционной смеси перед первой денатурацией. Амплификацию в пробирках осуществляли на приборе Perkin-Elmer 480

Thermal Cycler в следующем температурном режиме: 94°C, 30 с; 66°C, 30 с; 72°C, 1 мин. Амплификацию в 96-луночных планшетах проводили без минерального масла на приборе MJ Research PTC Peltier Thermal Cycler с горячей крышкой, используя следующий температурный режим: 94°C, 10 с; 66°C, 30 с; 72°C, 1 мин. Амплификацию одиночных молекул кДНК вели в течение 42 циклов ПЦР. Образцы суммарной обогащенной кДНК получали за 28 циклов ПЦР, взяв на старт приблизительно 10 000 молекул кДНК.

Дифференциальный скрининг. Одиночные *in vitro*-клоны, полученные клонированием *in vitro* в 96-луночных планшетах, разводили в 3 раза водой и наносили на два нейлоновых фильтра Hybond (Amersham) в одинаковом порядке (по 2 мкл в точку). Фильтры помещали в денатурирующий буфер (0.4 М NaOH, 1.5 М NaCl), затем в нейтрализующий буфер (1 М трис-HCl, pH 7.0, 1.5 М NaCl) и высушивали. ДНК пришивали к мембране ультрафиолетовым светом с помощью прибора UV Stratalinker (Stratagene). Один фильтр гибридизовали с радиоактивно меченной кДНК трейсера, другой – с кДНК драйвера. Зонды синтезировали с рассеянной затравки с помощью DECAprime II DNA labeling kit (Ambion), на каждый зонд брали 50 нг кДНК и 50 мкКи [α -³²P]dCTP (Amersham). Зонды очищали с помощью гель-фильтрации на колонках Chroma Spin-100 (CLONTECH). Гибридизацию проводили в растворе ExpressHyb (CLONTECH) 5 ч при 68°C. Фильтры отмывали при 68°C по стандартному протоколу [12] и экспонировали с рентгеновской пленкой (Kodak) 40 ч при -70°C.

Авторы благодарят акад. РАН Е.Д. Свердлова за внимание к работе и обсуждение результатов.

Работа поддержана CLONTECH Laboratories Inc. (США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lukyanov K.A., Matz M.V., Bogdanova E.A., Gurskaya N.G., Lukyanov S.A. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 24. P. 2194–2195.
2. Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарабыкин В.С., Свердлов Е.Д. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 701–704.
3. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1087–1088.
4. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Копанцев Е.П., Лукьянов С.А. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 49–54.
5. Mullis K.B. // PCR Methods Applic. 1991. V. 1. P. 1–4.
6. Lukyanov K.A., Launer G.A., Tarabykin V.S., Zarsky A.G., Lukyanov S.A. // Anal. Biochem. 1995. V. 229. P. 198–202.
7. Diatchenko 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.
8. Gurskaya N.G., Diatchenko 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. V. 240. P. 90–97.
9. Свердлов Е.Д., Ермолаева О.Д. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 1081–1088.
10. Barnes W.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 2216–2220.
11. Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A. // BioTechniq. 1994. V. 16. P. 1134–1137.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

In vitro Cloning of DNA Fragments Using One Polymerase Chain Reaction

K. A. Lukyanov and S. A. Lukyanov

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

Abstract—An improved version of the *in vitro* DNA cloning method described earlier is proposed. The method allows amplification by polymerase chain reaction (PCR) of individual DNA molecules of an unknown primary structure followed by sequencing. The modifications described here provide for *in vitro* cloning by means of a 40–45-cycle PCR (the original protocol required two consecutive amplifications). In addition, the *in vitro* cloning is suggested to be carried out in special 96-well plates in the presence of ethidium bromide; upon UV irradiation, the wells containing amplified DNA fluoresce to make the analysis of all 96 wells unnecessary. The improved protocol makes the preparation of individual *in vitro* clones more straightforward and less expensive.

Key words: *in vitro* cloning, PCR suppression, subtractive cDNA hybridization, differential screening, ethidium bromide, 96-well plate