



УДК 577.215.037

СЕЛЕКТИВНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ЭВОЛЮЦИОННО КОНСЕРВАТИВНЫХ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

© 1996 г. К. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская, Е. П. Копанцев, С. А. Лукьянов[#]

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

Поступила в редакцию 04.04.95 г.

Предложен эффективный метод клонирования последовательностей, общих для двух образцов кДНК. Метод использован для создания библиотеки экспрессирующихся последовательностей, эволюционно консервативных для человека и хомячка. На основе анализа выборки клонов показано, что полученная библиотека содержит практически 100% высококонсервативных клонов.

Ключевые слова: библиотека кДНК, общие последовательности, клонирование, полимеразная цепная реакция, эволюционная консервативность, человек, хомячок.

В настоящее время опубликовано лишь несколько работ по клонированию последовательностей, общих для двух образцов ДНК [1 - 3]. Все они направлены на анализ геномной ДНК с целью поиска хромосомспецифических последовательностей [1, 2] или идентификации эволюционно консервативных районов на данном участке хромосомы [3]. В данной работе описан метод получения библиотек экспрессирующихся последовательностей, общих для двух образцов биологического материала. Метод использован для выявления эволюционно консервативных последовательностей кДНК.

Предложенный метод основан на эффекте селективного ингибирования полимеразной цепной реакции (PCR), который был впервые использован в нашей предыдущей работе для создания высокоэффективного метода вычитающей гибридизации кДНК [4]. Этот 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 (рис. 1). Этот факт объясняется следующим образом. На каждом цикле PCR после денатурации в процессе охлаждения образца внутримолекулярная гибридиза-

ция ITR (самоотжиг) происходит раньше, чем отжиг праймера, поскольку температура самоотжига ITR выше температуры отжига праймера. Только небольшая часть молекул ДНК достигает температуры отжига праймера без формирования структуры типа “сковородка”, закрывающей сайт посадки праймера. Те молекулы, на которые праймер все-таки отжигается, после синтеза ДНК

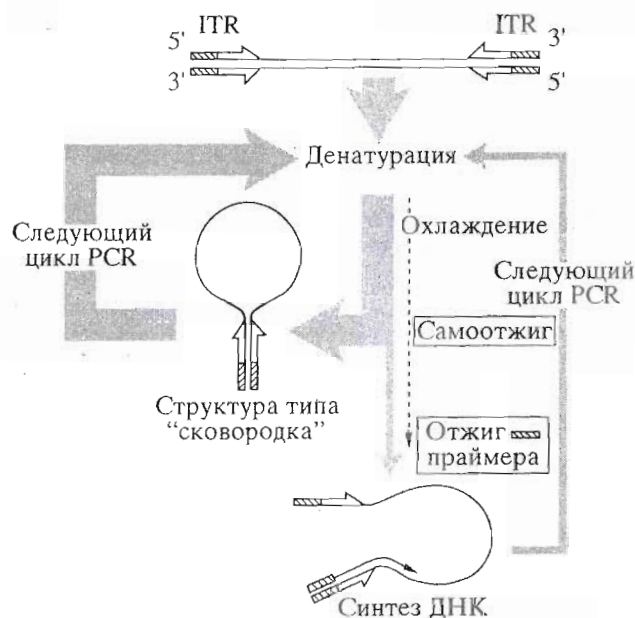


Рис. 1. Схема эффекта ингибирования амплификации молекул ДНК, фланкированных ITR, в PCR с праймером, соответствующим внешней части ITR. Толщина стрелок отражает количество молекул ДНК, участвующих в данном процессе.

Сокращения: EST – экспрессирующаяся последовательность, NERES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, ITR – инвертированные концевые повторы, PABP – poly(A)-связывающий белок, PCR – полимеразная цепная реакция, 3'UTR – 3'-концевая некодирующая область, кДНК – ДНК, комплементарная мРНК.

[#] Автор для переписки.

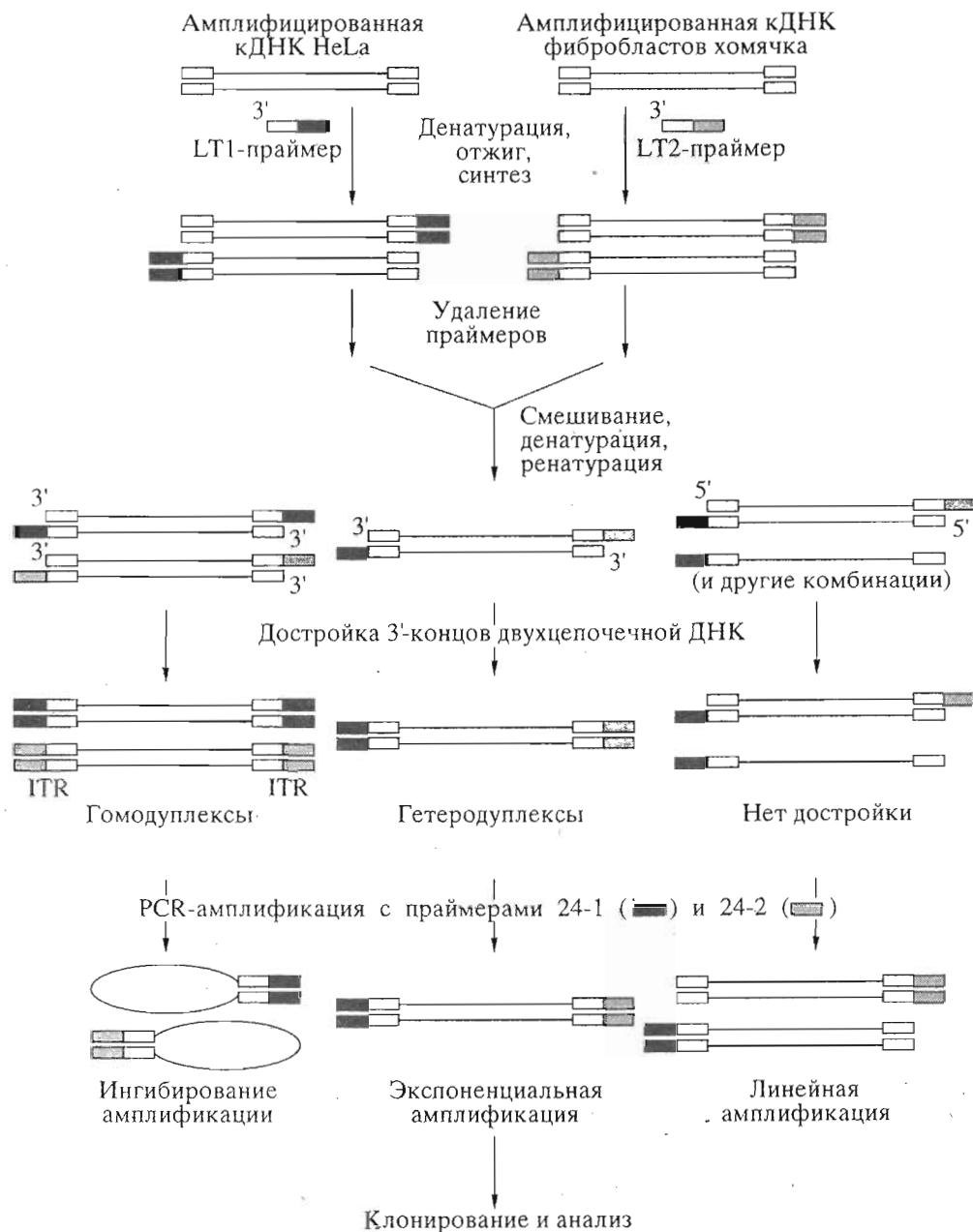


Рис. 2. Схема процедуры клонирования консервативных последовательностей. Прямоугольники на концах молекул кДНК обозначают последовательности праймеров, фланкирующих эти молекулы, а также комплементарные им последовательности. Белый прямоугольник соответствует Т-праймеру; черный – 5'-концевой части LT1-праймера, а также праймеру 24-1; заштрихованный – 5'-концевой части LT2-праймера, а также праймеру 24-2.

восстанавливают исходную структуру, что обеспечивает сохранение ингибиторного эффекта на дальнейших циклах PCR.

В методе, описанном ниже, в общем (высококонсервативные) для двух изучаемых образцов молекулы кДНК вводятся некомплементарные друг другу 3'- и 5'-концевые части, позволяющие вести амплификацию с соответствующих праймеров, в то время как низкоконсервативные последовательности получают ITR и их амплификация блокируется.

Метод был применен для поиска экспрессирующихся последовательностей, консервативных для человека и хомячка. В качестве клеточных образцов были взяты клеточная линия HeLa и клеточная линия фибробластов китайского хомячка. Для поиска консервативных экспрессирующихся последовательностей мы использовали кДНК-копии мРНК, амплифицированные с помощью PCR как описано нами ранее [5]. Синтез образцов амплифицированной кДНК включал следующие этапы: а) синтез первой цепи кДНК с

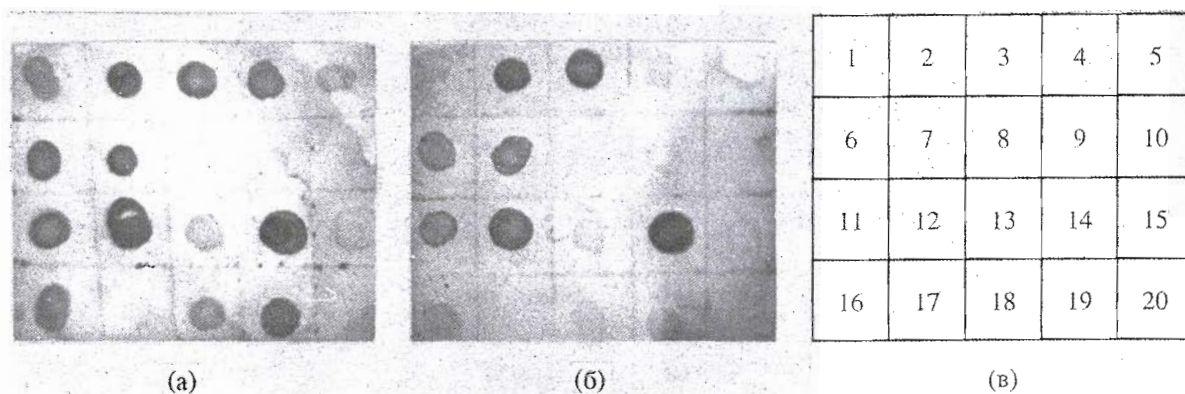


Рис. 3. Блот-гибридизация плазмидной ДНК клонов СС1 - СС20 с биотинмеченой кДНК человека (а) и хомячка (б). Порядок расположения клонов на фильтрах показан справа (в).

oligo(dT)-содержащего праймера (Т-праймера); б) присоединение к первой цепи кДНК oligo(dA)-последовательности с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы; в) PCR с Т-праймером.

Каждая из цепей полученных таким образом двухцепочечных молекул кДНК с одной стороны была фланкирована последовательностью Т-праймера, а с другой – комплементарной этому праймеру последовательностью. Дальнейшие этапы предлагаемой методики изображены на рис. 2. Сначала в результате одного цикла PCR с длинным Т-праймером (LT-праймером) была получена кДНК, имеющая на одном конце каждой цепи последовательность LT-праймера, а на другом – последовательность, комплементарную Т-праймеру. LT-праймер приблизительно в 2 раза длиннее Т-праймера, и его 3'-концевая часть повторяет последовательность Т-праймера. В два сравниваемых образца кДНК были введены два разных LT-праймера (LT1 и LT2), различающихся своей 5'-концевой частью. Затем была проведена денатурация и совместная ренатурация образцов. В процессе ренатурации молекулы кДНК могли: 1) остаться в одноцепочечной форме; 2) образовать дуплекс с молекулой из своего образца (гомодуплекс); 3) образовать дуплекс с молекулой из другого образца (гетеродуплекс). Для высококонсервативных молекул скорости образования гомо- и гетеродуплексов практически равны. Чем меньше степень гомологии между молекулами из разных образцов, тем ниже скорость их гибридизации. Следовательно, низкоконсервативные последовательности преимущественно образовывали гомодуплексы, что привело к обогащению фракции гетеродуплексов высококонсервативными молекулами.

Далее 3'-концы двухцепочечных молекул кДНК были достроены с помощью Taq-полимеразы, после чего кДНК была амплифицирована в PCR с 24-звенными праймерами 24-1, 24-2, идентичными 5'-концевым частям праймеров LT1 и

LT2. Из рис. 2 видно, что после достройки 3'-концов обе цепи гомодуплексов оказались фланкированы ITR (последовательности LT1- или LT2-праймера и им комплементарные), а цепи гетеродуплексов имели некомплементарные друг другу 3'- и 5'-концы, позволяющие амплифицировать такие молекулы. Поскольку молекулы с ITR образуют структуры типа "сковородка", блокирующие их амплификацию, в результате PCR был получен образец амплифицированной кДНК, обогащенный высококонсервативными последовательностями, который затем был клонирован в вектор pTZ18R по *SalI*-сайту.

Консервативность 20 случайно выбранных клонов (названных СС1 - СС20) была оценена с помощью сравнительной дот-гибридизации (рис. 3). В качестве зондов была использована амплифицированная кДНК человека (а) и хомячка (б), меченная биотином; на фильтры наносили плазмидную ДНК из клонов. Как видно из рис. 3, большинство клонов дают гибридизационные сигналы приблизительно равной интенсивности, что указывает на высокую степень гомологии этих последовательностей у человека и хомячка. Для оценки эффективности предлагаемого метода отбора консервативных последовательностей был проведен более подробный анализ тех клонов, которые по результатам дот-гибридизации выглядели наименее консервативными. Вставки из пяти клонов (СС1, СС4, СС16, СС18 и СС19), которые давали наибольшую разницу в гибридизационных сигналах, были частично или полностью секвенированы, и полученные последовательности были проанализированы с помощью пакета программ "Fasta" EMBL Data Library.

Результаты анализа показали, что два клон (СС16 и СС18) содержат фрагменты 3'-концевой некодирующей области (3' UnTranslated Region – 3'UTR) кДНК гистона H3.3. Полученные последовательности, по-видимому, принадлежат кДНК хомячка, поскольку отличаются от зарегистрированных последовательностей гистона H3.3

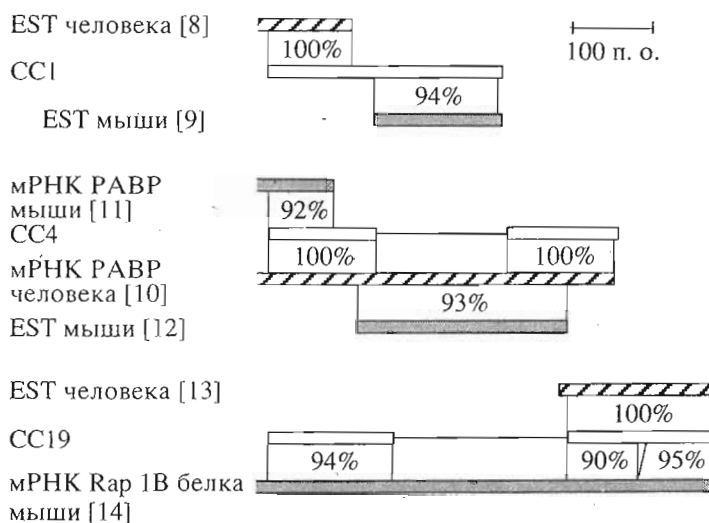


Рис. 4. Сравнение последовательностей фрагментов кДНК из клонов СС1, СС4 и СС19 с соответствующими последовательностями человека и грызунов. Белые прямоугольники обозначают отсекуенные участки изолированных нами клонов; заштрихованные – последовательности человека; серые – последовательности грызунов. Тонкие вертикальные или наклонные линии соединяют участки ДНК, для которых указан процент гомологии.

человека [6]. Эволюционная консервативность 3'UTR гистона H3.3 весьма высока: более 97% гомологии между различными видами млекопитающих [7] и 85% гомологии между человеком и цыпленком [6].

Ближайшие гомологи фрагментов кДНК из клонов СС1, СС4 и СС19 схематически показаны на рис. 4. Вставка клона СС1 своими разными частями оказалась гомологичной экспрессирующимся последовательностям (Expressed Sequence Tag – EST) человека [8] и мыши [9] на 100 и 94% соответственно. Анализ последовательностей СС1 и EST человека на наличие открытой рамки считывания показал, что большая часть клона СС1 содержала не кодирующую последовательность (3'UTR) и только 45 п. о. из 308 могли принадлежать кодирующей области.

Клон СС4 содержал 3'UTR (целиком) и два последних нуклеотида стоп-кодона кодирующей части кДНК poly(A)-связывающего белка (Poly(A)-Binding Protein – РАВР) человека [10]. мРНК этого белка из мыши и человека гомологичны на 92% в 3'UTR, однако 3'UTR мышинового транскрипта значительно короче [11]. Существование EST мыши [12], на 93% гомологичной дистальной части 3'UTR мРНК РАВР человека, позволяет предполагать наличие у мыши и более длинных транскриптов гена этого белка.

Клон СС19 содержал фрагмент кДНК человека (100% гомология с EST человека [13]), высокогомологичный дистальной части 3'UTR мРНК белка Rap1В из крысы [14]. Так, один конец вставки клона СС19 был гомологичен крысиной последовательности на 94%, а другой – на 87%.

Относительно низкий процент гомологии второго конца связан с наличием небольшой вставки (11 п. о.) в человеческой кДНК. По обе стороны от вставки гомология составляет 90 и 95%.

Таким образом, 5 секвенированных клонов (наименее консервативных по данным дот-гибридизации) содержали фрагменты кДНК, в основном имеющие более 90% гомологии между соответствующими последовательностями человека и грызунов. Опираясь на данные дот-гибридизации, можно заключить, что остальные 15 клонов содержат столь же или даже более консервативные фрагменты кДНК. Даже среди высококонсервативных 3'UTR, рассматриваемых в обзоре [15], такой процент гомологии на протяженных участках встречается редко. Разница в гибридизационных сигналах (см. рис. 3), по-видимому, объясняется разным уровнем экспрессии данных генов в анализированных клеточных линиях.

Человек и грызуны дивергировали в процессе эволюции около 75 млн. лет назад [15]. Показано, что эволюционно нейтральные последовательности ДНК изменяются со скоростью приблизительно 1% за 1 млн. лет, что соответствует всего 52% гомологии через 75 млн. лет [15]. Консервативность 3'UTR, наблюдаемая у многих генов, говорит о высокой функциональной значимости этого района. В настоящее время роль 3'UTR активно изучается, и для некоторых транскриптов показано, что 3'UTR принимает участие в регуляции трансляции, деградации и внутриклеточной локализации мРНК [обзор 16]. Обычно поиск консервативных участков ДНК ведется путем сравнения уже известных последовательностей, принадлежащих различным организмам. Наша

методика может применяться для обнаружения новых консервативных и, следовательно, функционально важных, экспрессирующихся последовательностей путем их селективного клонирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение суммарной РНК. Образцы клеточных культур HeLa и фибробластов китайского хомячка (по 5×10^6 клеток) суспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоционат; 30 мМ ацетат натрия, pH 7.0; 0.5% саркозил). После интенсивного встряхивания на вортексе добавляли 160 мкл уравновешенного дис-

тиллированной водой фенола и 160 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24 : 1). После интенсивного встряхивания смесь центрифугировали при 12000g 10 мин, переносили водную фазу в новую пробирку. Экстракцию смесью фенола с хлороформом (1 : 1) проводили 3 раза до исчезновения интерфазы. К водной фазе добавляли 2.5 объема этанола. Затем, после выдерживания пробирки в течение 2 ч при -20°C , центрифугировали при 12000g 20 мин. Осадок РНК растворяли в 200 мкл воды и использовали для синтеза кДНК.

В нашей работе были использованы следующие олигонуклеотидные праймеры (5' - 3'):

1. Т-праймер	CGCAGTTCGACCG(T) ₁₃
2. LT1-праймер	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCAGTTCGACCG(T) ₁₃
3. LT2-праймер	ACCGACGTGGACTATCCATGAACGCAGTTCGACCG(T) ₁₃
4. 24-1-праймер	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA
5. 24-2-праймер	ACCGACGTGGACTATCCATGAACG

Синтез первой цепи кДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) в объеме 30 мкл в присутствии 20 пмоль Т-праймера в качестве затравки. На реакцию брали по 3 мкг тотальной РНК.

Присоединение oligo(dA)-последовательности к первой цепи кДНК. Образцы первой цепи кДНК дважды осаждали этанолом для удаления нуклеозидтрифосфатов. 0.3 мкг первой цепи кДНК инкубировали с 10 ед. акт. терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы в 20 мкл буфера для этого фермента (Promega) в присутствии 200 мкМ dATP при 37°C в течение 15 мин.

Аmplификацию тотальной кДНК проводили в 50 мкл смеси для PCR (67 мМ трис-НСl, pH 8.3; 17 мМ сульфат аммония; 3 мМ хлорид магния; 0.01% бычий сывороточный альбумин; dNTP (250 мкМ каждый); 1 ед. акт. Taq-полимеразы), содержащей 0.4 мкМ Т-праймер и 15 нг кДНК с предыдущей стадии. PCR проводили на приборе DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus) в следующем режиме: денатурация ДНК – 92°C , 15 с, отжиг праймеров – 60°C , 15 с, синтез ДНК – 72°C , 2 мин; 20 циклов. Далее образцы осаждали этанолом.

Введение в кДНК последовательностей длинных Т-праймеров. К 2 мкг кДНК человека и хомячка, амплифицированной с Т-праймером, добавляли по 75 мкл смеси для PCR, содержащей 1 мкМ праймер LT1 или LT2 соответственно, и проводили 1 цикл PCR (94°C , 30 с; 60°C , 30 с; 72°C , 2 мин). Далее образцы очищали от праймеров с помощью Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega).

Гибридизация и последующая амплификация кДНК. По 0.5 мкг полученных на предыдущей ста-

дии кДНК человека и хомячка смешивали, осаждали этанолом и растворяли в 1 мкл гибридационного буфера (50 мМ HEPES, pH 7.5; 0.5 М NaCl; 0.1% SDS; 15 мкМ Т-праймер). Затем гибридационную смесь закрыли минеральным маслом, прогрели 2 мин при 100°C и инкубировали 16 ч при 68°C . К ренатурированной кДНК добавляли 400 мкл буфера (10 мМ трис-НСl, pH 7.0, с 50 мМ NaCl). К 1 мкл полученной кДНК добавляли 50 мкл смеси для PCR, не содержащей хлорид магния и Taq-полимеразу, и нагревали до 72°C , после чего добавляли хлорид магния до 3 мМ, 1 ед. акт. Taq-полимеразы, праймеры 24-1 и 24-2 до концентрации каждого 0.3 мкМ и провели 30 циклов PCR (92°C , 15 с; 72°C , 2 мин).

Клонирование кДНК, обогащенной консервативными последовательностями. Полученный на предыдущей стадии образец амплифицированной кДНК был обработан эндонуклеазой рестрикции *SalI* (сайт узнавания для этого фермента присутствует в Т-праймере) и клонирован в вектор pTZ18R. Процедуры рестрикции, лигирования, трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α и выделения плазмидной ДНК были проведены в соответствии со стандартными протоколами [17].

Анализ клонов. Плазмидную ДНК из 20 случайно выбранных клонов наносили на нитроцеллюлозные фильтры Hybond-N (Amersham) (по 200 нг в точку) и гибридизовали с образцами Biotin-11-dUTP-меченых амплифицированных кДНК клеточных культур HeLa и фибробластов китайского хомячка. Гибридизацию проводили при 68°C в стандартном буфере [17], фильтры отмывали при 68°C в $0.2 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ – 150 мМ

NaCl, 15 mM цитрат натрия) с 0.1% SDS. Мечение кДНК и окрашивание фильтров осуществляли в соответствии со стандартными протоколами [17].

Авторы выражают глубокую благодарность Е.Д. Свердлову за критическое обсуждение результатов, Е.А. Богдановой и М.В. Матцу за помощь в подготовке и оформлении статьи, а также В.К. Потапову за синтез олигонуклеотидных праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Aslanidis C., de Jong P.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 6765 - 6769.
2. *Brookes A.J., Porteous D.J.* // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 2609 - 2613.
3. *Sedlacek Z., Konecki D.S., Siebenhaar R., Kioschis P., Poustka A.* // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3419 - 3425.
4. *Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарабыкин В.С., Свердлов Е.Д.* // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 701 - 704.
5. *Lukyanov K.A., Launer G.A., Tarabykin V.S., Zairaisky A.G., Lukyanov S.A.* // Anal. Biochem. 1995. V. 229. P. 198 - 202.
6. *Wells D., Hoffman D., Kedes L.* // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 2871 - 2889 (EMBL Data Library Accession Numbers X05857, Y00108).
7. *Chalmers M., Wells D.* // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3075 - 3075 (EMBL Data Library Accession Number X51897).
8. *Okubo K., Fukushima A., Yoshii J., Niiyama T., Kojima Y., Yoshinari H., Arimoto J., Matsubara K.* // EMBL Data Library Accession Number D20420.
9. *Davies R.W., Roberts A.B., Morris A.J., Griffith G., Jerecic J., Ghandi S., Kaiser K., Savioz A.* // EMBL Data Library Accession Number Z36397.
10. *Grange T., Martin de Sa C., Oddos J., Pictet R.* // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 4771 - 4787 (EMBL Data Library Accession Number Y00345).
11. *Wang M., Cutler M., Karimpour I., Kleene K.C.* // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 3519 - 3519 (EMBL Data Library Accession Number X65553).
12. *Hoog C.* // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6123 - 6127 (EMBL Data Library Accession Number X61895).
13. *Frigerio J.M., Berthezene P., Garrido P., Ortiz E., Barthelley S., Vasseur S., Sastre B., Seleznieff I., Dagorn J.C., Iovanna J.L.* // EMBL Data Library Accession Number T24630.
14. *Rishi A.K., Gulamhussein A.I., Steele M.P.* // EMBL Data Library Accession Number U07795.
15. *Yaffe D., Nudel U., Neuman S.* // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 3723 - 3737.
16. *Jackson R.J.* // Cell. 1993. V. 74. P. 9 - 14.
17. *Short Protocols in Molecular Biology / Eds F.M. Ausubel et al.* N.Y.: Harvard Medical School, 1992.

Selective Amplification of Evolutionarily Conserved Expressed Sequences

K. A. Luk'yanov, N. G. Gurskaya, E. P. Kopantsev, and S. A. Luk'yanov¹

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, V-437, GSP-7, Moscow, 117871 Russia

Abstract—An efficacious method of cloning the sequences common for two cDNAs was proposed. The method was used for constructing a library of expressed sequences evolutionarily conserved for human and hamster.

Key words: *cDNA library, common sequences, cloning, polymerase chain reaction, evolutionary conservation, human, hamster.*

¹ To whom correspondence should be addressed.