



УДК 577.215.088

СЕЛЕКТИВНАЯ СУПРЕССИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 1999 г. К. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская, Е. А. Богданова, С. А. Лукьянов[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Микалухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.04.98 г. Принята к печати 22.05.98 г.

Обзор посвящен рассмотрению селективной супрессии полимеразной цепной реакции и методов, разработанных на ее основе (получение библиотек кДНК на основе малых количеств исходного биологического материала, вычитающая гибридизация и дифференциальный дисплей мРНК, быстрое клонирование полноразмерных кДНК, прогулка по хромосоме, клонирование *in vitro* и др.). Эти методы демонстрируют высокую эффективность и в совокупности позволяют проводить анализ сложных образцов ДНК – от поиска “интересных” последовательностей до выявления полной структуры соответствующих генов.

Ключевые слова: супрессия полимеразной цепной реакции; дифференциальная экспрессия генов; вычитающая гибридизация кДНК; дифференциальный дисплей мРНК; клонирование полноразмерных кДНК; прогулка по хромосоме.

Важнейшие процессы, происходящие в различных биологических системах (клеточная дифференцировка и морфогенез в ходе эмбрионального развития и регенерации, программируемая гибель клеток или их опухолевое перерождение и т.д.), находятся под контролем специфических регуляторных генов. Для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе биологических процессов, необходимо выявление и изучение генов, вовлеченных в их регуляцию. В настоящее время большинство методов молекулярной биологии, направленных на решение таких задач, основано на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), сделавшей доступной работу с малыми количествами биологического материала. Однако для применения ПЦР необходимо знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой ДНК. В случаях, когда нуклеотидная последовательность частично или полностью неизвестна, применение ПЦР часто наталкивается на серьезные проблемы.

Открытая в нашей лаборатории, селективная супрессия ПЦР (ССП) [1] позволила разработать ряд высокоэффективных взаимодополняющих методов выявления и анализа новых функционально важных последовательностей ДНК и РНК

Сокращения: ИКП – инвертированные концевые повторы; ССП – селективная супрессия полимеразной цепной реакции; ПЦР – полимеразная цепная реакция; УДД – упорядоченный дифференциальный дисплей; RACE (rapid amplification of cDNA ends) – быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК; SSH (suppression subtractive hybridization) – супрессионная вычитающая гибридизация.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 429-8020; факс: (095) 330-6538; e-mail: luk@ibch.siocb.ras.ru).

при полном или частичном отсутствии информации об их первичной структуре. Применение ССП позволяет отказаться от трудоемких и низкоэффективных методов физической сепарации различных фракций ДНК и делает методики поиска и анализа генетических последовательностей более удобными, быстрыми и воспроизводимыми.

СЕЛЕКТИВНАЯ СУПРЕССИЯ ПЦР

ССП состоит в ингибировании амплификации молекул ДНК, фланкированных инвертированными концевыми повторами (ИКП) в ПЦР с праймером, соответствующим внешней части ИКП, при условии, что длина праймера значительно меньше длины ИКП (рис. 1). По-видимому, этот факт объясняется следующим образом. На каждом цикле ПЦР после денатурации в процессе охлаждения образца внутримолекулярная гибридизация ИКП (самоотжиг) происходит раньше, чем отжиг праймера, поскольку температура самоотжига ИКП значительно выше температуры отжига праймера, при этом только небольшая часть молекул ДНК достигает температуры отжига праймера без формирования структуры типа “сковородка”, закрывающей место отжига праймера. Поскольку в ПЦР используется праймер, соответствующий внешней (а не внутренней) части ИКП, те молекулы, на которые праймер все-таки отжигается, после синтеза ДНК восстанавливают исходную структуру, что обеспечивает сохранение ингибиторного эффекта на дальнейших циклах ПЦР.

Степень ингибирования амплификации зависит от многих параметров, из которых основными являются следующие:

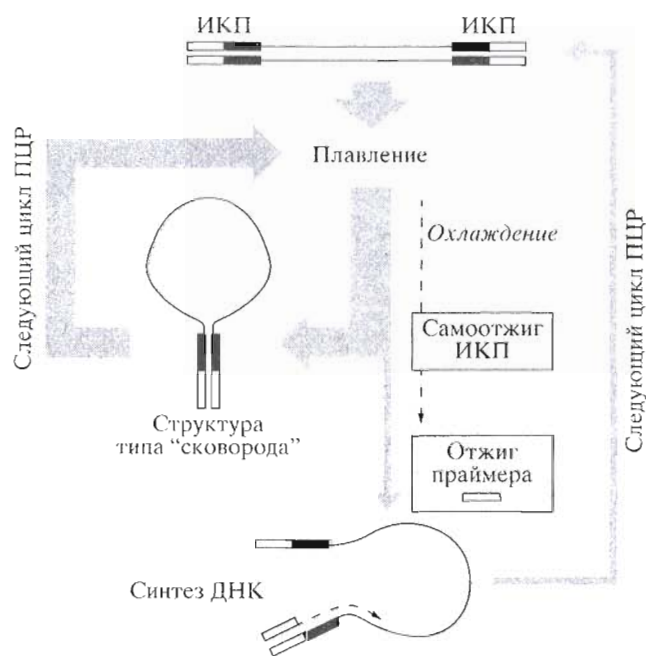


Рис. 1. Схема эффекта ингибирования амплификации молекул ДНК, фланкированных ИКП, в ПЦР с праймером, соответствующим внешней части ИКП (толщина стрелок отражает количество молекул ДНК, участвующих в данном процессе). Белый прямоугольник соответствует внешней части ИКП и амплификационному праймеру, черный прямоугольник – внутренней части ИКП. Каждая молекула одноцепочечной ДНК, образовавшаяся после стадии денатурации, может либо образовать структуру типа "сковорода", либо встретиться с праймером и затем быть достроенной до двухцепочечной формы. Поскольку самоотжиг ИКП может происходить при значительно более высокой температуре, чем отжиг праймера, большая часть молекул ДНК идет именно по пути самоотжига.

1. Различия в температурах отжига ИКП и амплификационного праймера. Соотношение длины и GC-состава ИКП в целом и последовательности, соответствующей праймеру, существенно влияет на эффективность ССП. Оптимальным представляется использование ИКП длиной 40–50 п.о. с повышенным содержанием GC-пар в его внутренней (супрессионной) части и амплификационного праймера, соответствующего внешней половине ИКП (длиной 20–25 нт).

2. Длина молекулы ДНК, несущей ИКП. Чем длиннее молекула, тем меньше вероятность встречи и внутримолекулярной гибридизации ее концов. Таким образом, ССП-эффект не ингибирует (или слабо ингибирует) амплификацию очень длинных молекул ДНК (пороговая длина зависит от конкретных условий, обычно она составляет 6–8 т.п.о.).

3. Концентрация праймера в ПЦР. ССП зависит от конкуренции между внутримолекулярной гибридизацией ИКП и отжигом праймера. По-

этому ССП происходит более эффективно при низких концентрациях праймера.

ССП может быть использована для подавления амплификации нежелательной фракции ДНК. Для этого в структуру ДНК необходимо ввести подходящие длинные ИКП – супрессионные последовательности.

ПОЛУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ДНК, СОДЕРЖАЩИХ ИКП

Разработано два основных способа присоединения супрессионных последовательностей к молекулам ДНК.

1. Лигирование двухцепочечных фрагментов ДНК с псевдодвухцепочечным – так называемым супрессионным адаптером [2].

2. ПЦР с длинным (супрессионным) праймером, 3'-концевая часть которого повторяет последовательность, уже имеющуюся в структуре фрагментов ДНК [1].

Первый способ – практически универсальный, поскольку не требует наличия каких-либо искусственно введенных последовательностей в составе молекул ДНК. Например, образец ДНК для лигирования может быть получен в результате синтеза двухцепочечной кДНК, а также в результате обработки кДНК или геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции. Очевидно, оптимальным является наличие фрагментов ДНК с тупыми (а не с липкими) концами, поскольку в этом случае возможно универсальное использование супрессионных адаптеров, имеющих тупой конец для лигирования. Второй способ удобен в тех случаях, когда образец ДНК уже подвергался амплификации и имеет в составе молекул известные последовательности. Примером этого могут служить образцы кДНК, полученные присоединением к первой цепи кДНК гомополимерной последовательности и последующей ПЦР с Т-праймером или С- и Т-праймерами.

СТРАТЕГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ССП

ССП может быть использована при анализе сложных популяций фрагментов ДНК (кДНК или фрагментированной геномной ДНК) для подавления амплификации нежелательной фракции ДНК (при сохранении экспоненциальной амплификации целевых последовательностей). В самом общем виде ССП позволяет отобрать из смеси симметрично и асимметрично фланкированных молекул ДНК исключительно последние. До изобретения ССП решить такую задачу с помощью ПЦР было невозможно.

Можно выделить три основные схемы использования ССП.

Схема 1 (рис. 2а) основана на присоединении ко всем молекулам ДНК одной супрессионной по-

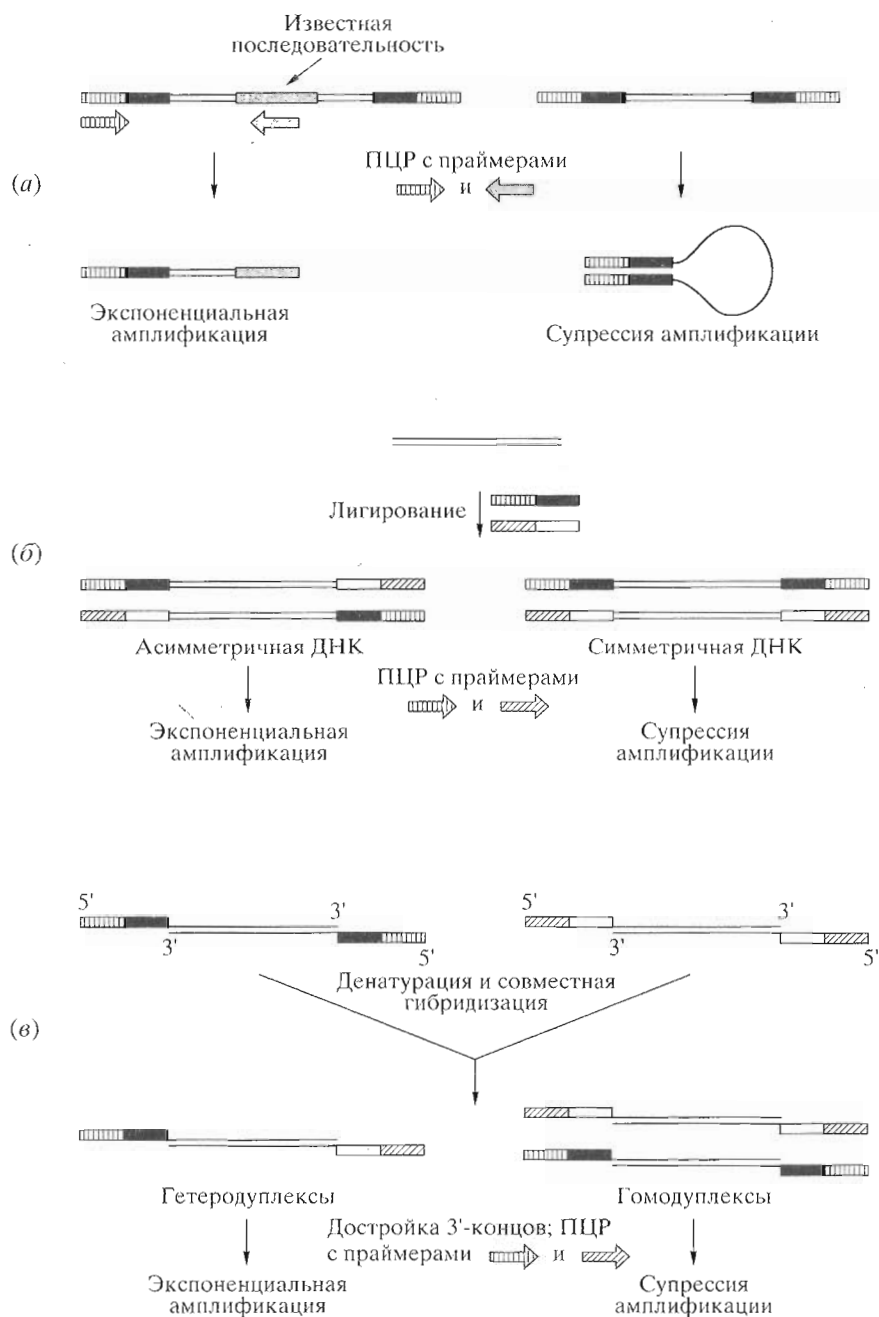


Рис. 2. Три схемы (а, б, в) использования ССП (пояснения в тексте). Белый и черный прямоугольники – внутренние части супрессионных последовательностей, вертикально и наклонно заштрихованные прямоугольники – внешние части супрессионных последовательностей.

следовательности и последующей амплификации с двумя праймерами, один из которых соответствует внешней части супрессионной последовательности, а второй комплементарен целевой ДНК (ген-специфический или oligo(dT)-содержащий праймер). В ходе ПЦР происходит отбор молекул ДНК, содержащих последовательность второго праймера. Эта схема лежит в основе таких методов, как поиск последовательностей геномной ДНК или кДНК, прилежащих к известно-

му фрагменту [2, 3]; приготовления библиотек кДНК на основе малых количеств суммарной РНК [4]; упорядоченного дифференциального дисплея мРНК [5].

Схема 2 (рис. 2б) основана на присоединении к образцу ДНК двух разных супрессионных последовательностей и последующей амплификации с праймерами, соответствующими их внешним частям. В ходе ПЦР происходит отбор асимметрично фланкированных молекул ДНК, несущих на сво-

их концах разные супрессионные последовательности. На этой схеме базируется метод клонирования *in vitro* [6].

Схема 3 (рис. 2в) – усложненный вариант второй. К двум образцам ДНК на 5'- (но не на 3'-) концы всех молекул ДНК присоединяют разные супрессионные последовательности. Затем образцы денатурируют и гибридизуют совместно. После достройки 3'-концов проводят ПЦР с праймерами, соответствующими внешним частям супрессионных последовательностей. Так же, как и во второй схеме, происходит отбор асимметрично фланкированных молекул, однако здесь эти ДНК должны в ходе гибридизации найти себе комплементарную цепь из противоположного образца. Такой отбор гетеродуплексов позволяет проводить вычитающую гибридизацию кДНК [1], нормализацию кДНК [7] и поиск эволюционно консервативных кДНК [8].

МЕТОДИКИ, РАЗРАБОТАННЫЕ НА ОСНОВЕ ССП

На сегодняшний день при изучении влияния геновой экспрессии на различные биологические процессы чрезвычайно распространена следующая стратегия проведения исследований:

1. Приготовление библиотек кДНК из исследуемых биологических образцов.
2. Поиск в этих библиотеках дифференциально экспрессирующихся или интересных по каким-либо другим соображениям генов (точнее, их фрагментов).
3. Получение полноразмерных кДНК и геномных копий найденных генов.

Все этапы такой структурной работы могут быть проделаны с помощью методов, основанных на ССП и подробно рассматриваемых в следующих разделах обзора.

Получение библиотек кДНК на основе малого количества биологического материала

Для широкого круга задач, связанных с изучением функциональных и структурных аспектов экспрессии генов, необходимы библиотеки кДНК. Способы их получения из относительно больших количеств биологического материала были детально разработаны уже давно и входят в ряд рутинных гено-инженерных методик. Однако в случае ограниченного количества биологического материала и, следовательно, невозможности выделения достаточного количества poly(A)⁺-РНК (на современном этапе развития молекулярной биологии таких случаев большинство) классические методы оказываются неприменимыми. Изобретение ПЦР явилось основанием для развития новых методов получения библиотек кДНК из ма-

лых количеств суммарной РНК. Для использования ПЦР, однако, необходимо знание хотя бы части нуклеотидной последовательности амплифицируемой ДНК. Наличие в мРНК подавляющего большинства генов poly(A)-последовательности дает возможность проводить ПЦР с oligo(dT)-содержащего праймера (Т-праймера). Для экспоненциальной амплификации необходимо присоединить ко всем молекулам кДНК искусственную последовательность, которая могла бы служить местом отжига второго праймера. На сегодняшний день описано несколько методов введения такой последовательности:

- 1) присоединение гомополимерной последовательности к 3'-концу первой цепи кДНК с помощью концевой нуклеотидилтрансферазы (тэйлирование) [9];
- 2) лигирование синтетического одноцепочечного олигонуклеотида к 1-ой цепи кДНК [10] или к мРНК [11] с помощью РНК-лигазы фага Т4;
- 3) лигирование двухцепочечного олигонуклеотидного адаптера с двухцепочечной кДНК с использованием ДНК-лигазы фага Т4 [12].

Лигирование двухцепочечных молекул с помощью Т4-ДНК-лигазы является более эффективным и воспроизводимым подходом, чем тэйлирование или лигирование одноцепочечных субстратов с использованием Т4-РНК-лигазы [3]. Однако метод [12], основанный на использовании Т4-ДНК-лигазы, имеет очень существенный недостаток: он позволяет работать только с poly(A)⁺-РНК. В том случае, если синтез кДНК ведется на основе суммарной РНК, даже использование Т-праймера в качестве затравки не предотвращает синтеза большого избытка фоновой кДНК на матрице рибосомной РНК.

На основе ССП был разработан метод, включающий лигирование с помощью Т4-ДНК-лигазы супрессионного адаптера к двухцепочечной кДНК и последующую ПЦР с использованием Т-праймера и праймера, соответствующего внешней части адаптера (схема 1, см. рис. 2а) [4]. В ходе такой ПЦР происходит селективная амплификация фракции кДНК, имеющей в своей структуре Т-праймер. Ингибирование амплификации остатальной кДНК, несущей на обоих концах молекул последовательность адаптера, достигается за счет ССП. Таким образом, возможно получение библиотеки кДНК на основе малых количеств суммарной РНК без выделения фракции poly(A)⁺-РНК.

Возможности предлагаемой методики были продемонстрированы нами на модельной системе [4], и в дальнейшем библиотеки кДНК, полученные указанным образом, успешно использовались для выявления и анализа функционально важных экспрессирующихся последовательностей в различных биологических системах [13–15]. Предложенный метод позволяет получать близ-

кие к полноразмерным репрезентативные библиотеки кДНК из малых (10–100 нг) количеств суммарной РНК, по качеству не уступающие библиотекам, получаемым классическими методами из 5–10 мкг poly(A)⁺-РНК.

Выявление дифференциально экспрессирующихся генов

Для понимания молекулярных механизмов биологических процессов необходим поиск и изучение генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе этих процессов. В основе методов идентификации таких генов лежит выявление молекул мРНК, по-разному представленных в тех или иных тканях и на разных стадиях биологического процесса. Исследование изменений в составе и содержании клеточной мРНК может осуществляться несколькими способами. В настоящее время наибольшее распространение получили две стратегии – дифференциальный дисплей и вычитающая гибридизация.

Дифференциальный дисплей

Технология дифференциального дисплея мРНК была предложена в 1992 г. в работе [16] и сегодня весьма популярна при поиске дифференциально экспрессирующихся генов. Она основана на использовании короткого олигонуклеотидного праймера, имеющего низкую температуру отжига и способного направлять ПЦР-амплификацию ограниченного пула фрагментов кДНК. Сравнительный анализ таких образцов кДНК с помощью электрофореза в полиакриламидном геле позволяет идентифицировать дифференциально представленные фрагменты кДНК. Однако использование праймеров произвольной структуры делает невозможным проведение систематического сравнения анализируемых образцов по всем видам мРНК: характерные наборы фрагментов ДНК носят случайный характер; подавляющее большинство этих фрагментов соответствует наиболее представленным в исходных образцах видам транскриптов. Кроме того, использование олигонуклеотидных праймеров с низкой температурой отжига сопровождается неспецифической амплификацией и приводит к многочисленным артефактам. Принципиально другой подход, ориентированный на систематическое сравнение образцов по всем видам мРНК и основанный на разделении 3'-концевых рестриктных фрагментов кДНК, был предложен Н.Б. Ивановой и А.В. Белявским [17]. К недостаткам этого подхода можно отнести его ограниченную чувствительность и трудоемкость процедуры.

Нами был разработан метод упорядоченного дифференциального дисплея мРНК (УДД), который также основан на анализе 3'-концевых рест-

риктных фрагментов кДНК [5]. Однако в предлагаемом нами подходе отбор этих фрагментов осуществляется не с помощью физической сепарации, а в результате ПЦР (схема 1, см. рис. 2а), в ходе которой селективно амплифицируются только 3'-концевые фрагменты кДНК (от Т-прайма до первого рестриктного сайта), что ведет к существенному упрощению метода и повышает его чувствительность.

Эффективность метода УДД была продемонстрирована на примере выявления последовательностей, дифференциально экспрессирующихся вдоль передне-задней оси тела планарии [5].

Вычитающая гибридизация кДНК

Вычитающая гибридизация кДНК представляет собой процесс истощающей гибридизации двух образцов кДНК, называемых драйвером и трейсером, проводимый для выявления последовательностей (мишеней), которые присутствуют в трейсере, но отсутствуют или представлены на более низком уровне в драйвере. Вычитающая гибридизация включает в себя гибридизацию трейсера с избытком драйвера и последующее отделение фракции гибридных молекул от фракции молекул мишени.

Применение вычитающей гибридизации кДНК привело к открытию значительного числа функционально важных генов, участвующих в эмбриональном развитии, клеточной дифференцировке, опухолевой трансформации и метастазировании. Однако низкая репрезентативность получаемых обогащенных библиотек, невысокие степени обогащений, трудоемкость и многостадийность процедур очистки обогащенной фракции значительно затрудняли использование этого подхода при работе с ограниченным количеством биологического материала и при идентификации генов, транскрипты которых содержатся в клетке в небольшом количестве (от 1 до 10 копий на клетку).

Разработанная нами процедура вычитающей гибридизации кДНК [1] позволяет преодолеть проблему поиска редких транскриптов путем введения стадии выравнивания (нормализации) концентраций различных транскриптов в исследуемом образце кДНК. Это достигается благодаря использованию ССП (схема 3, см. рис. 2в), поэтому метод получил название супрессионной вычитающей гибридизации (Suppression Subtractive Hybridization, SSH).

Эффективность предложенной методики была подтверждена в модельных экспериментах с использованием в качестве мишени экзогенной вирусной ДНК, добавляемой к образцу трейсера в определенных концентрациях [1]. Метод был применен для выявления последовательностей,

дифференциально экспрессирующихся в ходе различных биологических процессов, таких как активация иммунного ответа в культуре иммунокомпетентных клеток [18], изменение метастатического потенциала опухолевых клеток [19], репаративная регенерация плоских червей планарий [15], а также для создания тканеспецифических библиотек кДНК человека [20]. В настоящее время методика SSH широко используется в мировой практике (например, [21–25]).

Элементы разработанной техники вычитающей гибридизации оказалось возможным применить для решения некоторых других задач, например, создания нормализованных библиотек кДНК [7] и выявления эволюционно консервативных экспрессирующихся последовательностей [8].

Поиск 5'- и 3'-концевых фрагментов кДНК

Одной из наиболее важных и технически трудных задач при характеристике генов является получение полноразмерных кДНК. Традиционные методы выявления генетических последовательностей (такие как скрининг библиотек кДНК, клонирование консервативных генов с помощью ПЦР с вырожденными олигонуклеотидными праймерами, идентификация дифференциально экспрессирующихся генов с помощью дифференциального дисплея мРНК или вычитающей гибридизации кДНК) обычно позволяют идентифицировать только фрагмент кДНК. Для быстрого и эффективного клонирования полноразмерных кДНК в последние годы был предложен целый ряд методов для *in vitro*-амплификации концов кДНК под общим названием “быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК” (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) (обзор [26]). Большинство описанных в литературе методов RACE основано на введении в 3'-конец первой цепи кДНК дополнительных нуклеотидных последовательностей, служащих в дальнейшем местом отжига для праймеров в ПЦР. Однако проблема подавления амплификации неспецифических последовательностей при использовании RACE-стратегии для малопредставленных генов является еще более сложной, чем при получении библиотек кДНК.

Использование ССП позволяет преодолеть это затруднение. Образец кДНК лигируется с супрессионным адаптером и подвергается амплификации с праймером, соответствующим внешней части супрессионного адаптера и ген-специфическим праймером (схема 1, см. рис. 2а). При этом селективно амплифицируются только молекулы, содержащие место отжига специфического праймера, т.е. 5'- или 3'-концевые (в зависимости от направления специфического праймера) последовательности интересующего гена. Ампли-

фикация остальных молекул подавляется благодаря ССП.

Эффективность описанного метода была проверена в модельных экспериментах на уже известных генетических последовательностях [3] и в настоящее время широко используется во многих российских и зарубежных лабораториях (в 1997 г. было опубликовано более 100 работ с использованием этой методики, например, [27–31]).

Поиск промоторных участков генов (прогулка по хромосоме)

Анализ геномной организации выделенных последовательностей и клонирование регуляторных областей генов является важной задачей при структурно-функциональном анализе генов, однако существующие методы прогулки по хромосоме с использованием ПЦР достаточно трудоемки и неэффективны.

Нами был предложен новый метод ПЦР-прогулки по геномной ДНК, основанный на ССП [2]. Для получения образца ДНК, содержащего ИКП, геномную ДНК обрабатывают эндонуклеазой рестрикции и лигируют с супрессионным адаптером. Выделение регуляторных областей исследуемого гена производится в ходе дальнейших ПЦР полученного образца ДНК с использованием ген-специфического и адаптерного праймеров по той же схеме, что и выделение полноразмерных кДНК. Эта методика также нашла широкое применение (например, [32–37]).

Клонирование *in vitro*

Несмотря на то, что в последние годы большинство классических методов генной инженерии было улучшено или даже полностью вытеснено более удобными и эффективными технологиями, использующими ПЦР, в области молекулярного клонирования ДНК старые методы сохранили ведущую роль (клонирование в бактериальных, фаговых и других *in vivo*-системах).

На основе ССП был предложен новый метод, названный клонированием *in vitro* [6], который позволяет амплифицировать с помощью ПЦР и затем секвенировать индивидуальные молекулы ДНК неизвестной последовательности без использования клонирования *in vivo*. Метод клонирования *in vitro* включает следующие основные этапы (схема 2, рис. 2б):

1. Лигирование подлежащих клонированию фрагментов двухцепочечной ДНК одновременно с двумя супрессионными адаптерами.
2. Многократное разведение полученного образца до содержания единичных молекул ДНК в объеме, который будет взят для амплификации.

3. ПЦР-амплификация индивидуальных молекул ДНК с использованием праймеров, комплементарных внешним частям адаптеров.

Полученные продукты ПЦР, названные *in vitro*-клонами, соответствуют единичным молекулам ДНК. Благодаря ССП *in vitro*-клоны обязательно фланкированы последовательностями разных адаптеров, что позволяет определять нуклеотидную последовательность клонированного фрагмента ДНК любым методом секвенирования продуктов ПЦР.

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 нескольких десятков клонов. Мы использовали данный подход для проведения дифференциального скрининга библиотек кДНК, полученных с помощью вычитающей гибридизации [38]. Кроме того, нами был разработан протокол для быстрого получения панели перекрывающихся субклонов для секвенирования длинных (5 т.п.о.) фрагментов ДНК [39].

Таким образом, открытие ССП привело к созданию ряда дополняющих друг друга методик анализа сложных образцов ДНК: получение библиотек кДНК на основе малых количеств исходного биологического материала, вычитающая гибридизация и дифференциальный дисплей мРНК для выявления дифференциально экспрессирующихся последовательностей, быстрое клонирование полноразмерных кДНК, прогулка по хромосоме для клонирования промоторных и других областей генома, клонирование *in vitro* и др.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 98-04-48508 и № 97-04-50123-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарабыкин В.С., Сverdlov E.D. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 701–704.
2. Siebert P.D., Chenchik A., Kellogg D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 1087–1088.
3. Chenchik A., Diachenko L., Tarabykin V., Lukyanov S.A., Siebert P.D. // BioTechniq. 1996. V. 21. P. 526–534.
4. Lukyanov K.A., Diachenko L., Chenchik A., Nanisetti A., Siebert P.D., Usman N.Y., Matz M.V., Lukyanov S.A. // Biophys. Biochem. Res. Com. 1997. V. 230. P. 285–288.
5. Matz M.V., Usman N.Y., Shagin D.A., Bogdanova E.A., Lukyanov S.A. // Nucl. Acid. Res. 1997. V. 25. P. 2541–2542.

6. Lukyanov K.A., Matz M.V., Bogdanova E.A., Gurskaya N.G., Lukyanov S.A. // Nucl. Acid. Res. 1996. V. 24. P. 2194–2195.
7. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Матц М.В., Хаспеков Г.Л., Дьяченко Л.Б., Ченчик А.А., Ильевич-Стучков С.Г., Лукьянов С.А. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 686–690.
8. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Копанцев Е.П., Лукьянов С.А. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 49–54.
9. Frohman M.A., Dush M.K., Martin G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 8998–9002.
10. Dumas J.B., Edwards M., Delort J., Mallet J. // Nucl. Acid. Res. 1991. V. 19. P. 5227–5232.
11. Liu X., Gorovsky M.A. // Nucl. Acid. Res. 1993. V. 21. P. 4954–4960.
12. Akowitz A., Manuelidis L. // Gene. 1989. V. 81. P. 295–306.
13. Казанская О.В., Маркитантова Ю.В., Снеговая И.Ю., Долгилевич С.М., Тарабыкин В.С., Зарайский А.Г., Лукьянов С.А., Знойко С.Л., Микаэлян А.С., Мутаилов В.И. // Изв. АН. Серия биол. 1995. Т. 3. С. 271–275.
14. Kazanskaya O.V., Severtzova E.A., Barth K.A., Ermakova G.V., Lukyanov S.A., Benyumov A.O., Pannese M., Boncinelli E., Wilson S.W., Zaraty A.G. // Gene. 1997. V. 200. P. 25–34.
15. Bogdanova E.A., Matz M.V., Tarabykin V.S., Usman N.Y., Shagin D.A., Zaraty A.G., Lukyanov S.A. // Dev. Biol. 1998. V. 194. P. 287–293.
16. Liang P., Pardee A. // Science. 1992. V. 257. P. 967–971.
17. Ivanova N., Belyavsky A. // Nucl. Acid. Res. 1995. V. 23. P. 2954–2958.
18. 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.
19. Гурская Н.Г., Шагин Д.А., Лукьянов К.А., Вагнер Л.Л., Штутман М.С., Мусаткина Е.А., Монова Е.В., Татосян А.Г., Лукьянов С.А., Сverdlov E.D. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 425–431.
20. Diatchenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam 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.
21. Chu Z.-L., McKinsey T. A., Liu L., Gentry J.J., Malim M.H., Ballard D.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10057–10062.
22. Hudson C., Clements D., Friday R.V., Stott D., Woodland H.R. // Cell. 1997. V. 91. P. 397–405.
23. Mueller C.G.F., Rissoan M.-C., Salinas B., Ait-Yahia S., Ravel O., Bridon J.-M., Briere F., Lebecque S., Liu Y.-J. // J. Exp. Med. 1997. V. 186. P. 655–663.
24. Yokomizo T., Izumi T., Chang K., Takuwa Y., Shimizu T. // Nature. 1997. V. 387. P. 620–624.
25. Zhicheng S., Jacobs-Lorena M. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 28895–28900.
26. Schaefer B.C. // Anal. Biochem. 1995. V. 227. P. 255–273.

27. Yang W.-P., Levesque P.C., Little W.A., Conder M.L., Shalaby F.Y., Blonar M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 4017–4021.
28. Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M.F., Surwit R.S., Ricquier D., Warden C.H. // Nature Genet. 1997. V. 15. P. 269–272.
29. Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P., Caddle S.D., Ziaugra L., Beijersbergen R.L., Davidoff M.J., Liu Q., Bacchetti S., Haber D.A., Weinberg R.A. // Cell. 1997. V. 90. P. 785–795.
30. Ackerman S.L., Kozak L.P., Przyborski S.A., Rund L.A., Boyer B.B., Knowles B.B. // Nature. 1997. V. 386. P. 838–842.
31. Loftus S.K., Morris J.A., Carstea E.D., Gu J.Z., Cummings C., Brown A., Ellison J., Ohno K., Rosenfeld M.A., Tagle D.A., Pentchev P.G., Pavan W.J. // Science. 1997. V. 277. P. 232–235.
32. Karlsson A., Johansson M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7258–7262.
33. Rosenberg H.F., Dyer K.D. // Nucl. Acid. Res. 1996. V. 24. P. 3507–3514.
34. Takenoshita S., Hagiwara K., Nagashima M., Gemma A., Bennett W.P., Harris C.C. // Genomics. 1996. V. 36. P. 341–344.
35. Chong S.S., Pack S.D., Roschke A., Tanigami A., Carozzo R., Smith A.C.M., Dobyns W.B., Ledbetter D.H. // Hum. Mol. Genet. 1997. V. 6. P. 147–155.
36. Morii E., Jippo T., Tsujimura T., Hashimoto K., Kim D.-K., Lee Y.-M., Ogihara H., Tsujino K., Kim H.-M., Kitamura Y. // Blood. 1997. V. 90. P. 3057–3066.
37. Wade D.P., Puckey L.H., Knight B.L., Acquati F., Mihalich A., Taramelli R. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30387–30399.
38. Лукьянов К.А., Лукьянов С.А. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 882–887.
39. Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Matz M.V., Diatchenko L.B., Siebert P.D., Lukyanov S.A. // Anal. Biochem. 1998. V. 258. P. 138–141.

Selective Suppression of Polymerase Chain Reaction

K. A. Lukyanov, N. G. Gurskaya, E. A. Bogdanova, and S. A. Lukyanov[#]

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

The selective suppression of the polymerase chain reaction and methods based upon it (construction of cDNA libraries from low amounts of biological material, subtractive hybridization and differential display of mRNA, fast cloning of full-size cDNA, chromosome walking, cloning *in vitro*, and others) are reviewed. These methods display a high effectiveness and, taken together, enable intricate DNA analyses to be performed—from the search for nontrivial sequences to the total sequencing of the corresponding genes.

Key words: polymerase chain reaction suppression, differential gene expression, cDNA subtractive hybridization, mRNA differential display, full-size DNA cloning, chromosome walking

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 429-8020; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: luk@ibch.siohc.ras.ru.