



УДК 577.112.088.3

МЕТОД СОЗДАНИЯ НОРМАЛИЗОВАННЫХ БИБЛИОТЕК кДНК, ОБОГАЩЕННЫХ ПОЛНОРАЗМЕРНЫМИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ

© 2005 г. П. А. Жулидов*, Е. А. Богданова*, А. С. Щеглов*,
И. А. Шагина**, Л. Л. Вагнер**, Г. Л. Хазпеков***,
В. В. Кожемяко****, С. А. Лукьянов*#, Д. А. Шагин*

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

** ЗАО Евrogen, Москва;

***Кардиологический научный центр РАМН, Москва;

****Тихоокеанский институт биоорганической химии, Владивосток

Поступила в редакцию 21.05.2004 г. Принята к печати 16.07.2004 г.

Предложен новый метод получения нормализованных библиотек кДНК. Метод основан на свойствах недавно охарактеризованной нами дуплексспецифической нуклеазы из гепатопанкреаса камчатского краба (ДСН). ДСН термостабильна, эффективно расщепляет двухцепочечную ДНК и не активна по отношению к одноцепочечной ДНК (Shagin et al. *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 1935–1942). Разработанный метод позволяет нормализовать образцы кДНК, обогащенные полноразмерными последовательностями, без использования трудоемких и низкоэффективных стадий физического разделения. Эффективность метода продемонстрирована в модельных экспериментах с использованием образцов кДНК из ряда тканей человека.

Ключевые слова: дуплексспецифическая нуклеаза, нормализация кДНК, нормализованные библиотеки кДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Разница в уровнях экспрессии генов в различных типах клеток существенно осложняет анализ библиотек кДНК и выявление новых генов в ходе масштабного секвенирования таких библиотек. Использование нормализованных библиотек кДНК, разные виды кДНК в которых имеют приблизительно равную представленность, позволяет значительно повысить эффективность поиска редких генов. Наиболее эффективный подход к созданию нормализованных библиотек основан на том, что при реассоциации денатурированной двухцепочечной кДНК (дц-кДНК) или при гибридизации первой цепи кДНК с комплементарной ей РНК мажорные (высокопредставленные) последовательности переходят в двухцепочечную форму значительно быстрее, чем минорные (редкие). Вследствие этого фракция одноцепочечной кДНК (оц-фракция) становится в значительной мере нормализованной [1]. Таким образом, боль-

шинство существующих в настоящее время методов нормализации кДНК включают следующие стадии: (1) получение оц-кДНК (например, путем денатурации дц-кДНК); (2) гибридизация этой кДНК в присутствии комплементарной цепи кДНК или РНК. Во время гибридизации формируются нормализованная оц- и дц-фракция мажорных последовательностей; (3) отделение нормализованной фракции и (4) клонирование нормализованной библиотеки кДНК [2–11]. Основные различия в существующих методах нормализации заключаются в способе отделения нормализованной оц-фракции кДНК. Для этого используют ряд подходов, таких, как физическое разделение оц- и дц-фракций с использованием хроматографии на гидроксипатите [2, 3, 8] или с помощью парамагнитных шариков [7, 11], расщепление дц-фракции эндонуклеазами рестрикции [5], амплификация оц-фракции с использованием эффекта супрессии ПЦР [10].

К сожалению, большинство из существующих подходов не применимы для нормализации образцов кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями. Подробный анализ недостатков этих методов для приготовления таких

Сокращения: оц – одноцепочечная, дц – двухцепочечная кДНК; ИКП – инвертированные концевые повторы; ДСН – дуплексспецифическая нуклеаза; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-70-56; эл. почта: luk@ibch.ru).

библиотек кДНК представлен в статье Карнинци и соавт. [11].

На сегодняшний день известен только один метод, разработанный специально для приготовления полноразмерных нормализованных библиотек кДНК [11]. Нормализация с помощью этого метода состоит из следующих процедур: синтез первой цепи кДНК на матрице poly(A)⁺-РНК с использованием Т-праймера, биотинилирование кэп-структуры РНК, отделение фракции РНК-ДНК-гибридов, содержащих полноразмерную первую цепь кДНК с помощью парамагнитных шариков, деградация РНК, "тэйлинг" первой цепи кДНК, гибридизация полученной первой цепи с меченой биотин-мРНК из того же источника и удаление образовавшихся в ходе гибридизации РНК-ДНК-гибридов при помощи парамагнитных шариков. Очевидно, что метод трудоемок, многостадийен, включает в себя процедуры физического разделения дц- и оц-фракций и требует значительного количества poly(A)⁺-РНК (т.е. не может быть применен для нормализации образцов кДНК, приготовленных из малых количеств исходного материала, когда poly(A)⁺-РНК-фракция недоступна).

Таким образом, существует необходимость в простом и эффективном подходе, позволяющем получать нормализованные библиотеки кДНК, обогащенные полноразмерными последовательностями, и не требующем больших количеств исходного материала.

Ранее нами была описана новая нуклеаза – дуплексспецифическая нуклеаза из гепатопанкреаса камчатского краба (ДСН), способная специфически расщеплять дц-ДНК [12]. Использование этого фермента позволило разработать новый простой и эффективный метод нормализации кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями [13]. В настоящей работе мы предлагаем несколько модификаций этого метода, позволяющих получать как ненаправленно, так и направленно клонированные библиотеки кДНК. Эффективность метода была продемонстрирована в ряде модельных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия нормализации дц-кДНК с использованием ДСН

Как и большинство существующих методов нормализации разработанный нами метод, названный ДСН-нормализация, базируется на кинетике реассоциации кДНК и отличается от других методов способом отделения нормализованной оц-фракции [13]. В случае дц-кДНК ДСН-нормализация включает денатурацию и реассоциацию кДНК с образованием нормализованной одноцепочечной и нецелевой двухцепочечной фракций.

Для удаления дц-фракции кДНК мы использовали фермент ДСН, который специфически расщепляет дц-ДНК (как в ДНК-ДНК-, так и в ДНК-РНК-дуплексах) и проявляет незначительную активность в отношении оц-ДНК и РНК. Поскольку ДСН – термостабильный фермент, активный при температуре 70°C, то деградация дц-фракции проводится при той же температуре, что и ренатурация кДНК. Это позволяет избежать неспецифической гибридизации кДНК в процессе обработки ДСН и соответственно избежать потери транскриптов, склонных к образованию вторичных структур. Оставшаяся нормализованная оц-фракция далее амплифицируется с помощью ПЦР.

На рис. 1 представлена схема метода ДСН-нормализации для амплифицированной дц-кДНК, фланкированной одинаковыми последовательностями адаптеров.

ДСН-нормализация первой цепи кДНК

Метод ДСН-нормализации позволяет также осуществлять нормализацию неамплифицированной первой цепи кДНК. Удаление мажорных последовательностей осуществляется в ходе гибридизации первой цепи кДНК в присутствии poly(A)⁺-РНК, использованной в качестве матрицы для синтеза первой цепи. Эта модификация метода применима в случаях, когда количество исходного материала неограничено, и возможно выделение poly(A)⁺-РНК-фракции. В этом случае ДСН-нормализация включает следующие этапы: после синтеза первой цепи кДНК на матрице poly(A)⁺-РНК проводится денатурация и последующая реассоциация гетеродуплексов первой цепи кДНК и мРНК (рис. 2). В ходе реассоциации происходит выравнивание концентраций индивидуальных молекул кДНК в оц-фракции и образование ДНК-РНК-гибридов мажорных транскриптов. Обработка реакционной смеси ДСН приводит к деградации молекул ДНК в ДНК-РНК-гибридах. оц-Фракцию кДНК далее амплифицируют при помощи ПЦР.

Регулирование средней длины продукта ПЦР

Известно, что в ходе ПЦР короткие фрагменты амплифицируются более эффективно, чем длинные. Вследствие этого ПЦР-амплификация, осуществляемая перед приготовлением библиотеки кДНК, зачастую приводит к потере редких длинных транскриптов и к уменьшению среднего размера вставок в библиотеке кДНК. Для сохранения фракции длинных фрагментов кДНК в ходе амплификации мы использовали разработанный нами ранее метод регулирования средней длины сложного продукта ПЦР [14]. Указанный подход базируется на том, что в ходе ПЦР на матрице кДНК, содержащей инвертированные кон-

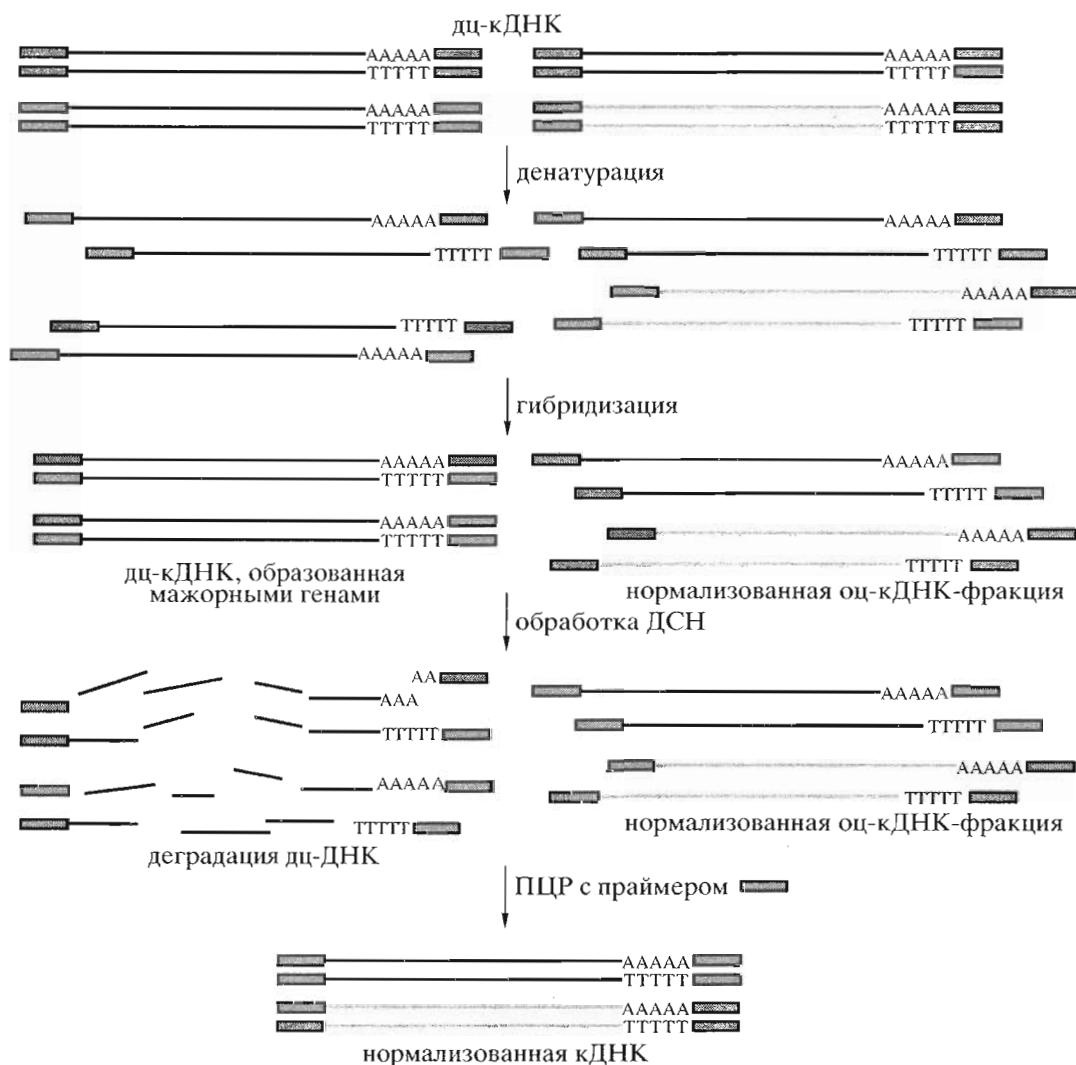


Рис. 1. Схема ДСН-нормализации дц-кДНК. Прямоугольники на концах молекул кДНК обозначают последовательности олигонуклеотидных адаптеров, фланкирующих эти молекулы и комплементарные им последовательности. Черная линия обозначает мажорный транскрипт, серая линия – минорный.

цевые повторы (ИКП), с праймером, соответствующим части ИКП, происходит преимущественная амплификация длинной фракции кДНК и подавление амплификации коротких молекул.

Подготовка кДНК для нормализации

кДНК, которую можно использовать для ДСН-нормализации, должна быть фланкирована определенными последовательностями адаптеров, что необходимо для последующей ПЦР-амплификации нормализованной фракции. Использование метода регулирования средней длины сложного продукта ПЦР при амплификации требует, чтобы последовательности адаптеров формировали ИКП, т.е. имели одинаковую структуру на 5'-конце.

Существует целый ряд методов, позволяющих получать образцы кДНК для ДСН-нормализации, в

том числе методы для приготовления кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями: метод кэп-ловушки (Cap-trapper) [15], метод олигокэпирования [15] и метод SMART (от Switching Mechanism At the 5' end of the RNA Transcript) [17–19].

В настоящей работе мы использовали метод SMART. В качестве матрицы для синтеза кДНК этим методом может быть использована как poly(A)⁺-РНК, так и тотальная РНК. Введение фланкирующих последовательностей адаптеров осуществляется в ходе синтеза первой цепи кДНК, и в результате как первая цепь кДНК, так и амплифицированная кДНК оказываются фланкированными ИКП. Использование различных адаптеров (табл. 1) позволяет получать кДНК, пригодные, в дальнейшем, как для ненаправленного, так и для направленного клонирования кДНК-библиотек.

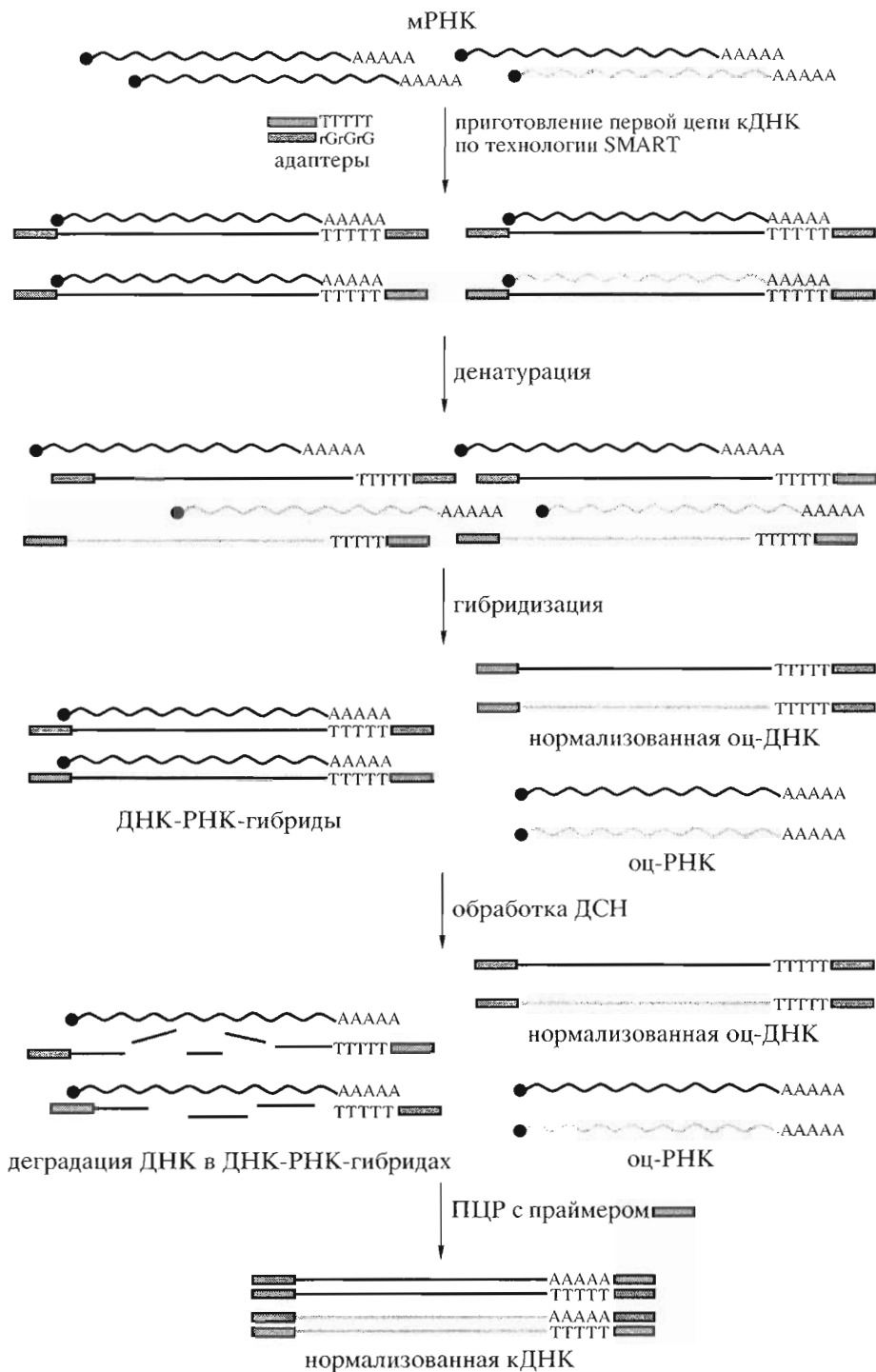


Рис. 2. Схема ДСН-нормализации оц-кДНК в присутствии мРНК. Прямоугольники на концах молекул кДНК обозначают последовательности олигонуклеотидных адаптеров, фланкирующих эти молекулы и комплементарные им последовательности. Черная линия обозначает мажорный транскрипт, серая линия – минорный. РНК изображена волнистой линией, ДНК – прямой.

Нормализация кДНК из различных тканей человека

использованием образцов РНК из различных тканей человека.

Различные модификации ДСН-нормализации были опробованы в модельных экспериментах с

Образцы амплифицированной кДНК для ДСН-нормализации были получены по технологии

Таблица 1. Олигонуклеотидные адаптеры, используемые для синтеза кДНК по технологии SMART с целью дальнейшего приготовления нормализованных библиотек кДНК (N = A, C, G или T; K = A, G или C)

Способ клонирования нормализованной библиотеки	Адаптеры*
Ненаправленное (по “тупым” концам)	SMART II и CDS
Направленное (“тупой” конец – <i>NotI</i>)	SMART II и CapNot1T20
Направленное (<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>)	SMART IV и CapNot1T20

* Структуры адаптеров 5' → 3'

SMART II	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGrGrGrG
SMART IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCrGrGrG
CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)KN
CapNot1T20	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGC GGCCGCT(20)KN

SMART [17–19] на матрице poly(A)⁺-РНК из скелетной мышцы и тотальной РНК из ряда тканей (плацента, эмбриональная печень, мозг, эмбриональные легкие, яички, тонкая кишка). Для синтеза первой цепи кДНК на матрице РНК из скелетной мышцы использовали олигонуклеотидные адаптеры SMART II и CDS. Использование этих адаптеров позволяет в дальнейшем осуществлять только ненаправленное клонирование библиотеки кДНК по тупым концам. Для синтеза первой цепи кДНК из остальных тканей использовали олигонуклеотид SMART II и модифицированный адаптер CapNot1T20, позволяющий осуществить направленное клонирование библиотеки кДНК. Нормализацию полученных образцов кДНК проводили как описано в “Эксперимент. части”. Оценку эффективности нормализации осуществляли путем сравнения нормализованных и ненормализованных образцов кДНК, полученных из одних и тех же тканей.

Для всех образцов нормализованной и ненормализованной кДНК анализ с помощью электрофореза в агарозном геле выявил исчезновение полос, соответствующих мажорным транскрип-

там, и сохранение средней длины кДНК в нормализованных образцах (рис. 3).

Анализ образцов кДНК с помощью псевдо-Нозерн-блот-гибридизации [20] с использованием радиоактивно меченных фрагментов генов *GAPD*, *ACTB* и *UBC* с высоким уровнем экспрессии в большинстве тканей человека выявил существенное снижение концентрации соответствующих кДНК в нормализованных образцах (рис. 4, дорожка 2).

Для дальнейшего анализа использовали библиотеки кДНК, приготовленные из образцов нормализованной и ненормализованной кДНК скелетной мышцы (НАК-библиотека приготовлена из нормализованной амплифицированной кДНК; НПЦ-библиотека – из кДНК, полученной путем нормализации первой цепи кДНК; СК-библиотека – из ненормализованной амплифицированной кДНК).

Сохранение средней длины вставок в нормализованных библиотеках по сравнению с ненормализованной контрольной библиотекой было подтверждено в следующем эксперименте. Из каждой библиотеки отобрали 106 случайных колоний белого цвета, выделили плазмидную ДНК и вы-

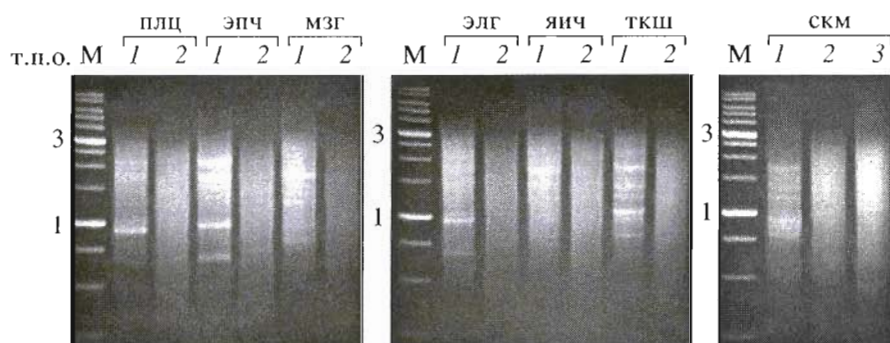


Рис. 3. Результат электрофореза в агарозном геле образцов ненормализованной и нормализованной кДНК из тканей человека (плц – плацента, эпч – эмбриональная печень, мзг – мозг, элг – эмбриональные легкие, яич – яички, ткш – тонкая кишка, скм – скелетная мышца): 1 – ненормализованная кДНК; 2 – образцы кДНК, полученные после нормализации амплифицированной кДНК; 3 – образцы кДНК, полученные после нормализации первой цепи кДНК; М – ДНК-маркер, 1 kb ladder (СибЭнзим), т.п.о.

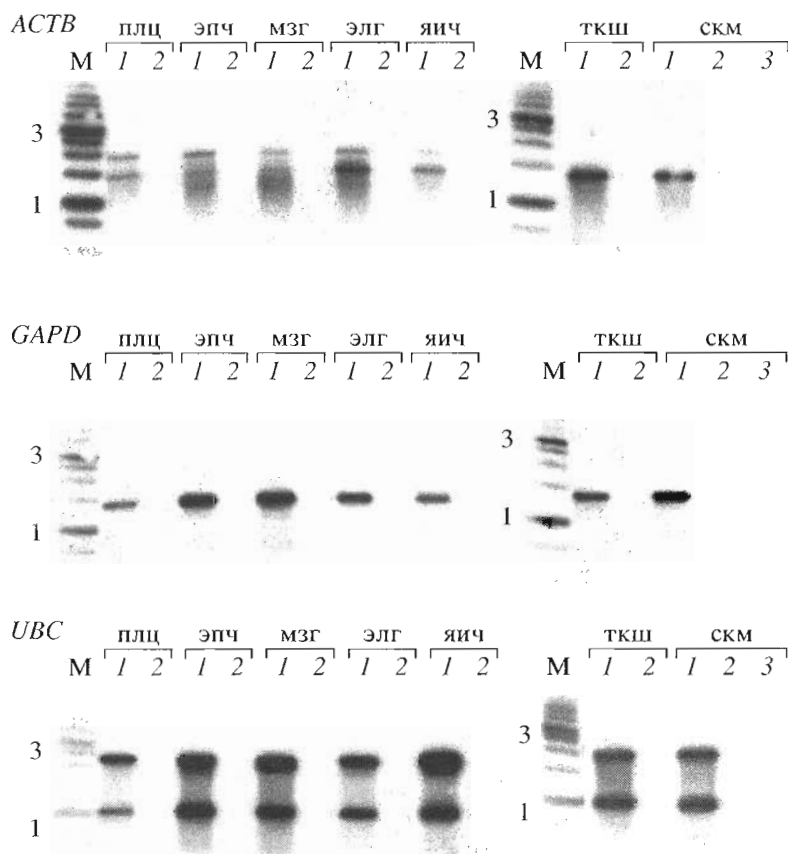


Рис. 4. Псевдо-Норthern-блот-анализ образцов нормализованной и ненормализованной кДНК из тканей человека (сокращения, см. подпись к рис. 3): 1 – ненормализованная кДНК; 2 – образцы кДНК, полученные после нормализации амплифицированной кДНК; 3 – образцы кДНК, полученные после нормализации первой цепи кДНК; М – маркер, 1 kb ladder, т.п.о. Номера использованных маркерных генов в GenBank указаны в табл. 2.

числили длину содержащихся в ней вставок. На основании полученных данных построили гистограммы (рис. 5). Как видно из представленных графиков, ДСН-нормализация не оказывает заметного влияния на длину вставок в библиотеках кДНК.

Гибридизация колоний из полученных библиотек с радиоактивно мечеными фрагментами маркерных генов показала значительное уменьшение количества клонов, соответствующих мажорным транскриптам (*GAPD*, *ACTB*, *UBC*), в нормализованных библиотеках кДНК. Количество клонов, соответствующих среднепредставленным транскриптам (*RPL13A*, *YWHAZ*, *RPS9*) в целом не изменилось в НАК-библиотеке по сравнению с СК-библиотекой и несколько снизилось в НПЦ-библиотеке. Увеличение в 3–4 раза количества клонов, соответствующих минорным транскриптам (*NFKB1*, *IGF2R*, *JUNC*), было обнаружено в НПЦ-библиотеке по сравнению с контрольной СК-библиотекой, тогда как в НАК-библиотеке концентрация этих транскриптов осталась неизменной (табл. 2). Таким образом, в нормализованных библиотеках наблюдалось снижение концен-

трации мажорных транскриптов до уровня минорных.

Ранее было подсчитано, что если в ненормализованном образце кДНК присутствует около 10000 различных типов молекул, то в ходе нормализации такого образца концентрация каждого типа молекул кДНК стремится к значению 0.01% [21]. Таким образом, при исчерпывающей нормализации концентрация транскриптов мажорных генов должна снизиться на один–два порядка, концентрация транскриптов среднепредставленных генов может снизиться в несколько раз или остаться неизменной, а концентрация минорных транскриптов может вырасти не более чем в три раза. Результаты, полученные нами при анализе библиотек кДНК, нормализованных с помощью разработанного нами метода, хорошо согласуются с расчетными данными, что подтверждает эффективность нормализации. Следует отметить, что в НПЦ-библиотеке количество клонов, соответствующих ряду мажорных транскриптов, оказалось даже ниже, чем количество клонов, соответствующих минорным транскриптам. Мы предполагаем,

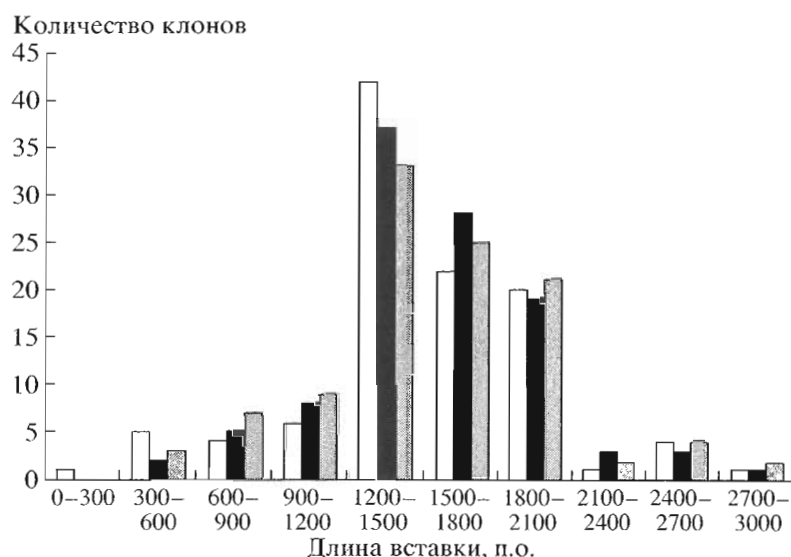


Рис. 5. Распределение плазмид с различным размером содержащихся в них вставок в библиотеках кДНК: белые столбцы – СК-библиотека, черные – НПЦ-библиотека, серые – НАК-библиотека.

что подобная “сверхнормализация” может объясняться тем, что при ДСН-обработке реакционной смеси, содержащей гибриды кДНК–РНК (нормализация первой цепи), деградации подвергаются только молекулы кДНК в составе гибридов, а высвобождаемые молекулы РНК могут образовывать

Таблица 2. Частота встречаемости различных транскриптов в ненормализованной СК- и нормализованных НПЦ- и НАК-библиотеках кДНК*

Ген	Номер в GenBank	Частота встречаемости в библиотеке кДНК, %**		
		СК	НПЦ	НАК
<i>GAPD</i>	NM_002046	1.561	0.002	0.01
<i>ACTB</i>	NM_001101	0.111	0.001	0.005
<i>UBC</i>	NM_021009	0.95	0.003	0.007
<i>YWHAZ</i>	NM_003406	0.044	0.009	0.03
<i>RPS9</i>	NM_001013	0.042	0.013	0.051
<i>RPL13A</i>	NM_012423	0.046	0.019	0.079
<i>NFKB1</i>	NM_003998	0.004	0.011	0.005
<i>IGF2R</i>	NM_000876	0.003	0.013	0.004
<i>P53</i>	NM_000546	<0.001	0.001	0.001
<i>JUNC</i>	NM_002228	<0.001	0.004	0.002

* НАК-библиотека – приготовлена из нормализованной амплифицированной кДНК; НПЦ-библиотека – из кДНК, полученной путем нормализации первой цепи кДНК; СК-библиотека – из ненормализованной амплифицированной кДНК.

** Частоту встречаемости вычисляли как отношение количества позитивных сигналов после гибридизации колоний с радиоактивно меченными фрагментами маркерных генов к общему числу проанализированных колоний, выраженное в %.

новые гибриды с молекулами кДНК оц-фракции. Вновь образованные ДНК–РНК-гибриды также подвергаются расщеплению ДСН. Нормализация амплифицированной кДНК в целом менее эффективна, но также приводит к значительному снижению концентрации мажорных транскриптов, что позволяет значительно повысить эффективность поиска редких генов в ситуации, когда доступна только тотальная РНК.

Таким образом, на сегодняшний день ДСН-нормализация является наиболее простым и эффективным методом нормализации кДНК. В отличие от ряда других методов, ДСН-нормализация не включает в себя трудоемких и малоэффективных стадий физического разделения ДНК-фракций, может быть использована для нормализации как амплифицированной кДНК, так и первой цепи кДНК, обогащенных полноразмерными молекулами. В ходе нормализации не происходит изменения средней длины кДНК в образцах, и распределение клонов по длине содержащихся в них вставок в нормализованных кДНК-библиотеках сходно с распределением в ненормализованных библиотеках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез первой цепи и амплификацию кДНК осуществляли с помощью набора реактивов SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, США), используя в качестве матрицы коммерчески доступную poly(A)⁺- или тотальную РНК (BD Biosciences Clontech, США), в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для синтеза первой цепи в случае РНК скелетной мышцы использовали олигонуклеотиды SMART II и CDS (BD

Biosciences Clontech, США), в случае РНК из других тканей – SMART II и CapNotIT20. Для амплификации первой цепи кДНК использовали олигонуклеотидный праймер SMART PCR (BD Biosciences Clontech, США). ПЦР осуществляли в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 3 нг первой цепи кДНК. Для получения образцов амплифицированной кДНК с концентрацией примерно 20 нг/мкл проводили 14 циклов ПЦР (95°C – 7 с; 65°C – 20 с; 72°C – 3 мин). Полученные образцы кДНК использовали для ДСН-нормализации и приготовления ненормализованных библиотек кДНК.

ДСН-нормализация кДНК. Сразу после завершения синтеза первую цепь кДНК, синтезированную на основе poly(A)⁺-РНК, пересаждали этанолом и растворяли в 20 мМ Трис-НСI (рН 7.5) до конечной концентрации кДНК 100 нг/мкл. Амплифицированную кДНК очищали с помощью набора реактивов QI Aquich PCR Purification Kit (Qiagen, США), пересаждали этанолом и растворяли в 20 мМ Трис-НСI (рН 7.5) до конечной концентрации кДНК 100 нг/мкл. Для нормализации отбирали аликвоты растворов кДНК, содержащие 150 нг первой цепи кДНК или амплифицированной кДНК, синтезированной на матрице poly(A)⁺-РНК; или 300 нг амплифицированной кДНК, синтезированной на основе тотальной РНК. Аликвоты смешивали с 1 мкл 4-кратного гибридизационного буфера (200 мМ Hepes, рН 7.5, 2 М NaCl, 0.8 мМ EDTA) и доводили объем реакционной смеси до 4 мкл, добавляя деионизованную воду. Реакционную смесь покрывали каплей минерального масла и денатурировали при 98°C в течение 3 мин. Далее образцы гибридизовали при 70°C в течение 4 ч. В предварительных экспериментах (данные не приведены) было показано, что время ренатурации образцов, необходимое для эффективной нормализации, составляет 4–6 ч и не должно превышать 7 ч. В образцах кДНК, ренатурация которых проводилась более 7 ч, наблюдалась частичная дегградация кДНК. После ренатурации к образцам кДНК добавляли по 5 мкл 2-кратного ДСН-буфера (100 мМ Трис-НСI, рН 8.0, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ дитиотреит), предварительно нагретого до 70°C, и продолжали инкубацию в течение 10 мин. Затем в реакцию добавляли 0.25 ед. акт. ДСН (Евроген, Россия) и инкубировали образцы при 70°C в течение 20 мин. ДСН ингибировали, добавляя к реакционной смеси 10 мкл 5 мМ EDTA. Далее к образцам нормализованной амплифицированной кДНК добавляли деионизованную воду до 40 мкл и отбирали по 1 мкл раствора для амплификации нормализованной фракции. Для амплификации образца нормализованной первой цепи кДНК использовали 1 мкл неразведенной реакционной смеси.

ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси с использованием набора реактивов Advantage 2 PCR kit (BD Biosciences Clontech, США). Для ампли-

фикации использовали олигонуклеотидный праймер CapM (5'AAGCAGTGGTATCAACGCAG), соответствующий внешней части фланкирующего кДНК-адаптера. Использование этого праймера препятствует уменьшению средней длины продукта ПЦР и позволяет сохранить фракцию длинных молекул кДНК [14]. До получения образцов амплифицированной кДНК с концентрацией примерно 20 нг/мкл проводили 20–22 цикла ПЦР (95°C – 7 с; 65°C – 20 с; 72°C – 3 мин).

Псевдо-Нозерн-блот-гибридизацию проводили как описано [20]. Нормализованную и ненормализованную амплифицированную кДНК разделяли в агарозном геле и переносили на мембраны Hybond-N (Amersham, США). Гибридизацию осуществляли в соответствии с протоколом [22] с использованием ³²P-меченых проб. Для приготовления проб использовали фрагменты генов, амплифицированные с помощью наборов олигонуклеотидных праймеров Human Amplimer Sets (BD Biosciences Clontech, США). Мечение осуществляли с помощью набора реактивов Prime-a-Gene Labeling System (Promega, США).

Приготовление библиотек кДНК. Образцы нормализованной и ненормализованной кДНК клонировали в вектор pGemT-easy (Promega, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя и использовали для трансформации *E. coli* посредством электропорации при помощи микропульсатора Biorad Micropulser (Biorad, США).

Гибридизация колоний. Для скрининга были отобраны колонии белого цвета. Колонии подращивали на продублированных нейлоновых фильтрах и гибридизовали с ³²P-мечеными пробами (приготовленными, как описано выше) в соответствии со стандартным протоколом [23]. Частоту встречаемости транскрипта оценивали как отношение количества клонов с положительным сигналом при гибридизации к общему количеству анализируемых клонов (от 7000 до 84000 клонов в зависимости от анализируемого транскрипта).

Оценка размеров вставок. По 106 случайных клонов из каждой библиотеки, показавших при бело-голубой селекции наличие вставки, подращивали в 150 мкл среды LB с ампициллином. По 1 мкл бактериальной культуры использовали для ПЦР с олигонуклеотидными праймерами M13 и оценивали размер полученных фрагментов с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные данные использовали для вычисления размеров вставок и построения гистограмм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Young B.D., Anderson M. // Nucleic Acids Hybridisation, a Practical Approach / Eds Hames B.D., Higgins S.J. Oxford-Washington DC.: IRL Press, 1985. P. 47–71.
2. Ko M. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. P. 5705–5711.

3. Patanjali S.R., Parimoo S., Weissman S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1943–1947.
4. Swaroop A., Xu J., Agarwal N., Weissman S.M. // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 1954.
5. Coche T., Dewez M. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 4545–4546.
6. Li W.-B., Gruber C.E., Lin J.-J., Lim R., D'Alessio J.M., Jessee J.A. // BioTechniques. 1994. V. 16. P. 722–729.
7. Sasaki Y., Ayusawa D., Oishi M. // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 987–992.
8. Soares M., Bonaldo M., Jelene P., Su L., Lawton L., Efstratiadis A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9228–9232.
9. Bonaldo M.F., Lennon G., Soares M.B. // Genome Res. 1996. V. 6. P. 791–806.
10. Лукьянов К.А., Гурская Н.Г., Матц М.В., Хаснеков Г.Л., Дьяченко Л.Б., Ченчик А.А., Ильевич-Стучков С.Г., Лукьянов С.А. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 686–690.
11. Carninci P., Shibata Y., Hayatsu N., Sugahara Y., Shibata K., Itoh M., Konno H., Okazaki Y., Muramatsu M., Hayashizaki Y. // Genome Res. 2000. V. 10. P. 1617–1630.
12. Shagin D.A., Rebrikov D.V., Kozhemyako V.B., Altshuler I.M., Shcheglov A.S., Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Staroverov D.B., Rasskazov V.A., Lukyanov S. // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1935–1942.
13. Zhulidov P.A., Bogdanova E.A., Shcheglov A.S., Vagner L.L., Khaspekov G.L., Kozhemyako V.B., Matz M.V., Meleshkevitch E., Moroz L.L., Lukyanov S.A., Shagin D.A. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32(3). P. e37.
14. Shagin D.A., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Matz M.V. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. e23.
15. Carninci P., Kvan C., Kitamura A., Ohsumi T., Okazaki Y., Itoh M., Kamiya M., Shibata K., Sasaki N., Iizawa M., et al. // Genomics. 1996. V. 37. P. 327–336.
16. Maruyama K., Sugano S. // Gene. 1994. V. 138. P. 171–174.
17. Chenchik A., Zhu Y.Y., Diatchenko L., Li R., Hill J., Siebert P.D. // BioTechniques Books / Eds Siebert P., Larriek J. Natick, MA., 1998. P. 305–319.
18. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 1558–1560.
19. Zhu Y.Y., Machleder E.M., Chenchik A., Li R., Siebert P.D. // Biotechniques. 2001. V. 30. P. 892–897.
20. Franz O., Bruchhaus I.I., Roeder T. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. e3.
21. Moreno-Palancas R.F., Fuldner R.A. // Automated DNA Sequencing and Analysis / Eds Adams M.D., Fields C., Venter J.C. London: Academic Press, 1994. P. 102–109.
22. Engler-Blum G., Meier M., Frank J., Muller G. // Anal. Biochem. 1993. V. 44. P. 235–244.
23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

A Method for the Preparation of Normalized cDNA Libraries Enriched with Full-Length Sequences

P. A. Zhulidov¹, E. A. Bogdanova¹, A. S. Shcheglov¹, I. A. Shagina², L. L. Wagner^{1,2}, G. L. Khazpekov³, V. V. Kozhemyako⁴, S. A. Lukyanov^{1#}, and D. A. Shagin¹

[#] Phone/fax: +7 (095) 330-7056; e-mail: luk@ibch.ru

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

² ZAO Evrogen, Moscow, Russia

³Cardiological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

⁴Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr. Stoletiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

We developed a new method for the preparation of normalized cDNA libraries enriched with full-length sequences. It is based on the properties of the recently characterized duplex-specific nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab. The duplex-specific nuclease is thermostable, it effectively cleaves double-stranded DNA and is inactive toward single-stranded DNA (Shagin *et al.*, *Genome Res.*, 2002, vol. 12, pp. 1935–1942). Our method enables the normalization of cDNA samples enriched with full-length sequences without use of laborious and ineffective stages of physical separation. The efficiency of the method was demonstrated in model experiments using cDNA samples from several human tissues. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cDNA normalization, duplex-specific nuclease, normalized cDNA libraries