

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.21

©Коллектив авторов

РАЗРАБОТКА НОВОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ БИБЛИОТЕК кДНК

В.И. Федченко, А.А. Калошин, А.Е. Медведев*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, РАМН. 119121 Москва, ул. Погодинская 10; тел: (499)245-05-09; факс: (499)245-0857; эл. почта: valfed@ibmc.msk.ru

Сконструирован оригинальный вектор рЕМ-(dT)₄₀f(+), который может быть использован для получения полноразмерных кДНК с полиаденилированных мРНК, выделенных из различных источников. Вектор рGEM-(dT)₄₀f(+) переводится в одноцепочечную, а затем в линейную форму, содержит на 3'-конце гомополимерный остаток (dT)₄₀ и служит вектором-праймером (ВП) для синтеза первой цепи кДНК. Использование синтетического олигонуклеотида, комплементарного к вектору и рекомбинантной ДНК, приводит к кольцеванию вектора и синтезу второй цепи ДНК. Такой подход имеет ряд преимуществ: (1) получение кДНК библиотек упрощено и состоит из трёх этапов; (2) получение полноразмерных кДНК молекул достигается вследствие добавления на 5'-конец гомополимера (dC)_n; (3) для получения библиотеки клонов требуется несколько микрограмм тотальной РНК; (4) можно получать клоны кДНК до 10 г.п.о; (5) для получения кДНК не используется ПСР-реакция, которая часто вызывает артефактные мутации в кДНК последовательности; (6) не образуются химерные продукты кДНК и не используется обработка рестриктазами.

Ключевые слова: библиотека кДНК клонов, вектор-праймер, полноразмерные кДНК, синтез кДНК.

ВВЕДЕНИЕ. С появлением полных генетических нуклеотидных последовательностей различных эукариот [1-3] на первый план вышла задача их расшифрования. С другой стороны, получение библиотек кДНК для различных видов прокариот и эукариот, необходимых для клонирования соответствующих генов, в настоящее время также не потеряло актуальности [4, 5].

Положение генов на хромосоме, определение регуляторных областей, идентификация интрон-экзонной структуры дает надежный результат при наличии полной последовательности транскрипта мРНК. Классический метод такого картирования - это синтез полной кДНК на матрице РНК с использованием обратной транскриптазы.

ВЕКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ БИБЛИОТЕК К ДНК

Большинство популярных методов получения библиотек кДНК не обеспечивает получения полноразмерных библиотек, поскольку вследствие процесса усечения первой цепи кДНК удаляется терминальная последовательность [6]. Защиту 3'-конца первой цепи кДНК можно осуществить двумя методами. 1) - путем добавления гомо-олигомерного хвоста при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы [7-9] или синтетического олигонуклеотида с применением Т4 РНК-лигазы [10]; 2) – с заменой структуры кэпа синтетическим олигомером [11]. Защита структуры кэпа олигонуклеотидами была успешно применена различными исследователями при получении полноразмерных кДНК клонов [12, 13] и определении промоторной области [14]. При получении библиотек кДНК неизбежно образуются усеченные клоны кДНК в результате деградации мРНК. Поэтому невозможно определить нативность полученных полноразмерных клонов кДНК. Это является общей проблемой для всех методов, поскольку кроме прямого секвенирования 3'-конца кДНК критерия оценки нативности кДНК нет.

Наиболее распространенные методы клонирования кДНК дают низкий выход рекомбинантных кДНК клонов с полноразмерной последовательностью кДНК [6]. Частично это связано с низким содержанием клонируемой мРНК, частично - с неэффективностью используемого метода. Выход полноразмерного продукта кДНК зависит от условий синтеза первой и второй цепи кДНК. Обработка двухцепочечной кДНК экзонуклеазой S1 также добавляет вариабельность синтезированной кДНК, особенно 5'-проксимальной области. Чтобы сохранить 3'-проксимальную последовательность кДНК и обогатить кДНК полноразмерными молекулами используют олигонуклеотид, комплементарный 5'-проксимальному концу мРНК, служащей затравкой при синтезе второй цепи кДНК. После синтеза второй цепи кДНК проводят её фракционирование по размеру. Ранее, для эффективного клонирования полноразмерных или близких к полноразмерным кДНК с полиаденилированных мРНК матриц, использовали метод разработанный Окаюта и Берг [7].

В данной работе мы значительно упростили процедуру клонирования, предложенную Окаюта и Берг [7]. Для этого нами был создан специальный одноцепочечный вектор-праймер, который можно использовать при клонировании различных поли-А содержащих мРНК-матрицу. Наш метод основан на использовании готового одноцепочечного вектора-праймера (ВП), содержащего на 3'-конце ДНК гомополимер (Т)_n. Этот ВП служит одновременно для синтеза первой цепи кДНК, так и для кольцевания и синтеза второй цепи ДНК с использованием синтетического олигонуклеотида (СО). Использование одноцепочечного ВП и СО значительно упрощает процедуру получения последовательностей кДНК и с большой эффективностью позволяет выделить полноразмерные клоны кДНК содержащие нативный 5'-проксимальный конец.

Полученные результаты показали, что предложенный нами метод получения кДНК библиотеки имеет значительное преимущество в виде простоты, эффективности и высоким выходом полноразмерных клонов кДНК.

МЕТОДИКА.

Реактивы. Соли, трис и кислоты использовали фирмы Sigma (США). Олигонуклеотиды были синтезированы трифосфатным методом на автоматическом синтезаторе производства Новосибирск (Россия). Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты; dATP, dCTP, dGTP, dTTP получены от фирмы "Farmacia Biotech" (Швеция); бактопептон, бакто-триптон, дрожжевой экстракт и бактоагар фирмы Difco (США). ДНК-полимераза, обратная транскриптаза, эндонуклеазы рестрикции (XbaI, HindIII, ScaI) и стандартные буферы - фирмы "Boehringer Mannheim" (Германия). Ингибитор рибонуклеазы, терминальная дезокситрансфераза и рибонуклеаза H, T4 ДНК лигаза фирмы Biolabs (Англия). AMV (Avian Myeloblastosis Virus) ревертаза, плазмидные векторы pGEM-3Z(f+) – от фирмы "Promega" (США). Фаг помощник R408, бактериальный штамм dT-*E. coli* K12 MN 522 - фирмы "Qiagen" (Германия).

Получение вектора-праймера.

Вставка гомополимера в область XbaI сайта. Плазмиду pGEM-3Zf(+) (10 мкг) обрабатывали 50 ед. рестриктазы XbaI при 37°C в стандартном (200 мкл) буфере. После 3-часовой инкубации реакцию останавливали 20 мкл раствором 0,25 М EDTA pH 8,0 и 10% SDS (EDTA-SDS). ДНК подвергали фенол хлороформной экстракции (ФХЭ), с последующим осаждением ДНК этанолом. Образованные в результате гидролиза плазмиды “липкие” XbaI-концы затупляли путём достройки внутренних 3'-концов ДНК-полимеразой I фрагмента Кленова. Реакционная смесь (100 мкл) содержала 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, по 40 мкМ каждого dNTP и 25 ед. фрагмента Кленова. После 30 мин инкубации при комнатной температуре, реакцию останавливали 2,5 мкл раствором EDTA-SDS, проводили ФХЭ и ДНК осаждали этанолом. Гомополимерный дезокситимидиновый (dT) и дезоксиаденилированный (dA) остаток (рис. 1 - 3a и 3b) подсоединяли к затупленному XbaI-концу при помощи терминальной трансферазы тимуса теленка (TdT), используя две параллельные реакции. В первой реакции подсоединяли гомополимер (dT)_n, во второй - (dA)_n. Первая реакционная смесь (60 мкл) включала: 200 мМ каодилята калия, 25 мМ Трис-HCl (pH 6,9), 2 мМ дитиотрейтола (DTT), 1,5 мМ CoCl₂, 5 мкг ДНК обработанную XbaI, 0,3 мМ dTTP, 100 ед TdT. Вторая смесь содержала 0,5 мМ dATP вместо 0,3 мМ dTTP. После инкубации при 37°C первой смеси в течение 10 мин, а второй - 30 мин - реакцию останавливали 3 мкл раствора EDTA-SDS. Раствор - обрабатывали ФХЭ и ДНК осаждали этанолом.

Получение двухцепочечной формы ВП. ДНК в первой и во второй смеси обрабатывали 25 ед. рестриктазы ScaI в 50 мкл стандартного ScaI-буфера в течение трех часов при 37°C. Реакцию останавливали 2,5 мкл раствора EDTA-SDS. После ФХЭ ДНК осаждали этанолом. В результате гидролиза рестриктазой ScaI образуются большой (1786 п.о. + (dT)_n или (dA)_n) и малый (1413 п.о. + (dT)_n или (dA)_n) фрагменты ДНК, которые разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Лигирование большого фрагмента (1786 п.о. + (dA)_n), содержащего на 3'-конце гомополимер (A)_n и малого фрагмента (1413 п.о. + (dT)_n) с гомополимером (dT)_n проводили в 50 мкл среде, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl₂, 20 мМ DTT, 1 мМ АТР, 50 мкг/мл BSA и 10 ед. T4-ДНК лигазы, при 16°C в течение 5 часов. Реакционную смесь прогревали в течение 10 мин при 60°C и этой смесью трансформировали клетки *Escherichia coli*.

Получение одноцепочечной кольцевой формы ДНК. Вектор pGEM-(dT)₄₀f(+) переводили в одноцепочечную форму следующим образом. Двухцепочечную плазмиду pGEM-(T)₄₀f(+) в штамме MN522 высевали на чашки с минимальным агаром M9 и 100 мкг/мл ампициллина (Ам) и инкубировали при 37°C в течение 12 часов. Отобранную ампициллин-резистентную колонию наращивали в 5 мл жидкой TYR среды, содержащей 100 мкг/мл Ам, при 37°C в течении 12 часов с интенсивным перемешиванием. К 100 мкл суспензии клеток добавляли 10 мл среды TYR со 100 мкг/мл Ам в 50 мл колбе и интенсивно перемешивали в течение 30-40 мин при 37°C, после чего добавляли фаг-помощник R408 (около 10¹¹ фаговых частиц на 1 мл) и продолжали интенсивно перемешивать в течение 6-8 часов. Клетки осаждали центрифугированием при 12000 g 20 минут, осторожно отбирали надосадочную жидкость (около 8 мл). К надосадочной жидкости добавляли 0,25 объема смеси ПЭГ/NaCl - 20% (ПЭГ м.в. 6000 вес/объем) и 2,5 М NaCl, выдерживали при 0°C 15 минут и центрифугировали 15 минут при 12000 g. Осадок фагемидной ДНК ресуспендировали в 1 мл ТЕ буфера (10 мМ Трис-HCl pH 8,0 и 0,1 мМ EDTA), проводили двукратную ФХУ, ДНК осаждали этанолом и растворили в 50 мкл ТЕ буфера.

ВЕКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ БИБЛИОТЕК К ДНК

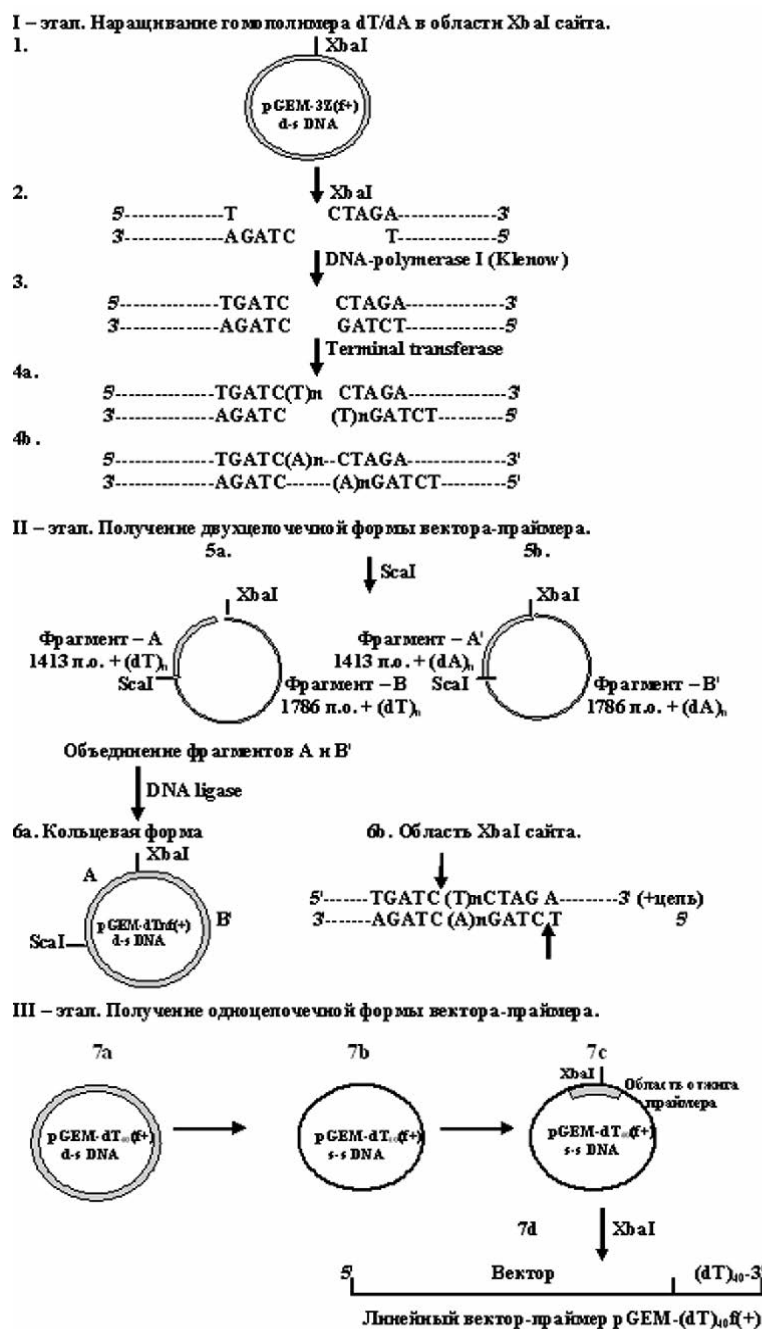


Рисунок 1.

Схема получения одноцепочечной формы вектора-праймера pGEM-(dT)₄₀f(+).

I – этап. Нарастивание гомополимера dT/dA в области XbaI сайта. (пункт – 1-2) - вектор pGEM-3Z(f+) разрезали по сайту XbaI в области MCS. (пункт – 3) - “липкие” XbaI концы затупляли путём дотраивания ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова). (пункт – 4) - на 3'-концы наращивали с использованием терминальной трансферазы гомополимеры: (пункт – 4a) – (dT)_n и (пункт – 4b) – (dA)_n.

II – этап. Получение двухцепочечной формы ВП. (пункт – 5) - линейные вектора (пункт – 4a и 4b) разрезали по сайту ScaI, получали фрагменты A и B' (1413 п.о. + (dT)_n) и A' и B' (1786 п.о. + (dA)_n). (пункт – 6a) – фрагмент - A (1413 п.о. + dT_n) и фрагмент B' - (1786 п.о. + (dA)_n) объединяли, лигировали T4 ДНК лигазой. В области XbaI сайта образовывался гомополимер dT/dA (пункт – 6b).

В результате отобран двухцепочечный ВП pGEM-(dT)₄₀f(+).

III – этап. Получение одноцепочечной формы ВП. Двухцепочечную форму ВП (пункт - 7a), с использованием фага помощника, переводили в одноцепочечную форму (пункт – 7b), область сайта XbaI отжигали с олигонуклеотидом (пункт – 7c) и после обработки рестриктазой XbaI получали линейный ВП с гомополимером (dT)₄₀ (пункт – 7d).

Олиго-направленная рестрикция. Для получения линейной одноцепочечной формы ДНК pGEM-(dT)₄₀f(+) 10 мкг ДНК, достаточной на 10 клонирований, отжигали с олигонуклеотидом 5'-CAGGTCGACTCTAGAAAA (комплементарным области MCS). Реакцию проводили в 100 мкл раствора содержащего 10 мкл праймера 0,5 пмоль/мкл и 10 мкл 1 мкг/мкл фагемидной ДНК pGEM-(dT)₄₀f(+). Раствор прогревали 2 минуты при 65°C, затем охлаждали до комнатной температуры в течение 30 минут. К раствору добавляли 10 мкл стандартного 10xXbaI буфера и 50 ед. рестриктазы XbaI и инкубировали 3 час при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мкл раствора EDTA-SDS, проводили ФХЭ, ДНК осаждали этанолом и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Для удаления избытка праймера и фрагментов праймера, образующихся после гидролиза рестриктазой, смесь прогревали при 95°C 3 мин, быстро охлаждали во льду и проводили гель фильтрацию на сефадексе G-50. Сефадекс G-50 упаковывали в 0,5 мл пробирку, дно которой прокалывали и покрывали стеклянным фильтром GF/A. Уплотнение сефадекса и удаление ТЕ-буфера проводили при 1000 об/мин, используя настольную центрифугу Eppendorf 5415 C. Затем 50 мкл смеси денатурированного дуплекса ДНК вносили в 0,5 мл пробирку с сефадексом G-50, которую вставляли в 1,5 мл пробирку и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин до полного просыхания сефадекса. Прошедший через сефадекс G-50 раствор имел объем 50 мкл и содержал одноцепочечную линейную ДНК. Примесь бактериальной РНК удаляли щелочным гидролизом, который проводили с 0,1 М NaOH при 65°C в течение 10 минут. Для нейтрализации щелочи добавляли 1/10 объема 10% CH₃COOH и 2,5 объема этанола, оставляли на 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали 15 минут при 12000 g. Осадок растворяли в 50 мкл ТЕ буфера. Присутствие РНК контролировали электрофоретически в 1% агарозном геле. Наличие в препарате других примесей не оказывало влияния на синтез кДНК.

Получение библиотеки клонов.

Выделение тотальной мРНК. Из 1 грамма печеночной ткани мыши тотальную РНК выделяли по прописи фирмы Promega. Для этого использовали стандартный набор по протоколу Promega "SV Total RNA Isolation System", для выделения тотальной РНК из тканей животных.

Синтез первой цепи кДНК. Получение рекомбинантной ВП-сДНК проводили с использованием суммарной полиаденилированной мРНК и линейного ВП. Для этого 10 мкг тотальной РНК в 10 мкл воды прогревали 5 мин при 65°C, охлаждали во льду, добавляли 1 мкг ВП pGEM-(T)₄₀f(+), 5 мкг актиномицина D, 5 мкл 10x буфера для обратной транскриптазы: 500 mM Трис-HCl (pH 8,3 при 42°C), 80 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 10 mM DTT, по 0,5 mM dNTP, 50 ед. РНКазина и 50 ед. AMV (Avian Myeloblastosis Virus) обратной транскриптазы общий объем 50 мкл. После инкубации при 42°C в течение 2 часов добавляли 5 мкл раствора EDTA-SDS, проводили ФХЭ и осаждали кДНК добавлением 50 мкл 4 М ацетата аммония и 250 мкл 96% этанола. Продукт промывали холодным 70% этанола, растворяли в 25 мкл ТЕ буфера и повторно осаждали, добавляя 25 мкл 4М ацетата аммония и 100 мкл 96% этанола; осадок промывали 70% этанолом и растворяли в 25 мкл воды без примеси РНКазы.

Контрольный синтез первой цепи кДНК с тотальной РНК проводили аналогичным способом, за исключением: 1 – при синтезе с ВП добавляли 50 мкКи [α -³²P]dATP; 2 – при синтезе без ВП, добавляли 5 мкг олиго (dT)₁₂₋₁₈ и 50 мкКи [α -³²P]dATP.

Цетидинилирование кДНК/мРНК гетеродуплекса. К 3'-концу гетеродуплексной кДНК-ВП подсоединяли поли(dC) участок с помощью терминальной дезокситрансферазы. К продукту синтеза 1-й цепи кДНК (во льду) добавляли 8 мкл 5-кратного буфера TdT (200 mM какодилата калия, 25 mM Трис-HCl (pH 6,9) 2 mM дитиотрейтола (DTT), 1,5 mM CoCl₂, 1 mM dATP, 10 ед. TdT и инкубировали 15 минут при 37°C. Реакцию останавливали 2,5 мкл раствора EDTA-SDS и проводили ФХЭ, ДНК осаждали этанолом и растворяли в 20 мкл ТЕ-буфера.

Кольцевание и синтез второй цепи ДНК. Линейный гетеродуплекс ВП-кДНК/РНК, содержащий на 3'-конце поли-(dG) остаток, закольцовывали с использованием синтетического олигонуклеотида 5'-GCATGCCTGCAGGTCGACTCTA(G)₁₅. Этот олигонуклеотид комплементарен 5'-концу +цепи вектора-праймера и 3'-концу кДНК и служит затравкой для синтеза второй цепи ДНК. Кольцевание молекулы ДНК проводили в 40 мкл смеси содержащей ДНК/РНК гетеродуплекс, олигонуклеотид (0,2 пмол/мкл), 100 мМ HEPES (pH 7.6), 68 мМ KCl. Смесь прогревали 10 мин при 80°C, медленно охлаждали (4 часа) до комнатной температуры, после чего проводили синтез второй цепи ДНК. К раствору добавляли 12 мкл 5× буфера (500 мМ HEPES pH 8,0, 340 мМ KCl, 40 мМ MgCl₂, 75 мМ DTT) 5 мкл 2,5 мМ dNTP, 1 мкл 15 мМ NAD, 5 ед. T4 ДНК-лигазы, 50 ед. ДНК-полимеразы I *E. coli* и 1 ед. РНКазы H. Объем смеси доводили до 100 мкл и инкубировали 2 часа при 15°C. Реакцию останавливали 5 мкл раствором EDTA-SDS, проводили ФХЭ, кДНК высаживали этанолом и растворяли в 20 мкл TE-буфера.

Трансформация клеток *E. coli*. Рубидиевые клетки *E. coli* K12 (штамм NM 522) готовили по модифицированному методу Kushner [15], аликвоты компетентных клеток (по 0,2) мл, хранили при -70°C. Трансформацию проводили по стандартному методу Cohen [16], используя 1 мкл вектора. Трансформированные клетки высевали на чашки с LB-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина (Ам). После инкубации при 37°C в течение ночи все индивидуальные колонии, выросшие на чашке, перекалывали на 96-луночный планшет в LB среду, содержащую антибиотик 100 мкг/мл Ам. После инкубации при 37°C в течение ночи, добавляли глицерин и хранили при -80°C.

Выделение плазмидной ДНК. Плазмидную ДНК получали из ночной культуры колонии в 3 мл LB раствора, содержащего 100 мкг/мл (Ам). Плазмидную ДНК выделяли системой стандартного набора фирмы Promega “Wizard Plusn SV Minipreps DNA Purification Systems”.

Секвенирование ДНК. Секвенирование проводили на капиллярном ДНК секвенаторе (Applied Biosystems 310 DNA analyzer) с использованием BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Нуклеотидные последовательности 3'-концевой части кДНК определяли с использованием праймера 5'GAATACTCAAGCTTGCATGCC, комплементарного области MCS вектора. Полученную последовательность ДНК соотносили с банком мышиных генов (GeneBank) с использованием BLAST программы с сайта National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Получение вектора-праймера.

Мы разработали простой и эффективный метод приготовления кДНК библиотек с высоким выходом полноразмерных кДНК. Он основан на использовании линейного одноцепочечного вектора-праймера, содержащего на 3'-конце гомополимер (dT)₄₀, который служит затравкой для синтеза первой цепи кДНК.

В данном методе процесс получения вектора-праймера разбит на три этапа: (I) – наращивание гетеродуплекса dT/dA в области XbaI сайта; (II) – получение кольцевой двухцепочечной формы вектора-праймера; (III) – образование линейной одноцепочечной формы вектора-праймера. Схема получения линейного вектора-праймера с гомополимером (dT)_n во множественном участке клонирования (MCS) представлена на рисунке 1. Получение ВП при клонировании кДНК, само по себе является отдельной и весьма трудоемкой процедурой. ВП можно получить из любой коммерческой плазмиды содержащей в MCS XbaI сайт и область репликации фага. Для получения ВП мы использовали плазмидный вектор серии pGEM-3Z фирмы “Promega”, а именно – pGEM-3Zf(+).

На первом этапе клонирования проводили гидролиз вектора pGEM-3Zf(+) по сайту XbaI. При гидролизе в этом сайте образуются “липкие” концы, на 3'-конце имеется тимидиновый нуклеотид. Если достроить “липкие” концы ДНК и между ними вставить гомополимер (dT/dA)_n, то при обработке этой же рестриктазой на 3'-конце “+”-цепи вектора получается гомополимер (dT)_n.

Чтобы получить такой ВП, плазмиду pGEM-3Zf(+) обрабатывали рестриктазой XbaI. Образующиеся после гидролиза выступающие 5'-XbaI-концы затупляли достраиванием ДНК-полимеразой I фрагмента Кленова (рис. 1, этап I – 1-3). Далее проводили две параллельные реакции с использованием терминальной трансферазы. В первой реакции, на 3'-концы двухцепочечной ДНК подсоединяли гомополимер (dT)_n, во второй - гомополимер (dA)_n (рис. 1, этап I – 4, 4b). Затем плазмидные ДНК, содержащие на 3'-концах гомополимеры (dT)_n и (dA)_n, обрабатывали рестриктазой ScaI. При гидролизе вектора pGEM-3Zf(+) рестриктазами XbaI и ScaI образуются два фрагмента – большой В и В' (1786 п.о. + (dT)_n или (dA)_n н.) и малый А и А' (1413 п.о. + (dT)_n или (dA)_n н.) (рис. 1, этап II – 5a, 5b). Эти фрагменты ДНК хорошо разделяются в 1% агарозном геле. В результате электрофоретического деления были получены четыре фрагмента А, А', В и В'. При объединении малого фрагмента ДНК А с гомополимером (dT)_n и большого фрагмента ДНК В' с гомополимером (dA)_n получали вектор pGEM-(dT)_nf(+), который при гидролизе рестриктазой XbaI на 3'-конце “+”-цепи ДНК содержал гомополимер (dT)_n (рис. 1, этап II – 6a, 6b). После клонирования и отбора клонов проводили рестриктный анализ и секвенирование. Из серии плазмидных векторов pGEM-(dT)_nf(+) был отобран клон pGEM-(dT)₄₀f(+) двухцепочечной ДНК (d-s DNA), содержащий в области XbaI сайта гомополимер (dT)₄₀ на “+”-цепи плазмидной ДНК.

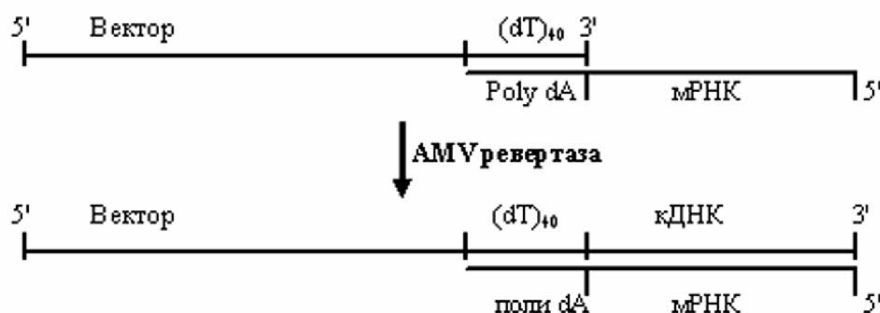
Сконструированный вектор pGEM-(dT)₄₀f(+) обладает некоторыми свойствами одноцепочечного бактериофага от которого он происходит. Такие вектора обычно содержат область репликации одноцепочечных фагов, таких как M13, f1, fd и их подобных и при выделении одноцепочечной формы фagemидной ДНК требуется такой же подход, как при получении одноцепочечных фагов. Метод получения фagemидной ДНК описан в материалах и методах. Линейную форму одноцепочечной плазмидной ДНК pGEM-40T(f+) получали гидролизом по сайту XbaI. Процедура включала отжиг одноцепочечного вектора с синтетическим олигонуклеотидом комплементарным участку в области XbaI 5'(CAGGTCGACTCTAGAAAA). При температуре ниже 35°C происходит полное отжигание праймеров на матрице ДНК. После рестрикции XbaI получается линейный одноцепочечный ВП с гомополимером (dT)₄₀ на 3-конце (рис. 1, этап III – 7a, 7b, 7c и 7d). Олигонуклеотидные фрагменты, образующиеся в результате гидролиза рестриктазой XbaI (см. методы), необходимо удалять, так как они могут мешать при синтезе первой цепи кДНК.

Синтез полноразмерной кДНК библиотеки.

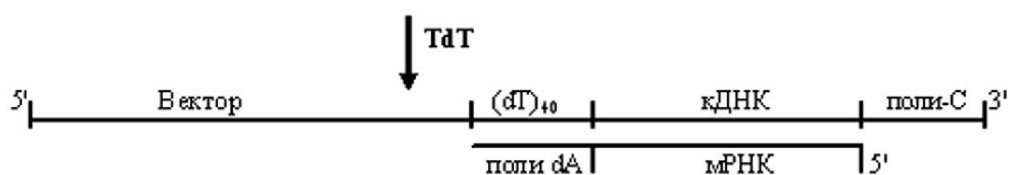
При наличии подготовленного ВП процесс получения библиотеки кДНК можно разбить на три этапа: I – синтез первой цепи кДНК с помощью одноцепочечного ВП, содержащего на 3'-конце гомополимер (dT)₄₀, и обратной транскриптазы; II – подсоединение гомополимера (dC)_n с помощью терминальной дезокситрансферазы и III – соединение первой цепи кДНК с другим концом вектора-праймера (закольцовывание молекулы одноцепочечной ДНК) и синтез второй цепи кДНК (см. рис. 2).

На первом этапе синтеза кДНК библиотеки мы использовали готовый линейный ВП, содержащий на 3'-конце гомополимер (dT)₄₀, служащий для отжига мРНК и синтеза кДНК (рис. 2 – этап I). Это значительно упрощает процедуру клонирования и дает хороший результат при получении полноразмерных кДНК копий с мРНК матриц [7].

I – Синтез первой цепи кДНК



II – Подсоединение гомополимера dC к 5'-концу кДНК



III - Кольцевание и синтез второй цепи молекулы



Рисунок 2.

Схема синтеза полноразмерных кДНК.

I - этап; синтез первой цепи кДНК идёт на матрице мРНК после отжига мРНК с вектором-праймером с использованием AMV ревертазы. II - этап; подсоединение гомополимера dC к 5'-концу кДНК с использованием терминальной трансферазы (TdT). III - этап; кольцевание гетеродуплекса ДНК/РНК с участием олигонуклеотида комплементарного 5'-концу + цепи вектора-праймера и 3'-концу кДНК с последующим синтезом второй цепи ДНК.

Количественный синтез первой цепи кДНК вначале исследовали на тотальной РНК с использованием в качестве затравки олиго (dT)₁₂₋₁₈. (см. рис. 3). Поддерживая постоянную концентрацию олиго (dT)₁₂₋₁₈, мы увеличивали концентрацию тотальной РНК печени мыши. При достижении количества РНК в пробе до 10 мкг выход продукта кДНК резко увеличивался (рис. 3 дорожка – 2), а при последующем увеличении происходило резкое подавление синтеза кДНК (рис. 3 дорожки – 3 и 4). Значительное повышение выхода продукта кДНК, по-видимому, можно объяснить достижением оптимального соотношения матрицы РНК, затравки и AMV ревертазы. Такое соотношение создает наиболее благоприятные условия AMV ревертазе для синтеза кДНК. Увеличение тотальной РНК в два раза (до 20 мкг РНК) приводит к ингибированию элонгации фермента и преимущественному синтезу короткого продукта. Такое же явление наблюдается при недостатке тотальной РНК (1 мкг РНК). Исходя из этих результатов, мы определили оптимальное соотношение тотальной РНК к ВП (рис. 3 дорожки – 5-8).

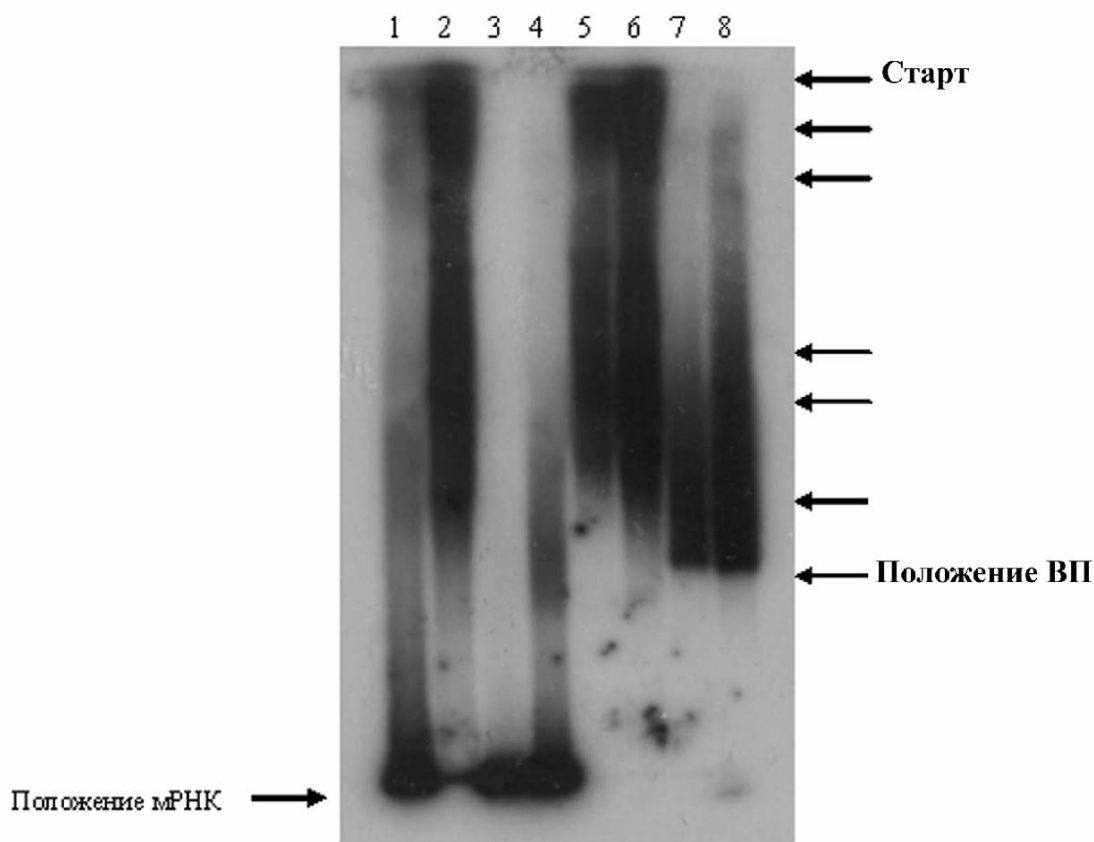


Рисунок 3.

Электрофорез в 1,2% щелочном агарозном геле синтеза первой цепи кДНК, полученной на тотальной мРНК печени мыши. Исследовалось соотношение мРНК к вектору-праймеру. Стрелками (без обозначения) показаны минорные полосы кДНК, положение вектора-праймера и положение мРНК. Дорожки: 1 - 1 мкг мРНК/5 мкг олиго (dT)₁₂₋₁₈; 2 - 10 мкг мРНК/5 мкг олиго (dT)₁₂₋₁₈; 3 - 20 мкг мРНК/5 мкг олиго (dT)₁₂₋₁₈; 4 - 25 мкг мРНК/5 мкг олиго (dT)₁₂₋₁₈; 5 - 13 мкг мРНК/1 мкг ВП; 6 - 10 мкг мРНК/1 мкг ВП; 7 - 7 мкг мРНК/1 мкг ВП; 8 - 5 мкг мРНК/1 мкг ВП.

При соотношении от 5 до 7 мкг тотальной РНК и 1 мкг ВП синтезируются в основном более короткие кДНК фрагменты (рис. 3 дорожки – 7 и 8). При соотношении от 10 до 13 мкг тотальной РНК и 1 мкг ВП размер кДНК значительно увеличивается (рис. 3 дорожки – 5 и 6). При соотношении 10 мкг мРНК и 1 мкг ВП практически весь ВП содержит фрагменты кДНК, и синтез кДНК достигает оптимального размера и уровня. Такое соотношение мРНК/ВП дает около 10^6 одиночных колоний.

После синтеза первой цепи кДНК образуется гетеродуплекс вектор-кДНК/мРНК в котором удалять РНК необязательно. Присутствие в гетеродуплексе РНК не мешает на дальнейших этапах клонирования кДНК и уменьшает число операций.

На втором этапе синтеза полноразмерных кДНК к 3'-концу кДНК подсоединяли поли-(dC)_n с использованием TdT (рис. 2 – этап II). Следует отметить, что гомополимер (dC)_n может подсоединяться в гетеродуплексе ДНК/РНК только

ВЕКТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ БИБЛИОТЕК К ДНК

к одному 3'-концу молекулы. С учетом того, что в отличие от использования двучепочного ВП, в данном случае не требуется проводить дополнительную рестриктазную обработку для удаления лишнего гомополимера [7, 17]. Для присоединения (dC)_n с использованием TdT к 3'-концу кДНК, необходимо максимально полно удалить dNTP, участвующие при синтезе первой цепи кДНК. Это необходимо сделать для того, чтобы при реакции с TdT происходило включение только dC нуклеотида. Для этого мы использовали двойное переосаждение гетеродуплекса с ацетатом аммония (см. раздел методика). Это приводит к максимальному вымыванию свободных dNTP, остающихся после синтеза первой цепи кДНК.

Третий этап представляет собой последовательность двух реакций (рис. 2 – этап III). В начале (А) – происходит кольцевание рекомбинантной формы ДНК. В этом случае происходит соединение 3'-конца кДНК, содержащий гомополимер (dC)_n с 5'-концом ВП при помощи синтетического олигонуклеотида 5'-CCTGCAGGTCTGACTCTA(G)₁₅, который комплементарен к обоим концам линейной ДНК. Олигонуклеотид добавляли в стехиометрическом соотношении, примерно на одну молекулу рекомбинантной ДНК десять молекул праймера. Затем (В) – синтез второй цепи ДНК с замещением гетеродуплексной РНК при помощи ферментов ДНК-полимеразы I *E. coli* и РНКазы Н и образования ковалентной кольцевой формы рекомбинантной ДНК с помощью Т4 ДНК-лигазы.

Клетки *E. coli* трансформировали рекомбинантным вектором. Выход трансформантов зависел от метода трансформации. Мы применяли метод трансформации рубидиевых клеток, который позволяет получить трансформанты с эффективностью 10⁹ на мкг контрольной плазмидной ДНК [16]. Для того чтобы избежать генерирования копий клонов клетки высевали сразу на чашку с агаром, содержащим 100 мг/мл Ам. Библиотека кДНК клонов составляла примерно 10⁶-10⁷ независимых колоний на мкг рекомбинантной ДНК. Все индивидуальные колонии, выросшие на чашке, перекалывали в 96-луночный планшет с LB средой, содержащей 100 мг/мл Ам. После инкубации при 37°C в течение ночи, добавляли глицерин и хранили при -80°C.

Из библиотеки клонов нами было проанализировано 100 5'-концевых последовательностей кДНК. В таблице 1 суммированы результаты анализа 5'-терминальных последовательностей, которые сравнивали с генными последовательностями на сайте (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast...>). Из 100 клонов было выявлено 27 полноразмерных клонов, которые соответствовали 12 генам. Наибольшее количество клонов приходилось на три гена (гены избыточной экспрессии в печени мыши): Mup1, Apoe и Alb1. Наибольшее количество, 6 полноразмерных и 5 усеченных клонов, приходится на главный белок мочи 1 (Mup1 - 925 п.о.); второй по количеству полноразмерных клонов является ген аполипопротеин Е (Apoe - 1104 п.о.) на который приходится 4 полноразмерных и 7 усеченных клонов; третий ген – альбумин (Alb1 - 2043 п.о.) содержал 3 полноразмерных и 9 усеченных клонов. Следовательно, количество полноразмерных клонов имеет прямую зависимость от количества мРНК данного гена и ее размера в препарате выделенной тотальной РНК. Другие проанализированные гены также содержали как полноразмерные, так и усеченные клоны. Примерно на один полноразмерный клон приходилось два усеченных клона. Два гена вовсе не содержали полноразмерных кДНК клонов. Кроме того, нам не удалось идентифицировать 29 клонов. Возможно, это связано с появлением мутантных последовательностей кДНК в клонах.

В таблице 2 показано разнообразие в участке старта транскрипции полноразмерных кДНК клонов от трех генов Alb1, Apoe и Mup1. У большинства полноразмерных клонов в области старта транскрипции наблюдается небольшая делеция в пределах 20 нуклеотидов, но два клона имеют полный мРНК транскрипт. Можно предположить, что большинство 5'-концевых мРНК в тотальной РНК имеют исключенную кэп-структуру.

Таблица 1. Полноразмерные клоны, полученные от кДНК библиотеки печени мыши. Alb - Albumin; Apoe - apolipoprotein E; Apo2 - apolipoprotein A-II; Arg1 - arginase, liver; Dao - D-amino acid oxidase; Mup1 - major urinary protein 1; Mup2 - uroplakin II; Fabp1 - fatty acid binding protein 1, liver; Gpx1 - glutathione peroxidase 1; Sept1 - septin 1; Serpina1b - serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1B; Trf - transferrin.

Гены печени мыши	Размер мРНК в нуклеотидах	Число полноразмерных клонов	Число усеченных клонов	Общее количество клонов
Alb1 (NM 009654.3)	2043	3	9	12
Apoe (NM 009696.2)	1104	4	7	13
Apo2 (NM 013474.1)	477	2	1	3
Arg1 (NM 007482.3)	1489	0	3	3
Dao (NM 010018.2)	1712	1	3	4
Mup1 (NM 031188.1)	925	6	5	11
Mup2 (U08030.1)	862	2	2	4
Fabp1 (NM 017399.1)	492	3	1	4
Gpx1 (NM 008160.1)	923	2	1	3
Sept1 (NM 017461.2)	1466	1	4	5
Serpina1b (NM 009244.4)	1434	1	5	6
Trf (NM 133977.1)	2345	0	5	5
Неизвестные кДНК клоны				29
Всего клонов.		25	46	100

Таблица 2. 5'-концевые последовательности кДНК клонов полученных на тотальной РНК печени мыши. Alb1 - Mus musculus albumin; Apoe - Mus musculus apolipoprotein E; Mup1 - Mus musculus major urinary protein.

Гены печени мыши	Последовательность соединения между вектором и кДНК	Длина кДНК	Число клонов
Alb1 (NM_009654.3) Полноразмерные клоны Усеченные клоны Всего клонов	gac ctag(c),tgacacagatcccttccatcaacccc... gac ctag(c),-----cagatcccttccatcaacccc... gac ctag(c),-----cttccatcaacccc...	2043 п.о.	1 1 1 9 12
Apoe (NM_009696.2) Полноразмерные клоны Усеченные клоны Всего клонов	gac ctag(c),ggactgttccgaaggagctgactggcca... gac ctag(c),-----ctgttccgaaggagctgactggcca... gac ctag(c),-----cggaaggagctgactggcca... gac ctag(c),-----aggagctgactggcca...	1104 п.о.	0 1 1 2 7 11
Mup1 (NM_031188.1) Полноразмерные клоны Усеченные клоны Всего клонов	gac ctag(c),ctgaaccagagatataagaacaagca... gac ctag(c),-----ccagagatataagaacaagca... gac ctag(c),-----gagatataagaacaagca... gac ctag(c),-----ataagaacaagca... gac ctag(c),-----caagca...	925 п.о.	1 2 1 1 1 5 11

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Наши результаты показывают, что метод применения линейного праймера-вектора при получении полноразмерных клонов кДНК, является быстрым и эффективным способом при создании библиотек кДНК и имеет ряд преимуществ. Получение библиотек кДНК включает три этапа. Получение интактной кДНК достигается вследствие добавления гомополимера (dC)_n на 5'-конец (на третьем этапе синтеза кДНК) с помощью TdT и не используется обработка рестриктазами. Несколько микрограмм тотальной РНК достаточно для получения библиотеки, содержащей более 10⁵ независимых клонов. Выход кДНК зависит от оптимального соотношения количества вектора-праймера и общего количества мРНК содержащих поли(А) участок. Соотношение количества ВП и тотальной мРНК необходимо подбирать экспериментально, поскольку оно влияет на синтез первой цепи кДНК. Можно клонировать длинные по размеру кДНК клоны. ПЦР реакция, часто вызывающая артефактные мутации в кДНК последовательности, здесь не используется. Кольцевание молекулы ДНК и синтез второй цепи ДНК происходят в одном этапе с использованием трех ферментов: ДНК-полимеразы, РНКазы H и ДНК-лигазы.

Наличие полноразмерных клонов предполагает, что большинство молекул мРНК, экстрагируемые из свеж выделенных препаратов печени мыши, являются интактными. Однако наличие большого количества усеченных клонов кДНК свидетельствует о существенной деградации ряда мРНК в клетках. Использование тотальной РНК и отсутствие РНК модифицирующих реакций, способствует минимизации деградации мРНК. Использование очищенной мРНК (в которой имеется наличие деградированной мРНК) уменьшает синтез кДНК длинного размера, потому что обратная транскриптаза расходуется для синтеза коротких кДНК. Следовательно, необходимо избегать различных процедур при выделении мРНК, а лучше использовать тотальную РНК, чем очищенную, но деградированную мРНК.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.. Lander E.S., Linton L.M. et al. (2001) Nature, **409**, 860-921.
2. Venter J.C., Adans M.D. et al. (2001) Science, **291**, 1304-1351.
3. Watersoton R.H., Lindblad-Toh K., Birney E. (2002) Nature, **420**(6915), 520-562.
4. Suzuki Y., Yoshitomo-Nakagawa K., Suyama A., Sugano S. (1997) Gene, **200**, 149-156.
5. Morin R.D., Chang E., Petrescu A., et al. (2006) Genome Res., **16**, 796-803.
6. Gubler U., Hoffman B.J. (1983) Gene, **25**, 263-269.
7. Okayama H., Berg P. (1982) Mol. Cell. Biol., **2**, 161-170.
8. Pruitt S.C. (1988) Gene, **66**, 121-134.
9. Carninci P., Kvam C., Kitamura A. et. al. (1996) Genomics, **37**, 327-336.
10. Apte A.N., Siebert P.D. (1993) Biotechniques, **15**, 890-893.
11. Maruyama K., Sugano S. (1994) Gene, **138**, 171-174.
12. Kato S., Ohtoko K., Ohtake H., Kimura T. (2005) DNA Res., **12**, 53-62.
13. Ota T., Suzuki Y., Nishikawa T. et. al. (2004) Nature Genet., **36**, 40-45.
14. Suzuki Y., Tsunoda T., Sese J. et. al. (2001) Genome Res., **11**, 677-684.
15. Kushner S.R. (1978) In: Genetic engineering (Boyer H.B. and Nicosia S., eds.) p. 17, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
16. Cohen S.N., Chang A.C.Y., Hsu L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 2110-2114.
17. Petty I.T., Hunter B.G. Jackson A.O. (1988) Gene, **74**, 423-432.

Поступила: 11. 01. 2010.

A NOVEL VECTOR FOR CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY

V.I. Fedchenko, A.A. Kaloshin, A.E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (499)245-05-09; fax: (499)245-0857; e-mail: valfed@ibmc.msk.ru

A new original vector pEM-(dT)₄₀(f+) has been prepared. It can be used for cDNA library construction from polyadenylated mRNA, isolated from various sources. The pGEM-(dT)₄₀f(+) is initially transformed into single stranded and then into a linear form and its (dT)₄₀ tail at 3'-end is used as the vector-primer for synthesis of the first strand cDNA. The use of a synthetic oligonucleotide complementary to the vector and recombinant DNA results in vector cyclization and synthesis of the second strand cDNA. This approach significantly simplifies cDNA library construction, it does not require PCR reaction (which can induce artifact mutations in cDNA sequences) and restrictase treatment.

Key words: cDNA library, vector-primer, full size cDNA, cDNA synthesis.