



Metoda różnicowego namnażania – sposób poszukiwania genów ulegających specyficznemu ekspresji

Grażyna Dąbrowska

Pracownia Genetyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Differential display – the method of searching for specifically expressed genes

Summary

Identification of differentially expressed genes is one of the major challenges in molecular biology. Several techniques allow the cloning of such sequences. However, methods such as differential hybridization are time-consuming and require large amounts of mRNA. Recently a new approach has been successfully developed: differential display by polymerase chain reaction (DD PCR). This technique has been proven to be highly effective in identifying sequences that are differentially expressed in various cell types.

Key words:

differential display, genes expression.

Adres do korespondencji

Grażyna Dąbrowska,
Pracownia Genetyki,
Instytut Biologii Ogólnej
i Molekularnej,
Uniwersytet Mikołaja
Kopernika,
ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń.

1. Wstęp

Przebieg normalnego rozwoju, jak i zmian patologicznych powstających w przypadku chorób takich jak nowotwory, czy też powodowanych przez mutację pojedynczego genu lub kompleksu wielu genów jest kierowany przez zmiany w ekspresji genów (1,2). Zmiany ekspresji genów są podstawą mechanizmów regulacyjnych, które kontrolują biologię komórki. Porównanie

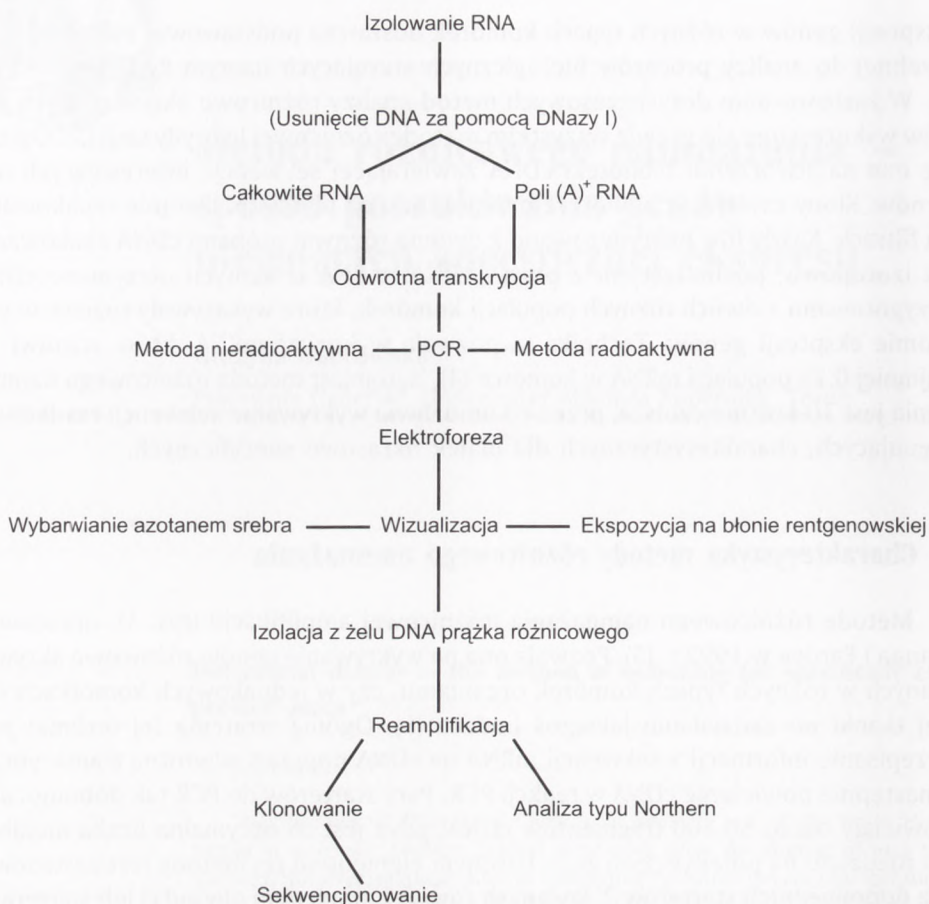
ekspresji genów w różnych typach komórek dostarcza podstawowej informacji potrzebnej do analizy procesów biologicznych sterujących naszym życiem.

W zastosowaniu dotychczasowych metod analizy różnicowo aktywowanych genów wykorzystuje się przede wszystkim metodę różnicowej hybrydyzacji (3). Opiera się ona na stworzeniu biblioteki cDNA zawierającej sekwencje interesujących nas genów. Klony zawarte w bibliotece przenoszono na płytki i podwójnie replikowano na filtrach. Każdy filtr hybrydyzowano z dwoma różnymi próbkami cDNA znakowanymi izotopowo, pochodzącymi z poly(A)⁺RNA. mRNA, z których otrzymano cDNA przygotowano z dwóch różnych populacji komórek, które wykazywały różnice w poziomie ekspresji genów. Technika ta pozwala wykrywać mRNA, które stanowi co najmniej 0,1% populacji mRNA w komórce (4). Natomiast metoda różnicowego namnażania jest 10-krotnie czulsza, przez co umożliwia wykrywanie sekwencji rzadko występujących, charakterystycznych dla białek okresowo specyficznych.

2. Charakterystyka metody różnicowego namnażania

Metodę różnicowego namnażania (różnicowej amplifikacji) (rys. 1), opracowali Lianga i Pardee w 1992 r. (5). Pozwala ona na wykrywanie genów różnicowo aktywowanych w różnych typach komórek organizmu, czy w jednakowych komórkach danej tkanki po zadziałaniu jakiegoś bodźca (6). Ogólną strategią tej techniki jest przepisanie informacji z sekwencji mRNA na cDNA poprzez odwrotną transkrypcję, a następnie powielenie cDNA w reakcji PCR. Pary starterów do PCR tak dobrano, aby powielały około 50-100 fragmentów cDNA, gdyż jest to optymalna liczba możliwa do rozdziału na pojedynczym żelu. Istotnym elementem tej metody jest zastosowanie odpowiednich starterów 3' (zwanymi również starterami oligo(dT) lub starterami zakotwiczonymi) i starterów 5' (przypadkowych).

Parametry PCR ustalono tak, aby umożliwić powielanie krótkich fragmentów. Liczbę powtórzonych cykli amplifikacji ustalono na nie więcej niż 40 (5). Namnożone fragmenty cDNA rozdzielano na żelach poliakrylamidowych lub agarozowych (7) i porównywano ich profile elektroforetyczne. DNA wyizolowane z produktów różnicowych klonowano w wektor bakteryjny i sekwencjonowano.



Rys. 1. Schemat metody różnicowego namnażania.

3. Wybór starterów

Od czasu wprowadzenia metody DD PCR eksperymentowano z różnorodnymi starterami. Wybór starterów 3' wykorzystuje ogon poli(A)⁺ obecny w większości eukariotycznych mRNA (8) do zakotwiczenia startera na końcu 3' poprzez ciąg d(T)₁₂ (oraz dwie dodatkowe zasady). Z rachunku prawdopodobieństwa wynika, że każdy 3' starter rozpoznaje 1/12 całkowitej populacji mRNA, ponieważ wykluczając T jako przedostatnią zasadę istnieje 12 różnych kombinacji osatnich dwóch zasad. Startery 5' o losowej sekwencji przyłączają się do cDNA w różnych miejscach w stosunku do ogona poli(A)⁺, stąd produkty reakcji PCR różnią się wielkością. Do całkowitego przeanalizowania dowolnej populacji RNA poprzez DD PCR potrzebne jest użycie 26 różnych starterów 5' (9) (tab. 1).

Tabela 1

Zestaw 5' starterów używanych do całkowitej analizy ekspresjonowanego RNA metodą DD PCR wg Bauer i in. (16)

Nr	Sekwencja (5' do 3')									
1	T	A	C	A	A	C	G	A	G	G
2	T	G	G	A	T	T	G	G	T	C
3	C	T	T	T	C	T	A	C	C	C
4	T	T	T	T	G	G	C	T	C	C
5	G	G	A	A	C	C	A	A	T	C
6	A	A	A	C	T	C	C	G	T	C
7	T	C	G	A	T	A	C	A	G	G
8	T	G	G	T	A	A	A	G	G	G
9	T	C	G	G	T	C	A	T	A	G
10	G	G	T	A	C	T	A	A	G	G
11	T	A	C	C	T	A	A	G	C	G
12	C	T	G	C	T	T	G	A	T	G
13	G	T	T	T	T	C	G	C	A	G
14	G	A	T	C	A	A	G	T	C	C
15	G	A	T	C	C	A	G	T	A	C
16	G	A	T	C	A	C	G	T	A	C
17	G	A	T	C	T	G	A	C	A	C
18	G	A	T	C	T	C	A	G	A	C
19	G	A	T	C	A	T	A	G	C	C
20	G	A	T	C	A	A	T	C	G	C
21	G	A	T	C	T	A	A	C	C	G
22	G	A	T	C	G	C	A	T	T	G
23	G	A	T	C	T	G	A	C	T	G
24	G	A	T	C	A	T	G	G	T	C
25	G	A	T	C	A	T	A	G	C	G
26	G	A	T	C	T	A	A	G	G	C

Wybrano przypadkowe 10-mery, dlatego podczas fazy przyłączania starterów w reakcji PCR musi być utrzymana dość niska temperatura (około 40°C). W tych warunkach startery przypadkowe mają tendencję do błędnego przyłączania się (10). Dla wielu transkryptów izolowanych metodą DD PCR stwierdzono dwa lub trzy błędne sparowania z sekwencją losowych starterów używanych w czasie reakcji (11). Aby zminimalizować ten problem niektórzy używają dłuższych starterów w połączeniu z wyższą temperaturą wiązania starterów (12).

Teoretycznie produkty DD PCR powinny zawierać sekwencje komplementarne zarówno do starterów losowych jak i zakotwiczonych. Aby zweryfikować to przypuszczenie wykonano oddzielne reakcje PCR ze znakowanymi na końcach zakotwi-

czonymi bądź przypadkowymi starterami. W obu typach doświadczeń obserwowano zasadniczo identyczne wzory prążków (13). Jednakże opublikowano doniesienia o eksperymentach, w których cDNA obu porównywanych populacji RNA były namnożone z pojedynczego startera. Ustalono, że większa część powielonych fragmentów cDNA została zainicjowana starterami losowymi (14). Natomiast Liang i in. (15) otrzymali produkty DD PCR stosując tylko startery oligo (dT).

4. Etapy metody różnicowego namnażania

4.1. Izolacja całkowitego RNA lub poli(A)⁺ RNA

RNA odznacza się małą stabilnością, a jego okres półtrwania u organizmów eukariotycznych jest krótszy niż 4 godziny (16). Dlatego w technice DD PCR istotne jest wyizolowanie RNA dobrej jakości (17).

Najmniej kłopotliwe jest zastosowanie, komercyjnych odczynników, np. TRI Reagent (MRC Inc.) (18). Wykorzystując powinowactwo poli(A)⁺RNA do oligo(dT)-celulozy (19) otrzymywano frakcję poli(A)⁺ RNA, która stanowi około 5% całkowitego RNA (20).

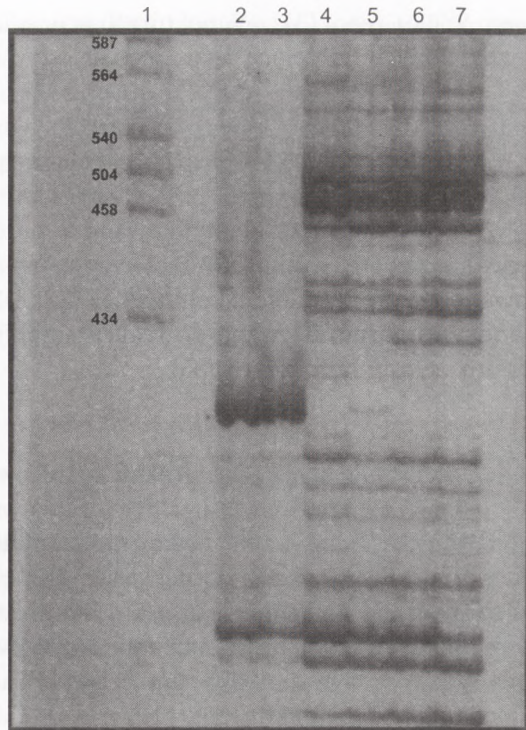
Obecność genomowego DNA w preparatach RNA może być powodem powstawania artefaktów (21). W celu usunięcia tych zanieczyszczeń, preparaty RNA poddawano trawieniu DNazą wolną od RNaz (22).

4.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Informację zapisaną w RNA przepisano na cDNA z udziałem odwrotnej transkryptazy, np. z MMLV (23) i startera oligo(dT) w obecności mieszaniny deoksyrybonukleotydów.

4.3. Amplifikacja cDNA

cDNA powielano za pomocą łańcuchowej reakcji enzymatycznej używając polimerazy Taq (24) lub fragmentu Stoffel polimerazy Taq (25). Fragment Stoffel polimerazy Taq dostarcza więcej produktów amplifikacji (około 40), podczas gdy w reakcji z polimerazą Taq obserwujemy jedynie około dziesięciu produktów specyficznej amplifikacji (26). W reakcji PCR niezbędna jest obecność starterów: zakotwiczonych (te same co w reakcji RT) i losowych oraz dNTP. W przypadku autoradiografii bezpośrednio do reakcji PCR dodawano nukleotyd znakowany izotopem np. ³⁵S (12) lub ³²P (14).



Fot. 1. Rozdział elektroforetyczny na żelu poliakrylamidowym produktów różnicowego namnażania uzyskanych na materiale roślinnym (*Pharbitis nil*) z użyciem startera zakotwiczonego T₁₁ AA i startera przypadkowego o sekwencji AGTCAGCCAC, poli(A)⁺RNA, odwrotnej transkryptazy SuperScriptII, fragmentu Stoffel polimerazy Taq. DNA wybarwiono azotanem srebra.

Ścieżki: 1 – wzorzec wielkości-pBR322/HaeIII, 2 i 3 – produkt reamplifikacji DNA prążka różnicowego o wielkości około 390 par zasad, 4,5,6 i 7 – produkty reakcji PCR.

4.4. Elektroforeza produktów reakcji PCR

Otrzymane po amplifikacji fragmenty cDNA rozdzielano na 6% żelach poliakrylamidowych: denaturujących (27) lub natywnych (28) (fot. 1). Z powodzeniem wykrywano produkty DD PCR rozdzielane elektroforetycznie w 1,6% żelach agarozowych (7).

4.5. Wizualizacja produktów DD PCR

Najczęściej stosowaną techniką wizualizacji jest autoradiografia choć czas ekspozycji potrzebny do uzyskania sygnału jest dość długi (24 godziny). W DD PCR stosowano nukleotyd wyznakowany izotopami fosforu ³²P czy ³³P, ponieważ jednorazowo do reakcji potrzebna jest pięciokrotnie mniejsza ilość znakowanego nukleotydu niż w przypadku znakowania ³⁵S (29).

Nieradioaktywną metodę wizualizacji – wysrebrzenie żeli opracowaną przez Bassam i in. (30) przystosowano dla techniki *differential display* (27). Barwienie azotanem srebra jest szybką i czułą metodą. Poziom detekcji porównywalny jest z czułością osiąganą przy znakowaniu izotopowym czy fluorescencyjnym, np. fluorochro-

mem SYBR GreenI (31). W niektórych procedurach DD PCR do barwienia produktów rozdzielonych na żelach agarozowych używano bromku etydyny (7).

4.6. Izolowanie DNA z prążka różnicowego

Prążek różnicujący identyfikowano w porównywanych ścieżkach żelu, wycinano z żelu, a zawarte w nim DNA izolowano. W przypadku żeli denaturujących DNA izolowano z wykorzystaniem kolumnienek (32). DNA wyizolowane z żeli natywnych, barwionych srebrem używano do reakcji amplifikacji bezpośrednio po inkubacji fragmentu żelu w buforze TE (33).

4.7. Reamplifikacja DNA prążka różnicowego

DNA otrzymane z żelu powtórnie amplifikowano z zastosowaniem identycznej pary primerów jak w pierwotnej reakcji PCR (fot. 1). Wielkość otrzymanego produktu sprawdzano na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Niekiedy produkty reamplifikacji otrzymane z prążków różnicowych ujawniały produkt niejednorodny, wówczas wykonywano kilka rund reamplifikacji z oczyszczaniem, aż do otrzymania pojedynczego produktu (26).

5. Zastosowanie produktów DD PCR do klonowania genów ulegających różnicowej ekspresji

Podczas stosowania DD PCR często zdarzają się produkty fałszywie pozytywne. Dlatego każdorazowo sprawdzano hybrydazyjnie zreamplifikowane cDNA prążków różnicowych. W tej analizie produkty powtórnej amplifikacji znakowano izotopowo i stosowano jako sondę molekularną do hybrydazyjacji z RNA pochodzącym z dwóch porównywanych wariantów.

Przetestowany produkt reamplifikacji ulegający różnicowej ekspresji w porównywanych tkankach, klonowano, a następnie sekwencjonowano DNA badanego produktu różnicowego. Znając sekwencje badanego prążka porównywano ją z sekwencjami dostępnymi w banku genów używając do tego celu, np. programu BLAST.

6. Sposoby unikania fałszywie pozytywnych wyników

W celu uniknięcia fałszywie pozytywnych prążków:

1. Reakcje RT i PCR powtarzano na RNA pochodzącym z innej izolacji (34).
2. Do reakcji PCR brano 3 różne stężenia produktów RT (31).

3. Przeprowadzano kontrolę amplifikacji na RNA jako matrycy z ominięciem etapu RT (17).
4. Wyizolowane RNA poddawano trawieniu DNazą (35).
5. Ponownie przeprowadzano reakcję PCR na tym samym produkcie odwrotnej transkrypcji w celu sprawdzenia czy wynik jest powtarzalny (26).
6. Zastosowano dwa różne typy odwrotnych transkryptaz, np. z MMLV i Super-Script II do otrzymania cDNA (36).
7. Należy być świadomym, że w każdym prążku żelu może być obecny więcej niż jeden rodzaj cDNA (37).

7. Zastosowanie metody DD PCR

Metoda ta mimo swojej wieloetapowości ma duże zastosowanie jako jedna z najlepszych i najczulszych metod porównywania populacji RNA. Technika ta stała się do tego stopnia popularna, że wyprodukowano gotowe zestawy odczynników do DD PCR, np. firmy Gen Hunter Corporation, Brooklin.

Z powodzeniem wykorzystuje się DD PCR w badaniach nad genami aktywowanymi podczas nowotworzenia u ludzi np. u chorych na raka jelita grubego (38,39), prostaty (40) czy piersi (41). Technika ta przyczyniła się do poznania mechanizmów rządzących rozwojem organizmów i ich organów (31,42). Na przykład wyizolowanie genu Xbub3 z blastomerów *Xenopus* umożliwiło zrozumienie mechanizmów regulacji cyklu komórkowego i różnicowania komórkowego we wczesnej fazie zarodka (43). Metodę tę stosowano z powodzeniem do identyfikacji genów ulegających różnicowej ekspresji zarówno w organizmach roślinnych (26,44) jak i zwierzęcych (45). Ostatnio technika DD PCR przyczyniła się też do zbadania zagadnień związanych z programowaną śmiercią komórek (46,47), a także wniosła wiele nowych wiadomości na temat problemów związanych z otyłością (48,49). Możliwości metody różnicowej amplifikacji doskonale ukazano w pracy Cirelli i Tononi (50), w której odnotowano bardzo subtelne różnice w ekspresji genów pojawiające się podczas snu.

Metoda DD PCR może być z powodzeniem stosowana w poszukiwaniu nowych genów aktywowanych bądź wyciszanych w określonych warunkach.

Wykaz stosowanych skrótów:

DD PCR – metoda różnicowego namnażania (*differential display by polymerase chain reaction*); MMLV – mysi wirus leukemii Moloneya; TE – Tris-HCl i EDTA.

Literatura

1. Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A., (1987), *Science*, 236, 1237-1238.
2. Lewin B., (1990), *Cell*, 61, 743-744.
3. Harper G., (1997), in: Eds. Hansen N., Harper G., *Differentially Expressed Genes in Plant: A Bench Manual*, T J International Ltd., Cornwall, Great Britain, 23-43.
4. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Molecular*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 10.38-10.40.
5. Liang P., Pardee A. B., (1992), *Science*, 257, 967-971.
6. Renner C., Trumper L., Pfitzenmeier J. P., Loftin U., Gerlach K., Stehle I., Wadle A., Pfreundschuh M., (1998), *BioTechniques*, 24, 720-724.
7. Rompf R., Kahl G., (1997), *BioTechniques*, 23, 28-32.
8. Jackson R. J., Standart N., (1990), *Cell*, 62, 15.
9. Bauer D., Muller H., Reich J., Riedel H., Ahrenkiel V., Warthoe P., Strauss M., (1993), *Nucl. Acids Res.*, 21, 4272-4280.
10. Liang P., Bauer D., Averboukh L., Warthoe P., Rohrwild M., Muller H., Strauss M., Pardee A. B., (1995), *Meth. Enzymol.*, 254, 304-321.
11. Zhao S., Ooi S. L., Pardee A. B., (1995), *BioTechniques*, 18, 842-850.
12. Jurecic R., Nguyen T., Belmont J. W., (1996), *Trends Genet.*, 12, 502-504.
13. Momiyama T., Afele J. C., Saito T., Kayano T., Tabei Y., Takaiwa F., Takayanagi K., Nishimura S., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213, 376-382.
14. Zhao S., Molnar G., Zhang J., Zheng L., Averboukh L., Pardee A. B., (1998), *BioTechniques*, 24, 842-852.
15. Liang P., Zhu W., Zhang X., Guo Z., O'Connell R. P., Averboukh A., Wang F., Pardee A. B., (1994), *Nucl. Acids Res.*, 22, 5763-5764.
16. Lewin B., (1994), *Genes V*, Oxford University Press, 254-256.
17. Lasocki M. J., (1997), in: Eds. Gelvin S. B., Schilperoord R. A., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1-20.
18. Chomczynski P., Sacchi N., (1987), *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
19. Bothwell A., Yancopoulos G. D., Aly F. W., (1990), *Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes*, Jones and Bartlett Publisher, Boston, 19-20.
20. Wingender E., (1993), *Gene Regulation in Eukaryotes*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 19-20.
21. Bauer P., Rofs A., Regitz-Zagrosek V., Hildebrandt A., Fleck E., (1997), *BioTechniques*, 22, 1128-1132.
22. Spycher S. E., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V. B., Palomba L., Azzi A., (1997), *FASEB Jour.*, 11, 181-188.
23. Wang X., Feuerstein G. Z., (1995), *BioTechniques*, 18, 448-453.
24. Wang X-B., Funada M., Imai Y., Revay R. S., Ujike H., Vandenberg D. J., Uhl G. R., (1997), *J. Neurosci.*, 17, 5993-6000.
25. Weaver K. R., Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M., Callahan L. M., (1994), *BioTechniques*, 16, 226-227.
26. Doss R. P., (1996), *BioTechniques*, 21, 408-412.
27. Chalhoub B. A., Thibault S., Laucou V., Rameau C., Hofte H., Cousin R., (1997), *BioTechniques*, 22, 216-220.
28. Selmin O., Lucier G. W., Clark G. C., Tritscher A. M., Heuvel J. P. V., Gastel J. A., Walker N. J., Sutter T. R., Bell D. A., (1996), *Carcinogenesis*, 17, 2609-2615.
29. Liang P., Pardee A. B., (1995), *Science*, 267, 1186-1187.
30. Bassam B. J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M., (1991), *Anal. Biochem.*, 196, 80-83.
31. Zoidl G., Blanchard A. D., Zoidl C., Dong Z., Brennan A., Parmantier E., Mirsky R., Jessen K. R., (1997), *J. Neur. Res.*, 49, 32-42.
32. Bonnet S., Prevot G., Bourguoin C., (1998), *Nucl. Acids Res.*, 26, 1130-1131.
33. Raaphorst F. M., Tami J., Sanz I. E., (1996), *BioTechniques*, 20, 78.

34. Luce M. J., Burrows P. D., (1998), *BioTechniques*, 24, 766-770.
35. Wang X., Ruffolo R. R., Feuerstein G. Z., (1996), *Trends Plant Sci.*, 17, 276-279.
36. Sung Y.-J., Denman R. B., (1997), *BioTechniques*, 23, 462-468.
37. Callard D., Lescure B., Mazzolini L., (1994), *BioTechniques*, 16, 1096-1103.
38. Cafferata E. G., Gonzalez-Guerrico A. M., Pivetta O. H., Santa-Coloma T. A., (1996), *Cell Mol. Biol.*, 42, 797-804.
39. Cajot J.-F., Sordat I., Silvestre T., Sordat B., (1997), *Cancer Res.*, 57, 2593-2597.
40. Gerdes M. J., Dang T. D., Lu B., Larsen M., McBride L., Rowley D. R., (1996), *Endocrinology*, 137, 864-872.
41. Alban R. S., Sparvero S., Pardee A. B., (1996), *Molec. Med.*, 2, 469-478.
42. Villar A. J., Eddy E. M., Pedersen R. A., (1995), *Devel. Biol.*, 172, 264-271.
43. Goto T., Kinoshita T., (1999), *DNA & Cell Biol.*, 18, 227-234.
44. Szczyglowski K., Hamburger D., Kapranov P., de Bruijn F. J., (1997), *Plant Physiol.*, 114, 1335-1346.
45. Sehgal A., Presente A., Dudus L., Engelhardt J. F., (1996), *Exp. Lung. Res.*, 22, 419-434.
46. Welburn S. C., Murphy N. B., (1998), *Cell Death and Differ.*, 5, 615-622.
47. Thomson J. M., Waldrip H. W., Compton M. M., (1997), *Develop. Comp. Immunol.*, 21, 413-424.
48. Hu E., Liang P., Spiegelman B. M., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 10697-10703.
49. Lin X., Braymer H. D., Bray G. A., York D. A., (1998), *Life Sciences*, 63, 145-153.
50. Cirelli Ch., Tononi G., (1998), *Molec. Brain Res.*, 56, 293-305.