



УДК 577.215.037

## КЛОНИРОВАНИЕ РЕГИОН-СПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПЛАНАРИИ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО МЕТОДА – УПОРЯДОЧЕННОГО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ДИСПЛЕЯ

© 1998 г. М. В. Мати, Д. А. Шагин, Н. Ю. Усман, Е. А. Богданова, А. Ф. Фрадков, Т. А. Соболева, С. А. Лукьянов<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 12.01.98 г. Принята к печати 23.03.98 г.

Для поиска региональных молекулярных маркеров пресноводной планарии *Dugesia tigrina* был применен новый метод выявления дифференциально экспрессирующихся генов – упорядоченный дифференциальный дисплей мРНК (УДД). В предлагаемом методе эффект селективной супрессии полимеразной цепной реакции (ПЦР) используется для избирательной амплификации пула 3'-концевых фрагментов кДНК, отщепляемых конкретной эндонуклеазой рестрикции. В полученных образцах амплифицированной кДНК каждой мРНК соответствует фрагмент кДНК, длина которого определяется положением ближайшего к 3'-концу сайта рестрикции. В ходе последующей ПЦР с фланкирующими заглубленными на два нуклеотида праймерами происходит амплификация 1/192 части всех молекул кДНК образца, что позволяет выявлять среди них дифференциально экспрессирующиеся последовательности путем сравнения разделенных электрофорезом в ПААГ образцов. Последовательное использование всех возможных комбинаций заглубленных праймеров позволяет проводить систематическое исследование всего пула мРНК. С помощью УДД выявлен ряд генетических последовательностей, имеющих дифференциальный характер экспрессии вдоль передне-задней оси тела планарии.

*Ключевые слова:* эффект супрессии полимеразной цепной реакции; дифференциальный дисплей мРНК; молекулярные маркеры; планария.

Важнейшие биологические процессы, такие, как 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 этих процессов, необходимо выявление и изучение генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе этих процессов. Техника дифференциального дисплея мРНК, основанная на использовании короткого олигонуклеотидного праймера, имеющего низкую температуру отжига и способного вести ПЦР-амплификацию ограниченного пула фрагментов кДНК, была предложена в 1992 г. [1, 2] и сегодня стала одной из самых популярных при поиске дифференциально экспрессирующихся генов. В настоящее время в литературе представлен широкий спектр модифи-

каций метода дифференциального дисплея, адаптированных для разных биологических систем [1–7]. Однако практически все предлагаемые процедуры имеют ряд общих существенных недостатков. Использование праймеров произвольной структуры делает невозможным проведение систематического сравнения анализируемых образцов по всем видам мРНК: наборы полос носят случайный характер, подавляющее большинство этих полос соответствует наиболее представленным в образцах видам транскриптов. Кроме того, использование олигонуклеотидных праймеров с низкой температурой отжига приводит к многочисленным артефактам.

Позднее, в 1995 г., был предложен принципиально другой подход, ориентированный на систематическое сравнение образцов по всем видам мРНК и основанный на разделении 3'-концевых рестриктных фрагментов кДНК [8, 9]. К недостаткам этого подхода можно отнести его ограниченную чувствительность и трудоемкость процедур.

Предлагаемый в настоящей работе метод упорядоченного дифференциального дисплея мРНК (УДД) также основан на анализе 3'-концевых рестриктных фрагментов кДНК. Однако, в отличие

Сокращения: ИКП – инвертированные концевые повторы; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция–полимеразная цепная реакция; УДД – упорядоченный дифференциальный дисплей.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 330-70-29; факс: (095) 330-65-38; e-mail: luk@ibch.siobc.ras.ru).

от описанных ранее методик [8, 9] в предлагаемой нами технологии отбор этих фрагментов осуществляется не с помощью физической сепарации, а в результате ПЦР, в ходе которой селективно амплифицируются только 3'-концевые фрагменты кДНК. Это ведет к существенному упрощению метода и повышает его чувствительность.

Последовательность экспериментальных процедур УДД схематически представлена на рис. 1. Двухцепочечная кДНК (может быть приготовлена на основе как poly(A<sup>+</sup>)-фракции РНК, так и на основе суммарной РНК с использованием в качестве затравки Т-праймера) подвергается обработке определенной эндонуклеазой рестрикции. Нами была выбрана эндонуклеаза рестрикции *RsaI*, узнающая сайт из четырех оснований (GT↓AC), так как такой сайт встречается хотя бы один раз почти во всех последовательностях кДНК [8]. После обработки кДНК этой эндонуклеазой образуются фрагменты кДНК с тупыми концами, причем практически все виды молекул кДНК оказываются разделенными на фрагменты. Затем фрагменты кДНК лигируют с супрессионным псевдодвухцепочечным адаптером. Такой адаптер представляет собой смесь двух олигонуклеотидов (рис. 2) – длинного (43 звена) и короткого (12 звеньев, комплементарных 3'-концевой части длинного олигонуклеотида). В дуплексе олигонуклеотиды формируют “тупой конец”, участвующий в процессе лигирования. Поскольку олигонуклеотиды не фосфорилированы, фосфодиэфирную связь образует только длинный олигонуклеотид, который лигируется своим 3'-концом к 5'-концу каждого фрагмента кДНК.

На следующем этапе проводится избирательная амплификация 3'-концевых фрагментов кДНК. В результате дестройки “липких” концов ДНК (которая происходит непосредственно перед началом ПЦР при добавлении *Taq*-полимеразы) все фрагменты кДНК, за исключением фрагментов, соответствующих 3'-концевым последовательностям мРНК, оказываются фланкированы с обеих сторон инвертированными концевыми повторами (ИКП), идентичными длинному олигонуклеотиду адаптера. В ходе ПЦР с Out-праймером (рис. 2), соответствующим внешним 20 нуклеотидам этого адаптера (Out – от англ. “outer”, внешний), происходит эффективная селективная супрессия амплификации молекул кДНК, содержащих ИКП [10–12]. В присутствии Т- и Out-праймеров к экспоненциальной ПЦР-амплификации способны только те фрагменты кДНК, которые содержат сайт отжига для Т-праймера, т.е. соответствуют 3'-концевым последовательностям мРНК. Таким образом, каждый вид мРНК оказывается представленным в образце единственным фрагментом кДНК характерной длины.

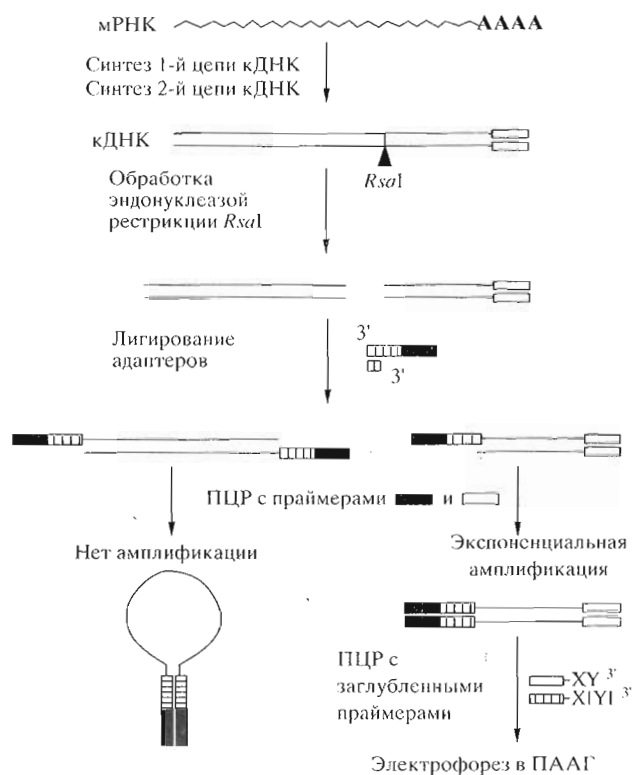


Рис. 1. Принципиальная схема упорядоченного дифференциального дисплея (УДД) (пояснения в тексте).

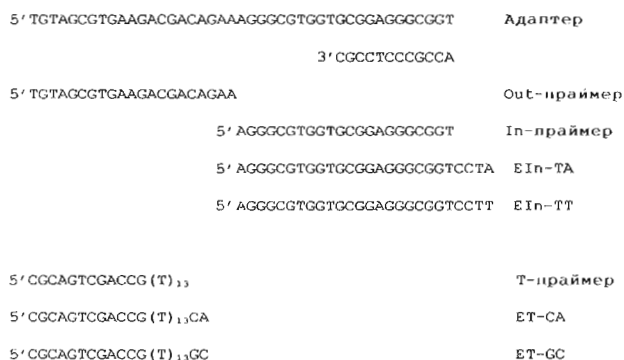


Рис. 2. Структуры адаптера и праймеров, использованных для УДД.

Согласно литературным данным [13], в эукариотической клетке обычно экспрессируется не менее 10000 различных генов. Для проведения сравнительного анализа образцов с помощью ПААГ необходимо разделение полученного пула 3'-концевых фрагментов кДНК на субпопуляции, содержащие не более 200 индивидуальных фрагментов кДНК. Это достигается путем “прореживающей” амплификации полученных образцов кДНК в ПЦР с парой заглубленных, т.е. удлиненных (extended) со стороны 3'-конца на два дополнительных основания, праймеров – ET-прайме-

ром и EIn-праймером (In – от английского “Inner”, внутренний праймер), соответствующим внутренним 22 нуклеотидам адаптера (рис. 2). Существует 16 вариантов двухнуклеотидного заглупления для праймера EIn и 12 – для праймера ET (4 праймера ET-TN, где N – любое нуклеотидное основание, очевидно, нефункциональны). Таким образом, теоретически существует 192 (16 × 12) возможные комбинации для пары заглупленных праймеров, причем любое из сочетаний при использовании в ПЦР способно приводить к амплификации только небольшой части пула (субпопуляции) 3'-концевых фрагментов кДНК. Если предположить, что в анализируемом образце присутствует 10000–20000 различных типов мРНК, каждая субпопуляция оказывается представлена набором из 50–100 различных фрагментов. Фрагменты, попавшие в одну субпопуляцию, могут быть разделены по длинам электрофорезом в ПААГ. Перебирая возможные сочетания заглупленных праймеров, можно исследовать весь пул 3'-концевых фрагментов кДНК.

Все получаемые с помощью УДД фрагменты кДНК оказываются асимметрично фланкированы последовательностями адаптера и Т-праймера и после элюции из геля могут быть легко реамплифицированы и напрямую секвенированы (минуя стадию клонирования).

Эффективность метода УДД была продемонстрирована на примере выявления генов, дифференциально экспрессирующихся в теле пресноводной планарии *Dugesia tigrina*. Способность к регенерации, восстановлению утраченных тканей и частей тела, – одно из фундаментальных свойств живых организмов и уже более 200 лет привлекает внимание исследователей. Пресноводные планарии (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) хорошо известны благодаря уникальной способности к восстановлению целостной морфологической организации даже из небольших фрагментов тела, что делает их удобной моделью для исследования регенерации [14]. Выявление региональных молекулярных маркеров у планарии и анализ их экспрессии при регенерации представляется важным этапом на пути понимания молекулярных основ восстановительных процессов.

Мы использовали метод УДД для выявления генов, дифференциально экспрессирующихся вдоль передне-задней оси тела планарии и способных служить удобными молекулярными маркерами для наблюдения за восстановительными процессами. Планарию разрезали на шесть приблизительно равных фрагментов, как показано на рис. 3, а. Из каждого фрагмента была выделена суммарная РНК и приготовлены образцы кДНК. Фракция 3'-концевых фрагментов кДНК была амплифицирована, как описано выше. Для “прореживающей” амплификации мы использо-

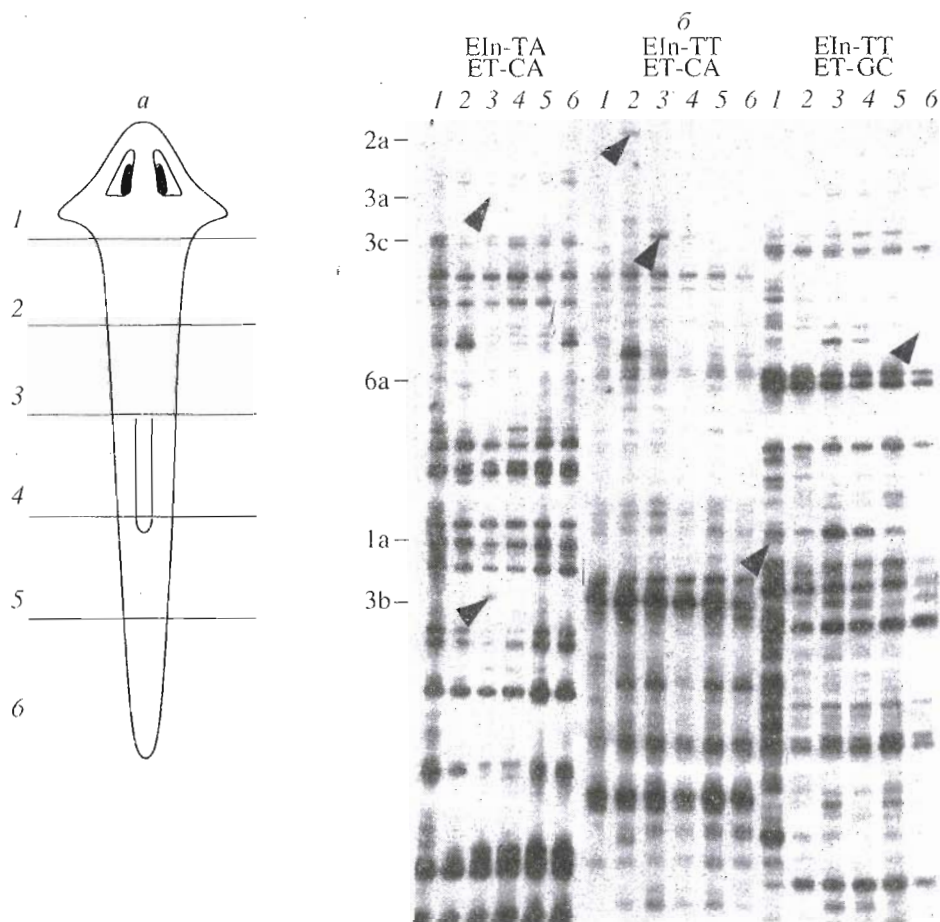
вали 3 комбинации заглупленных праймеров, в которых участвовали два праймера EIn (EIn-TA и EIn-TT, рис. 2) и два праймера ET (ET-CA и ET-GC, рис. 2). Праймеры EIn были длиннее последовательности адаптера на 4 основания: CСТА(3') и ССТТ(3'). Два 3'-концевых основания обеспечивали специфическую амплификацию субпопуляций, в то время как два стоящих перед ними основания (СС) служили для закрывания остатка сайта рестрикции *RsaI* (3'...TG...5'). Для повышения специфичности затравления ПЦР вводилась ошибка в четвертое положение от 3'-конца праймеров EIn (С вместо А) [15].

Результат сравнения образцов кДНК, полученных из разных зон тела планарии для трех использованных комбинаций заглупленных праймеров приведен на рис. 3, б. Отмечены шесть дифференциальных полос. Фрагменты кДНК из соответствующих им участков геля были элюированы, реамплифицированы и секвенированы.

На основании информации о последовательности нуклеотидов для каждого выделенного фрагмента кДНК были сконструированы пары специфических праймеров. Эти праймеры использовали для ОТ-ПЦР-анализа распределения соответствующих транскриптов в теле планарии в независимо полученных образцах кДНК. ОТ-ПЦР-анализ подтвердил полученные с помощью УДД данные о распределении пяти выделенных фрагментов (1а, 2а, 3а, 3б и 3с) (рис. 4). В дальнейшем это распределение было подтверждено также с помощью гибридизации *in situ* (данные не приведены).

Относительную представленность последовательностей 2а и 3а в исходных образцах кДНК оценили с помощью ПЦР: в качестве эталона использовали последовательные разведения известного количества ДНК данного фрагмента. Согласно нашим оценкам, фрагмент 2а составляет 0.03–0.06% тотальной кДНК из второй зоны тела, а фрагмент 3а – 0.01–0.02% тотальной кДНК из третьей зоны тела. Так как видимость фрагмента 3а на УДД-автографе предельна для анализа, его представленность в образце можно принять за нижнюю границу чувствительности метода. Таким образом, УДД позволяет выявлять дифференциальные фрагменты, составляющие примерно 0.01% суммарной кДНК, что соответствует 10–50 копиям мРНК на клетку. Столь высокая чувствительность УДД делает предлагаемый метод удобным для поиска дифференциально экспрессирующихся генов в различных экспериментальных системах.

Предварительный анализ аминокислотных последовательностей, соответствующих нуклеотидным последовательностям выявленных нами региональных генетических маркеров, показал, что фрагмент 2а кодирует два углеводсвязывающих домена, характерных для лектинов С-типа и вы-

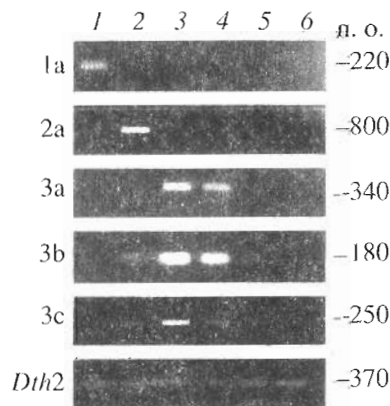


**Рис. 3.** Выявление последовательностей кДНК, дифференциально распределенных вдоль передне-задней оси тела планарии. *a* – Схема разрезания планарии. Цифрами отмечены зоны тела планарии, из которых были приготовлены кДНК. *б* – Электрофорез в 6% денатурирующем ПААГ продуктов ПЦР-амплификации 3'-концевых фрагментов кДНК с тремя комбинациями заглубленных праймеров (ЕТ и ЕIn). Номера дорожек (1–6) соответствуют зонам тела планарии на схеме *a*. Дифференциальные полосы отмечены стрелками; их обозначения даны слева.

сокогомологичных между собой, а также с углеводсвязывающими доменами, входящими в состав полипептида, кодируемого ранее идентифицированным нами у планарии геном *scarf* [17, 18]; полипептид, соответствующий фрагменту 3с обнаруживает сходство с металлопротеиназами внеклеточного матрикса (астацинового типа), 3а – с цинк-зависимыми карбоксипептидазами. Полипептид, соответствующий последовательности 3b, содержит участок, высокоомологичный ДНК-связывающим доменам НМГ-класса (НМГ – High Mobility Group). Для остальных последовательностей не было выявлено значимых гомологий с известными аминокислотными последовательностями.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа проводилась на бесполой лабораторной расе пресноводных планарий *D. tigrina* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). Эксперименты проводились на голодных особях (2 недели



**Рис. 4.** ОТ-ПЦР-анализ распределения транскриптов, соответствующих изолированным последовательностям кДНК и гена *Dth2* [16] (контроль), вдоль передне-задней оси тела планарии. Гель-электрофорез в 1.5% агарозном геле; номера дорожек соответствуют зонам, показанным на рис. 3, *a*. [16]. Слева обозначены дифференциальные фрагменты кДНК, для которых проводили анализ (см. рис. 3, *б*), справа – размер соответствующих продуктов ПЦР, полученных при амплификации со специфическими праймерами.

голодания) примерно одного размера (7–13 мм). Содержали планарий при температуре  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  в отстоянной водопроводной воде. Операции проводили микрохирургическим скальпелем под бинокулярным микроскопом.

**Выделение суммарной РНК.** Тотальную РНК из изолированных кусочков ткани планарии выделяли согласно методике [19].

**Получение пула 3'-концевых фрагментов кДНК.** Синтез двухцепочечной кДНК проводили на основе 1 мкг тотальной РНК с использованием cDNA Great Length Synthesis Kit (Clontech Laboratories Inc., США) и Т-праймера (рис. 2). Образцы кДНК обработали эндонуклеазой рестрикции *RsaI* (New England Biolabs) (1.5 ч при  $37^\circ\text{C}$  и 1 мин при  $68^\circ\text{C}$  для инактивации фермента), осадили этанолом и растворили в 10 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСI, pH 8.0, и 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ . 5 мкл полученного препарата кДНК лигировали с псевдодвухцепочечным адаптером. Реакцию лигирования проводили при  $16^\circ\text{C}$  в течение 15 ч в 20 мкл однократного лигазного буфера (Promega) в присутствии 2 мкМ адаптера и 2 ед. акт. ДНК-лигазы (Promega). Лигазную смесь разводили в пять раз и добавляли по 1 мкл полученного раствора кДНК к аликвотам (20 мкл) буфера для ПЦР (50 мМ Трицин-КОН, pH 8.7, 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 250 мкМ dNTP), содержащего 0.1 мкМ Out- и Т-праймеры (рис. 2). Температуру реакционной смеси доводили до  $72^\circ\text{C}$ , после чего добавляли 5 ед. акт. KlenTaq-ДНК-полимеразы (Ab Peptides). Далее проводили 15–18 циклов амплификации на приборе OmniGene (Hybaid) в режиме:  $95^\circ\text{C} - 5$  с;  $65^\circ\text{C} - 30$  с;  $72^\circ\text{C} - 1$  мин. Концентрация полученной амплифицированной кДНК составляла 20 нг/мкл.

**“Проживающая” амплификация.** 5'-Концы праймеров E1p (рис. 2) радиоактивно метили  $^{32}\text{P}$  с помощью T4-полинуклеотидкиназы (New England Biolabs). Реакцию проводили при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в 10 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСI, pH 7.6, 40 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ спермидин, 1 мМ EDTA, 1 мкМ праймер, 1 мкМ  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и 2.5 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы. Инактивацию фермента осуществляли прогреванием при  $100^\circ\text{C}$ , 20 с; 2 мкл реакционной смеси добавляли к 18 мкл смеси для ПЦР (20 мМ Трицин-КОН, pH 8.7, 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2.5 ед. акт. KlenTaq-ДНК-полимеразы, 2 пмоль праймера E1 (рис. 2), 250 мкМ dNTP и 1 мкг кДНК, полученной на предыдущем этапе). Проводили 23 цикла ПЦР в режиме  $95^\circ\text{C} - 5$  с;  $66^\circ\text{C} - 30$  с;  $72^\circ\text{C} - 1$  мин.

**Электрофорез.** Для разделения продуктов ПЦР использовали 6% денатурирующий ПААГ толщиной 0.4 мм и шириной 35 см. Для электрофореза использовали однократный буфер TBE (0.05 М Трис, pH 8.5, 0.045 М  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 1 мМ EDTA) в верхней камере и двукратный буфер TBE в геле и

нижней камере. Лунки промывали и заполняли TBE, проводили префорез (5 мин при 600 В), затем промывали и заполняли лунки 0.4-кратным TBE и вторично проводили префорез. Перед нанесением образцов лунки промывали 0.4-кратным TBE. 3 мкл каждого образца амплифицированной кДНК смешивали с 3 мкл буфера для нанесения (95% формамид, 20 мМ EDTA, 0.05% бромфеноловый синий, 0.05% ксиленцианол FF), прогревали 3 мин при  $95^\circ\text{C}$  и наносили на гель. Электрофорез проводили при постоянной мощности 100 Вт в течение 3 ч. Затем гель высушивали на стекле при  $60^\circ\text{C}$  и экспонировали на рентгеновскую пленку (Amersham, Англия) в течение 12 ч.

**Выделение и амплификация дифференциально представленных фрагментов кДНК.** Радиоавтограф совмещали с гелем и горячей иглой прожигали в пленке отверстия по краям дифференциальной полосы, оставляя следы в соответствующих точках геля. Помеченную таким образом область геля размягчали, прикладывая мокрую фильтровальную бумагу, центральную часть полосы вырезали и помещали в 20 мкл деионизированной воды. Элюцию проводили в течение 2 ч при  $56^\circ\text{C}$ . 1 мкл элюата использовали в ПЦР (18–22 цикла) с праймерами E1 и E1p.

**Секвенирование ДНК.** Фрагменты кДНК амплифицировали для получения одноцепочечной матрицы для секвенирования в присутствии 5 пмоль одного из концевых праймеров и 0.1 пмоль другого по методу Гилленштейна и Эрлиха [20]. После 25 циклов ПЦР с 1 нг ДНК в качестве матрицы, продукт переосадили, добавляя равный объем 12 М LiCl и 0.6 объема изопропилового спирта, осадок дважды промывали 80% этанолом и растворяли в 10 мкл деионизированной воды. Секвенирование полученной матрицы осуществляли по стандартному протоколу [21] с  $^{32}\text{P}$ -фосфорилированным праймером, взятым в ПЦР в недостатке.

**OT-ПЦР-анализ.** Синтез первой цепи кДНК проводили в соответствии со стандартным протоколом (Amersham) в объеме 20 мкл в присутствии 20 пмоль Т-праймера (рис. 2) в качестве затравки. В реакцию брали по 1 мкг тотальной РНК. Обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при  $95^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. Полученные образцы первой цепи кДНК использовали для ПЦР-амплификации с олигонуклеотидными праймерами, специфическими к выявленным последовательностям кДНК (5 → 3): (1a) – ttgcgaatttccttcgaacac и actcgaaacagcgcacatcga; (2a) – aattcatttcagactgaagaac и atagtttgatgatcaacaga; (3a) – ggctcacttcaaatgataaag и tagcagagatcccctgtaatatag; (3b) – cattctctgcctactattgtat и acatttcttggtctcttcc; (3c) – ggaattaggaaatgtttga и ctctcgatctgatgtagaa. В качестве контроля проводили ПЦР с праймерами, специфическими для гена *Dth2* ttggttccaatcggcttcc и scagaactgagacttggc. Согласно литературным данным [16], мРНК гена *Dth2* (тканеспецифичный, экспрессируется в клетках паренхимы планарии) равномерно распре-

лена вдоль передне-задней оси тела планарии. Условия ПЦР описаны выше (см. "Получение пула 3'-концевых фрагментов"). Для фрагментов (3a) и (3b) было проведено по 27 циклов, для (1a) и (2a) – по 22 цикла, для (1c) – 19 циклов, для *Dth2* – 25 циклов ПЦР. Продукты амплификации анализировали в 1.5% агарозном геле, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия.

Авторы признательны Е.Д. Свердлову за постоянное внимание к работе и обсуждение результатов. Особую благодарность авторы выражают И.М. Шейман за предоставленных планарий. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 97-04-50123).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liang P., Pardee A. // *Science*. 1992. V. 257. P. 967–971.
2. Welsh J., Chada K., Dalal S.S., Ralph D., Cheng R., McClelland M. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4965–4970.
3. Palph D., McClelland M., Welsh J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 10710–10714.
4. Liang P., Averboukh L., Pardee A. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3269–3275.
5. Zhao S., Ooi S.L., Pardee A. // *BioTechniques*. 1995. V. 18. P. 842–850.
6. McKendree W.L.Jr., Nairn III C.J., Bausher M.G. // *BioTechniques*. 1995. V. 19. P. 715–719.
7. Chen J.J.W., Peck K. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 793–794.
8. Ivanova N., Belyavsky A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2954–2958.
9. Kato K. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 394–395.
10. Лукьянов С.А., Гурская Н.Г., Лукьянов К.А., Тарабыкин В.С., Свердлов Е.Д. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 701–704.
11. Siebert P.D., Chenchik A., Kellog D.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1087–1088.
12. Diachenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Mogadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 6025–6030.
13. Bishop J.O., Morton J.G., Rosebach M., Richardson M. // *Nature*. 1974. V. 250. P. 199–204.
14. Baguna J., Salo E., Romero R., Garcia-Fernandez J., Bueno D., Munoz-Marmol A.M., Bayascas-Ramirez J.R., Casali A. // *Zool. Sci.* 1994. V. 11. P. 781–795.
15. Lukyanov K.A., Matz M.V., Bogdanova E.A., Gurskaya N.G., Lukyanov S.A. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 2541–2542.
16. Garcia-Fernandez J., Baguna J., Salo E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 7338–7342.
17. Богданова Е.А., Матц М.В., Тарабыкин В.С., Усман Н.Ю., Лукьянов С.А. // *Онтогенез*. 1997. V. 28. P. 132–137.
18. Bogdanova E., Matz M., Tarabykin V., Usman N., Shagin D., Zaraysky A., Lukyanov S. // *Dev. Biol.* 1998. (in press).
19. Chomczynski P., Sacchi N. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156–159.
20. Gyllensten U.B., Erlich H.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 7652–7656.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Cloning of Region-Specific Genetic Markers of Planarian *Dugesia tigrina* by Means of a New Method: Ordered Differential Display

M. V. Matz, D. A. Shagin, N. Yu. Usman, E. A. Bogdanova,  
A. F. Fradkov, T. A. Soboleva, and S. A. Lukyanov<sup>#</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/110, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

A new method for finding differentially expressed genes, termed ordered differential display of mRNAs (ODD), was used in the search for region-specific molecular markers of freshwater planarian *Dugesia tigrina*. In this method, the effect of selective suppression of a polymerase chain reaction (PCR) is used for the differential amplification of a pool of 3'-terminal cDNA fragments generated by digestion of cDNAs with a restriction endonuclease. In the resulting amplified cDNAs, every mRNA is represented by a cDNA fragment whose length is determined by the position of the restriction site nearest to the 3'-terminus. Subsequent PCR with primers 3'-extended by two random nucleotides allowed the amplification of 1/192 part of all cDNA molecules present in the sample. The comparison of the generated pools of cDNA molecules separated by PAGE leads to the identification of differentially expressed sequences. The systematic study of the total mRNA pool is achieved by the successive use of all possible combinations of extended primers. Some sequences preferentially expressed along the anterior–posterior axis of planarian were identified using ODD.

*Key words:* PCR suppression, differential display of mRNAs, molecular markers, planarian

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7029; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: luk@ibch.siocb.ras.ru.