



УДК 577.113.5

УПРОЩЕННЫЙ ВАРИАНТ МЕТОДА МАКСАМА — ГИЛБЕРТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ФРАГМЕНТОВ ДНК

*Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П.,
Попов С. Г.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Предложен вариант метода Максама — Гилберта, в котором для удаления реагентов после проведения химических реакций нуклеотидный материал осаждают раствором перхлората лития в ацетоне. Модификация цитозиновых остатков проводится в присутствии хлористого лития. Использование нового способа осаждения позволяет упростить и ускорить процесс анализа олигонуклеотидов и фрагментов ДНК в растворе.

В современных исследованиях, связанных с использованием синтетических и природных фрагментов ДНК, одним из основных этапов является анализ первичной структуры. Для этих целей широко используется метод Максама — Гилберта, основанный на химической модификации гетероциклических оснований [1], и его различные варианты [2—5]. В работе [6] при проведении анализа последовательности фрагментов ДНК было предложено для осаждения нуклеотидного материала использовать 2% раствор перхлората лития в ацетоне; это позволяет, по мнению авторов, не применять ДНК- или РНК-носители вследствие быстрого формирования осадка. С целью дальнейшего упрощения метода Максама — Гилберта нами использован описанный авторами [6] способ и разработана детальная методика проведения анализа последовательности синтетических олигонуклеотидов и фрагментов ДНК.

Предлагаемая нами методика включает в качестве основных стадий (см. таблицу): проведение химических реакций модификации; осаждение нуклеотидного материала 2% раствором перхлората лития в ацетоне для удаления химических реагентов; промывку осадка ацетоном, спиртом; гидролиз 1,5 М пиперидином при 100° С с последующим повторением стадий осаждения и промывки.

Использование нового способа осаждения позволяет не только исклю-

Схема анализа первичной структуры ДНК

Операция	Условия реакций			
	G	A+G	T+C	C
Смешивание	4 мкл [³² P]ДНК, 15 мкл Н ₂ O, 1 мкл 20% Me ₂ SO в воде	5 мкл [³² P]ДНК, 15 мкл HCOOH	5 мкл [³² P]ДНК, высушить, 20 мкл гидра- зина	4 мкл [³² P]ДНК, высушить, 20 мкл 1,5 М LiCl и 0,01 М LiOH в гидразине
Инкубация	Время инкубации см. в «Экспериментальной части»			
Осаждение	200 мкл 20% LiClO ₄ в ацетоне			
Центрифугирование	1 мин, 10 000 g			
Промывка	Ацетон, этанол, высушивание феном			
Гидролиз	50 мкл 1,5 М водного пиперидина, 100° С, 15 мин			
Осаждение	600 мкл 20% LiClO ₄ в ацетоне			
Центрифугирование	1 мин, 10 000 g			
Промывка	Ацетон, этанол, высушивание феном			

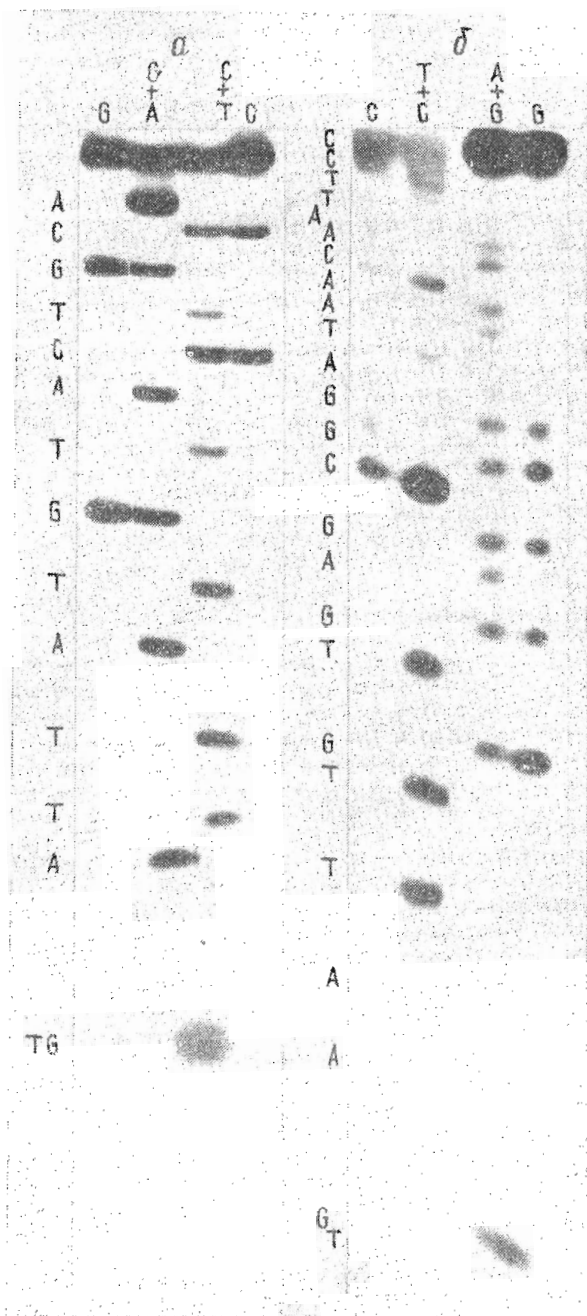


Рис. 1. Определение нуклеотидной последовательности олигодезоксирибонуклеотидов: *a* — 15-членник, *б* — 24-членник. Электрофорез в 16% ПААГ с 7 М мочевиной

чить из метода «стон»-буферы стадии спиртового осаждения с добавлением РНК-носителя, требующие глубокого охлаждения растворов и стадии лиофилизации, но и значительно сократить общее время анализа. Так как осадок формируется практически мгновенно, центрифугирование можно проводить сразу после добавления раствора перхлората к реакционной смеси. Таким образом, остановка реакции, удаление химических реагентов из раствора и подготовка нуклеотидного материала для следующей операции занимают 2–3 мин. В результате общее время проведения реакции модификации, инверсионного гидролиза и подготовки образцов для электрофореза при определении первичной структуры олигонуклеотидов составляет не более 1–2 ч (см. таблицу). В этом случае время модификации

пиримидиновых оснований колеблется в пределах 20–40 мин при 37° С для 50–20-членных олигомеров. Для реакций модификации по пуринам в предложенных условиях достаточно 10–15 мин.

Известно, что реакция модификации цитозиновых оснований по методу Максама – Гилберта протекает в присутствии хлористого натрия в щелочной среде. Использование NaCl практически исключает возможность применения нового способа осаждения, особенно для олигонуклеотидов, из-за низкой растворимости NaCl в ацетоне и спирте. Поэтому NaCl и NaOH мы заменили на LiCl и LiOH, что дает возможность избежать солевых примесей в нуклеотидном материале после стадии осаждения.

Хорошо известно, что на стадиях осаждения анализируемого материала спиртом, особенно в случае олигонуклеотидов, в общепринятом варианте метода происходит значительная потеря низкомолекулярных фрагментов ДНК, образующихся в реакциях модификации, а также после расщепления под действием пиперидина. Примененный способ осаждения позволяет в значительной мере освободиться от этого недостатка, повысив содержание ди-, три- и тетрамерных фрагментов ДНК в осадке. Это обстоятельство оказывается особенно важным при анализе олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 20 оснований (рис. 1).

Приведенная в настоящей работе методика была использована при определении первичной структуры нескольких десятков синтетических олиго- и полинуклеотидов различной длины, а также фрагментов ДНК, полученных после сшивки олигонуклеотидов ДНК-лигазой или выделенных из состава плазмидных ДНК. Результаты типичных экспериментов приведены на рис. 1 и 2.

Таким образом, предложенная методика по всем характеристикам не уступает описанному в литературе, позволяет значительно уменьшить потери нуклеотидного материала в ходе реакции и осаждения, упростить и ускорить процедуру анализа.

Экспериментальная часть

В работе использовали LiClO₄ ос.ч. или LiClO₄·3H₂O х.ч.; пиперидин х.ч., диметилсульфат purum (Apolda, ГДР) перед использованием перегоняли; гидразингидрат (Fluka, Швейцария) перегоняли над щелочью; этиловый спирт очищали перегонкой над активированным углем; [α-³²P]dNTP и [γ-³²P]ATP отечественного производства.

Введение ³²P-метки во фрагменты ДНК и электрофорез проводили как описано в работе [7]. Меченые фрагменты вырезали из геля и переносили методом электроаффинности на диски DEAE-бумаги диаметром 6 мм (DE-81, Whatman).

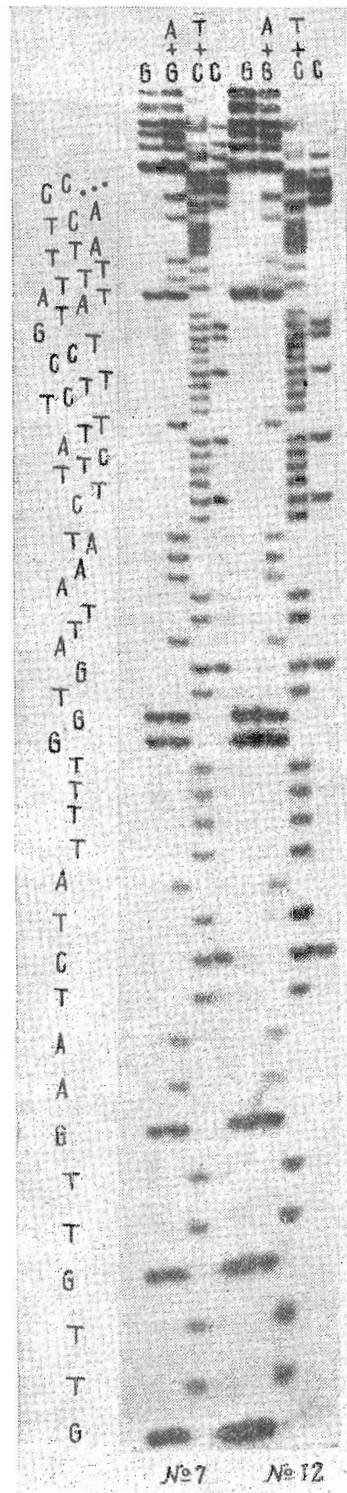


Рис. 2. Определение нуклеотидной последовательности одной из цепей 183-членного синтетического дуплекса в составе фрагмента *EcoRI/HindIII* из плазмиды pBR327 (клоны № 7 и 12). Электрофорез в 16% ПААГ с 7 М мочевиной

Элюцию проводили 20–30 мин в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3) с 10 мМ EDTA при 600 В на концентраторе образцов фирмы ISCO (США). По окончании элюции иммобилизованный на дисках материал смывали 1,5 М водным LiClO_4 (2×20 мкл), осаждали 10 объемами ацетона, осадок промывали спиртом, высушивали в вакууме и растворяли в 20 мкл воды.

Проведение реакций. В центрифужные пробирки объемом 1,5 мл (или меньшего объема) помещали меченые фрагменты ДНК и добавляли реагенты (см. таблицу, п. 1). Время реакции при 37°С по пиримидиновым основаниям для олигонуклеотидов длиной до 20 звеньев составляло 40 мин, от 20 до 50 звеньев – 20 мин. Для фрагментов длиной более 50 оснований время реакции не отличалось от описанного в литературе [1]. В случае пуриновых оснований для олигонуклеотидов длиной до 50 звеньев реакцию проводили 10–15 мин при 20°С. После завершения реакции добавляли 10-кратный избыток (по объему) 2% LiClO_4 в ацетоне, энергично встряхивали 3–5 с и центрифугировали 1 мин при 10 000 *g*. Супернатант удаляли, осадок последовательно промывали 200 мкл ацетона и 200 мкл спирта, центрифугируя осадок после встряхивания. Растворитель удаляли, осадок сушили 2–3 мин феном на воздухе.

К осадку добавляли 50 мкл 1,5 М водного пиперидина, пробирки закупоривали и выдерживали 15 мин на кипящей водяной бане, затем добавляли 500 мкл 2% LiClO_4 в ацетоне, встряхивали 5–10 с, центрифугировали, промывали ацетоном и спиртом, как описано выше, и высушивали. Осадок растворяли в 3–4 мкл формамида, содержащего 0,1% маркерных красителей кисленицианола или бромфенолового синего. Образцы наносили на полиакриламидный гель ($40 \times 20 \times 0,2$ см) в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3) с 7 М мочевиной. Электрофорез проводили в том же буфере 3–4 ч при 2000 В и гели радиавтографировали.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. Meth. Enzymol., 1980, v. 85, p. 499–560.
2. Свердлов Е. Д., Калинина Н. Ф. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1696–1698.
3. Чувпило С. А., Кравченко В. В. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 12, с. 1634–1637.
4. Pulleyblank D. E. FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 276–278.
5. Banaszuk A. M., Deubau R. V., Sherwood J., Michalak M., Glick B. R. Analyt. Biochem., 1983, v. 128, № 2, p. 281–286.
6. Барам Г. И., Грачев С. А. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 10, с. 1420–1422.
7. Манниатис Т., Фрич Э. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
8.VII.1985
После доработки
3.III.1986

A SIMPLIFIED VERSION OF THE MAXAM – GILBERT METHOD FOR THE PRIMARY STRUCTURE DETERMINATION OF OLIGONUCLEOTIDES AND DNA FRAGMENTS

DANILYUK N. K., YASTREEV S. I., ARTAMONOVA T. P., POPOV S. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

A modification to the Maxam – Gilbert method is proposed that involves precipitation of the nucleotide material with the acetone solution of lithium perchlorate after the completion of chemical reactions to remove the reagents. Modification of cytosine residues is carried out in the presence of lithium chloride. The new mode of precipitation simplifies and speeds up the analysis of oligonucleotides and DNA fragments.