



УДК 577.213.32

НОВЫЙ ПОДХОД К УВЕЛИЧЕНИЮ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПЦР

© 2003 г. К. Б. Игнатов[#], А. И. Мирошников, В. М. Крамаров*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 24.06.2002 г. Принята к печати 16.09.2002 г.

Предложен новый подход к увеличению специфичности и выхода продукта полимеразной цепной реакции, основанный на регуляции активности ДНК-полимеразы в ходе ПЦР путем изменения концентрации ионов магния в зависимости от температуры реакционной смеси. Для этого использовалась малорастворимая соль магния – оксалат магния, чья растворимость зависит от температуры. В ходе ПЦР поддерживалась насыщающая концентрация оксалата магния за счет присутствия в реакционной смеси нерастворимого избытка этой соли. Вследствие этого концентрация ионов магния определялась растворимостью соли и зависела от температуры реакционной среды. Продемонстрировано, что связывание ионов магния при понижении температуры и их высвобождение при повышении температуры влияет на активность ДНК-полимеразы и создает благоприятные условия для ПЦР-амплификации целевого фрагмента ДНК.

Ключевые слова: полимеразная активность; полимеразная цепная реакция (ПЦР); специфичность амплификации; Taq-ДНК-полимераза; оксалат магния.

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – один из основных методов современной молекулярной биологии. К настоящему моменту для решения задачи увеличения специфичности ПЦР применяется несколько основных подходов: оптимизация условий ПЦР [1–3], использование метода “горячего старта” [4–8], проведение “гнездовой” ПЦР [9, 10], введение в реакционную смесь веществ, способствующих плавлению ДНК [11–16].

Мы предлагаем новый подход к увеличению выхода продукта и специфичности ПЦР. Он основан на регуляции ферментативной активности ДНК-полимеразы в ходе цикла ПЦР путем изменения концентрации ионов магния в зависимости от температуры реакционной смеси. Ионы магния необходимы для проявления ДНК-полимеразами ферментативной активности [17, 18], а изменение их концентрации существенно влияет на уровень полимеразной активности [19]. Связывая ионы магния при понижении температуры и высвобождая их при повышении, можно регулировать активность ДНК-полимеразы в процессе ПЦР. Мы предположили, что дополнительное (за счет изменения концентрации ионов магния) уменьшение полимеразной активности при снижении температуры и ее увеличение при повышении температуры создадут благоприятные условия для амплификации специфического фрагмента ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки нашей идеи мы использовали в качестве источника ионов магния в реакционной среде малорастворимую соль магния – оксалат, чья растворимость в воде возрастает с увеличением температуры и изменяется от 0.57 мМ при 18°C до 5.4 мМ при 100°C [20]. В реакционную смесь вводили нерастворимый избыток оксалата магния, достаточный для поддержания в условиях ПЦР насыщающей концентрации соли в растворе. В этом случае концентрация ионов магния в процессе ПЦР будет определяться растворимостью оксалата магния и зависеть от температуры (с увеличением температуры реакционной среды концентрация ионов магния в ней будет возрастать, а с уменьшением температуры концентрация – снижаться).

Оптимальное для ферментативного синтеза ДНК значение концентрации ионов магния определяется свойствами используемой ДНК-полимеразы. Например, в условиях ПЦР оптимальная для Taq-ДНК-полимеразы концентрация ионов магния – 1.5–2 мМ [1, 19, 21], а для KlenTaq-ДНК-полимеразы 3–4 мМ [22]. Поэтому, используя оксалат магния, необходимо иметь возможность корректировать концентрацию ионов магния в растворе в зависимости от свойств ДНК-полимеразы. Мы решили эту задачу, добавляя в реакционную смесь с оксалатом магния хорошо растворимую соль щавелевой кислоты – оксалат аммония, присутствие которого уменьшает растворимость оксалата магния. Варьируя концентрацию оксалата аммо-

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-71-93; эл. почта: ignatov@ibch.ru).

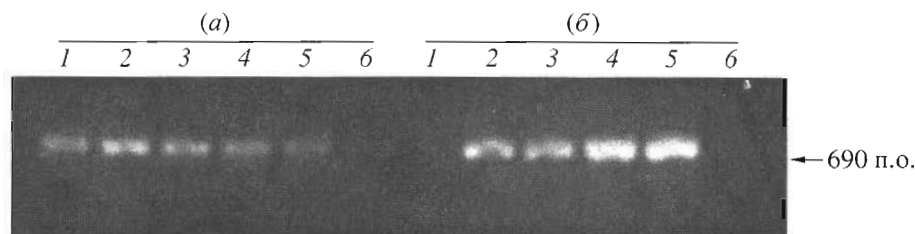


Рис. 1. Электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации *Klentag*- и *Taq*-ДНК-полимеразами (а и б соответственно) фрагмента геномной ДНК *E. coli* (690 п.о.). ПЦР проводили в присутствии суспензии MgC_2O_4 и 0 (1), 2 (2), 4 (3), 8 (4), 12 (5) и 16 мМ (6) $(NH_4)_2C_2O_4$.

ния, мы влияли на интервал изменения концентрации ионов магния в процессе цикла ПЦР. Оптимальная для используемой ДНК-полимеразы концентрация оксалата аммония в реакционной среде определялась по результатам ПЦР (рис. 1). Как видно на рис. 1, максимальный выход продукта реакции для *Taq*-ДНК-полимеразы наблюдался в присутствии оксалата аммония в концентрации 8–12 мМ, а для *Klentag*-ДНК-полимеразы – 2 мМ. Введение оксалата аммония позволяет легко оптимизировать реакционную смесь с оксалатом магния для проведения ПЦР с различными полимеразы.

Для изучения влияния зависящего от температуры изменения концентрации ионов магния на ферментативную активность ДНК-полимеразы мы сравнили активность *Taq*-ДНК-полимеразы в реакционной смеси, содержащей избыток оксалата магния и 10 мМ оксалата аммония, относительно ее активности в обычном буфере для ПЦР, содержащем хлорид магния в концентрации 1.75 мМ. Сравнение проводили в интервале тем-

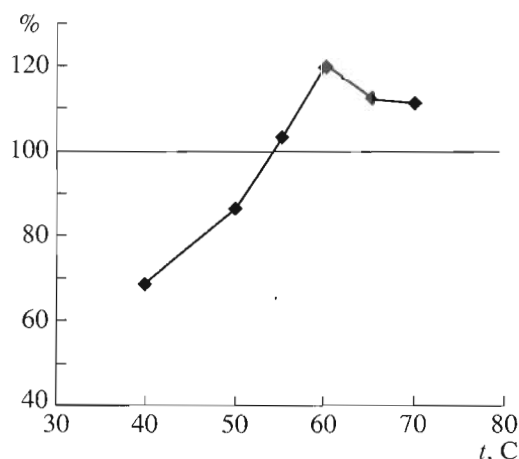


Рис. 2. Температурная зависимость отношения (выраженного в процентах) уровня ферментативной активности *Taq*-ДНК-полимеразы в буфере с суспензией MgC_2O_4 и 10 мМ $(NH_4)_2C_2O_4$ к уровню ее активности в обычном буфере с 1.75 мМ $MgCl_2$, принятом за 100%.

ператур от 40 до 70°C (рис. 2). Активность *Taq*-ДНК-полимеразы в буфере с хлоридом магния была принята за 100%. При 55°C наблюдалась примерно одинаковая ферментативная активность *Taq*-ДНК-полимеразы в обычном буфере и в буфере с оксалатом. Снижение температуры вело к уменьшению концентрации иона магния в буфере с оксалатом и, как следствие, к дополнительному (относительно активности в обычном буфере) уменьшению полимеразной активности, а повышение температуры выше 55°C вызывало дополнительный рост ферментативной активности за счет увеличения концентрации иона магния (рис. 2). Использование оксалата магния позволило увеличить степень зависимости ферментативной активности *Taq*-ДНК-полимеразы от температуры.

Высокая специфичность ПЦР-амплификации целевого фрагмента ДНК обеспечивается проведением реакции при температурах выше 50°C [21]. Инициация синтеза неспецифических фрагментов ДНК, как правило, происходит при более низкой температуре [4, 5]. Использование оксалата магния позволяет создать оптимальную для синтеза ДНК концентрацию ионов магния только при температурах выше 50–55°C (рис. 2). Эти условия должны препятствовать инициации синтеза неспецифических продуктов и способствовать увеличению выхода целевого продукта ПЦР. Для проверки этого предположения мы провели ПЦР-амплификацию “трудных” матриц. В качестве “трудных” матриц использовали последовательности ДНК гена *HLA-C* главного комплекса гистосовместимости I человека и генов рибосомных белков L2 митохондрий мыши и человека, амплификация которых в обычных условиях проведения ПЦР идет с низкой эффективностью и сопровождается синтезом неспецифических продуктов. ПЦР проводили с *Taq*-ДНК-полимеразой как изложено в “Эксперимент. части”. Источником ионов магния в реакционной среде служил хлорид магния (в концентрации 1.75 мМ) или оксалат магния. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что использование оксалата магния позволяет подавить амплификацию не-

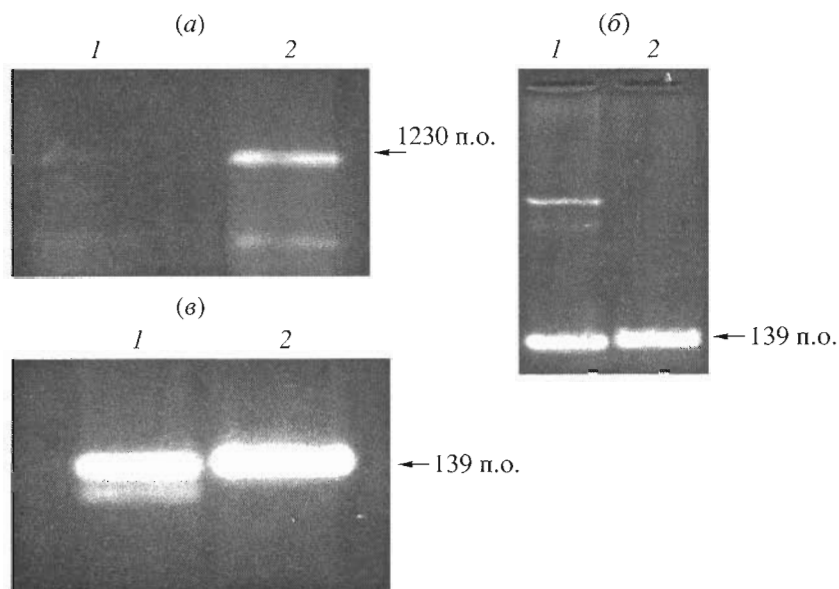


Рис. 3. Электрофорез в 1.2% агарозном геле продуктов ПЦР-амплификации *Taq*-ДНК-полимеразой “трудных” матриц. ПЦР проводили в присутствии 1.75 мМ $MgCl_2$ (1) или суспензии MgC_2O_4 и 10 мМ $(NH_4)_2C_2O_4$ (2). (а) – фрагмент (1230 п.о.) геномной ДНК человека, амплифицированный с праймерами Р3 и Р4; (б) – фрагмент (139 п.о.) кДНК рибосомного белка L2 митохондрии человека, амплифицированный с праймерами Р5 и Р6; (в) – фрагмент (139 п.о.) кДНК рибосомного белка L2 митохондрии мыши, амплифицированный с праймерами Р7 и Р8.

специфических фрагментов ДНК и увеличить выход целевого продукта ПЦР.

Наши результаты хорошо согласуются с уже опубликованными данными о влиянии концентрации ионов магния на специфичность ПЦР и выход продукта амплификации. Ранее было показано, что с уменьшением концентрации иона магния специфичность ПЦР возрастает [1, 23], однако при этом уменьшается выход синтезируемого продукта. Высокие концентрации иона магния [1, 23], так же как и избыток полимеразной активности [19, 24], обеспечивают высокий уровень синтеза ДНК, но могут инициировать синтез неспецифических продуктов ПЦР. При использовании в ПЦР оксалата магния праймирование и инициация синтеза ДНК происходит при низких концентрациях ионов магния и, как следствие, низком уровне полимеразной активности, а элонгация цепи при значительно более высоких концентрациях магния и высоком уровне полимеразной активности. Таким образом обеспечивается высокая специфичность ПЦР в сочетании с высокой эффективностью амплификации целевого продукта.

Некоторые данные о влиянии присутствия в стандартной реакционной смеси ПЦР оксалат-иона на результаты реакции были приведены в работе [25], где авторы сравнили способность хлорида и оксалата тетраметиламмония (ТМА) увеличивать специфичность ПЦР и выход продукта амплификации. Они показали, что результат введения в реакционную смесь оксалата ТМА

намного превосходит результат введения хлорида ТМА, однако молекулярный механизм этого эффекта остался непонятным. Результаты нашей работы позволяют объяснить экспериментальные данные, полученные в работе [25]. Авторами не была учтена возможность химического взаимодействия оксалат-иона с компонентами реакционной смеси. Очевидно, что оксалат-ион образует с присутствующим в реакционной смеси ионом магния малорастворимый оксалат магния. Из этого следует, что разница в эффективности воздействия на ПЦР между оксалатом и хлоридом ТМА связана с образованием (в случае оксалата ТМА) оксалата магния и с возникающей вследствие этого зависимостью концентрации ионов магния от температуры.

В заключение следует отметить, что полученные нами результаты демонстрируют возможность влияния на ферментативную активность ДНК-полимераз путем зависимо от температуры изменения концентрации ионов магния. Вводя в реакционную смесь малорастворимую соль магния (оксалат магния), чья растворимость существенно зависит от температуры, мы получили возможность воздействовать на активность фермента в ходе ПЦР. Это позволило значительно увеличить специфичность реакции и выход продукта амплификации. Наш подход к проведению ПЦР можно использовать с разными полимеразам, поскольку реакционный буфер можно легко адаптировать к используемому ферменту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ферменты, произведенные в лаборатории биотехнологии Института биоорганической химии РАН. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы Н.С. Быстровым (ИБХ РАН) и имели следующую структуру (5' → 3'):

- P1 ATGGCTAACGAATTAACCTGGCA;
 P2 TTACTCACTCTCTGCCGGTAAT;
 P3 GCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAG;
 P4 CATCATAGCGGTGACCACAGCTCCAA;
 P5 CCAAATTCCTTGACGCCCTCGCTAG;
 P6 CTGAATGTCTCTGGCTTGAACCC.

Для проведения ПЦР использовали Mastercycler 5330 (Eppendorf).

Оптимизация концентрации оксалата аммония в реакционной смеси, содержащей нерастворимый избыток оксалата магния при проведении ПЦР с *Taq*- и *Klentaq*-ДНК-полимеразами. Фрагмент геномной ДНК *E. coli* (690 п.о.), кодирующий урацил-ДНК-гликозилазу *E. coli*, синтезировали в ходе ПЦР с олигонуклеотидными праймерами P1 и P2. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 10 mM Трис-НСl (рН 9.0 при 25°C); 50 mM КСl; 0.1% Тритон X-100; дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) в концентрации 0.2 mM каждый; 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы или 10 ед. акт. *Klentaq*-ДНК-полимеразы; олигонуклеотидные праймеры P1 и P2 по 17 пмоль каждого; 100 нг геномной ДНК *E. coli* в качестве матрицы; и суспензию MgC₂O₄ (смешивали по 5 мкл 100 mM MgCl₂ и 100 mM (NH₄)₂C₂O₄ и добавляли в реакционную смесь). ПЦР проводили в присутствии 0, 2, 4, 6, 8, 12 и 16 mM (NH₄)₂C₂O₄ в следующем температурном режиме: 94°C – 30, 58°C – 30, 72°C – 100 с; число циклов 25. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1.2% агарозном геле.

Температурная зависимость уровня ферментативной активности *Taq*-ДНК-полимеразы в буфере, содержащем нерастворимый избыток MgC₂O₄. Ферментативную активность *Taq*-ДНК-полимеразы определяли при 40, 50, 55, 60, 65 и 70°C. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 10 mM Трис-НСl (рН 9.0 при 25°C); 50 mM КСl; 0.1% Тритон X-100; дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) в концентрации 0.2 mM каждый; 2 мкКи [α-³²P]dATP; 0.1 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы; активированную ДНК спермы лосося (12.5 мг/мл). Реакционная смесь содержала или 1.75 mM MgCl₂, или 10 mM (NH₄)₂C₂O₄ и суспензию MgC₂O₄ (суспензию получали как описано выше). Реакцию проводили в течение 10 мин. Уровень ферментативной активности *Taq*-ДНК-полимеразы определяли по количеству радиоактивности, включенной в кислотонерастворимую фракцию. Для этого

20 мкл реакционной смеси после проведения реакции наносили на фильтр GF/B (Whatman). Фильтры промывали 10% раствором трихлоруксусной кислоты и высушивали. Количество радиоактивности на фильтре подсчитывали на сцинтилляционном счетчике Beckman LS 9800 со сцинтиллятором Ready-Solv HP (Beckman).

Относительную активность *Taq*-ДНК-полимеразы рассчитывали как отношение радиоактивности, включенной в кислотонерастворимую фракцию, в буфере, содержащем MgC₂O₄, к соответствующей величине радиоактивности, включенной в буфере с MgCl₂.

ПЦР-амплификация “трудных” матриц. При проведении ПЦР-амплификации “трудных” матриц в качестве последних выбирали последовательности ДНК, чей синтез в обычных условиях проведения ПЦР идет с низкой эффективностью и сопровождается синтезом неспецифических продуктов реакции. Фрагмент (1230 п.о.) гена *HLA-C* главного комплекса гистосовместимости I (аллель HLA-4) был амплифицирован с использованием геномной ДНК человека, взятой в качестве матрицы, и праймеров P3 и P4; фрагмент (139 п.о.) кДНК рибосомного белка L2 митохондрии человека – с использованием кДНК, взятой в качестве матрицы, и праймеров P5 и P6; фрагмент (139 п.о.) кДНК рибосомного белка L2 митохондрии мыши – с использованием праймеров P7 и P8.

Реакционная смесь (50 мкл) содержала: 10 mM Трис-НСl (рН 9.0 при 25°C); 50 mM КСl; 0.1% Тритон X-100; дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) в концентрации 0.2 mM каждый; 2.5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы; олигонуклеотидные праймеры по 20 пмоль каждый; 0.1 нг кДНК или 1 нг геномной ДНК в качестве матрицы. Реакционная смесь содержала или 1.75 mM MgCl₂, или 10 mM (NH₄)₂C₂O₄ и суспензию MgC₂O₄ (суспензию получали как описано выше). ПЦР проводили в следующем температурном режиме: 94°C – 30, 58°C – 30, 72°C – 100 с, в течение 35 циклов. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 1.2% агарозном геле.

Авторы выражают благодарность Е. Украинцевой и В. Орловой за предоставление матричных ДНК и праймеров для ПЦР-амплификации “трудных” матриц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams J.F. // BioTechniques. 1989. V. 7. P. 762–768.
2. Rychlik W., Spencer W.J., Rhoads R.E. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 6409–6412.
3. Harris S., Jones D.B. // Br. J. Biomed. Sci. 1997. V. 54. P. 166–173.
4. Nuovo G.J., Gallery F., MacConnell P., Becker J., Bloch W. // Am. J. Pathol. 1991. V. 139. P. 1239–1244.

5. Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 1717–1723.
6. Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Troconi B.M. // BioTechniques. 1994. V. 16. P. 42–44.
7. Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A. // BioTechniques. 1994. V. 16. P. 1134–1137.
8. Birch D.E. // Nature. 1996. V. 381. P. 445–446.
9. Kemp D.J., Smith D.B., Foote S.J., Samaras N., Peterson M.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 2423–2427.
10. Zimmermann K., Mannhalter J.W. // BioTechniques. 1998. V. 24. P. 222–224.
11. Winship P.R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 1266.
12. Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 7465.
13. Weissensteiner T., Lanchbury J.S. // BioTechniques. 1996. V. 21. P. 1102–1108.
14. Baskaran N., Kandpal R.P., Bhargava A.K., Glynn M.W., Bale A., Weissman S.M. // Genome Res. 1996. V. 6. P. 633–638.
15. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3957–3958.
16. Hengen P.N. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 225–226.
17. Steitz T.A., Smerdon S.J., Jager J., Joyce C.M. // Science. 1994. V. 266. P. 2022–2025.
18. Steitz T.A. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 17395–17398.
19. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Chang S.Y., Landre P.A., Abramson R.D., Gelfand D.H. // PCR Methods Appl. 1993. V. 2. P. 275–287.
20. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Ленинград: Госхимиздат, 1963. Т. 2. С. 116–117.
21. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. // Science. 1988. V. 239. P. 487–491.
22. Barnes W.M. // Gene. 1992. V. 112. P. 29–35.
23. Rychlik W. // BioTechniques. 1995. V. 18. P. 84–90.
24. Innis M.A., Gelfand D.H. // PCR Protocols: A guide to Methods and Applications / Eds M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. San Diego, California: Acad. Press, 1990. P. 3–12.
25. Kovarova M., Draber P. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. E. 70.

A New Approach to Enhanced PCR Specificity

K. B. Ignatov[#] A. I. Miroshnikov, and V. M. Kramarov

[#] Phone: +7 (095) 335-7193; e-mail: ignatov@ibch.ru

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

A new approach to enhanced specificity and product yield of polymerase chain reaction is proposed. It is based on control of DNA polymerase activity during PCR by changing the magnesium ion concentration, which depends on the temperature of the reaction mixture. A slightly soluble magnesium salt, magnesium oxalate, whose solubility depends on temperature, was used as a source of magnesium ions. During PCR, magnesium oxalate was maintained at saturating concentration by the presence of an insoluble excess of this salt, and the concentration of magnesium ions depended on the salt solubility: binding of magnesium ions at lower temperatures and their release at higher temperatures was shown to affect the DNA polymerase activity and to favor the specific PCR amplification of the target DNA fragment. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: amplification specificity, magnesium oxalate, polymerase activity, polymerase chain reaction (PCR), Taq DNA polymerase