



УДК 547.963.32.02

ТВЕРДОФАЗНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Чувпило С. А.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва*

Кравченко В. В.

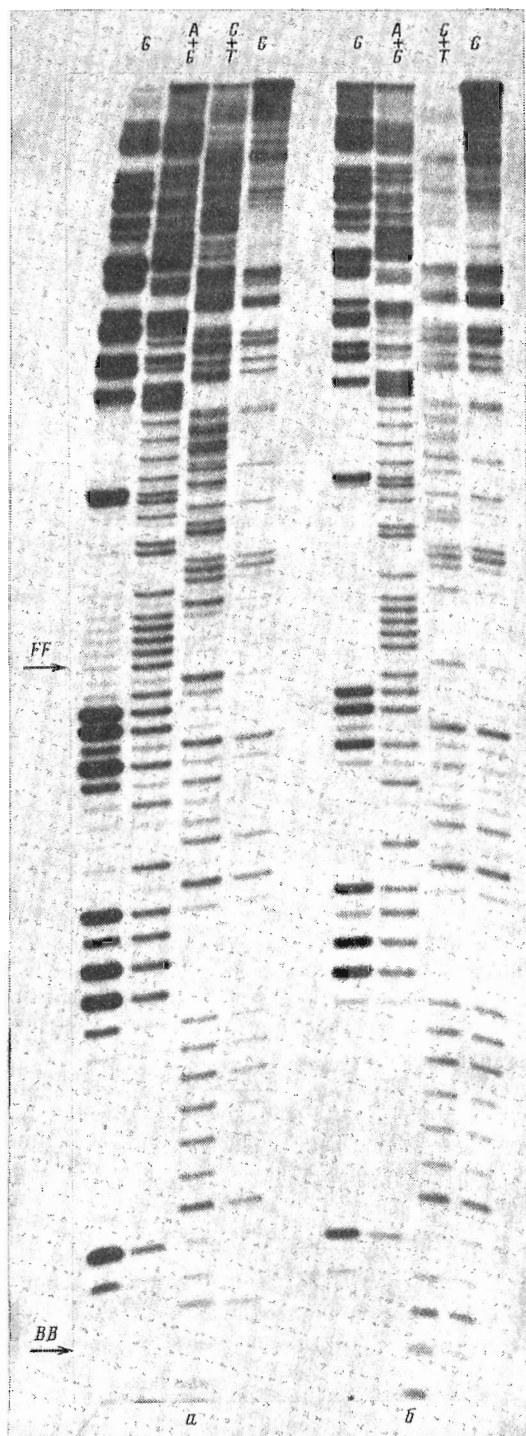
*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии
Главмикробиопроба СССР, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Разработан простой метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, основанный на том, что терминально меченный фрагмент ДНК адсорбируют на DEAE-бумаге и в иммобилизованном состоянии подвергают специфическим химическим модификациям с последующим расщеплением по G, A+G, C и C+T. По результативности этот способ не уступает общепринятому методу Максама — Гилберта [1], но требует значительно меньших затрат труда и времени.

В настоящее время для определения нуклеотидной последовательности ДНК наиболее широко используется метод Максама — Гилберта, основанный на специфических химических модификациях пуринов и пиримидинов [1]. Этот метод применим для анализа первичной структуры не только природных ДНК, но и синтетических олиго- и полинуклеотидов. Кроме того, популярности этого метода способствует доступность реагентов и простота проведения химических реакций. Однако в отличие от ферментативного метода Сэнгера [2] химический метод Максама — Гилберта более трудоемок из-за многочисленных операций лиофилизации, осаждения и промывок анализируемого материала. В то же время недостаточная очистка образца от солевых примесей (до модификации) или от химических реагентов (после нее) приводит к ухудшению радиоавтограммы разделяющего геля, что сильно затрудняет или делает невозможным прочтение последовательности ДНК.

Нам удалось упростить процессы очистки вещества перед химической модификацией и удаления химических реагентов после нее. С этой целью терминально меченный фрагмент ДНК иммобилизовали на DEAE-бумаге и все дальнейшие операции проводили не в растворе, как это делается по методике Максама — Гилберта, а на твердой фазе. Оказалось, что при этом существенно упрощаются и сокращаются по времени операции, выполняемые при анализе первичной структуры. Так, например, на удаление пиперидина, занимающее по Максаму — Гилберту несколько часов [1], в нашем способе затрачивается всего 1–2 мин. Сильно сокращаются и другие операции; в результате общее время анализа (до нанесения вещества на гель) в основном определяется продолжительностью самих реакций химической модификации и пиперидинового гидролиза и обычно составляет 1,5 ч.

На рисунке приведены результаты параллельного определения нуклеотидной последовательности ДНК модифицированным методом Максама — Гилберта в растворе и на DEAE-бумаге. Видно, что оба метода дают одинаковый результат. Таким образом, иммобилизация ДНК на DEAE-целлюлозе не оказывает влияния на химические реакции модификации и расщепления, используемые при секвенировании, и не сказывается на разрешающей способности геля.



Радиоавтограмма разделяющего гена, полученного при определении нуклеотидной последовательности *Eco* RI – *Msp* I-фрагмента плазмиды pBR 322 длиной 459 пар оснований модифицированным методом [4] Максама – Гилберта [1]: а – на DEAE-бумаге, б – в растворе

Следует отметить, что при секвенировании ДНК твердофазным методом происходят некоторые потери анализируемого вещества; судя по измерениям радиоактивности, они составляют 5–10% на стадии пиперидинового гидролиза и около 20% при элюции с DEAE-бумаги. Однако сильное упрощение операций секвенирования и повышение их воспроизводимости, по нашему мнению, вполне оправдывают эти потери. Как видно на рисунке, потери материала происходят одинаково для длинных и коротких фрагментов и поэтому не сказываются на интерпретации полученных результатов. Таким образом, предлагаемый нами способ секвенирования ДНК прост, надежен и позволяет стабильно получать радиоавтограммы хорошего разрешения.

Экспериментальная часть

Введение ^{32}P -метки в ДНК и электрофорез проводили как описано в работе [3]. РНК-носитель готовили из дрожжевой тРНК. Для этого 10 мг тРНК инкубировали 30 мин при 37°C в 1 мл воды с 20 мкг РНКазы А, фермент удаляли экстракцией хлороформом и РНК дважды переосаждали этанолом из 0,3 М ацетата натрия. Использовали однократно перегнаный диметилсульфат, муравьиную кислоту квалификации ос. ч., гидразингидрат квалификации х. ч. без дополнительной очистки.

Подготовка образца. ^{32}P -Меченый фрагмент ДНК иммобилизовали на бумаге DE-81 (диск диаметром 4 мм) в процессе электроэлюции из полиакриламидного или агарозного геля. Элюцию проводили 2 ч в 25 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3) с 0,5 мМ EDTA при 250 В в аппарате для концентрирования образцов фирмы ISCO (можно использовать также стеклянную трубку, закрытую с одного конца DEAE-бумагой и диализной мембраной, а электроэлюцию проводить в аппарате для диск-электрофореза фирмы Reanal). По окончании элюции диск DEAE-бумаги промывали, помещая его с помощью пинцета на 1–2 с в дистиллированную воду, и переносили на лист фильтровальной бумаги. Операцию повторяли 4–5 раз. Затем аналогичную промывку проводили в 96% этаноле, диск DEAE-бумаги высушивали на воздухе или в вакуумном эксикаторе, разрезали на четыре равные части, маркировали и использовали для проведения химических реакций.

В альтернативном варианте фрагмент элюировали из геля по методу Максама — Гилберта [1] и после однократного осаждения с тРНК носителем (50 мкг) и растворения в 20 мкл воды наносили по 5 мкл на четыре маркированные полоски DEAE-бумаги DE-81 размером $2,5 \times 5$ мм. Промывку и высушивание проводили как описано выше.

Химическая модификация. Специфическую модификацию по гуанину проводили в 1% растворе диметилсульфата в 50 мМ формиат-аммонийном буфере, рН 3,5 [4], модификацию пуринов (апуринизацию) — в 66% муравьиной кислоте [5], модификацию пиримидинов — в гидразингидрате [5], модификацию цитозина — в гидразингидрате, насыщенном NaCl и содержащем 0,25 н. NaOH [5]. Сухие бумажные полоски с иммобилизованным радиоактивным фрагментом ДНК помещали на стекло или лавсановую пленку, наносили раствор соответствующего реагента в таком количестве, чтобы он полностью впитался в бумагу (4–5 мкл для полоски размером $2,5 \times 5$ мм) и накрывали лавсановой или полиэтиленовой пленкой для предотвращения испарения. По окончании модификации полоску бумаги промывали 4–5 раз спиртом, водой и снова спиртом (каждый раз окуная ее на 1–2 с в жидкость и помещая на фильтровальную бумагу) и затем высушивали.

При указанных выше концентрациях реагентов времена реакций модификации по G, A+G, C+T и C относятся как 2 : 5 : 10 : 10. В случае фрагментов длиной 100–150 оснований оптимальное время модификации при комнатной температуре составляет для G 4 мин, для A+G 10, для C+T 20, для C 20 мин. С увеличением нуклеотидной цепи продолжительность реакций уменьшается и для фрагмента величиной 300 и более пар оснований составляет 1; 2,5; 5 и 5 мин; при секвенировании

олигонуклеотидов длиной 10—15 звеньев время специфической модификации по G, A+G, C+T и C увеличивается соответственно до 12, 30, 60 и 60 мин.

Гидролиз и десорбция ДНК. Высушенные бумажные полоски после модификации помещали в 1,5-мл полипропиленовую пробирку с 1 М водным раствором пиперидина (так, чтобы они все находились под слоем жидкости) и выдерживали 30 мин на кипящей водяной бане (для предотвращения испарения раствора крышка пробирки должна быть плотно закрыта). Пиперидин удаляли описанной выше 4—5-кратной промывкой в воде и спирте. Сухие полоски помещали по отдельности в конические наконечники от автоматической пипетки (на 200 мкл), вставленные в полипропиленовые пробирки объемом 0,4 мл (для удобства наконечники могут быть укорочены в широкой части), в каждый добавляли по 50 мкл 1 М раствора NaCl, содержащего 10 мМ EDTA и 5 мкг РНК носителя, инкубировали 5—10 мин при 65°С и подвергали кратковременному центрифугированию для переноса элюиционного раствора в пробирку. Десорбцию повторяли еще раз, после чего радиоактивный материал осаждали 96% спиртом, осадок промывали 80% спиртом, высушивали и растворяли в 2—4 мкл формамида, содержащего маркерные красители ксиленцианол FF и бромфеноловый синий. Образцы наносили на 15% полиакриламидный гель (30×40×0,4 см) в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,3) с 7 М мочевиной; электрофорез проводили в том же буфере 2,5—3 ч при 2000 В. На рисунке приведена типичная радиоавтограмма.

Авторы благодарят В. Г. Коробко, В. Н. Добрынина и М. Н. Колосова за полезную дискуссию и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology, v. 65, Nucleic Acids, Part 1/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 499—560.
2. Sanger F., Nicklin S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 12, p. 5463—5468.
3. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. И. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 830—839.
4. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. И. Биоорганич. химия, 1977, т. 3, № 9, с. 1281—1283.
5. Korobko V. G., Dobrynin V. N., Severtsova I. V., Bistrov N. S., Shuvpilo S. A., Kolosov M. N. Nucl. Acids Res., Symp. Ser., 1980, № 7, p. 365—376.

Поступила в редакцию
13.VII.1983

A SOLID-PHASE METHOD FOR DNA SEQUENCING

SHUVPILO S. A., KRAVCHENKO V. V.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

A solid-phase method for DNA sequencing has been developed which involves immobilization of the terminally labeled DNA fragment on the DEAE-paper followed by chemical modification and cleavage at G, A+G, C+T, and C sites. As compared to the Maxam and Gilbert method, the new technique is more rapid and less laborious, being of the same efficiency.