



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 11 * №12* 1985

УДК 577.152.361*:113.6:213.622

ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ С БОЛЬШОЙ СТЕПЕНЬЮ ВЫРОЖДЕННОСТИ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ мРНК И КЛОНОВ кДНК, СООТВЕТСТВУЮЩИХ ГЕНУ α -СУБЪЕДИНИЦЫ Na^+,K^+ -АТР-азы

Петрухин Е. Е., Гришин А. В., Арсениян С. Г.,
Броуде Н. Е., Гринкевич В. А., Филиппова Л. Ю.,
Северцова И. В., Модянов Н. Н.

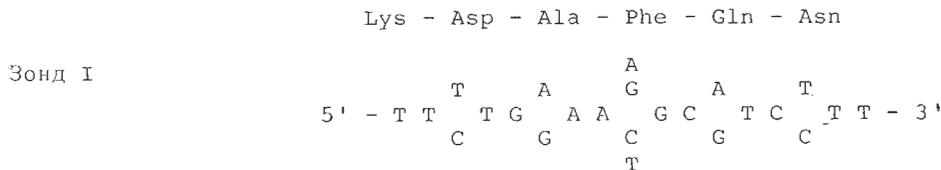
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Для идентификации и поиска нуклеотидных последовательностей, содержащих структурную часть гена α -субъединицы Na^+,K^+ -АТР-азы, синтезированы 17-звенные олигонуклеотидные зонды, соответствующие пептиду Lys-Asp-Ala-Phe-Gln-Asn. Показано, что при вырожденности 64 17-звенный зонд пригоден лишь для идентификации специфической последовательности в мРНК. Для поиска клонов, содержащих фрагменты кДНК, необходимо предварительное фракционирование зондов с помощью ВЭЖХ или повторный синтез группы олигонуклеотидов с меньшей вырожденностью.

Синтетические олигонуклеотидные зонды широко используются для идентификации специфических последовательностей РНК и ДНК. При использовании зондов с большой степенью вырожденности неизбежно возникают проблемы, обусловленные высоким уровнем неспецифического связывания.

На первом этапе работ по установлению полной аминокислотной последовательности α -субъединицы Na^+,K^+ -АТР-азы был осуществлен структурный анализ фрагментов гидрофильной области полипептидной цепи [1]. Полученные результаты послужили основой для синтеза 17-членных олигонуклеотидных зондов с вырожденностью 64 (схема 1).

СХЕМА 1



Предварительные опыты по гибридизации таких зондов с иммобилизованной $\text{poly}(\text{A}^+)$ -РНК показали, что сигнал, вызванный специфической гибридизацией, обнаруживается на большом фоне неспецифического связывания зондов в области 18S и 28S РНК. Однако при попытках использовать эти зонды для скрининга представительной кДНК библиотеки нам не удалось обнаружить клонов, дающих положительный сигнал гибридизации. Таким образом, стала очевидной необходимость обогащения зондов по специфической последовательности. Согласно литературным данным, вырожденность порядка 64 для 16–17-звенных зондов является критической в плане их использования для идентификации положительных клонов [2]. Так, лишь ген предшественника человеческого соматокрипина был идентифицирован с помощью таких зондов: 14-звенного (вырожденность 64) и 20-звенного (вырожденность 96) [3]. В подавляющем же

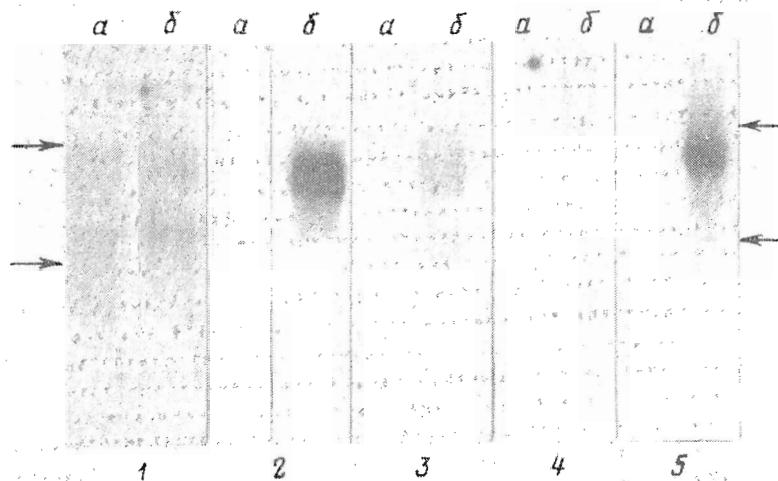


Рис. 1. Результаты гибридизации радиоактивно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными α -субъединице Na^+ , K^+ -АТР-азы с иммобилизованной poly(A^+)-РНК из почек свиньи. *a* – 15 мкг poly(A^-)-РНК; *b* – 5 мкг poly(A^+)-РНК. 1 – гибридизация РНК с зондом I; 2–4 – гибридизация РНК с зондами из фракций I–III (см. рис. 2); 5 – гибридизация РНК с зондом Ib (см. схему 2). Стрелками указано положение 28S и 18S РНК

большинстве случаев успех в поиске положительных клонов при длине зонда 14–17 достигается при вырожденности не более 32 [2].

Разработано несколько различных подходов для уменьшения вырожденности зондов. Например, в ряде случаев оказалось удачным использование G в третьем положении кодона [4], а также I [5] при неопределенности A/G и A/G/C/T соответственно. Другой способ уменьшения вырожденности основан на синтезе уникальных последовательностей с использованием статистически наиболее вероятных для данного типа клеток кодонов [6]. Однако оба метода не гарантируют полного сохранения комплементарности зонда с искомой последовательностью и потому их целесообразнее использовать для синтеза более длинных зондов.

В настоящей работе предложен и использован метод обогащения нуклеотидных зондов по специфической последовательности путем фракционирования исходной смеси синтетических олигонуклеотидов (64 варианта) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В других экспериментах для уменьшения вырожденности использовался также заново синтезированный четырьмя группами по 16 вариантов препарат зонда I. Результаты эксперимента позволяют сопоставить оба способа уменьшения вырожденности олигонуклеотидных зондов.

На схеме приведена структура пептида из триптического гидролизата α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТР-азы [1] и соответствующий ему олигонуклеотидный зонд I. Этот зонд представляет собой смесь 64 17-звенных олигонуклеотидов, из которых лишь один комплементарен искомой мРНК.

Гибридизация этого зонда с poly(A^+)-РНК, выделенной из мозгового слоя почек свиньи, показала, что кроме полосы мРНК α -субъединицы фермента, дающей положительный сигнал гибридизации в области 25–26S, имеется высокий фон неспецифического связывания в области 28S и 18S РНК (рис. 1).

Фракционирование зонда I осуществлялось с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Оптимальные условия разделения были подобраны в серии аналитических экспериментов на трех типах сорбентов: μBondapak C₁₈ (Waters, США), Zorbax ODS (Du Pont, США) и Nucleosil 7C₁₈ (Machery-Nagel, ФРГ). Цель этих опытов заключалась в поиске условий, обеспечивающих наиболее полное отделение фракций, содержащих искомый зонд, от основной массы нуклеотидного материала. Степень обогащения фрак-

ций элюата по специфической последовательности оценивалась гибридизацией с poly(A⁺)-РНК.

В ходе препаративного деления на колонке Nucleosil C₁₈ исходная смесь олигонуклеотидов была разделена на пять фракций (рис. 2). Обессорливание фракций проводилось на биогеле Р-4. На рис. 1 (дорожки 2–4) приведены результаты гибридизации первых трех фракций элюата: самый сильный сигнал дает олигонуклеотидный зонд первой фракции, нуклеотиды остальных фракций практически не давали положительной гибридизации.

Аналогичные результаты по обогащению специфической последовательностью получены при фракционировании двух других 17-членных зондов с вырожденностью 64.

Таким образом, фракционирование зонда I с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе позволило существенно обогатить олигонуклеотидный зонд нужной последовательностью. В результате удалось резко снизить фон неспецифической гибридизации.

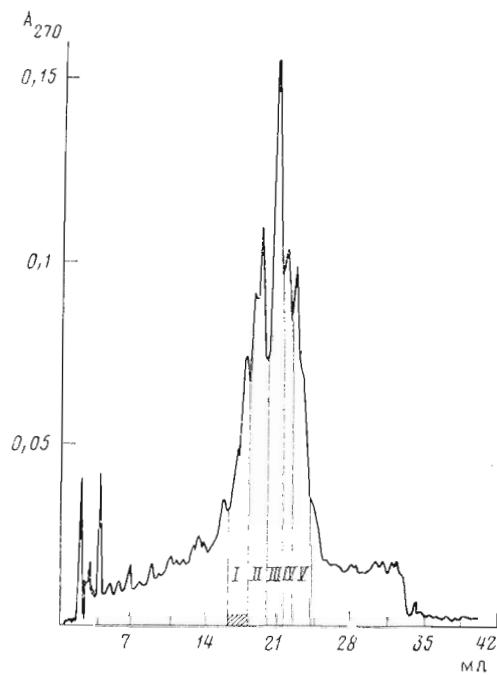
Параллельно с хроматографическим обогащением зонда был осуществлен синтез четырех групп олигонуклеотидов. Он был спланирован таким образом, чтобы ликвидировать неоднозначность структуры в центре молекулы олигонуклеотида. Поэтому были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие все четыре варианта кодонов, соответствующих аланину

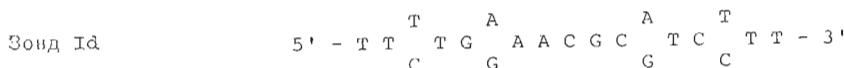
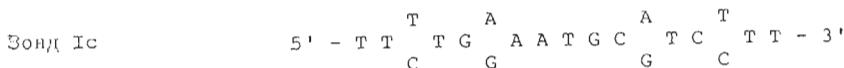
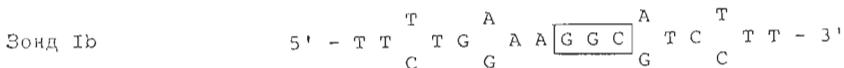
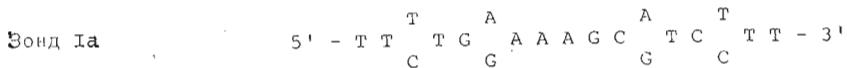
Рис. 2. Обогащение зонда I с помощью ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) с сорбентом Nucleosil 7C₁₈. Элюирующие буферы: А – 0,1 М CH₃COONH₄ (рН 7,0), В – 0,1 М CH₃COONH₄ (рН 7,0), 60% CH₃OH. Скорость элюирования 0,7 мл/мин. Прямоугольником на оси абсцисс обозначены границы обогащенной фракции, гибридизующейся с мРНК

(схема 2). Результаты гибридизации с poly(A⁺)-РНК (рис. 1) четко показали, что вариант зонда Ib, содержащий последовательность GGС, гибридизируется с мРНК, причем интенсивность сигнала гибридизации сравнима с таковой при обогащении зонда хроматографическим путем.

Как уже упоминалось выше, при скрининге зондом I библиотеки кДНК, содержащей ~2·10⁴ клонов, нам не удалось обнаружить положительных клонов. При использовании для гибридизации хроматографически обогащенной фракции зонда I были обнаружены клоны, дающие положительный сигнал гибридизации (рис. 3). Еще более четкий результат был получен при использовании зонда Ib, содержащего 16 вариантов олигонуклеотида (рис. 3). При гибридизации на колониях нами было проверено несколько описанных методик гибридизации и отмычки зондов. Наилучшие результаты с точки зрения уменьшения фона, обусловленного неспецифическим связыванием, были получены при использовании для гибридизации смеси гепарина, пироfosфата натрия и коктейля Блotto в дополнение к обычно применяемому раствору Денхардта (см. «Экспериментальную часть»).

При скрининге библиотеки клонов, полученной с «рассеянной» затравкой (статистический гидролизат ДНК) (10⁵ клонов), зондом Ib было выявлено 17 положительных колоний. Один из клонов (рВ 804) содержал вставку 449 п.о. с внутренним сайтом PstI. Анализ пуклеотидной последовательности этой вставки позволил установить структуру 17,4 кДа фрагмента α -субъединицы Na⁺,K⁺-АТР-азы [7].





На основании полученных результатов можно сделать вывод, что при вырожденности 64 17-звенные олигонуклеотидные зонды пригодны в лучшем случае для идентификации специфической последовательности в мРНК. Для получения положительных сигналов гибридизации при поиске клонов, содержащих фрагменты кДНК, необходимо обогащение зондов

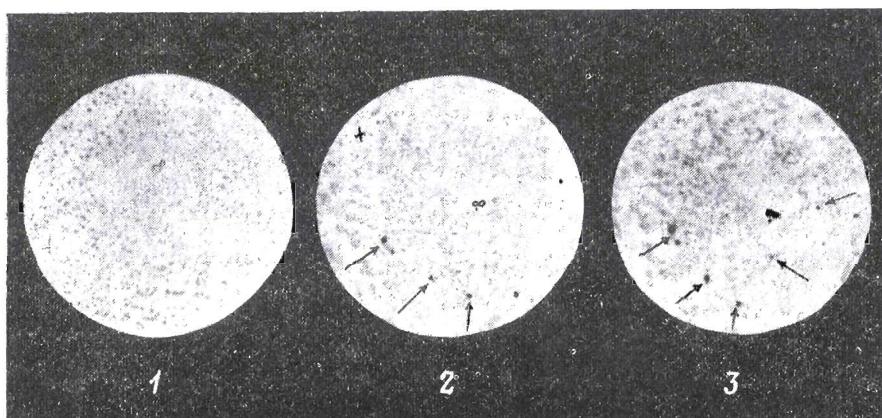


Рис. 3. Гибридизация радиоактивно меченых зондов с ДНК бактериальных клонов, иммобилизованной на нитроцеллULOZИМ фильтре (см. «Экспер. часть»): 1 – гибридизация с зондом I; 2 – гибридизация того же фильтра с зондом, полученным при фракционировании исходного зонда с помощью ВЭЖХ (фракция I); 3 – гибридизация того же фильтра с зондом Iв (см. схему 2). Стрелками отмечены колонии, дающие положительный сигнал гибридизации

специфической последовательностью. Этого можно достичь путем фракционирования исходной смеси олигонуклеотидов ВЭЖХ или синтезом групп олигонуклеотидов с меньшей вырожденностью.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. Ю. А. Овчинникову и чл.-кор. Е. Д. Свердлову за постоянное внимание и ценные советы.

Экспериментальная часть

В работе использовали: ацетат аммония, EDTA, MgCl₂, дитиотрейт, MOPS (Sigma, США); формальдегид*, спермидин·HCl (Fluka, Швейцария); ацетат натрия (Merck, ФРГ); агарозу, SDS, биогель P-4 (Bio-Rad,

* Формальдегид перед использованием очищали от параформа.

США); формамид (BRL, США); метапол (Pierce, США); РНК дрожжей (Serva, ФРГ); фикол 400 (Pharmacia, Швеция); поливинилпирролидон, М 44 000 (BDH, Англия); ВСА, фракция V (Calbiochem, США); NaCl (ос. ч., СССР); [γ -³²P]ATP, уд. акт. 5000 Ки/моль (Amersham, Англия). Полинуклеотидкиназа фага T4 была любезно предоставлена А. В. Честухиным (ИБХ АН СССР).

Синтез олигонуклеотидов проводили фосфотриэфирым методом в растворе [8]. *Олигонуклеотиды метили по 5'-концу* [γ -³²P]ATP с помощью полинуклеотидкиназы по методу [9].

Обогащение зонда осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (4,6×250 мм) Nucleosil 7C₁₈ (Machery-Nagel, ФРГ), хроматограф Du Pont Instruments (Du Pont, США). Образец (30 мкг) наносили на колонку в объеме не более 200 мкл. Элюирование нуклеотидов осуществляли линейным градиентом концентрации метанола в 0,1 М CH₃COONH₄, pH 7,0 (рис. 3). Олигонуклеотиды детектировали спектрофотометрически (λ 270 нм). Аналитические опыты проводили, используя 1–3 мкг материала исходного зонда.

Обессоливание обогащенной фракции проводили с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке (1×20 см) с биогелем P-4 (100–200 меш), уравновешенным трижды дистиллированной водой. Предварительно фракцию упаривали на роторном испарителе до объема 500 мкл. После обессоливания фракцию упаривали до объема 440 мкл и хранили при температуре от –5 до –10° С. Из 30 мкг исходного зонда в конечном итоге получили 5 мкг обогащенной фракции.

Выделение мРНК из мозгового слоя почек свиньи, фракционирование мРНК в сахарозном градиенте, синтез и клонирование кДНК проводили как описано ранее [10].

Гибридизация мРНК с олигонуклеотидными зондами. 5–10 мкг poly(A⁺)-РНК подвергали электрофоретическому разделению в 1,5% агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегид [11]. Детекцию специфической мРНК радиоактивно меченным олигонуклеотидным зондом проводили на высушенном геле, без переноса РНК на твердый носитель [12].

Прегибридизацию, гибридизацию и отмывку геля осуществляли по стандартной методике [12]. Температура гибридизации для зонда I, определенная эмпирически, составляла 40° С. Отмытый гель экспонировали с рентгеновской пленкой PM-B с усиливающим экраном при –70° С в течение 16–48 ч.

Скрининг библиотеки кДНК. Бактериальные колонии лизировали на нитроцеллюлозном фильтре, пейтрализовали и запекали, как описано в работе [13].

Прегибридизацию, гибридизацию и отмывку нитроцеллюлозных фильтров проводили по методике, описанной в работе [14]. Для уменьшения неспецифического связывания во все растворы добавляли гепарин, пирофосфат натрия и коктейль Блотто (раствор обезжиренного сухого молока) как описано в работах [15, 16]. Высушенные фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой PM-B в течение 16–48 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арзамазова Н. М., Аристархова Е. А., Шафиева Г. И., Назимов Н. В., Алданова Н. А., Модянов Н. Н. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1598–1606.
2. Reyes U., Wallace R. B. In: Genetic Engineering / Ed. Setlow R. B. N. Y.–L.: Plenum Press, 1984, v. 6, p. 157–173.
3. Gubler U., Monahan J. J., Lemedico P. T., Bhatt R. S., Collier K. J., Hoffman B. J., Bohlen P., Esch F., Ling N., Zeitin F., Brazeau P., Poonian M. C., Glage L. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 14, p. 4311–4314.
4. Gubler U., Chua A. O., Hoffman B. J., Collier K. J., Eng J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 14, p. 4307–4310.
5. Takahashi Y., Kato K., Hayashizaki Y., Wakabayashi T., Ohtsuka E., Matsuki S., Ikebara M., Matsubara K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1985, v. 82, № 4, p. 1931–1935.
6. Lathe R. J. Mol. Biol., 1985, v. 183, № 1, p. 1–12.
7. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Арсениян С. Г., Броуде Н. Е., Петрухин К. Е., Гришин А. В., Арзамазова Н. М., Северцова Н. В., Модянов Н. Н. Докл. АН СССР, 1985, т. 283, № 5, с. 1278–1280.

8. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bhal C. P., Wu R. Nucleic Acid Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж. В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 134–135.
10. Петрухин К. Е., Броуде Н. Е., Арсениан С. Г., Гршин А. В., Джанджугазян К. Н., Модилов Н. Н. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 12, с. 1607–1613.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж. В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 197–198.
12. Meinkoth J., Whal G. Anal. Biochem., 1984, v. 138, № 2, p. 264–284.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбурк Дж. В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984, с. 294–295.
14. Hanahan D., Meselson M. In: Methods in Enzymology / Eds Wu R., Grossman L., Moldave K. N. Y.—L.: Acad. Press, 1983, v. 100, p. 333–342.
15. Johnson D. A., Gautsch J. A., Sportsman J. K., Elder J. H. Gene Anal. Techn., 1984, v. 1, № 1, p. 3–8.
16. Sigh L., Janes K. V. Nucleic Acid. Res., 1984, v. 12, № 14, p. 5627–5638.

Поступила в редакцию
5.VII.1985

SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES WITH HIGH DEGREE OF DEGENERACY USED AS HYBRIDIZATION PROBES FOR IDENTIFICATION OF mRNA AND cDNA CLONES CODING FOR α -SUBUNIT OF Na^+ , K^+ -ATPase

PETRUKHIN K. E., GRISHIN A. V., ARSENYAN S. G.,
BROUDE N. E., GRINKEVICH V. A., FILIPPOVA L. Yu., SEVERTSOVA I. V.,
MODYANOV N. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Oligonucleotides deduced from the amino acid sequence of a hexapeptide Lys-Asp-Phe-Ala-Glu-Asn were synthesized and used as probes to screen a pig kidney cDNA library for a specific DNA sequence coding for the α -subunit of Na^+ , K^+ -ATPase. It was shown that the mixed oligoprobe, consisting of 64 heptadecamers, could be only suitable for mRNA blot analysis. To identify the clones with specific cDNA inserts, mixed oligoprobes were fractionated by HPLC technique. For the same purpose a new set of oligonucleotides, synthesized as four groups of 16 different heptadecamers each, was used.