



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 9 * 1993

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.21

© 1993 М. И. Просняк, С. И. Веселовская *, В. А. Мясников *,
Е. Ю. Ефремова *, В. К. Потапов *, С. А. Лимборская, Е. Д. Свердлов

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДАКТИЛОСКОПИИ ПУТЕМ ГИБРИДИЗАЦИИ С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ ДУПЛЕКСЫ С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ

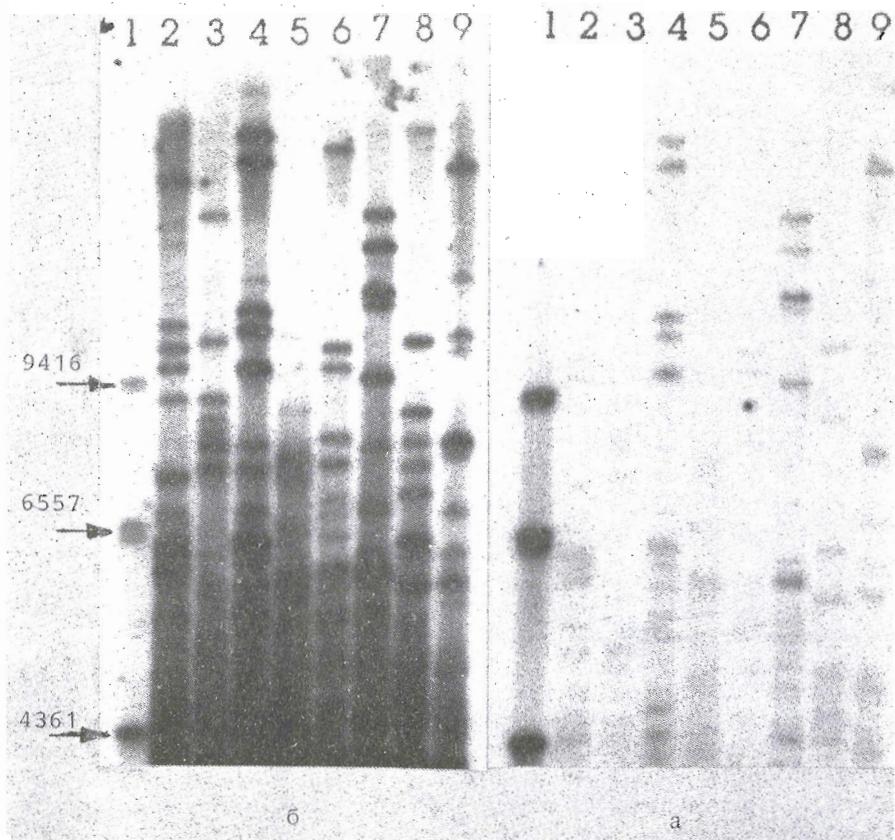
Институт молекулярной генетики РАН, Москва;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова,
Москва

Ключевые слова: геномная дактилоскопия, гибридизация, 5-метилцитозин, 2-аминоаденин.

Геномная дактилоскопия (ГД) (ДНК-фингерпринтинг, геномный фингерпринтинг) находит все более широкое применение как в картировании геномов и генетике популяций, так и в прикладных областях: в изучении наследственных заболеваний, в судебной экспертизе, криминалистике, характеризации пород животных и т. д. (см. для обзора [1]). Методология ГД основана на анализе распределения простых высокоповторяющихся и высоковариабельных последовательностей — мини- и микросателлитов в геномах. Среди методов, используемых для этой цели, важное место занимает молекулярная гибридизация с меченными олигонуклеотидами, соответствующими по последовательностям основным элементам высоковариабельных повторяющихся последовательностей ДНК. При этом высокомолекулярную ДНК расщепляют эндонуклеазами рестрикции, полученные фрагменты разделяют на агарозном геле, переносят на мембранные фильтры и гибридизуют с меченым олигонуклеотидом. В результате наблюдается серия полос (паттерн), высокоспецифичная для данного индивидуума. При семейном анализе наблюдается менделевская сегрегация отдельных элементов паттерна. Однако во многих случаях для выполнения анализа доступны лишь чрезвычайно малые количества ДНК, и чувствительности стандартных методов недостаточно для тестирования. Низкая чувствительность связана, с одной стороны, с низким содержанием индивидуальных фрагментов в пробе ДНК, используемой для анализа, а с другой — с нестабильностью дуплексов, образуемых олигонуклеотидами с комплементарными им последовательностями ДНК. Можно надеяться, что повышение стабильности дуплексов приведет к увеличению чувствительности анализа. Действительно, Хохейтель и др. [2] показали, что введение 5-метилдезоксицитидинов (m^5C) в олигонуклеотидную пробу, приводящее к повышению стабильности образуемых ею дуплексов, улучшает ее гибридационные свойства.

Другим типом модификации, как правило, повышающим стабильность дуплексов (см. анализ этой проблемы и обзор литературы [3]), является замена дезоксиаденозина на 2-аминодезоксиаденозин (n^2A) в составе олигонуклеотидов. Ранее мы продемонстрировали [4, 5], что использование олигонуклеотидов, содержащих две такие модификации, в качестве праймеров при секвенировании повышает эффективность анализа и позволяет использовать в составе комбинированных праймеров при систематическом шаговом секвенировании по методу [6] пентануклеотиды вместо гексануклеотидов.



Авторадиограммы агарозных гелей после разделения *Bsp*RI-гидролизатов ДНК восьми неродственных индивидуумов и гибридизации с 32 P-меченными дезоксирибонуклеотидами (САС)₅ (а) и (m^5 C- n^2 A- m^5 C)₅ (б). В дорожках 1 — положения молекулярных маркеров — фрагментов ДНК фага λ' , полученных после расщепления эндонуклеазой *Hind*III; цифры слева — длина маркерных фрагментов в парах оснований. Дорожки 2—9 — опытные образцы ДНК

В данной работе мы показываем, что использование олигонуклеотидов, содержащих эти два типа модифицированных звеньев, резко повышает чувствительность гибридизационного анализа в геномной дактилоскопии. С этой целью мы сравнили гибридизацию восьми образцов ДНК, полученных от неродственных индивидуумов, с пентадекануклеотидом (САС)₅ и его модифицированным аналогом (m^5 C- n^2 A- m^5 C). Выбранный олигонуклеотид идентифицирует широко распространенную микросателлитную последовательность и рассматривается как одна из наиболее информативных проб в геномной дактилоскопии [7, 8].

Результаты представлены на рисунке, из которого следует, что модифицированные олигонуклеотиды дают то же распределение полос на авторадиограмме, что и немодифицированные, но интенсивность полос в случае модифицированной пробы существенно выше. Это позволяет надеяться, что такого рода пробы могут повысить чувствительность и сократить время анализа.

Экспериментальная часть

Гибридизационные пробы и ДНК. Модифицированный олигонуклеотид (m^5 C- n^2 A- m^5 C)₅ и его немодифицированный аналог были синтезированы как описано ранее [4, 5] и мечены 32 P по 5'-концу с помощью полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]ATP.

Образцы ДНК человека выделены из крови восьми неродственных индивидуумов и расщеплены эндонуклеазой *Bsp*RI согласно стандартным методам.

Электрофорез фрагментов ДНК осуществляли в 0,8% агарозном геле, используя 10 мкг ДНК на дорожку. В качестве маркеров молекулярного веса использовали фрагменты, получаемые при расщеплении ДНК фага λ эндонуклеазой *Hind*III. После разделения фрагменты были перенесены на нитроцеллюлозный фильтр Hybond-C extra (0,45 мкм, Amersham).

Условия гибридизации. После прегибридизации при 47° С в течение 4 ч в буфере, содержащем 5×SSC, 5× смесь Денхарда, 1% SDS и 5 мМ EDTA, фильтры инкубировали 16 ч в 10 мл этого же буфера с 10^6 имп/(мин·мл) меченых [32 P] олигонуклеотидов.

После гибридизации фильтры дважды отмывали в буфере 2×SSC с 0,2% SDS в течение 5 мин при 47° С и радиоавтографировали 16 ч при —70° С с интенсифицирующим экраном.

Работа была частично финансирована Советом по геному человека в рамках ГНТП «Геном человека».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рыков А. П., Гордон И. О. // Биотехнология. 1992. Т. 3. С. 3—12.
2. Hoheisel J. D., Craig A. G., Lehrach H. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 16653—16660.
3. Cheong C., Tinoco I., Chollet Jr. and A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 5115—5122.
4. Ажикина Т. Л., Шевченко Ю. О., Лебедев Ю. Б., Веселовская С. В., Потапов В. К., Свердлов Е. Д. // Докл. РАН. 1993. Т. 330. № 5. С. 624—627.
5. Ажикина Т. Л., Потапов В. К., Веселовская С. В., Мясников В. А., Свердлов Е. Д. // Докл. РАН. 1993 (в печати).
6. Kieleczawa J., Dunn J., Studier F. W. // Science. 1992. V. 258. P. 1787—1791.
7. Ali S., Muller C. R., Epplen J. T. // Hum. Genet. 1987. V. 74. P. 239—243.
8. Рыков А. П., Куприянова Н. С., Капанадзе Б. И., Печволов К. К., Позмогова Г. Е., Просняк М. И., Янковский Н. К. // Генетика. 1993 (в печати).

Поступило в редакцию
18.VI.1993

M. I. Prosnyak, S. I. Veselovskaya, V. A. Myasnikov*,
E. Yu. Efremova*, V. K. Potapov*, S. A. Limborskaya,
E. D. Sverdlov*

ADVANCEMENT OF THE DNA FINGERPRINTING BY MEANS OF MOLECULAR HYBRIDIZATION WITH MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES, FORMING THE DUPLEXES WITH INCREASED STABILITY

*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of Russia, Moscow;
* M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of Russia, Moscow*

The modified oligodeoxyribonucleotide ($m^5C-n^2A-m^5C$), containing 5-methylcytosine and 2-aminoadenine instead of cytosine and adenine residues, respectively has been used as a hybridisation probe in DNA fingerprinting. The oligonucleotide, due to the substitutions forms more stable duplexes with complementary sequence in DNA than the corresponding nonmodified pentadecanucleotide. The comparison with its natural counterpart displays considerably increased intensity of bands in patterns obtained with modified analog. The use of such analogues can increase sensitivity and shorten time of DNA fingerprinting.