



УДК 582.282'11:577.213.32:577.152.361

ГОРЯЧИЙ СТАРТ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
ПРИ ПОМОЩИ ДНК-ГЕЛИКАЗ© 1999 г. О. К. Кабоев[#], И. В. Шевелев, Л. А. Лучкина, А. Н. Третьяков, О. Г. Щербакова

Петербургский институт ядерной физики РАН, 188350, Гатчина

Поступило в редакцию 15.10.98 г. Принято к печати 10.01.99 г.

Разработан новый метод горячего старта ПЦР, использующий ДНК-геликазы. Добавление ДНК-геликазы предотвращает случайный отжиг праймеров и синтез неспецифических продуктов во время приготовления реакционной смеси и начального прогрева. Горячий старт ПЦР происходит автоматически после инактивации ДНК-геликазы при прогреве реакционной смеси.

Ключевые слова: ПЦР, горячий старт; ДНК-геликаза.

Техника горячего старта для амплификации ДНК с помощью ПЦР разработана для увеличения специфичности реакции и выхода продуктов [1]. Все существующие способы реализации горячего старта ПЦР направлены на то, чтобы исключить или существенно уменьшить неспецифичный отжиг праймеров, происходящий во время приготовления реакционной смеси и начального прогрева. Для этой цели реакцию начинают либо добавлением критических компонентов смеси (праймеров, ионов магния, ДНК-полимеразы) после достижения заданной температуры отжига [1], либо заранее разделяют компоненты смеси при помощи тугоплавких веществ (например, парафина) [2, 3]. В случае добавления к ДНК-полимеразе антител, которые не позволяют ей проводить синтез ДНК, горячий старт ПЦР достигается при инактивации антител нагреванием [4]. Поскольку для ПЦР в данное время применяется около десятка различных термостабильных ДНК-полимераз, то для каждой из них необходимы свои антитела. Предлагаемый нами метод горячего старта ПЦР основан на использовании термолabile ДНК-геликаз, которые расплавляют дуплексы праймер-праймер, праймер-матрица при комнатной температуре в момент приготовления реакционной смеси. Горячий старт происходит при прогреве реакционной смеси, вызывающем инактивацию ДНК-геликаз.

ДНК-геликазы (КФ 3.6.1.-) были выделены из *Thermus thermophilus*, тимуса теленка и *Escherichia coli* (клонированный нами продукт гена *dnaB*) и хроматографически очищены. Активность геликаз определяли по их способности расплести дуплекс однострессовой ДНК бактериофагов фХ174 или М13 с комплементарными мечеными олиго-

нуклеотидами согласно ранее опубликованным методам [5, 6]. Были выбраны препараты, удовлетворяющие следующим требованиям: отсутствие нуклеазных активностей, расплетающая активность при температурах 20–50°C и инактивация после прогрева при 95°C в течение 2 мин.

ПЦР проводили в термоциклере ТЦ-1000-1 (ИРЛЕН, С.-Петербург) (93°C – 10 с, 56°C – 20 с, 69°C – 40 с, указаны температура и время в реакционной смеси) при скорости нагрева и охлаждения около 2°C/с и в высокоскоростном термоциклере в тонкостенных микроплатах (94°C – 1 с, 52°C – 2 с, 70°C – 4 с) при скорости нагрева и охлаждения около 7°C/с [7]. Состав реакционной смеси (30 мкл для обычного либо 4 мкл для высокоскоростного термоциклера): 20 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2–7 мМ MgCl₂, 0.1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.01 % Тритон X-100, 0.4 мМ dNTP, 0.5 мМ АТР, 0.3 мкМ праймеры. В смесь добавляли 1 ед. акт. ДНК-полимеразы *Thermus sp.* (выделена в ОМРБ ПИЯФ РАН) либо 2.5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) и около 10–1000 копий геномной ДНК. Праймеры были синтезированы фосфорамидитным методом. Ручной горячий старт осуществляли добавлением праймеров или ДНК-полимеразы в пробирки с реакционной смесью, установленные в термоциклере и прогретые до заданной температуры отжига. Горячий старт при помощи антител к *Taq*-ДНК-полимеразе проводили согласно инструкции производителя (*TaqStart Antibody*, Clontech). Для осуществления описываемой модификации горячего старта ПЦР ДНК-геликазный препарат добавляли в реакционную смесь до внесения ДНК-полимеразы, праймеров и матрицы. После 30–35 циклов продукты амплификации (4 мкл) разделяли гель-электрофорезом в 1.7% агарозе в 0.1 М Трис-боратном буфере, рН 8.3, содержащем 20 мМ EDTA и 0.5 мкг/мл бромистого этидиума.

[#] Автор для переписки (тел.: (812-71) 4-60-56; факс: (812-71) 3-23-03; e-mail: kaboev@omrb.pnpi.spb.ru).

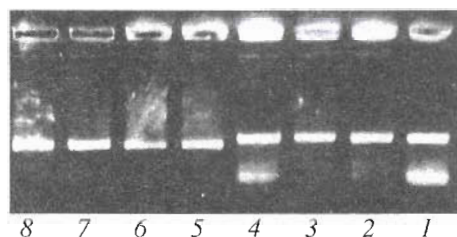


Рис. 1. Влияние *dnaB*-геликазы на специфичность ПЦР. Гель-электрофорез в 1.7% агарозе продуктов амплификации фрагментов последовательности IS6110 ДНК *M. tuberculosis*. ПЦР проводили в скоростном термоциклере. В качестве матрицы использовали щелочной лизат (0.2 М NaOH, 15 мин при 94°C с последующей нейтрализацией до pH 8–9) осадка мокроты больного туберкулезом. Праймеры ограничивали фрагменты 901–1160 п. о. (дорожки 1–4) и 927–1117 п. о. (дорожки 5–8). Инкубационная смесь содержала алиquotы четырех последовательных фракций препарата *dnaB*-геликазы, полученных при его гель-фильтрации на сефакриле S-200 (дорожки 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7, 4 и 8 соответственно). Дорожки 3 и 7 соответствуют фракции с максимальной концентрацией белка (около 0.5 мкг/мкл).

На рис. 1 показан результат амплификации фрагментов ДНК *Mycobacteria tuberculosis*, выделенной из мокроты больного туберкулезом. Использовали две пары праймеров, которые ограничивают участки 901–1160 п. о. и 927–1117 п. о. в последовательности IS6110 [8]. В реакционную смесь добавляли алиquotы фракций *dnaB*-геликазы, полученные в результате гель-фильтрации уже очищенного, практически гомогенного пре-

парата на сефакриле S-200. Специфичность амплификации участка 901–1160 п. о. была максимальной, когда добавляли алиquotу из фракций, соответствующих пику белка. Добавление этих же фракций ДНК-геликазы практически не влияло на выход и специфичность продукта амплификации другого фрагмента IS6110 (927–1117 п. о.), праймеры к которому при данных условиях неспецифично не отжигались.

При сравнении разработанного нами метода горячего старта ПЦР с другими его аналогами (рис. 2а и б) оказалось, что применение ДНК-геликазы, так же как и применение антител к ДНК-полимеразе, увеличивает выход и специфичность продукта ПЦР. ДНК-геликазы из других источников также обладают способностью имитировать горячий старт ПЦР (результаты не приведены). Но в случае с *dnaB*-геликазой, выделенной и очищенной из бактериального продуцента (выход ДНК-геликазы после индукции клеток 30–50% от суммарного белка в грубом экстракте), мы можем считать, что именно этот фермент реализует горячий старт ПЦР, а не его возможные примеси.

Таким образом, показана принципиальная возможность применения ДНК-геликаз для увеличения специфичности и выхода продуктов ПЦР. Преимущества данного подхода в том, что нет необходимости добавлять компоненты смеси вручную (как и для антител к ДНК-полимеразе), и в универсальности, так как мишенью обратимой инактивации служит процесс праймирования, а не конкретная ДНК-полимераза.

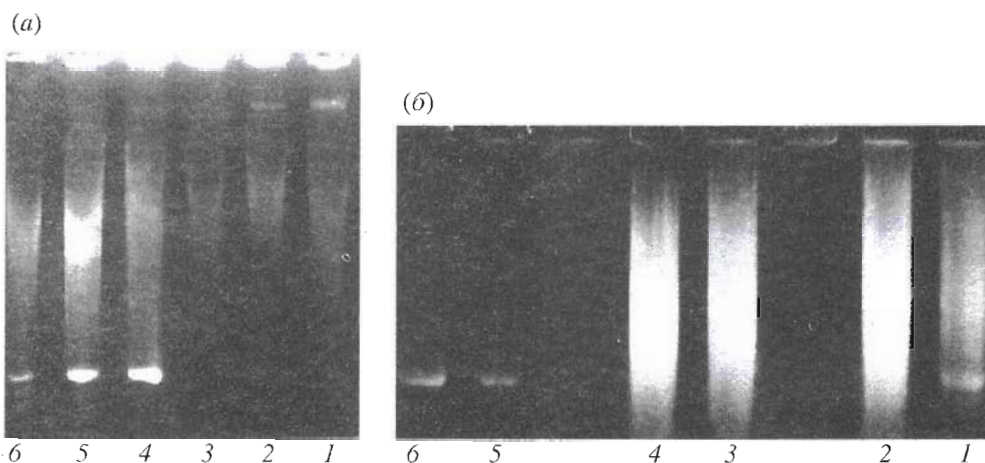


Рис. 2. Гель-электрофорез в 1.7% агарозе продуктов амплификации последовательности IS6110 ДНК *M. tuberculosis* (фрагмент 901–1160 п. о.). ПЦР проводили в стандартном термоциклере. (а) Горячий старт ПЦР при помощи антител к Taq-ДНК-полимеразе. В качестве матрицы использовали 1000 (дорожки 1 и 4), 100 (дорожки 2 и 5) и 10 (дорожки 3 и 6) копий геномной ДНК *M. tuberculosis* в присутствии 1 мкг неспецифичной ДНК. Инкубационная смесь была собрана, как описано в инструкции для набора TaqStart Antibody, Clontech. Дорожки 1–3 – без добавления антител, дорожки 4–6 – с добавлением антител. (б) Горячий старт ПЦР при помощи ДНК-геликазы. В качестве матрицы использовали 100 (дорожки 1, 3 и 5) и 10 (дорожки 2, 4 и 6) копий геномной ДНК *M. tuberculosis* в присутствии 1 мкг неспецифичной ДНК. Дорожки 1 и 2 – ручной горячий старт, 3 и 4 – без горячего старта, 5 и 6 – горячий старт при помощи *dnaB*-геликазы.

Работа поддерживалась ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" 1996 г.

Авторы выражают благодарность проф. Л.А. Носкину за поддержку работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *D'Aquila R.T., Bechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorczyca P., Kaplan J.C.* // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 3749.
2. *Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Tronconi B.M.* // *Biotechniques.* 1994. V. 16. P. 42–43.
3. *Bassam B.J., Caetano-Anolles G.* // *Biotechniques.* 1993. V. 14. P. 30–34.
4. *Kellogg D.E., Rybalkin I., Chen S., Mukhamedova N., Vlasik T., Siebert P.D., Chenchik A.* // *Biotechniques.* 1994. V. 16. P. 1134–1137.
5. *Zhang S., Grosse F.* // *Chromosoma.* 1992. V. 102. P. 100–106.
6. *Shukla S.K., McCarthy D.* // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 1626–1631.
7. *Третьяков А.Н., Пантина Р.А., Кабоев О.К.* // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 526–528.
8. *Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H., Gicquel B., Guesdon J.L.* // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 188.

Hot Start of the Polymerase Chain Reaction Using DNA Helicases

O. K. Kaboev[#], I. V. Shevelev, L. A. Luchkina, A. N. Tret'yakov, and O. G. Shcherbakova

Petersburg Institute for Nuclear Physics, Russian Academy of Sciences, Gatchina, 188350 Russia

A novel method for the hot start of PCR using DNA helicases is developed. The addition of a DNA helicase prevents the random annealing of primers and synthesis of nonspecific products during the preparation of the reaction mixture and initial heating. The hot start of PCR occurs automatically after inactivation of the DNA helicase upon heating of the reaction mixture.

Key words: DNA helicase, hot start, PCR

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: kaboev@omrb.pnpi.spb.ru.

Сдано в набор 04.02.99 г.

Подписано к печати 06.04.99 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 10.0

Усл. кр.-отт. 2.8 тыс.

Уч.-изд. л. 10.7

Бум. л. 5.0

Тираж 265 экз.

Зак. 2526