



УДК 547.963.32.04 p/c +

ПРОСТОЙ СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ
3'-ПРОКСИМАЛЬНОЙ МЕТКИ В ДНК ДЛЯ ЕЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ
МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ

Гуревич А. И., Игوشин А. В.

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

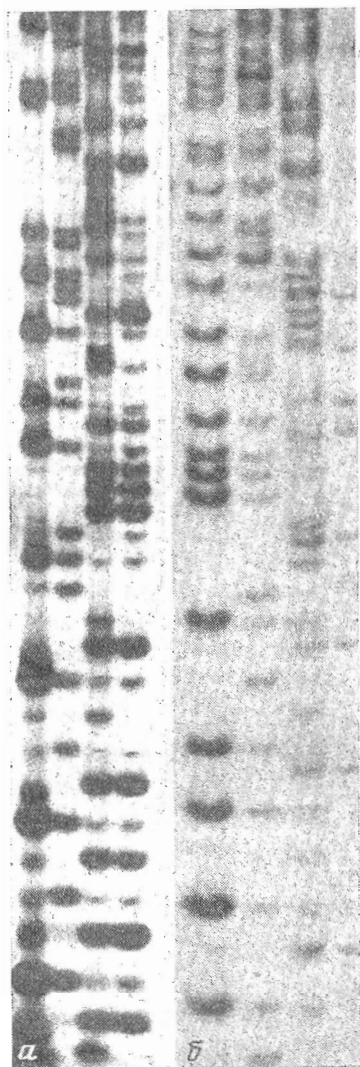
Предложен простой способ введения множественной 3'-проксимальной метки в ДНК с помощью Т4-ДНК-полимеразы, позволяющий получать фрагменты ДНК высокой степени радиоактивности, которые пригодны для секвенирования методом химических модификаций. Выбраны оптимальные условия для введения в 3'-концы фрагмента ДНК по 8–10 меченых остатков нуклеотидов.

Введение радиоактивной метки в 5'- или 3'-концы ДНК [1] или в расположенную вблизи 3'-конца фрагмента 3'-проксимальную область [2] является необходимой стадией при секвенировании ДНК методом химических модификаций. Для этой цели часто используют достройку 3'-концов в двунитчатых ДНК путем заполнения концевых однонитчатых участков с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ и ДНК-полимеразы I *E. coli* (КФ 2.7.7.7), ДНК-полимеразы фага Т4 (КФ 2.7.7.7) либо обратной транскриптазы (AMV). Два первых фермента использовались также для введения метки в тупые концы фрагментов ДНК путем обмена 3'-концевых нуклеотидов с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ [1, 3].

Существенное значение для получения четких радиоавтографов секвенционных гелей имеет высокий уровень радиоактивной метки в анализируемых фрагментах ДНК. Это становится особенно важным при анализе фрагментов большой длины. Удобным способом резкого увеличения удельной радиоактивности предназначенного для секвенирования фрагмента ДНК является введение с помощью ДНК-полимеразы не одного, а нескольких меченых остатков нуклеотидов в 3'-концевой участок, протяженность которого можно увеличить действием 3'-экзонуклеазы (например, экзонуклеазы III *E. coli* [4]). Мы использовали для этой цели ДНК-полимеразу фага Т4. Этот фермент обладает высокой 3'-экзонуклеазной активностью для однонитчатых ДНК, но в двунитчатых ДНК отщепляет 3'-концевые нуклеотиды с умеренной скоростью, так что реакцию гидролиза можно легко контролировать.

Варьируя соотношение Т4-полимеразы и двунитчатого фрагмента ДНК, продолжительность и температуру реакции, мы подобрали оптимальные условия, позволяющие вводить 8–10 меченых остатков нуклеотидов в каждый 3'-конец ДНК. Предлагаемый нами метод включает в себя стадию экзонуклеазного гидролиза в течение 5 мин при 37°С и примерно эквивалентном соотношении фермента и реагирующих концов ДНК, что соответствует 5–6 ед. акт. Т4-полимеразы на 1 пмоль фрагмента; количество фермента может быть уменьшено в 2–3 раза. Вторая стадия — достройка 3'-концов ДНК набором всех четырех меченых $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ — проводится при той же температуре и завершается за 2–3 мин. Наконец, чтобы исключить гетерогенность 3'-концевых участков меченых фрагментов, мы проводили заключительную стадию реакции с Т4-полимеразой в присутствии избытка немеченых dNTP.

В качестве примера использования предлагаемого метода мы повторно определили нуклеотидную последовательность фрагмента *EcoRI*-I, установленную нами ранее в результате секвенирования коротких субфрагментов [5]. Радиоактивная метка была введена в 3'-концевые участки фраг-



Радиоавтографы секвенционных гелей субфрагмента *Hind*III-290. Количество ДНК в каждой из колонок около 10 нг. *a* — опыт с множественной 3'-проксимальной меткой, экспозиция 8 ч без усиливающего экрана; *б* — опыт с 5'-терминальной меткой, экспозиция 7 сут с усиливающим экраном. ЭУ-ВЗ У4.2

мента, как описано выше, после чего фрагмент (общая длина около 1200 п.о.) действием рестриктазы *Hind*III был расщеплен на 2 субфрагмента (290 и 909 п.о.), нуклеотидную последовательность которых определяли методом частичной химической модификации. На рисунке приведен радиоавтограф одного из секвенционных гелей. Для сравнения приведен радиоавтограф аналогичного геля, полученного при анализе того же фрагмента ДНК, меченного по 5'-концу и, следовательно, в 8–10 раз менее радиоактивного. При одинаковых количествах анализируемых фрагментов экспозиция в первом случае составила 8 ч (без усиливающего экрана), а во втором — 7 сут (с усиливающим экраном). Это наглядно демонстрирует преимущество множественной 3'-проксимальной метки.

При использовании предлагаемого способа введения метки на разделяющих гелях неоднозначно проявляются лишь самые большие продукты частичного расщепления, число которых равно числу меченых остатков нуклеотидов, введенных с помощью Т4-полимеразы. Это не является препятствием для секвенирования фрагментов ДНК, длина которых значительно превышает длину меченого концевой участка.

Экспериментальная часть

Реактивы: трис, акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Reanal, Венгрия), перед употреблением перекристаллизовывали; N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal, Венгрия); мочевины, ос.ч. («Союз-

реактив»); dNTP (Calbiochem, Швейцария); [α - 32 P]dNTP, 1500–2000 Ки/ммоль (Amersham, Англия).

T4-ДНК-полимераза выделена по методу [6]; рестрикционные эндонуклеазы *Hind*II и *Hpa*II выделены как описано в работе [7], эндонуклеаза *Bsp*RI (СКТВ БАВ, Главмикробиопром, Новосибирск).

Для введения множественной 3'-проксимальной метки раствор 1 пмоль фрагмента ДНК в 100 мкл буфера, содержащего 63 мМ трис-HCl, 6,3 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, pH 8,8, и 170 мкг/мл желатина обрабатывали T4-ДНК-полимеразой (2–5 ед. акт. фермента) в течение 5 мин при 37°С, затем прибавляли 10 мкл раствора, содержащего по 10 пмоль каждого из [α - 32 P]dNTP, и через 2 мин 10 мкл раствора, содержащего по 1 пмоль каждого из dNTP; реакционную смесь инкубировали еще 10 мин при 20°С, прибавляли 15 мкл 0,5 М EDTA, 15 мкл 3 М ацетата натрия, pH 5,5, и осаждали меченую ДНК 300 мкл спирта.

При подборе оптимальных условий введения множественной 3'-проксимальной метки использовали *Bsp*RI-фрагменты плазмиды pBR322 (сайт GG \dagger CC, фрагменты с тупыми концами), варьируя соотношение ДНК и T4-полимеразы (от 0,1 до 5 ед. акт. на 1 пмоль фрагмента), продолжительность и температуру (от 20 до 37°С) на стадии 3'-экзонуклеазного гидролиза; стадию достройки проводили, используя избыток dNTP (на 1 пмоль фрагмента по 100 пмоль каждого dNTP и по 0,2 пмоль [α - 32 P]dNTP). Для оценки длины достроенных концевых участков удельную радиоактивность меченых *Bsp*RI-фрагментов сравнивали с радиоактивностью меченых в тех же условиях (минуя стадию 3'-экзонуклеазного гидролиза) *Hpa*II-фрагментов плазмиды pBR322 (сайт C \dagger CGG, достраивается по 2 пуклеотида с каждого конца фрагмента).

Частичную химическую деградацию исследуемых фрагментов ДНК проводили по методу Максама — Гилберта [1] с модификациями, разработанными Коробко и др. [8, 9], а также Смитом и Калво [4]. Электрофорез проводили в пластинах полиакриламидного геля толщиной 0,4 мм, используя для разделения фрагментов 5% гель, не содержащий мочевины, а для анализа нуклеотидной последовательности — денатурирующие гели концентрации 15% (для последовательностей 3–50), 6% (последовательности 50–400) и 5% (последовательности 400–900) [4]. Для получения радиоавтографов использовали рентгеновскую пленку РМ-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. In: Methods in Enzymology. Vol. 65. Nucleic Acids. Part I/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 499–560.
2. Гуревич А. И., Аваков А. Э. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 301–304.
3. Challberg M. D., Englund P. T. In: Methods in Enzymology. Vol. 65. Nucleic Acids. Part I/Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 39–42.
4. Smith D. R., Calvo J. M. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2255–2274.
5. Гуревич А. И., Игошин А. В., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1580–1584.
6. Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Paas A. J., Lillehaug J. R., Kleppe K. Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045–5050.
7. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Данилевская О. П., Ковалев Ю. Н. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1196–1204.
8. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420–1422.
9. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1281–1283.

Поступила в редакцию
2.XI.1981

A FACILE PROCEDURE FOR MULTIPLE 3'-PROXIMAL LABELING OF DNA FOR SEQUENCING BY CHEMICAL MODIFICATION METHOD

ГУРЕВИЧ А. И., ИГОШИН А. В.

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

A simple procedure is developed for multiple 3'-proximal labeling of DNA by means of T4 polymerase. This leads to highly radioactive DNA fragments suitable for sequencing by the chemical modification method. The optimal conditions were found for introducing from 8 to 10 labeled nucleotide residues into the DNA 3' ends.