

Модифицированный способ определения места расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции

Г. Г. Приходько, Н. А. Петров, В. Е. Чижиков, С. Х. Дегтярев*

* - автор для переписки

Успехи молекулярной биологии и генетической инженерии во многом определяются наличием широкого ассортимента эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз), список которых ежегодно пополняется новыми наименованиями [1]. Обнаруживаемые ферменты необходимо охарактеризовать как по узнаваемой ими последовательности, так и по месту расщепления цепи ДНК. Идентификация сайта узнавания в настоящее время не представляет проблемы. С этой целью обычно используют совместный гидролиз ДНК изучаемыми ферментами и ферментами известной специфичности [2—4] либо сравнивают экспериментальные данные с предполагаемыми картинами расщепления маркерной ДНК по сайтам узнавания [5—8].

Браун и Смит разработали общий метод для установления места расщепления ДНК [9]. Однако ввиду его громоздкости он не нашел широкого применения. Более часто применяют следующие два подхода. Согласно первому радиоактивную метку вводят в концы фрагментов, образующихся при гидролизе исследуемой рестриктазой, с целью установления последовательности оснований вблизи места разрыва (2, 3, 6, 7). Но при этом возникают трудности с изучением выступающих 3'-концов, а также при определении точек разрыва для эндонуклеаз рестрикции II-S-типа. Этих недостатков лишен метод прямого определения места гидролиза ДНК, в котором метку вводят в 5'-конец фрагмента ДНК, содержащего сайт узнавания искомой рестриктазы. Установление последовательности нуклеотидов такого фрагмента по методу Максама-Гилберта с параллельным ферментативным гидролизом меченого фрагмента позволяет определить место расщепления ДНК [4, 10-13]. Известно, однако, что модификация оснований по методу Максама-Гилберта приводит к появлению дополнительного по сравнению с продуктами ферментативного гидролиза фосфата на 3'-конце [14]. Это приводит к заметной разнице в подвижности фрагментов ДНК при электрофорезе, что затрудняет интерпретацию полученных результатов.

В данной работе предложен простой способ определения точек расщепления ДНК различными рестриктазами. Он основан на химической и ферментативной обработке меченых по 3'-концу фрагментов ДНК. При этом продукты расщепления будут иметь одинаковое строение, а, следовательно, и подвижность при электрофорезе.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использованы α -³²P-dATP, ферменты HindIII, EcoRI и MspI производства НПО "Фермент", г. Вильнюс; ферменты ClaI, FokI и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* - НПО "Вектор", г. Новосибирск.

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, введение 3'-концевой радиоактивной метки, очистку фрагментов ДНК, секвенирование и электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в основном, как описано в работах [14, 15]. Для работы использовали 0.1-0.5 пмоль 3'-меченого

фрагмента ДНК. Аликвоту, составляющую около 5% от этого количества, гидролизировали препаратом исследуемого фермента в соответствующих условиях в течение 10-30 мин. Реакцию останавливали добавлением формамида до 80% и тепловой денатурацией в течение 2 мин на кипящей бане с последующим быстрым охлаждением во льду. Для электрофореза использовали 1/40 часть полученной смеси.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При последовательной обработке ДНК гидразином и пиперидином, приводящей к расщеплению по пиримидиновым звеньям 3'-меченого фрагмента ДНК, изображенного на рис. 1, образуется 4 радиоактивных продукта.

Гидролиз этого же фрагмента ДНК рестриктазой Cla I даст только один меченый фрагмент, полностью совпадающий со вторым по величине продуктом химического расщепления. Таким образом, 3'-меченый фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания исследуемой рестриктазы, необходимо секвенировать по методу Максама- Гилберта [14], а небольшую аликвоту его гидролизовать изучаемым ферментом. Совместный электрофорез (на параллельных дорожках) в денатурирующем геле продуктов химического расщепления по четырем основаниям и ферментативного гидролиза позволит одновременно расшифровать первичную структуру участка ДНК и точное место разрыва цепи эндонуклеазой.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Продукты ферментативного и химического (гидразин + пиперидин) гидролиза 3'-меченого фрагмента ДНК. Звездочкой отмечен радиоактивный фосфат, стрелкой - место расщепления рестриктазой, подчеркнут сайт узнавания

В качестве примера мы приводим результаты определения сайтов расщепления эндонуклеаз рестрикции HindIII, FokI и ClaI. Как известно, плаزمида pBR322 содержит вблизи сайта узнавания рестриктазы EcoRI также сайты рестриктаз ClaI, HindIII и FokI [15]. После расщепления плазмидной ДНК рестриктазами EcoRI и MspI в EcoRI-концы продуктов гидролиза была селективно введена метка с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и α -³²P-dATP. Меченый по одному 3'-концу фрагмент EcoRI-MspI размером 162 п.н., содержащий сайты рестрикции для упомянутых трех ферментов, был выделен с помощью гель-электрофореза и секвенирован по методу [14]. Параллельно его аликвоты были гидролизованы препаратами HindIII, ClaI и FokI. Радиоавтографы совместного электрофореза продуктов приведены на рис. 2, а расшифровка результатов на рис. 3.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Радиоавтографы гелей после электрофореза продуктов химического и ферментативного расщепления EcoRI-MspI-фрагмента ДНК плазмиды pBR322 (162 п. н.), меченого по 3'-EcoRI-концу

а - 12%-ный ПААГ: 1 - продукты гидролиза рестриктазой HindIII; 6 - ClaI; 6-4%-ный ПААГ: 1,6 - продукты гидролиза эндонуклеазой рестрикции FokI; 2-5 - в обоих случаях продукты химического расщепления фрагмента ДНК по методу Максама-Гилберта (2 - G, 3 - A+G, 4 - T+C, 5- C)

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 3. Результаты определения мест расщепления цепи ДНК рестриктазами HindIII, ClaI (а) и FokI (б). Стрелками отмечены места расщепления, подчеркнуты сайты узнавания. Нумерация нуклеотидных остатков в последовательности рBR322 дана от сайта узнавания EcoRI. Звездочками отмечены концевые радиоактивные нуклеотиды

Из полученных данных следует, что разрыв HindIII приходится, как и следовало ожидать, между основаниями А в последовательности AAGCTT, разрыв ClaI - между основаниями Т и С в последовательности ATCGAT, а FokI - на расстоянии 9 нуклеотидных остатков от сайта узнавания GGATG (в данном случае между основаниями С и G в последовательности AGCGCA). При этом необходимо помнить, что любая полоса на радиоавтографе продуктов химического расщепления соответствует олигонуклеотидному фрагменту, остающемуся после удаления указанного основания из цепи и ее разрыва (см. рис. 1). Тем самым, совпадение полос в химическом и ферментативном гидролизатах говорит о том, что расщепление цепи ферментом происходит между данным основанием и нижеследующим. Определение точки разрыва в комплементарной цепи при действии этих рестриктаз можно провести, пометив тот же фрагмент с противоположного MspI-конца и повторив процедуру. Преимущество предлагаемого способа состоит как в наглядности результата, так и в том, что полнота гидролиза фрагмента не существенна. Для определения места расщепления достаточно следовой активности фермента. Единственным условием является отсутствие значительных примесей экзонуклеаз в исследуемом препарате, которые могут количественно отщепить метку с 3'-конца тест-фрагмента. Предлагаемый метод был использован нами при установлении места расщепления ДНК рестриктазами VspI [16] и VneI [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kessler C., Neumaier T. C., Wolf W.-Gene, 1985, v. 33, N 1, p. 1-102.
2. Bitinaite J. S., Klimasauskas S. /., Butkis V. V. et al.- FEBS Lett., 1985, v. 182, N 2, p. 509-513.
3. Khosaka T., Kiwaki M.- Gene, 1984, v. 31, N 1-3, p. 251-255.
4. Grosskopf R., Wolf W., Kessler C.- Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, N 5, p. 1517-1528.
5. Barker D., Hoff M., Oliphant A. et al. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, N 14, p. 5567-5581.
6. Sasaki I., Yamada Y.- Agric. Biol. Chem., 1984, v. 48, N 12, p. 3027-3034.
7. Qiang B.-O., Schildkrauf /.- Nucl. Acids Res., 1986, v. 14, N 5, p. 1991-1999.
8. Whitehead Ph., Brown N.-J. Gen. Microb., 1985, v. 131, N 4, p. 951-958.
9. Brown N., Smith M.- Methods in Enzymology, 1980, v. 65, p. 391-404.
10. Bolton B., Neseh G., Comer M. et al.- FEBS Lett., 1985, v. 182, N 1; p. 130-134.
11. Brown N., Smith M.-FEBS Lett., 1976, v. 65, N 3, p. 284-287.
12. Klined D., Humayun Z., Jeffrey A. et al.-Proc. Natl. Acad. Sci. US, 1976, v. 73, N 2, p. 293-297.
13. Tapper D. P., Clayton D. A.- Nucl. Acids Res., 1981, v., 9, N 24, p. 6787-6794.
14. Maxam A. M., Gilbert W. O.- Proc. Natl. Acad. Sci. US, 1977, v. 74, N 2, p. 560-564.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.- В кн.: Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.- М.: Мир, 1984.
16. Дегтярев С. Х., Репин В. Е., Речкунова Н. И. и др.-Биоорган, химия, 1987, т. 13, № 3, с. 420-421.
17. Дегтярев С. Х., Речкунова Н. И., Нетесова Н. А. и др.- Биоорган, химия, 1987, т. 13, № 3, с. 422-423.

