

Определение чистоты препаратов эндонуклеаз рестрикции

С. Х. Дегтярев*, Н. И. Речкунова

* - автор для переписки

В начале 70-х годов были открыты первые эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), а сегодня уже налажен выпуск широкого ассортимента этих ферментов для использования в генно-инженерных работах. Одной из важнейших характеристик производимых препаратов ферментов является их чистота от примесных активностей, в частности от примесей нуклеаз и фосфатаз.

Для их определения предложено несколько методов [1], позволяющих порознь тестировать как те, так и другие примеси. Более общим методом является тест рестрикция - сшивка - рестрикция, который в основном и используется при проверке качества ферментов [1, 2]. Фермент считается свободным от примесей, если после обработки смеси его рестриктов ДНК-лигазой происходит достаточно полная сшивка фрагментов с исчезновением канонической картины рестрикции, которая полностью восстанавливается после обработки сшитых фрагментов тестируемой рестриктазой.

При всей наглядности этого теста он обладает рядом недостатков. Во-первых, по своей сути он является косвенным и требует наличия ДНК-лигазы очень высокого качества. Во-вторых, он не универсален и для ряда рестриктаз неприменим, что связано, по-видимому, с особенностями реакции лигирования [1, 2]; при этом трудно предсказать, в каких точно случаях он не будет работать. И, наконец, в-третьих, он не является количественным.

На наш взгляд, этих трудностей можно избежать, если использовать тест, основанный на несложных модельных субстратах. Анализ примесных активностей можно проводить, используя 5'-[³²P]-меченный олигонуклеотид, что позволит одновременно тестировать и экзонуклеазную и фосфатазную активность. При этом фосфатазная активность будет проявляться в снижении удельной радиоактивности субстрата при выдерживании с препаратом фермента, а экзонуклеазная - в проявлении набора более коротких фрагментов, что можно тестировать с помощью электрофореза.

В данной работе сделана попытка использовать такой тест для определения чистоты препаратов рестриктаз.

Опыт выделения рестриктаз и изучения свойств полученных препаратов показывает, что одна из наиболее часто встречаемых примесей - это экзонуклеазная активность типа экзоIII. При ее тестировании необходимо использовать олигонуклеотид в виде дуплекса, не содержащего 3'-выступающего конца. Ясно также, что для целей данной работы длина олигонуклеотида не должна быть больше 30-40 п.о., чтобы при непродолжительном электрофорезе можно было бы разделить все получаемые фрагменты ДНК. В то же время, так как ферменты плохо взаимодействуют с олигонуклеотидами малой длины, размеры последних не должны быть меньше 10-15 п.о. Что касается состава олигонуклеотида, то он, видимо, может быть достаточно произвольным, однако использование гомополимеров, на наш взгляд, нежелательно как из-за искажения конформации ДНК, так и из-за неоднозначности залипания цепей ДНК с образованием множества субстратов.

В настоящем исследовании мы использовали олигонуклеотид состава 5'-

CAGTTTAGGATCCATTTAC-3' с соответствующей полной комплементарной цепью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали ДНК фага λ , ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазу рестрикции MvaI (НПО "Фермент"), а также RsaI, NcoI, VspI, Kzo9I, Bsu15I, FokI (НПО "Вектор"). Синтетический двадцатичленный олигонуклеотидный дуплекс любезно предоставлен Ю. А. Горбуновым (ВНИИ МБ). 5'-[^{32}P]-меченный олигонуклеотид получали, используя γ -[^{32}P]-АТФ и полинуклеотидкиназу [3], и выделяли, как описано [4]. Инкубацию ферментов с меченым олигонуклеотидным дуплексом проводили при 37°C в течение 1 ч в 50 мкл смеси следующего состава: 10 мМ трис-HCl, pH 7.5; 6 мМ MgCl_2 ; 6 мМ β -меркаптоэтанол; 40 мМ NaCl; 1 мМ дуплекс и 5-10 ед. фермента (в случае Kzo9I - 0.5 ед.). После инкубации в пробы добавляли по 5 мкл раствора бромфенолового синего в формамиде, далее пробы анализировали электрофорезом в 20% ПААГ с 7 М мочевиной (30-40 В/см, длина пробега маркера 25-30 см) с последующей радиоавтографией.

Гидролиз ДНК фага λ эндонуклеазами рестрикции проводили в 60 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl; pH 7.5; 6 мМ MgCl_2 ; 6 мМ β -меркаптоэтанол; 40 мМ NaCl; 3 мкг ДНК фага λ и 3-5 ед. фермента при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали, прогревая пробы при 65°C в течение 10 мин. После охлаждения из смеси отбирали аликвоту 40 мкл; добавляли АТФ до концентрации 5×10^{-4} М и 1-2 ед. ДНК-лигазы фага T4. Реакцию проводили при 5°C в течение 16 ч, затем пробы прогревали и проводили повторный гидролиз той же рестриктазой в половине объема аликвоты. Пробы на электрофорез наносили в последовательности рестрикция - сшивка - повторная рестрикция. Сканирование радиоавтографов проводили на приборе Ultrosan XL (LKB, Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные радиоавтографии гелей при тестировании препаратов ферментов и полупродуктов по предлагаемому методу.

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 1. Радиоавтограф геля после электрофореза 5'- ^{32}P -меченного олигонуклеотида, инкубируемого с различными препаратами ферментов.

а - дорожки: 1 - полупродукт RsaI, 2 - полупродукт VspI, 3 - препарат MvaI, 4 - полупродукт NcoI, 5 - контроль; б - дорожки: 1 - препарат FokI, 2 - препарат Bsu15I, 3 - препарат RsaI, 4 - препарат NcoI, 5 - препарат VspI, 6 - препарат Kzo9I, 7 - контроль; в - дорожки: 1 - препарат SfaNI, 2 - препарат фосфатазы, 3 - контроль.

Из рис. 1а видно, что полупродукты RsaI (дорожка 7), VspI (дорожка 2), NcoI (дорожка 4) содержат экзонуклеазные примеси, тогда как у препарата фермента MvaI (дорожка 8) таких примесей нет и при его инкубации с меченой ДНК не наблюдается уменьшения метки в исходном олигонуклеотиде по сравнению с контролем (дорожка 5).

На рис. 1б приведена радиоавтография геля при тестировании по предлагаемому методу образцов препаратов рестриктаз FokI, Bsu15I, RsaI, NcoI, VspI, Kzo9I (дорожки, соответственно 1-6), производимых в НПО "Вектор".

Из рисунка видно, что очищенные препараты ферментов не оказывают какого-либо эффекта на меченый олигонуклеотид по сравнению с контролем (дорожка 7), за исключением Kzo9I, сайт

узнавания которого (GATC) находится внутри последовательности данного олигонуклеотида и поэтому происходит его частичное расщепление.

На рис. 1в показано влияние добавления фосфатазы (дорожка 2) по сравнению с контролем (дорожка 3) или препаратом рестриктазы (дорожка 1). На дорожке 2 наблюдается уменьшение количества метки в исходном олигонуклеотиде по сравнению с контролем.

Таким образом, предлагаемый метод позволяет проводить анализ чистоты полученных препаратов ферментов. Причем, как видно из рис. 1 а и б, это тестирование можно проводить количественно. Для этого достаточно просканировать радиоавтограф и потом оценить процент сохранения метки в исходном олигонуклеотиде (или, при наличии сайта узнавания, в сумме исходной ДНК и полученных рестриктов) по сравнению с контролем.

Ниже даны результаты сканирования радиоавтографов, приведенных на рис. 1а и 1в. Полученные количественные характеристики препаратов ферментов не зависят от вида примесей и могут являться объективным критерием чистоты фермента.

Ферментный препарат	% сохранения метки в исходном олигонуклеотиде
Полупродукт RsaI	37.5
Полупродукт VspI	36.7
Полупродукт NcoI	23.5
Препарат SfaNI	97
Присутствие фосфатазы	32.1

Для ряда препаратов и полупродуктов ферментов проводили также анализ чистоты с помощью стандартного теста рестрикция-сшивка-рестрикция.

На рис. 2а и б приведены фотографии гелей после анализа этим методом препарата RsaI и RsaI-полупродукта соответственно, а также результаты тестирования ферментов MvaI (рис. 2, в), NcoI (рис. 2, г) и полупродукта NcoI (рис. 2, д).

Изображение отсутствует в архиве Wayback Machine.

Рис. 2. Тестирование чистоты препаратов рестриктаз по методу рестрикция-лигирование-рестрикция. в - RsaI; б - полупродукт RsaI; в - MvaI; г - полупродукт NcoI; д - NcoI; дорожки: 1 - рестрикция; 2 - лигирование; 3 - повторная рестрикция.

При сравнении данных на рис. 1 а и б и рис. 2 видно, что в тех случаях, когда есть нуклеазные примеси (полупродукты RsaI, NcoI), не наблюдается и сшивка рестриктов при стандартном методе анализа. В то же время препараты рестриктаз RsaI и NcoI, не содержащие примесей нуклеаз, дают практически полную сшивку.

Известно, что метод рестрикция-сшивка-рестрикция не всегда применим. Это связано с тем, что эффективность ДНК-лигазой сшивки зависит от структуры липких концов. В частности, не наблюдается сшивки рестриктов MvaI гидролизата (рис. 2, в), что соответствует описанию его свойств [2]. Следовательно, данным тестом оценить чистоту препарата MvaI невозможно, тогда как предлагаемый в данной работе метод позволяет это сделать, что говорит о более широком спектре его возможностей.

Использование дуплекса другой структуры или олигонуклеотида, содержащего 5'-выступающий конец, не сказывается существенным образом на степени гидролиза ДНК примесными

активностями.

Авторы выражают благодарность С. Н. Загребельному за помощь в работе и при подготовке рукописи, Ю. П. Зернову за полезные обсуждения, Ю. А. Горбунову за предоставление препарата олигонуклеотида и Ю. В. Федосову (ТИБОХ ДВНЦ) за предоставление препарата фосфатазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. New England Biolabs.- 1986/87.- Catalog. -
2. Ферменты для молекулярной биологии.-Вильнюс.- 1985.
3. Lillehang J., Kleppe R., Kleppe K. Phosphorilation of double stranded DNA by T4 polynucleotide kinase // Biochemistry.- 1976.- V. 15.
4. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1977.- V. 74.

pages : 1