



Структура и функция биополимеров

УДК 577.323.4

ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН НА ПРОФИЛИ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК

И. В. Разлуцкий, Л. С. Шляхтенко, Ю. Л. Любченко

Введение. Определение параметров плавления широко применяется для характеристики ДНК, а высокая чувствительность профиля плавления ДНК к нуклеотидной последовательности позволяет использовать этот метод для выявления в ДНК участков, структура которых отличается от остальной части ДНК, например АТ-богатых участков [1]. Однако этим возможности метода не исчерпываются. Согласно современным представлениям [2—5], плавление ДНК происходит путем кооперативного выплавления участков длиной в несколько сотен пар нуклеотидов. Изменение нуклеотидной последовательности в одном из таких участков может привести к изменению его температуры плавления, которое возможно регистрировать современными экспериментальными методами.

Плавление ДНК изучается с применением различных подходов. Чувствительность их настолько высока, что можно надеяться на обнаружение в ДНК даже одиночных нуклеотидных замен. Впервые такая чувствительность плавления была продемонстрирована в работах Лермана и др. [6, 7], и сделано это было с использованием нового и оригинального подхода — гель-электрофореза в градиенте концентрации денатурирующих агентов. Метод основан на обнаруженном в этой же лаборатории эффекте резкого торможения ДНК при электрофорезе в геле, причиной которого является образование в молекуле ДНК денатурированного участка [6—8]. Было показано, что таким способом удается регистрировать замены АТ на ГС (или наоборот) [6, 7]. Высокая чувствительность метода позволила обнаружить отличия в нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК из гепатома человека, приводящие к заболеванию β -талассемией [7]. Таким образом, очевидны возможности использования плавления ДНК для обнаружения в ней нуклеотидных замен. Однако в экспериментальном подходе Лермана имеется одно осложняющее обстоятельство: необходимо, чтобы замены находились в первом плавящемся участке. Поэтому естественным было бы использовать другие экспериментальные методы плавления ДНК, чувствительные к нуклеотидным заменам. Одна из наиболее хорошо разработанных методик основана на спектрофотометрии. В настоящее время чувствительность этого метода очень высока. На дифференциальной кривой плавление отдельных участков ДНК регистрируется в виде узких пиков ($0,5^\circ\text{C}$) [5—9]. Из теоретических расчетов следовало, что положение отдельных пиков очень чувствительно к изменениям в нуклеотидной последовательности [9]. Итак, для регистрации нуклеотидных замен с помощью спектрофотометрического метода имеются достаточно веские аргументы. Прямая проверка такой возможности метода и была целью настоящей работы.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* HB101, содержащие плазмиды TC-7, DT-19 и DT-25, были представлены нам С. В. Машко (ВНИИгенетика). ДНК выделяли щелочным методом [10], модифицированным для больших объемов, с последующей дополнительной очисткой плазмидной ДНК от хромосомной равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl с бромистым этидием. Затем экстракцией бутанолом и последующей хроматографией на колонке с сефакрилом S-300 получали препарат ДНК, свободный от примесей РНК и бромистого этидия, в буферном растворе $0.1 \times \text{SSC}$.

Полученные препараты плазмидных ДНК расщепляли рестриктазой *Pst*I на два фрагмента длиной 1150 и 2800 пар нуклеотидов (п.н.).

Во избежание образования в ДНК неспецифических однонитевых разрывов реакцию расщепления вели в течение минимального времени, необходимого для расщепления не менее 90 % всех кольцевых молекул, за ходом реак-

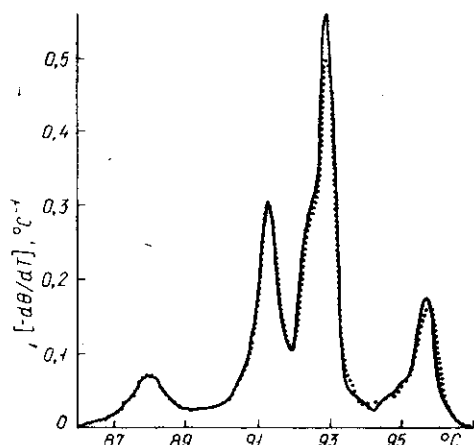


Рис. 1. Профили плавления короткого *Pst*I-фрагмента ДНК плазмиды TC-7 в растворе $1,6 \times \text{SSC}$. Пунктиром и сплошной линией показаны данные двух независимых экспериментов

Fig. 1. The melting profiles of the short *Pst*I-fragment of TC-7 DNA in $1,6 \times \text{SSC}$. Dotted and heavy lines are used for two independent experiments

ции следили с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле и по окончании реакции ДНК очищали от фермента обработкой фенолом.

Как и ранее (см. [11, 12]), для разделения фрагментов ДНК использовали изокинетическое центрифугирование. Фракционирование проводили в линейном (5—20 %-ном) градиенте концентрации сахарозы в бакет-роторе объемом 3×30 мл. Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге Ж-62 в течение 44 ч при 28000 об/мин и 4°C . Пробирки раскапывали с помощью перистальтического насоса, используя для регистрации микрохроматограф Милихром. Фракции, содержащие фрагменты ДНК, концентрировали этанолом и растворяли в буферном растворе $1,6 \times \text{SSC}$, после чего препарат ДНК пропускали через колонку с сефадексом Г-50, уравновешенную $1,6 \times \text{SSC}$. Чистоту полученных препаратов обязательно контролировали с помощью гель-электрофореза. Стандартный препарат содержал не более 5 % длинного фрагмента.

Плавление проводили в термостатированной ячейке собственной конструкции на двухлучевом спектрофотометре Кэри 219. Кривые регистрировали при 270 нм. Значения температуры и поглощения пробивали на перфоленту, которую затем вводили в калькулятор HP 9825A («Hewlett Packard», США). Профили плавления сглаживались сверткой с гауссовой функцией с дисперсией $0,04^\circ\text{C}$. Все экспериментальные кривые получались при скорости нагревания $0,05$ град/мин, которая поддерживалась постоянной с точностью 10 %. Тщательно контролировались также ионная сила раствора, условия хранения препарата ДНК и все этапы приготовления образца для плавления, что и позволило добиться высокой воспроизводимости экспериментальных данных (см. рис. 1, на котором приведены профили плавления фрагмента ДНК плазмиды TC-7).

Гель-электрофорез при различной температуре проводили на специально сконструированном аппарате по принципу, описанному в работе [7], в интервале температур от 0 до 70°C . Точность термостатирования составляла $0,1^\circ\text{C}$. В качестве денатуранта использовали смесь формамида с мочевиной (см. также [6—8]). Концентрации денатуранта 100 % отвечала концентрация формамида 40 % и мочевины — 7 М. Для разделения фрагментов ДНК приготавливали гель из 6,5 %-ного полиакриламида (соотношение акриламида к бисакриламиду составляло 37,5:1). Градиент концентрации денатуранта создавался в направлении, перпендикулярном движению ДНК. Разделение проводили в ТАЕ-буфере, pH 7,8, содержащем 40 мМ трис, 20 мМ ацетат Na, 2 мМ ЭДТА. Образцы ДНК насливали в виде непрерывной полосы, и электрофорез

вели при напряженности поля 10 В/см при фиксированной температуре. ДНК в геле прокрашивали бромистым этидием и гель фотографировали через красный светофильтр при освещении его ультрафиолетовым светом.

Результаты и обсуждение. Постановка задачи. Характеристика экспериментальных объектов. Исследования влияния отдельных нуклеотидных замен на профили плавления ДНК проводили на ДНК плазмид *TC-7*, *DT-19* и *DT-25*. На рис. 2 схематически изображено строение указанных плазмид. Отличия в их после-

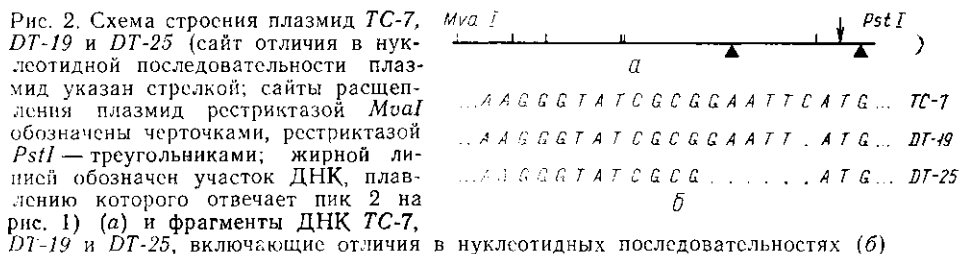


Fig. 2. Scheme of construction of *TC-7*, *DT-19* and *DT-25* plasmids. Differences in the sequences of plasmids are shown by the arrow (a) and fragments of *TC-7*, *DT-19* and *DT-25* DNAs including differences in the sequences (б)

довательности относятся лишь к одному участку ДНК, указанному стрелкой. Ниже приведены нуклеотидные последовательности фрагмента ДНК, включающего все замены. Видно, что ДНК *DT-19* отличается от ДНК *TC-7* делецией одной GC-пары; другая ДНК — *DT-25* — делецией более протяженного участка, содержащего четыре AT- и две GC-пары. Для плавления использовали не всю плазмидную ДНК, а ее фрагмент размером 1150 п.н., полученный расщеплением исходной плазмиды рестриктазой *PstI*. Как видно из рис. 2, нуклеотидные замены находятся в этом рестрикционном фрагменте. Как показали результаты расчетов, проведенных Б. Р. Амирикяном, участок ДНК, включающий нуклеотидные замены, располагается на конце фрагмента и плавится не последним.

В работе специальное внимание было обращено на точность регистрации профилей плавления. На рис. 1 приведены результаты двух независимых измерений профилей плавления фрагмента ДНК *TC-7*. (Поскольку в настоящей работе исследование проводилось лишь с короткими *PstI*-рестрикционными фрагментами плазмидных ДНК, то в дальнейшем все фрагменты будем просто называть по обозначению соответствующей ДНК.) Видно, что повторяемость хорошая, пики также хорошо совпадают не только по положению, но и по амплитуде. Пары кривых, на которых положение одних и тех же пиков совпадало с точностью до нескольких сотых градуса, были получены и для остальных ДНК.

Все опыты по плавлению проводили в растворе с высокой ионной силой (1,6×SSC). Такие условия отвечают равновесному плавлению ДНК [11—12].

Профили плавления ДНК плазмид *TC-7*, *DT-19* и *DT-25*. На рис. 3 на одном графике приведены профили плавления трех ДНК. Для каждой ДНК при сравнении разных профилей между собой взяты те кривые, которые полностью совпадали в повторных опытах. Из сравнения следует, что их профили плавления отличаются друг от друга лишь положением второго пика при совпадении остальных как по положению, так и по амплитуде.

Из данных рис. 3 видно, что по отношению к ДНК *TC-7* пик 2 ДНК *DT-19* сдвигается влево, а ДНК *DT-25* — вправо. На рис. 2 показано, что в первом случае доля GC-пар в участке 2 понижается из-за делеции одной GC-пары, а во втором — повышается (делеция четырех пар AT и двух GC-пар). Полученный эффект отвечает тому, который следовало ожидать из-за изменения нуклеотидного состава ДНК.

Ниже приведены данные, показывающие различия в положении пика 2 (δT_2) для всех трех ДНК. Разница в температурах максимума второго пика составляет для ДНК $DT-19-TC-7 = -0,14^\circ C$; $DT-25-TC-7 = 0,14^\circ C$; $DT-25-DT-19 = 0,28^\circ C$. Видно, что эффект от исследованных нуклеотидных замен невелик, в зависимости от типа делеции

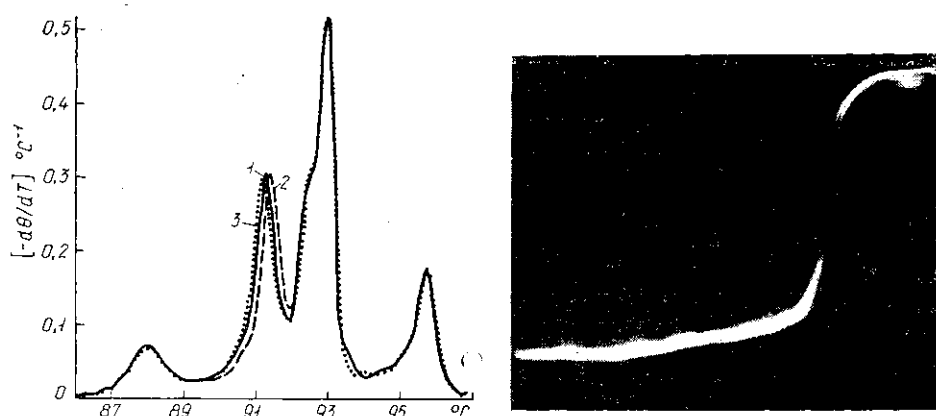


Рис. 3. Профили плавления *PstI*-фрагментов трех ДНК в растворе $1,6\times SSC$: 1 — ДНК *TC-7*; 2 — *DT-25*, 3 — *DT-19*

Fig. 3. The melting profiles of *PstI*-fragments of three DNAs in $1,6\times SSC$: 1 — *TC-7* DNA; 2 — *DT-25*; 3 — *DT-19*

Рис. 4. Разделение фрагментов ДНК *TC-7* и *DT-19*, отличающихся делецией одной GC-пары. Температура геля $65^\circ C$, концентрация денатуранта растет слева направо (20—80 %)

Fig. 4. The separation of *TC-7* and *DT-19* DNA fragments (deletion of one GC-base pair). Temperature of gel was $65^\circ C$, denaturant concentration is increased from the left to the right (20-80 %)

составляет $0,14-0,28^\circ C$ и его знак меняется вследствие уменьшения или увеличения среднего GC-содержания участка.

Эффект сдвига, обусловленный изменением GC-содержания, можно оценить, используя известное линейное соотношение между температурой плавления ДНК и ее средним AT-содержанием [13]. По этой оценке делеция одной GC-пары в участке 2 размером 200 п.н. уменьшает температуру максимума пика 2 на величину $0,12^\circ C$. Почти та же картина наблюдается при делеции четырех AT- и двух GC-пар ($0,1^\circ C$).

Мы видим, что полученные оценки хорошо совпадают с экспериментальными данными. Следовательно, можно предположить, что измеренные эффекты сдвига пика 2 обусловлены практически полностью изменением среднего нуклеотидного состава участка ДНК. Безусловно, все исследованные нуклеотидные замены меняют и стэкинг-взаимодействие. Этот эффект должен сказываться на сдвиге пика, но его вклад, видимо, не больше ошибки измерений ($\pm 0,03^\circ C$).

Таким образом, нами показана высокая чувствительность профилей плавления ДНК к нуклеотидным заменам, позволяющая зарегистрировать делецию одной пары нуклеотидов. Из проведенных оценок следует, что замена одной пары нуклеотидов на другую должна приводить к вдвое большему эффекту, чем делеция одной пары.

Отметим еще одно важное обстоятельство. Для проверки чувствительности профиля плавления ДНК к отдельным нуклеотидным заменам нами были выбраны такие профили плавления, положение пиков на которых, кроме пика 2, совпадало без какого-либо сдвига кривых по оси температур. На кривых, приведенных на рис. 3, положение пика 3 варьировало на величину не более $0,02^\circ C$. Однако сопоставление этих данных с результатами других опытов показало, что столь высокие требования к воспроизводимости не являются обязательными.

Сдвиг кривых по оси температур на величину $\sim 0,5^\circ\text{C}$ до совмещения их по положению наиболее интенсивного пика 3 дает значения величины δT_2 для разных ДНК, совпадающие с приведенными выше. Следовательно, отчетливые пики на профиле плавления ДНК, положение которых не меняется при нуклеотидных заменах, служат надежным внутренним репером, позволяющим измерить эффект сдвига с точностью до нескольких сотых долей градуса.

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях. Другим способом, позволяющим обнаружить точечные замены, является гель-электрофорез в денатурирующих условиях. Мы провели сопоставление возможностей обоих методов на одних и тех же объектах.

Однако, как было сказано выше, с помощью электрофоретического метода можно обнаружить замены только в случае их нахождения в участке ДНК, ответственном за эффект торможения, т. е. в самом первом плавящемся участке. Как видно из рис. 3, в нашем случае все изменения касаются второго пика, следовательно, для проведения электрофоретического разделения необходимо отделить легкоплавкую область (пик 1), сделав первой область с заменами. Нуклеотидная последовательность всех трех плазмид известна [14, 15]. Это позволило подобрать рестрикционное расщепление плазмидных ДНК с полученным фрагментом, для которого пику 2 отвечал самый легкоплавкий участок.

На рис. 2 приведена карта рестрикции короткого фрагмента ДНК плазмиды *TC-7*. Видно, что подходящим для электрофоретических исследований будет двойное расщепление рестриктазами *PstI* и *MvaI*. Из рис. 2 видно, что расщепление рестриктазой *MvaI* происходит на расстоянии 200 н.п. от участка 2, т. е. в его результате характер плавления участка не меняется. Благодаря значительному отличию по размеру пучного фрагмента ДНК от остальных нет необходимости проводить предварительное разделение двух *PstI*-фрагментов, как это мы делали для опытов по плавлению.

Три ДНК (*TC-7*, *DT-19* и *DT-25*) расщепляли сначала рестриктазой *PstI*, а затем после удаления фермента — *MvaI*.

Смесь фрагментов ДНК *TC-7* и *DT-19*, получающихся после расщепления, предварительно разделяли в 6,5 %-ном полиакриламидном геле. Из геля вырезали полосу, отвечающую фрагментам из ~ 400 н.п., которую смешивали с гелем, содержащим денатурант, с помощью 2 %-ной агарозы, после чего в направлении, перпендикулярном градиенту концентрации денатуранта, проводили повторное разделение. Результаты такого разделения для фрагментов ДНК *DT-19* и *TC-7* приведены на рис. 4. Видно, что профили денатурации сдвинуты, и величина сдвига соответствует ожидаемому эффекту — $0,14^\circ\text{C}$.

З а к л ю ч е н и е. Приведенные в работе данные показывают, что как спектрофотометрический, так и электрофоретический методы регистрации плавления ДНК чувствительны к очень незначительным изменениям в последовательности ДНК. Оба метода имеют преимущества и недостатки. Так, преимуществом электрофоретического метода является возможность анализа в одном опыте нескольких образцов ДНК, но требование того, чтобы нуклеотидные замены происходили в первом плавящемся участке, в значительной мере ограничивает использование этой методики в практических целях. Спектрофотометрический метод этого недостатка лишен. Кроме того, с его помощью можно получать количественные оценки эффекта. Необходимость получения каждого из образцов ДНК в чистом виде является определенным ограничением данного метода. Безусловно, оба метода не могут по своей информативности конкурировать с секвенированием, дающим полную информацию об изменениях в последовательности ДНК. Однако при исследовании одних и тех же объектов, например фрагментов одной и той же области генома, информацию об изменении последовательности ДНК с помощью плавления удается получить довольно быстро и это обстоятельство может оказаться весьма полезным.

THE INFLUENCE OF BASE-PAIR CHANGES ON DNA DENATURATION PROFILES

I. V. Razlutsky, L. S. Shlyakhtenko, Yu. L. Lyubchenko

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Melting profiles of DNA fragments of ~ 1150 b. p. long containing deletions of one, five and six nucleotides have been obtained. It was shown that all these deletions changed the position only of one peak on the DNAs melting profiles. The value of the shift was 0.28 ± 0.3 °C in the case of deletion of one GC and four AT base pairs and it was 0.14 ± 0.03 °C in the case of deletion of one GC-base pair. Denaturing gradient gel electrophoresis was also used for investigation of these DNA fragments melting. The deletion of one GC-base pair was demonstrated to cause a substantial shift of the DNA denaturation profile

1. Localization of low-melting regions in phage T7 DNA / V. I. Lyamichev, I. G. Panyutin, D. I. Chernyi, Yu. L. Lyubchenko // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 7.— P. 2165—2176.
2. Франк-Каменецкий М. Д. Теоретические модели ДНК // Теорет. методы исследования биополимеров.— М.: ВИНТИ, 1979.— Т. 15.— С. 42—73.
3. Fine structure of DNA melting curves / Yu. L. Lyubchenko, M. D. Frank-Kamenetskii, A. V. Vologodskii et al. // Biopolymers.— 1976.—15, N 6.— P. 1019—1036.
4. Fine structure in the thermal denaturation of DNA / A. Wada, S. Ueno, H. Tachibana, Y. Hsiami // CRC Crit. Rev. Biochem.— 1980.—9.— P. 87—144.
5. Лазуркин Ю. С. Молекулярное плавление ДНК и эффект тонкой структуры кривых плавления // Молекуляр. биология.— 1977.—11, № 6.— С. 1311—1324.
6. Fischer S. G., Lerman L. S. Separation of random fragments of DNA according to their sequences // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1980.—77, N 8.— P. 4420—4424.
7. Myers R. M., Maniatis S. G., Lerman L. S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis // Meth. Enzymol.— 1986.— pt E.— P. 180—196.
8. Lyamichev V. I., Panyutin T. G., Lyubchenko Yu. L. Gel-electrophoresis of partially denatured DNA. Retardation effect: its analysis and application // Nucl. Acids Res.— 1982.—10, N 15.— P. 4813—4826.
9. Lyubchenko Yu. L., Vologodskii A. V., Frank-Kamenetskii M. D. Direct comparison of theoretical and experimental melting curves // Nature.— 1978.—271, N 5640.— P. 28—31.
10. Маниадис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 474 с.
11. Kozlovskii S. A., Lyubchenko Yu. L. Non-equilibrium character of DNA melting // Nucl. Acids Res.— 1984.—12, N 10.— P. 4339—4349.
12. A study of the reversibility of helix-coil transition in DNA / M. P. Perelroyzen, V. I. Lyamichev, Yu. A. Kalambet et al. // Ibid.— 1981.—9, N 16.— P. 4043—4059.
13. Pavlov V. M., Lyubchenko Yu. L. A new method for recording of DNA differential melting curves // Biopolymers.— 1978.—17, N 4.— P. 795—798.
14. The nucleotide sequence of human fibroblast interferon cDNA / T. Taniguchi, S. Ohno, K. Y. Fujii, M. Muramatsu // Gene.— 1980.—10, N 4.— P. 11—15.
15. Первичная структура участка ДНК *E. coli*, предшествующего генам триптофанового оперона / В. В. Губанов, Ю. В. Лебедев, Г. С. Монастырская и др. // Биоорг. химия.— 1984.—10, № 3.— С. 415—417.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 14.01.87