



УДК 577.152.651'14

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ VI\*. ДИСКРИМИНАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ МИСМАТЧ, ПРИ ЛИГИРОВАНИИ ТАНДЕМА КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ДНК-МАТРИЦЕ

© 1998 г. Д. В. Пышный, А. А. Кривенко\*, С. Г. Лохов,  
Е. М. Иванова#, Г. М. Дымшиц\*, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8;

\*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 28.08.96 г. Принята к печати 26.12.96 г.

Продемонстрирована высокая специфичность лигирования ДНК-лигазой фага Т4 тетрауклеотида с фланкирующими его октануклеотидами на ДНК-матрице. Показано, что при наличии мисматча в комплексе тетрауклеотид + ДНК-матрица образование продуктов лигирования практически не происходит. Лигирование тандема октануклеотид + тетрауклеотид + октануклеотид позволяет с высокой достоверностью определять наличие любой однобуквенной замены в сайте связывания тетрауклеотида.

*Ключевые слова:* лигирование, точечные мутации, тандемы коротких олигонуклеотидов, мисматч.

Способность фермента ДНК-лигазы фага Т4 (КФ 6.5.1.1) образовывать ковалентную связь между соседними олигонуклеотидами на комплементарной ДНК-матрице лежит в основе одного из подходов к выявлению точечных мутаций. Возможность дискриминации однобуквенных замен в ДНК обусловлена снижением эффективности лигирования пары олигонуклеотидов при наличии в их комплексе с ДНК-матрицей некомплементарной пары оснований в непосредственной близости от сайта лигирования [1]. Избирательность действия фермента зависит от типа и положения однобуквенной замены по отношению к месту образования фосфодиэфирной связи между олигонуклеотидами. В ряде случаев происходит лигирование и в "неправильных" комплексах. Таким образом, субстратная специфичность лигазы не может обеспечить однозначность образования продуктов лигирования только в правильном (полностью комплементарном) комплексе зондов с ДНК [2–4]. Эффективность метода выявления точечных мутаций в последовательностях нуклеиновых кислот определяют по фактору дискриминации (FD), который рассчитывают как отношение выхода продукта лигирования олиго-

нуклеотидов в правильном комплексе с ДНК к выходу продукта в случае последовательности, содержащей однобуквенную замену. Чем выше фактор дискриминации, тем эффективнее выявление точечной мутации. Фактор дискриминации может быть повышен подбором условий проведения лигирования в зависимости от типа мисматча и его положения [5]. Селективность лигирования возрастает с уменьшением длины одного из используемых олигонуклеотидных зондов [6]. Очевидно, это связано с тем, что обладающие относительно низкими гибридизационными свойствами короткие олигонуклеотиды образуют крайне нестабильные комплексы при наличии хотя бы одной некомплементарной пары. Так, тетрауклеотиды способны образовывать стабильные комплексы с ДНК-матрицей исключительно в присутствии пары фланкирующих олигонуклеотидов [7]. Это позволяет предположить, что при наличии однобуквенной замены в участке комплементарного связывания тетрауклеотида образование его комплексов с матрицей будет мало вероятно. Кроме того, известно, что максимальная избирательность фермента проявляется по отношению к мисматчу, отстоящему от сайта лигирования не более чем на 3 пары оснований [2]. Поэтому лигирование тандемов, включающих тетрауклеотид, в случае образования комплекса с мисматчем должно быть затруднено. Возможность эффек-

\* Сообщение V см. [7].

Сокращения: PEG – полиэтиленгликоль, \*p – <sup>32</sup>P; префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

# Автор для переписки.

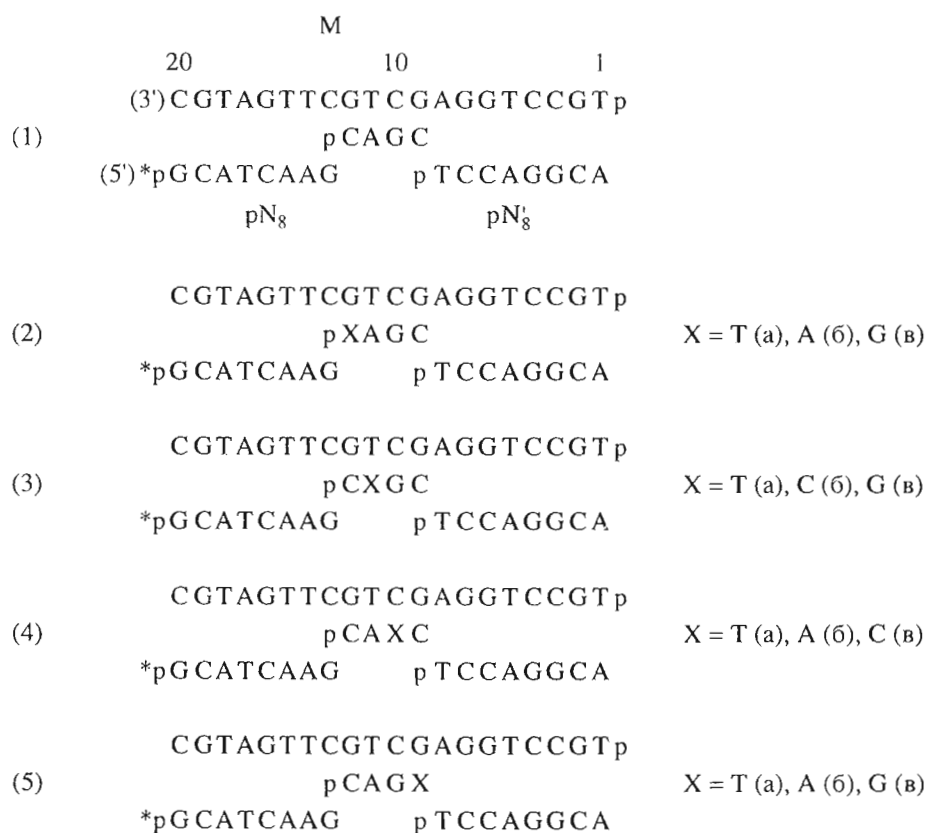
тивного лигирования правильных комплексов тетрамеров с фланкирующими его октануклеотидами на матрице ДНК показана нами ранее [7].

Целью данной работы является исследование селективности лигирования тетрауклеотида с октануклеотидами в правильных и несовершенных комплексах.

Исследование проводили, используя в качестве ДНК-матрицы, как и в нашей предыдущей работе [7], 20-звенный олигонуклеотид М (схема).

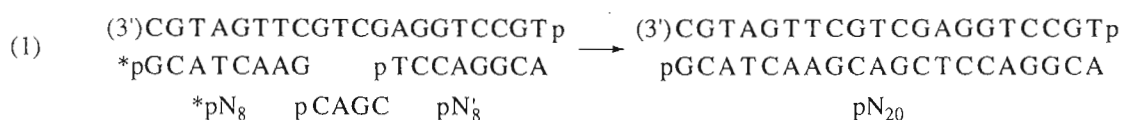
Селективность лигирования тетрауклеотидов  $pN_4$  с парой октануклеотидов  $pN_8$  и  $pN'_8$  оценивали путем сравнения эффективности лигирования в правильном комплексе (1) и в комплексах (2)–(5), содержащих все возможные мисматчи в дуплексе тетрауклеотид · матрица М. “Неправильные” комплексы (с мисматчем) получали, вводя в тетрауклеотид  $pCAGC$ , полностью комплементарный матрице, однобуквенные замены по всем положениям ( $pXAGC$ ,  $pCXGC$ ,  $pCAXC$  и  $pCAGX$ ).

Схема



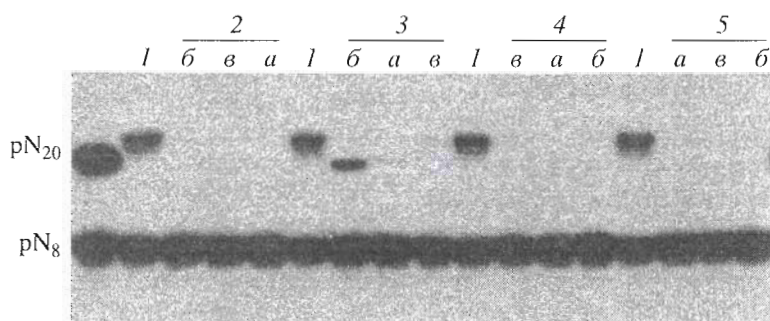
На первом этапе работы лигирование тандемов в комплексах (1)–(5) проводили при 25°C в течение 15 мин при эквимольных соотношениях всех трех олигонуклеотидов и матрицы М.

Образование продукта реакции  $pN_{20}$  (32%) наблюдается при лигировании тетрауклеотида  $pCAGC$  в правильном комплексе (1) (рис. 1).

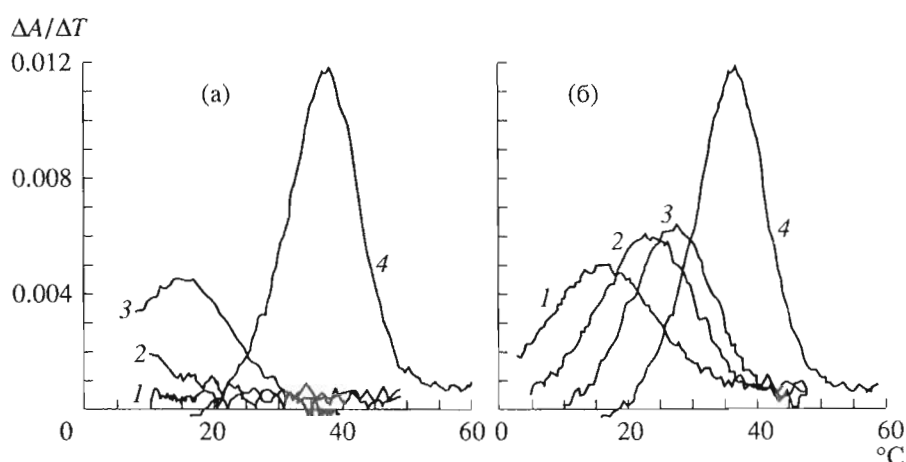


10 из 12 мисматчей (в комплексах (2а–в), (3в), (4а–в) и (5а–в)) дискриминируются полностью

(рис. 1). Продукты лигирования даже в следовых количествах в этих комплексах не регистрируются.



**Рис. 1.** Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования (25°C, 15 мин, 50 ед. акт. ДНК-лигазы) в комплексах (1)–(5) тандемов \*pN<sub>8</sub> + pN<sub>4</sub> + pN<sub>8</sub><sup>1</sup>. Обозначения дорожек соответствуют анализируемым комплексам.



**Рис. 2.** Дифференциальные кривые плавления дуплекса М + pN<sub>4</sub> в присутствии фланкирующих октануклеотидов pN<sub>8</sub> и pN<sub>8</sub><sup>1</sup> (0.1 М NaCl, 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 8% PEG, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>). (а) – комплексы: 1 – (2б), 2 – (4б), 3 – (3б), 4 – (1); (б) – комплексы: 1 – (5а), 2 – (5в), 3 – (5б), 4 – (1).

С учетом точности определения радиоактивной метки можно сказать, что выход лигирования тандемов в этих случаях не может превышать 0.1%. Фактор дискриминации мисматчей в комплексах (2), (4) и (5) должен превышать 300, так как в правильном комплексе (1) лигирование протекает на 32%. Таким образом, при образовании правильного комплекса лигирование тандемов pN<sub>8</sub> + pN<sub>4</sub> + pN<sub>8</sub><sup>1</sup> протекает высокоизбирательно. Исключение составляют комплексы (3а) и (3б), содержащие тетраплексы рСТGC и рССGC с заменой, произведенной по второму положению от 5'-конца. Образование "неправильных" эйкозануклеотидов в этих случаях регистрируется с выходом 2 и 12% (рис. 1, 3а и 3б), т.е. фактор дискриминации мисматчей Т-Т и С-Т составляет 16 и 2.7 соответственно.

Отличия эффективности лигирования олигонуклеотидов в комплексах с различными мисматчами могут быть обусловлены как структурными

особенностями тандема олигонуклеотидов, так и субстратной специфичностью фермента. Основным свойством тандема, влияющим на выход реакции лигирования, является его термостабильность. Поэтому было проведено сравнение гибридных свойств тетраплексов в правильном комплексе (1), в комплексах (2б), (4б) и (5а–в), инкубирование которых с ДНК-лигазой не приводит к образованию эйкозануклеотидов, и комплекса (3б), имеющего самый низкий фактор дискриминации.

Нами было показано, что дуплекс матрицы М с тетраплексом рСAGC в присутствии пары фланкирующих октануклеотидов (комплекс (1)) имеет  $T_{пл}$  38°C [7]. Как видно из данных, приведенных на рис. 2а, введение однобуквенной замены по первому или третьему положению (от 5'-конца) тетраплекса сказывается фатально на его способности образовывать комплекс с матрицей М. Зарегистрировать комплексы тетраплексов



рAAGC и рСААС с матрицей в присутствии октануклеотидов не удается. В то же время в составе комплексов (5), т.е. при замене в тетрануклеотиде четвертого основания, образование неправильных комплексов тетрануклеотидов рСАГХ с матрицей М происходит, но температуры плавления их значительно ниже, чем в случае правильного тетрануклеотида рСАГС (рис. 2б). Тетрануклеотид рССГС, лигирование которого с октануклеотидами в комплексе (3б) протекает на 12%, также образует неправильный дуплекс с матрицей (в присутствии пары октануклеотидов) с  $T_{пл} = 15^{\circ}\text{C}$ , что ниже температуры плавления комплексов М · рСАГХ (в присутствии октануклеотидов), которые дискриминируются лигазой полностью. Таким образом, отсутствие продукта лигирования в комплексах (5) может быть обусловлено только специфичностью лигазы, дискриминирующей мисматчи в положении сайтов лигирования.

Характер дифференциальной кривой плавления дуплекса М · рССГС (комплекс (3б), рис. 2а) позволяет судить о том, что при  $37^{\circ}\text{C}$  концентрация дуплексов мишени с тетрануклеотидом должна быть исключительно мала. Поэтому нам представлялось возможным повысить фактор дискриминации лигирования комплекса (3б) путем повышения температуры реакции.

Нами было показано [7], что лигирование тандема в правильном комплексе (1) протекает с одинаковой эффективностью в температурном интервале от  $20$  до  $37^{\circ}\text{C}$  и образование продукта реакции рN<sub>20</sub> через 30 мин реакции при  $37^{\circ}\text{C}$  достигает 42%.

Как видно из рис. 3, при повышении температуры эффективность лигирования в неправильном комплексе (3б) уменьшается. Образование неправильного эйкозануклеотида при  $37^{\circ}\text{C}$  происходит лишь на 4%. Таким образом, повышая температуру лигирования тандема в комплексе (3б), удается повысить фактор дискриминации с 2.7 до 10. В еще большей степени (с 10 до 50) удастся повысить его при понижении концентрации одного из компонентов тандема, например октануклеотида \*рN<sub>8</sub><sup>1</sup>, до  $5 \times 10^{-7}$  М (рис. 4). В таких условиях в случае правильного комплекса (1) регистрируется количественное образование продукта лигирования рN<sub>20</sub> и следовое количество (2%) при лигировании рССГС в комплексе (3б).

Еще одним способом повышения фактора дискриминации неправильных комплексов при лигировании является повышение специфичности действия самого фермента путем изменения условий реакции. Мы предположили, что повышение ионной силы, приводящее к ингибированию реакции [5, 8], должно в большей степени сказываться на малоэффективном лигировании

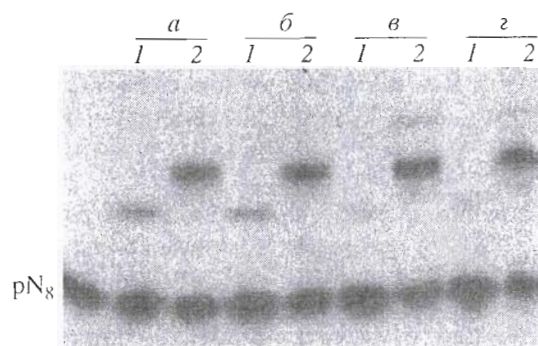


Рис. 3. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования пары фланкирующих октануклеотидов \*рN<sub>8</sub><sup>1</sup> и рN<sub>8</sub><sup>1</sup> с рССГС (комплекс (3б) – дорожка 1), рСАГС (комплекс (1) – дорожка 2) в течение 30 мин при температуре: 20 (а), 25 (б), 30 (в),  $37^{\circ}\text{C}$  (г).

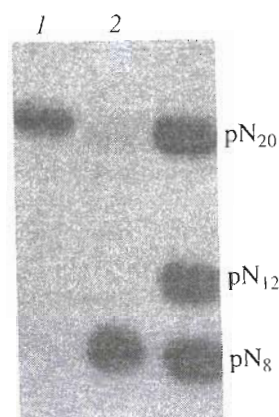


Рис. 4. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования ( $37^{\circ}\text{C}$ , 30 мин, 50 ед. акт. ДНК-лигазы) пары фланкирующих октануклеотидов рN<sub>8</sub> и \*рN<sub>8</sub><sup>1</sup> с рСАГС (комплекс (1) – дорожка 1) и рССГС (комплекс (3б) – дорожка 2).  $[M] = [pN_4] = [pN_8] = 10 \text{ мкМ}$ .  $[*pN_8^1] = 0.5 \text{ мкМ}$ .

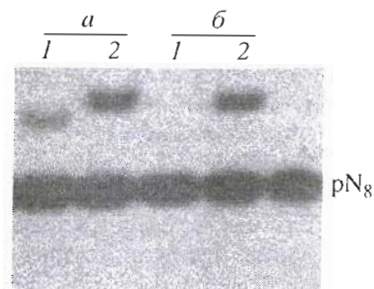


Рис. 5. Радиоавтограф электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ продуктов лигирования ( $37^{\circ}\text{C}$ , 30 мин) пары фланкирующих октануклеотидов рN<sub>8</sub> и \*рN<sub>8</sub><sup>1</sup> с рССГС (комплекс (3б) – дорожка 1); рСАГС (комплекс (1) – дорожка 2).  $[NaCl]$ , М: 0.1 (а); 0.3 (б).

тандема  $pN_8 + pCCGC + pN_8'$  в неправильном комплексе, чем на лигировании в правильном комплексе (1). Для проверки этой возможности было проведено сравнение эффективности лигирования тандемов в комплексах (1) и (3б) в буфере, содержащем 0.3 М NaCl.

Как видно из рис. 5, при наличии тетрануклеотида  $pCCGC$  в неправильном комплексе (3б) наблюдается полное ингибирование образования продуктов лигирования. Наличие эйкозануклеотида не удается зарегистрировать даже в следовых количествах, в то время как эффективность лигирования тетрануклеотида  $pCAGC$  в комплексе (1) изменяется незначительно (35%). Фактор дискриминации  $pCCGC$  в этих условиях становится таким же, как и для тетрануклеотидов с остальными однонуклеотидными заменами, т.е. не менее 300.

Таким образом, лигирование на комплементарной матрице тандема коротких олигонуклеотидов (октануклеотид + тетрануклеотид + октануклеотид) протекает с исключительно высокой селективностью. Использование таких тандемов для лигирования на фрагментах ДНК представляется весьма перспективным для тестирования с высокой степенью точности однобуквенных замен или выявления ДНК с определенной последовательностью.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ДНК-лигазу фага T4 производства "Сибэнзим" (Россия).

**Олигодезоксирибонуклеотиды** синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по [9].

Концентрацию олигонуклеотидов и их производных определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины  $\epsilon_{260}$  моно- и динуклеотидов [10]. Исследование термической денатурации олигонуклеотидных дуплексов проводили при концентрации олигонуклеотидных компонентов, равной  $10^{-5}$  М, в буфере 0.1 М NaCl, 20 мМ трис-HCl (pH 7.5), 8% PEG (6000), 10 мМ  $MgCl_2$  на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милихром" (Россия) на длине волны 270 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин. Температуры плавления комплексов матрицы и тетрануклеотидов в присутствии октануклеотидов определяли как описано в работе [11].

$5'$ - $^{32}P$ -Меченые олигонуклеотиды получали по методу [12], используя  $[\gamma$ - $^{32}P$ ]АТР.

Активность фермента определяли по методике [13], принимая за 1 ед. акт. количество фермента, необходимое для того, чтобы обеспечить 50% лигирования *Hind*III-фрагментов ДНК фага

$\lambda$  за 30 мин при 16°C в 20 мкл реакционной смеси при концентрации ДНК 0.3 мкг/мкл.

Реакцию лигирования проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ  $MgCl_2$ , 20 мМ трис-HCl (pH 7.5), 8% PEG, 1 мМ АТР, 0.1 М NaCl, 10 мМ дитиотреит, при 25 и 37°C. Концентрация каждого олигонуклеотидного компонента в стандартных условиях составляла 10 мкМ. В стандартной реакции использовали 50 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4. Реакцию останавливали прогреванием при 100°C в течение 5 мин. Кинетические характеристики снимали, отбирая аликвоты по 10 мкл и осаждая их 2% раствором  $LiClO_4$  в ацетоне.

Продукты лигирования разделяли гель-электрофорезом в денатурирующем ПААГ (20%). В качестве маркеров длины использовали олигонуклеотиды, полученные химическим методом. Нуклеотидный состав эйкозануклеотида, полученного при лигировании, подтверждали секвенированием по методу Максама-Гилберта [14].

Степень лигирования (%) вычисляли как отношение радиоактивности участков геля, содержащих продукты лигирования, к суммарной радиоактивности в соответствующей дорожке.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L. // Science. 1988. V. 241. P. 1077–1080.
2. Harada K., Orgel L.E. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2287–2291.
3. Цитович А.В., Долинная Н.Г., Шабарова З.А. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. С. 690–699.
4. Шилов И.А., Королева О.Н., Друца В.Л. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 647–654.
5. Wu D.Y., Wallace B.R. // Gene. 1989. V. 76. P. 245–254.
6. Wu D.Y., Wallace B.R. // Genomics. 1989. V. 4. P. 560–569.
7. Пышный Д.В., Кривенко А.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Дымишиц Г.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 25–31.
8. Raae A.J., Kleppe R.K., Kleppe K. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 60. P. 437–443.
9. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
10. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
11. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
12. Berkner K.L., Folk W.R. // Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
13. New England Biolabs. 1990–1991. Catalog. P. 51.
14. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.

## Interaction of Derivatives of Short Oligonucleotides with Nucleic Acids.

### VI\*. Discrimination of Mismatch-Containing Complexes upon Ligation of a Tandem of Short Oligonucleotides on DNA Template

D. V. Pyshnyi\*, A. A. Krivenko\*\*, S. G. Lokhov\*,  
E. M. Ivanova\*, G. M. Dymshits\*\*, and V. F. Zarytova\*

\* *Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

\*\* *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

**Abstract**—The high ligation specificity of a tetranucleotide with a pair of flanking octanucleotides on DNA template by the action of T4 phage DNA ligase is shown. In a tetranucleotide–DNA template complex containing a mismatch, almost no ligation products are formed. The ligation of a tandem octanucleotide–tetranucleotide–octanucleotide makes it possible to identify accurately any single nucleotide substitution in a tetranucleotide binding site.

*Key words: ligation; point mutations; short oligonucleotides, tandems; mismatch.*