



УДК 577.113.083 : 543.545

МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ЯДЕРНОЙ ДНК ИЗ ЛИМФОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ЧЕРЕЗ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИОННУЮ МЕМБРАНУ

*Шапиро Ю. А., Зайцев И. З., Юров Ю. Б.,
Яковлев А. Г., Гиндлиц В. М.*

*Институт клинической психиатрии ВНИИП
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Разработан новый метод электрофоретической очистки ДНК с использованием ультрафильтрационной мембраны XM-300 (Amicon). Предлагаемая система электрофильтрации позволяет в короткие сроки получать препараты ядерной ДНК из лимфоцитов периферической крови, характеризующиеся высокой чистотой и полимерностью.

В настоящее время многие направления молекулярно-биологических исследований прямо или косвенно связаны с изучением структуры и функций генетического аппарата различных организмов. Необходимым условием проведения подобных исследований является наличие препаратов чистой высокомолекулярной ДНК. Известны разнообразные методические подходы, позволяющие препаративно выделять нуклеиновые кислоты из различных источников [1-4]. Однако в определенных случаях эти методы не способны обеспечить высокое качество ДНК. При этом возможно использование комбинации известных методов, но, как правило, комбинированные методы требуют дополнительных затрат.

Примером вышесказанному является задача препаративного выделения высокомолекулярной ДНК из лимфоцитов периферической крови. Ядра лимфоцитов крови человека представляют собой, по-видимому, единственный удобный для выделения ДНК материал, доступный практически для любой лаборатории, занимающейся исследованием генома человека. Сравнительная простота получения этого материала, а также возможность исследования на его основе индивидуальных геномов определяют широкое использование лимфоцитов для выделения нуклеиновых кислот [5-8].

Традиционные методы позволяют выделять из лимфоцитов препараты ДНК, мало пригодные в качестве субстрата для эндонуклеаз рестрикции, что может быть обусловлено комплексом физиологических функций лимфоцитов, накладывающим определенный отпечаток на структурные особенности их генетического аппарата. Лишь дополнительная очистка ДНК центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия [5] или с помощью метоксиэтанола [6, 9] позволяет получить лимфоцитарную ДНК удовлетворительного качества.

Настоящая работа представляет простую и высокоэффективную процедуру выделения высокомолекулярной ДНК, достаточно чистой для ферментативного анализа.

Суть нового метода заключается в том, что в процессе электрофильтрации лизата ядер лимфоцитов в присутствии саркозина белки, РНК и полисахариды проходят через ультрафильтр, тогда как ДНК остается на нем в виде желеобразного слоя. Метод позволяет выделять высокомолекулярную ДНК или фрагменты ДНК, имеющие длину не менее 300 пар оснований.

Представленный метод разработан на примере выделения ДНК из лимфоцитов периферической крови человека, однако мы полагаем, что он может найти широкое применение при препаративном выделении высокомо-

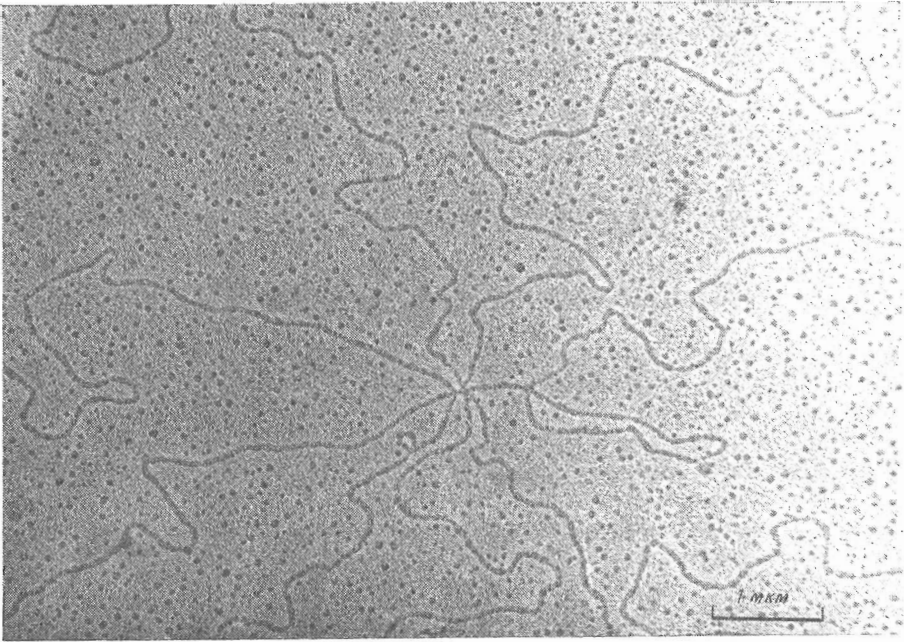


Рис. 1. Электронная микрофотография одного из препаратов лимфоцитарной ДНК. Наньление платиной

лекулярной ДНК из многих других источников. Средний выход ДНК из ядер лимфоцитов составлял в наших опытах 4,5–5 мг на 100 мл донорской крови, при этом теоретически ожидаемое содержание ДНК в таком объеме материала составляет от 4,5 до 6 мг [10, 11].

Электронно-микроскопическое исследование выделенных препаратов ДНК свидетельствует об их чистоте и очень высокой степени полимерности молекул ДНК (рис. 1). Спектрофотометрический анализ степени загрязнения препаратов белками и полисахаридами, проведенный на основе определения соотношения коэффициентов поглощения D_{260}/D_{280} (1,9–2,0) и D_{260}/D_{230} (2,5–2,6), также подтверждает высокую степень очистки ДНК, достигаемую предложенным методом.

Пригодность выделенной ДНК в качестве субстратов для эндонуклеаз рестрикции мы проверяли в реакциях с эндонуклеазами *EcoRI* и *PstI* (рис. 2). Полная рестрикция 5 мкг очищенной электрофильтрацией ДНК достигалась уже через 1 ч инкубации при 37° С с рестриктазами в концентрации 0,5 ед. акт./мкг ДНК в 50 мкл инкубационной смеси. Опыт показывает, что распространенный метод определения степени эндонуклеазного гидролиза эукариотической ДНК по одновременному расщеплению ДНК фага λ [5, 12] не является корректным, так как в некоторых случаях наряду с полным расщеплением ДНК фага λ эукариотическая ДНК оказывается практически негидролизованной. Поэтому для определения степени расщепления эукариотической ДНК мы использовали метод гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах [13] тотальной ДНК с фрагментом $\alpha R1$, представленным в геноме человека 100 000 копиями. Подробное изложение мотивов подобного подхода представлено в работе [14].

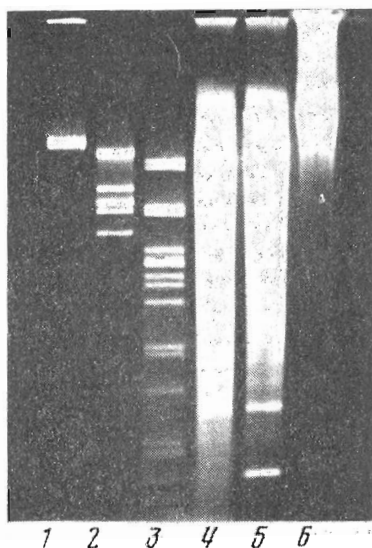
Экспериментальная часть

Рестриктазу *PstI* выделяли по методу [11]. Рестриктаза *EcoRI* была получена из Института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, ДНК фага λ выделена из штамма $\lambda C1857s7$ [15].

Саркозил, бромистый этидий, дитиотреит поставлены фирмой Serva, декстран сульфат и тритон X-100 — фирмой Ferak, фиколл 400 — фирмой Pharmacia, ультрафильтры ХМ-300 — фирмой Amicon.

Остальные материалы отечественного производства.

Рис. 2. Электрофорез в 0,8% агарозе одного из препаратов лимфоцитарной ДНК (6) и ее гидролизатов после обработки эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* (5) и *PstI* (4). Контрольные образцы: ДНК фага λ (1) и ее гидролизаты после обработки эндонуклеазами *EcoRI* (2) и *PstI* (3)



Выделение ядер из лимфоцитов. Цельную гепаринизированную кровь разводили 0,15 М NaCl в соотношении 1 : 3. Разведенную кровь смешивали с 6% декстрансульфатом 500 в соотношении 5 : 1. Смесь отстаивали 30 мин при 20° С (далее все процедуры проводили при 4° С). Лейкоциты из надосадочной жидкости осаждали центрифугированием при 450 g в течение 20 мин и отмывали трехкратным центрифугированием в 0,15 М NaCl (450 g, 10 мин). Отмытые клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 0,5 М сахарозу, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ EDTA с тритоном X-100 в конечной концентрации 0,5%. Фракцию ядер отмывали трехкратным центрифугированием в том же буфере без тритона (450 g, 10 мин).

Выделение и очистка ДНК. Ядра ресуспендировали в буфере А (50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ EDTA, 50 мМ NaCl) из расчета 100 мл буфера на 1 мл ядерного осадка и лизировали добавлением саркозила (N-лаурилсаркозин) до конечной концентрации 1% [16]. Лизат инкубировали при 65° С до полного просветления (не менее 1 ч) и центрифугировали 1 ч при 20 000 об/мин для удаления механических примесей. Супернатант переносили в цилиндр, закрытый снизу фильтром ХМ-300. На супернатант наслаивали равный объем буфера А+1% саркозил. Жидкость, находящуюся в цилиндре, отделяли от анодной камеры диализной мембраной Visking 20. Нижний край цилиндра с ультрафильтром опускали в катодную камеру. Обе электродные камеры заполняли буфером, содержащим 89 мМ трис-НСl, 89 мМ Н₃ВО₄, 5 мМ EDTA (рН 8,3). Электрофильтрацию проводили при 5 мА/см² в течение 6–8 ч.

После электрофоретического осаждения ДНК на фильтре жидкость удаляли из цилиндра, а желеобразный слой ДНК растворяли в нужном буфере.

Препараты ДНК для электронной микроскопии готовили по методу [17] с последующим окрашиванием уранилацетатом или напылением платины.

Эндонуклеазную обработку ДНК рестриктазой *PstI* проводили в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит. Буфер для *EcoRI* содержал 6 мМ трис-НСl (рН 7,9), 6 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 6 мМ β-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. Обработку ДНК рестриктазами проводили в течение 1 ч при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объема буфера, содержащего 25% фикал 400; 50 мМ EDTA, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 2% саркозил. Электрофорез ДНК проводили в 0,8% агарозе в горизонтальном аппарате при 200 В, 80 мА в течение 2,5 ч. Затем гель окрашивали бромистым этидием (1 мкг/мл) в течение 30 мин.

Авторы выражают благодарность И. А. Александрову за помощь в получении электронных микрофотографий препаратов ДНК, Е. В. Анашьеву за постоянное участие в обсуждении и М. Е. Варганыну за поддержку работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marmur J. J. *Mol. Biol.*, 1961, v. 3, № 1, p. 208-218.
2. Craig L. *Enzymology*, 1967, v. 11, № 2, p. 870-905.
3. Lester S. C., Le Van S. K., Stegich C., De Mars R. *Somatic Cell Genetics*, 1980, v. 6, № 1, p. 241-259.
4. Frazier M. L., Montagna R. A., Saunders G. F. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 2, p. 367-374.
5. Wyman A. R.; White R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 10, p. 6754-6758.
6. Jeffreys A. J. *Cell*, 1979, v. 18, № 1, p. 1-10.
7. Panny S. R., Scott A. F., Smith K. D., Phillips J. A., Kazazian H. H., Talbot C. C., Boehm C. D. *Amer. J. Hum. Genet.*, 1981, v. 33, № 1, p. 25-35.
8. Rogers J. C., Kawahara R. S. *Experimental Cell Research*, 1981, v. 134, № 1, p. 1-13.
9. Kirby K. S., Cook E. A. *Biochem. J.*, 1967, v. 104, № 2, p. 254-257.
10. Yunis J. J., Tsai M. Y., Willay A. M. In: *Molecular structure of human chromosomes* / Ed. Yunis J. J. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 1-33.
11. Fiszler-Szafarz B., Szafarz D., de Murillo A. G. *Analyt. Biochemistry*, 1981, v. 110, № 1, p. 165-170.
12. Smith S. S., Thomas C. A. *Gene*, 1981, v. 13, № 3, p. 395-408.
13. Southern E. M. *J. Mol. Biol.*, 1975, v. 98, № 3, p. 503-517.
14. Darling S. M., Crampton J. M., Williamson R. *J. Mol. Biol.*, 1982, v. 154, № 1, p. 51-63.
15. Муллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, p. 296.
16. Creusot F., Christman J. K. *Analyt. Biochemistry*, 1980, v. 103, № 2, p. 343-349.
17. Kleinschmidt A. K. *Methods in Enzymology*, 1962, v. 12B, p. 361-377.

Поступила в редакцию
2.XI.1981
После доработки
15.VI.1982

FACILE ULTRAFILTRATION METHOD FOR DNA ISOLATION AND PURIFICATION

SHAPIRO Yu. A., ZAITSEV I. Z., YUROV Yu. B., YAKOVLEV A. G.,
GINDILIS V. M.

Institute of Psychiatry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A new method of DNA isolation by electrophoresis and ultrafiltration through «Amicon» ultramembrane XM-300 has been elaborated. It allows to obtain rapidly a high molecular weight DNA pure enough for gene engineering purposes. The yield of DNA is about theoretically expected one.