

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗАТОРЕ ABI PRISM 3130 КОМПАНИИ APPLIED BIOSYSTEMS®

П.М. Лазарев

Полесский государственный университет, niklosa@mail.ru

Важнейшим фактором, обеспечившим бурное развитие и значительные достижения молекулярной биологии и медицинской диагностики, явились открытие полимеразной цепной реакции и прогресс в области синтеза коротких фрагментов одноцепочечной ДНК – немодифицированных олигонуклеотидов и флуоресцентных олигонуклеотидных конъюгатов. Флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды применяются в качестве зондов для гомогенной и гетерогенной гибридизации с целевой ДНК и РНК; возможность применения 2',3'-дидезоксинуклеотидов в качестве субстратов полимеразы привели к удобному методу секвенирования ДНК, применяемому до сих пор; эффект резонансного переноса энергии (RET) позволил сконструировать и использовать на практике флуоресцентно-меченные олигонуклеотиды для отслеживания количества амплифицируемой ДНК в ПЦР и привел к развитию метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), позволяющего проводить количественный ДНК-анализ.

За последние три десятилетия использование феномена флуоресценции, а также флуоресцентных методов анализа существенно расширилось. Особенно сильное влияние флуоресцентных методов проявилось в молекулярно-биологических и биомедицинских приложениях. Более ранний ауторадиографический метод визуализации белков и нуклеиновых кислот из-за неудобства работы с радиоизотопами был вытеснен флуоресцентным.

Действительно, флуоресцентный метод анализа превосходит ауторадиографический по чувствительности, поскольку одна молекула красителя способна излучить до своего выцветания до нескольких десятков тысяч фотонов. В настоящее время флуоресцентное детектирование широко используется в ДНК-секвенировании, генетическом анализе и генотипировании, в иммунохимическом анализе, для визуализации клеток и отдельных молекул, а также некоторых других приложениях, число которых постоянно растет.

Секвенирование *de novo*, как один из методов флуоресцентного анализа ДНК, устойчиво развивается и использование новейших реагентов дает возможность лучше понять организацию генома, картировать гены напрямую связанные с предрасположенностью к определенным видам деятельности, социально-значимым заболеваниям.

Короткие олигонуклеотидные последовательности длиной 10-50 нуклеотидов синтезируются в настоящее время в научно-исследовательской лаборатории лонгитудинальных исследований в автоматическом режиме с использованием твердофазного амидофосфитного метода на синтезаторе MerMade 4 Bioautomation (США).

Секвенирование – это определение последовательности неизвестной ДНК.

Исторически, первым методом секвенирования ДНК был метод Максама-Гилберта, основанный на химическом расщеплении одноцепочечной ДНК с последующим фракционированием продуктов деградации [1]. Но в скором времени этот метод был вытеснен методом Сэнгера, основанном на терминировании ПЦР с помощью 2',3'-дидезоксинуклеозид трифосфатов (ddNTP) [2] (рисунок).

Принцип метода состоит в следующем: к известному региону секвенируемой молекулы ДНК подбирается комплементарный меченый олигонуклеотид (праймер) и проводится четыре независимые реакции элонгации, причем в каждую реакцию добавляется один из ингибиторов ПЦР – ddATP, ddCTP, ddGTP или ddTTP. В результате элонгации с участием ДНК-полимеразы получаются фрагменты разных размеров, которые разделяют электрофоретически, а детектирование проводят по флуоресценции метки. С помощью такой процедуры возможно определить за один прием до 700–800 неизвестных нуклеотидов секвенируемой ДНК.

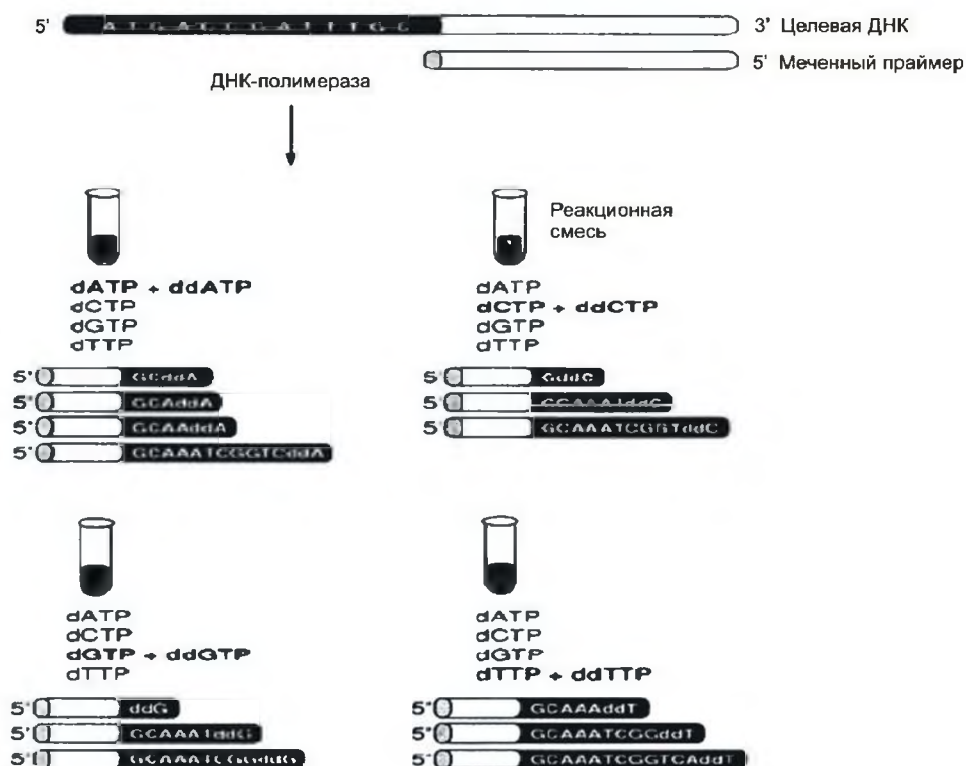


Рисунок – Секвенирование по Сэнгеру

Улучшенный способ секвенирования требует четырех различных флуоресцентных меток, каждая из которых конъюгирована с одним из четырех 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов. При этом на флуоресцентные метки для секвенирования накладываются жесткие требования:

1. Каждая флуоресцентная метка должна иметь отличный от других максимум флуоресценции.
2. Все метки по возможности должны возбуждаться одним источником и на одной длине волны.
3. Красители должны иметь большие коэффициенты экстинкции и излучать с большими квантовыми выходами.
4. Красители должны быть химически стабильными при высоких температурах, т.к. секвенирование протекает при 55–95°C.
5. Метки должны вносить минимальный вклад в электрофоретическую подвижность нуклеотидных фрагментов.
6. Метки не должны сильно влиять на активность ДНК-полимеразы.

На сегодняшний день известны несколько классов флуоресцентных красителей, производные которых получили широкое применение в ставших рутинными процедурах анализа ДНК.

Флуоресцентные красители являются востребованными в химии нуклеиновых кислот и белков, поскольку каждый краситель обладает уникальным набором спектральных и фотофизических свойств. И хотя некоторые производные для введения флуоресцентных красителей в олигонуклеотиды являются коммерчески доступными, но их стоимость чрезвычайно высока, а дизайн реагентов зачастую не оптимизирован или вообще отсутствует какая-либо информация о структуре веществ. Зачастую методики синтеза коммерческих реагентов описаны только в патентах и рассчитаны на получение миллиграммовых количеств веществ, при этом методики не всегда воспроизводимы. В литературе также часто не описываются свойства модифицирующих реагентов и возможные области их использования.

Оптимизация и масштабирование методик, а также разработка удобных реагентов для модификации нуклеиновых кислот различными способами является весьма актуальной задачей.

Большой интерес вызывают широко представленные на белорусском рынке реагенты компании Applied Biosystems® (США) для проведения ДНК-секвенирования, в частности набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Целью работы, проведенной в научно-исследовательской лаборатории лонгитудинальных исследований, является оптимизация дорогостоящих методов секвенирования участков ядерной ДНК для удешевления процессов без существенной потери качества проводимых исследований.

Подобные исследования не проводились, так как отсутствует достоверная информация о совершенствовании методов секвенирования для получения меченых нуклеиновых кислот и уменьшения расходов дорогостоящих импортных реагентов.

Выбор цели связан с лавинообразным ростом потребности республики в реагентах для ПЦР-диагностики, необходимых для проведения секвенирования и их чрезвычайно высокой стоимостью.

В соответствии с поставленной целью, выполнение работы сводилось к решению следующих задач:

- найти предел качественного определения нуклеотидной последовательности при разбавлении набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 5-тикратным буфером для секвенсированной реакции.
- исследовать влияние на качество секвенса вспомогательных реагентов разных производителей;

Объектом исследования являются амплифицированные участки гена PPAR α длиной 266 п.о., полученные методом классической ПЦР, пересаженные этанолом и окрашенные соответствующими флуоресцентными метками исследуемого набора.

Согласно рекомендаций производителя [3] при секвенировании/ ресеквенировании для определения качественного состава достаточно длинных участков ДНК используется 8 мкл Ready-Reaction Mix на одну реакцию. Путем разведения 5X буфером для секвенирования были получены разбавленные смеси для проведения секвенсированной реакции в объеме 20 мкл.

В таблицах 1 и 2 приведены данные о качестве определения нуклеотидной последовательности при многократном разбавлении стандартного набора при проведении секвенирования в режимах FastSeq50_POP7 и StdSeq50_POP7, с использованием в качестве вспомогательных реактивов формамида HiDi® Formamide и формамида производства Acros Organics (Бельгия).

Таблица 1 – Качество определения нуклеотидной последовательности в режиме FastSeq50_POP7.

Номер пробы	Число п.о., определенных с вероятностью более 95%							
	Разбавление							
	2X		4X		6X		8X	
	HiDi	Acros	HiDi	Acros	HiDi	Acros	HiDi	Acros
1	230	228	214	208	188	186	141	137
2	217	210	216	208	191	182	165	149
3	221	213	216	206	183	178	158	149
4	236	228	219	210	189	180	161	154

Таблица 2 – Качество определения нуклеотидной последовательности в режиме StdSeq50_POP7.

Номер пробы	Число п.н., определенных с вероятностью более 95%							
	Разбавление							
	2X		4X		6X		8X	
	HiDi	Acros	HiDi	Acros	HiDi	Acros	HiDi	Acros
1	246	241	225	220	205	198	165	151
2	238	234	229	221	209	198	172	168
3	238	233	231	228	211	202	168	154
4	241	236	230	226	209	197	159	148

Впервые показаны ранее не описанные возможности разбавления Ready-Reaction Mix коммерческого набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 5X-буфером для проведения секвеновой реакции.

Варьированием соотношения реагентов была показана возможность существенной экономии дорогостоящих реагентов при секвенировании с использованием 50-см капилляра в форматах FastSeq50_POP7 (считывание ДНК-последовательности 4 проб в час) и StdSeq50_POP7 (4 пробы/2 часа, с улучшением качества определения последовательности на 15-17%) , что особенно важно для лабораторий, проводящих массовые скрининговые исследования.

Литература:

1. A new method for sequencing DNA / A.M. Maxam, W. Gilbert // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74, № 2. – P. 560–564.
2. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74, № 12. – P. 5463–5467.
3. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol / ©Applied Biosystems. 2005