

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 2005 г. А. Лиманский

*Институт микробиологии и иммунологии им. Мечникова АМН Украины,
ул. Пушкинская, 14, Харьков-57, 61057, Украина
E-mail: alex.lymunskiy@mail.ru*

*Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies,
Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan*

Поступила в редакцию 14.01.05 г.

С помощью атомно-силовой микроскопии визуализированы линейные молекулы ДНК, амплифицированные после проведения полимеразной цепной реакции. Измеренная контурная длина продукта полимеразной цепной реакции с размером последовательности в 1414 пар нуклеотидов составила (435 ± 15) нм. На основании вычисленного значения расстояния между нуклеотидами вдоль оси дуплекса, равного 0,31 нм, было предположено, что линейные молекулы ДНК на поверхности слюды, являющейся подложкой в методе атомно-силовой микроскопии, находятся в А-форме. Обсуждается влияние поверхностных свойств слюды и процедуры высушивания образца на конформацию адсорбированных молекул ДНК, а также возможные причины гауссова распределения контурной длины синтезированного ампликона.

Ключевые слова: ампликон, атомно-силовая микроскопия, полимеразная цепная реакция.

Новейшие молекулярно-генетические методы позволяют манипулировать с генами и их фрагментами с высочайшей точностью, вплоть до одного нуклеотида. Практически в каждой современной лаборатории молекулярной биологии используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для решения как прикладных, так и фундаментальных задач. Используя современные ПЦР-наборы в совокупности с праймерами, фланкирующими интересующий фрагмент генома, исследователи амплифицируют исследуемый фрагмент ДНК. После визуализации амплифицированного фрагмента ДНК посредством электрофореза и последующего окрашивания бромидом этидия, при условии наличия единственной полосы в геле, соответствующей исследуемому фрагменту ДНК, а также после проведения очистки от праймеров, нуклеотидов, ДНК-полимеразы, можно предположить, что образец содержит искомым фрагмент ДНК заданной длины с точностью до нуклеотида. Но такова ли ситуация в действительности? Соответствует ли контурная длина фрагментов ДНК, амплифицированных в полимеразной цепной реакции, теоретической длине ожидаемого фрагмента ДНК?

Сокращения: ПЦР - полимеразная цепная реакция, АСМ - атомно-силовая микроскопия.

Ответ на эти вопросы позволяет получить один из современных методов нанобиологии - атомно-силовая микроскопия (АСМ). Ранее было показано, что измерение контурной длины целых молекул ДНК, а также их рестрикционных фрагментов может быть легко выполнено с помощью АСМ и соответствующего программного обеспечения [1,2]. В данной работе фрагмент плазмидной ДНК pGEMEX длиной 1414 пар нуклеотидов был амплифицирован посредством полимеразной цепной реакции. Очищенный продукт ПЦР визуализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Была измерена контурная длина ампликона. Проведен статистический анализ распределения контурной длины амплифицированных фрагментов ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения ПЦР использовали линейную ДНК, полученную ферментативной обработкой суперспиральной ДНК pGEMEX длиной 3993 пар нуклеотидов (п.н.) (Promega, США) рестриктазой Seal (New England Biolabs, Англия). Сконструированные нами праймеры L1 и L2 ограничивали фрагмент ДНК, содержащий промотор T7 РНК-полимеразы и область терминации транскрипции. Схематиче-

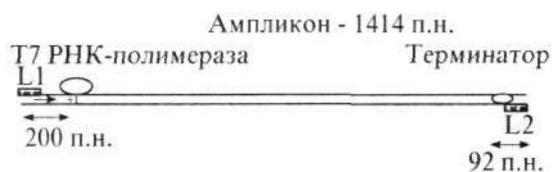


Рис. 1. Схематическое представление матрицы ДНК, используемой в данной работе. Праймеры, показанные прямоугольниками, фланкируют фрагмент ДНК рGEMEX длиной 1414 п.н., который содержит промотор и терминатор транскрипции T7 РНК-полимеразы.

ское представление амплифицируемого фрагмента ДНК длиной 1414 п.н. приведено на рис. 1. Праймеры L1 и L2, последовательности которых с соответствующими позициями на ДНК рGEMEX приведены ниже, были получены от Sigma (Япония):

5'-cgc tta caa ttt cca ttc gcc att c-3' - прямой праймер L1 (3748 - 3772),

5'-ctg att ctg tgg ata ace gta tta ccg-3' - обратный праймер L2 (1168 - 1142).

ПЦР с горячим стартом проводили в объеме реакционной смеси 50 мкл на амплификаторе GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, США) при следующих температурных и временных параметрах: начальная инкубация - 95°C, 2 мин, денатурация - 95°C, 1 мин, отжиг - 69 - 73°C, 1 мин, синтез - 74°C, 1 мин, количество циклов - 35. Температуру отжига определяли теоретически с помощью программы Oligo. С целью минимизации амплификации неспецифических фрагментов проводили несколько постановок ПЦР при различных температурах отжига - 69, 71, 73°C.

Для визуализации ампликонов 15 мкл ПЦР-продукта разделяли посредством электрофореза в 2% агарозном геле с последующей окраской бромидом этидия.

Для очистки амплифицированного фрагмента ДНК использовали следующую процедуру. После проведения электрофореза вырезали полоску геля, содержащую ампликон, с использованием в качестве детектора длинноволнового УФ-источника излучения низкой интенсивности (BioRad, США). Для дальнейшей очистки ампликона от нуклеотидов, праймеров и ДНК-полимеразы использовали набор QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Япония) согласно рекомендациям производителя, а также экстракцию фенол/хлороформом с последующим осаждением этанолом.

Для проведения ПЦР использовали термостабильную ДНК-полимеразу высокой точно-

сти двух видов - Pyrobest ДНК-полимеразу (TaKaRa Co., Япония) и Invitrogen Platinum ДНК-полимеразу (Invitrogen, Япония).

В качестве подложки для АСМ применяли свежесколотую слюду. Для нанесения ДНК на слюду использовали 10 мМ NEPERES буфер, содержащий 2,5 мМ MgCl₂. Каплю раствора ДНК с концентрацией 0,1-1 мкг/мл в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl, рН 7,9, 1 мМ ЭДТА) объемом 10 мкл наносили на полоску слюды размером 1 см², промывали после 2-минутной экспозиции деионизованной водой, обдували потоком аргона и выдерживали образец при давлении 100 мм рт. ст. в течение 20 минут. Для приготовления буферных растворов и образцов ДНК использовали ультрачистую воду с удельным сопротивлением ~ 17 МОмсм, полученную с помощью установки Milli Q (Millipore, США).

АСМ-изображения ДНК были записаны с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) посредством вибрирующего варианта (tapping mode) АСМ в воздухе в режиме «высота» с использованием OMCL-TR кантилеверов (Olympus Optical Co., Япония) с резонансной частотой 340 - 360 кГц и константой жесткости 42 Н/м. Изображения были получены размером 512 x 512 пикселей, сглажены и проанализированы с помощью программного обеспечения Nanoscope (версия 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На точность и специфичность ПЦР влияют несколько параметров, в том числе степень гомологии праймеров, температура отжига праймеров, точность выбранной ДНК-полимеразы, концентрация ионов магния, состав реакционного буфера для ПЦР. Повышению точности ПЦР способствует также применение варианта ПЦР с горячим стартом, использование амплификатора с высокими значениями скоростей нагрева и охлаждения. Поэтому для проведения ПЦР мы использовали высокоскоростной амплификатор и две высокоточные ДНК-полимеразы Invitrogen Platinum и Pyrobest Takara, которые характеризуются минимальной ошибкой синтеза. Кроме того, повышение температуры отжига позволило минимизировать образующиеся неспецифические продукты амплификации. Из приведенной на рис. 2а электрофореграммы ампликонов при различных значениях $T_{от}$ видно, что при $T_{от}$ - 71°C (дорожки 1 и 2) образуется достаточно большое количество ампликона для обеих ДНК-полимераз, отсут-

ствуют низкомолекулярные неспецифические продукты амплификации, однако видны следовые количества высокомолекулярных неспецифических ПЦР-продуктов, о чем свидетельствует шлейф выше интенсивной полосы ампликонов. Повышение $T_{от}$ до 73°C приводит к значительному уменьшению количества синтезированного ампликона с помощью ДНК-полимеразы Pyrobest Takara (дорожка 3), в то время как для ДНК-полимеразы Invitrogen Platinum полоса ампликона отсутствует (дорожка 4), что указывает на отсутствие синтеза ПЦР-продукта при данных условиях. После вырезания полос ампликонов из дорожек 1 и 2 агарозного геля (рис. 2а) и проведения соответствующей процедуры очистки (см. Материалы и методы) исследуемые образцы продуктов ПЦР, содержащие только ожидаемый фрагмент ДНК длиной 1414 п.н. (как можно видеть из рис. 2б), были визуализированы посредством АСМ. АСМ-изображения ПЦР-продукта после проведения ПЦР с ДНК-полимеразой Pyrobest Takara и Invitrogen Platinum приведены на рис. 3а и 3б соответственно.

Образцы ДНК были адсорбированы на поверхности свежесколотой слюды в HEPES-буфере, содержащем ионы магния. В этом случае поверхность слюды характеризуется меньшей степенью адсорбции по сравнению с другими известными методами обработки слюды, такими как аминосиликонирование поверхности слюды в жидкости [3,4] и парах производных аminosиланов [5]. Поэтому образцы ДНК, помещенные на поверхность слюды в присутствии ионов магния, подвержены меньшему влиянию поверхностных свойств слюды на конформацию ампликонов. Авторы работ [6,7] считают, что при таком способе подготовки образца для АСМ осуществляется сдвиг равновесия от трехмерной структуры ДНК в растворе к двумерной на поверхности слюды. При этом после потери одной степени свободы молекулы ДНК имеют возможность двигаться в двух оставшихся направлениях. График гауссова распределения контурной длины ампликонов ДНК показан на рис. 4. Полученное значение контурной длины исследуемых ампликонов - (435 ± 15) нм - меньше теоретического значения длины молекул ДНК в В-форме на $\sim 10\%$. Ранее в работе [7] также было отмечено, что контурная длина молекул ДНК, измеренная на АСМ-изображениях молекул в воздухе, всегда меньше, чем теоретическая длина молекул ДНК в В-форме в предположении, что расстояние между парами нуклеотидов составляет 0,34 нм. Возможными причинами наблюдаемого эффек-

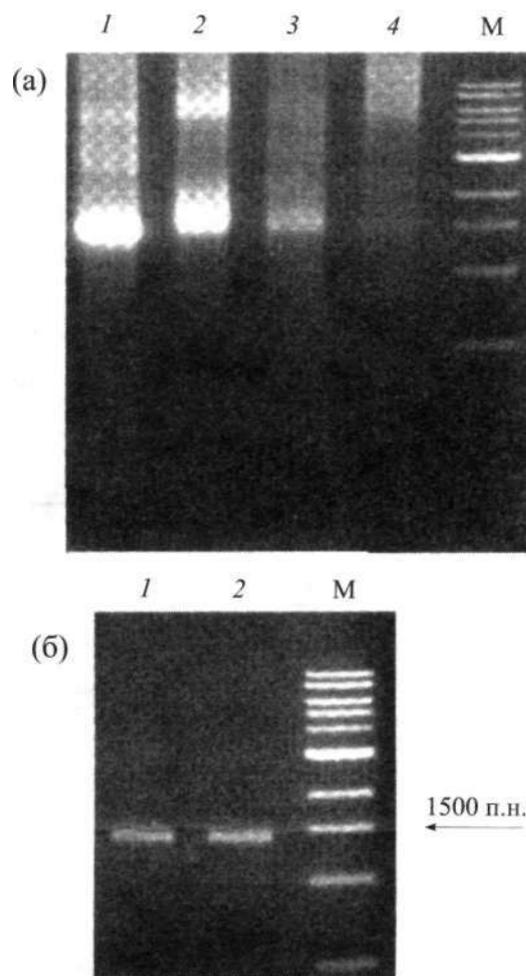


Рис. 2. Амплификация фрагмента линейной ДНК рGEMEX при различных условиях проведения ПЦР. (а) -1,2- температура отжига $T_{от} = 71^{\circ}\text{C}$; 3, 4 - $T_{от} = 73^{\circ}\text{C}$. 1,3- ДНК-полимераза Pyrobest TaKaRa; 2, 4 - ДНК-полимераза Invitrogen Platinum. М - маркер молекулярной массы (выделен фрагмент длиной 3000 п.н.). (б) - Очистка ампликонов после проведения гель-электрофореза с последующим вырезанием полосы ПЦР-продукта с использованием набора для экстракции QIAquick gel extraction kit, экстракции фенол/хлороформом и пересаживанием этанолом. Амплификация с ДНК-полимеразой: 1 - Pyrobest TaKaRa; 2 - Invitrogen Platinum. М - маркер молекулярной массы (выделен фрагмент длиной 3000 п.н.).

та авторы [7] считают: недостаточное разрешение атомно-силового микроскопа; неточности алгоритма расчета контурной длины ДНК; наличие процедуры высушивания образца ДНК перед визуализацией посредством АСМ. Однако, по нашему мнению, первые две из перечисленных причин не могут привести к статистически значимому уменьшению контурной длины ДНК. Такое уменьшение длины линейной молекулы на ~ 45 нм для ампликона длиной

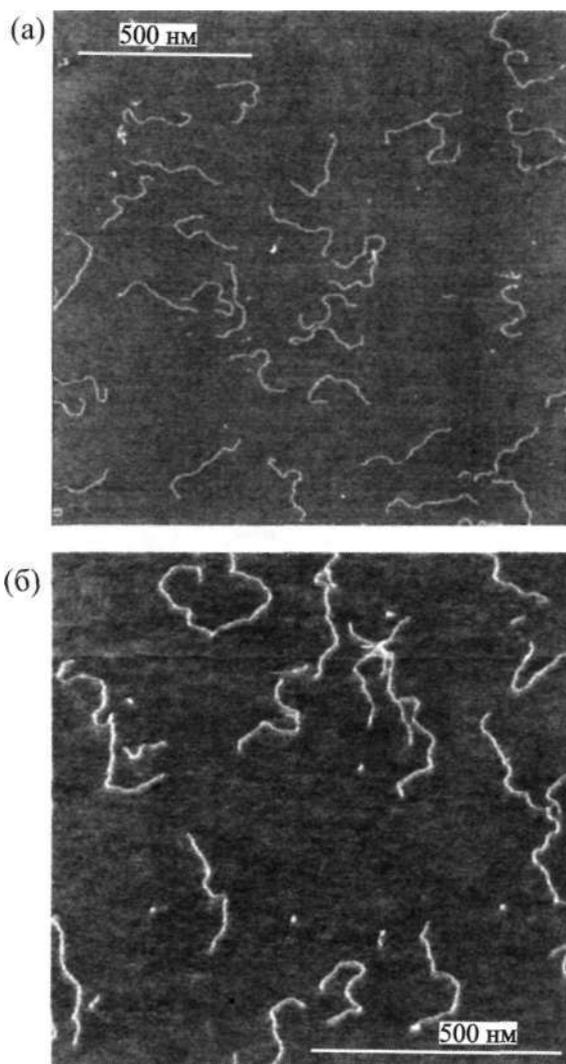


Рис. 3. Изображение амплифицированного фрагмента ДНК рGEMEX, полученное методом атомно-силовой микроскопии. Размер кадра: (а) - 2,2 x 2,2 мкм; (б) - 1,5 x 1,5 мкм. Ожидаемая длина ампликона составляет 1414 п.н., или 485 нм в предположении В-формы ДНК. Шкала градаций оттенков от черного до белого соответствует диапазону высоты объекта 0 - 5 нм. Изображения ДНК были записаны в воздухе в режиме tapping mode.

1414 п.н., или 480 нм в предположении В-формы ДНК, существенно выше погрешности измерения длины с помощью программного обеспечения, а также значительно больше разрешающей способности АСМ для биомолекул. Высушивание же образца ДНК после нанесения на поверхность слюды может приводить к переходу молекул из В-формы, характерной для раствора, в конформацию, отличную от В-формы, что, в свою очередь, может уменьшать контурную длину молекул ДНК.

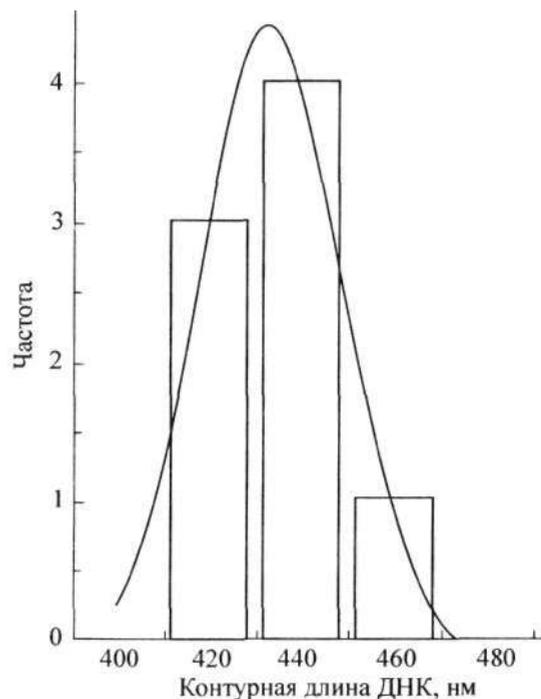


Рис. 4. Контурная длина ампликонов после проведения ПЦР и последующей очистки, измеренная по АСМ-изображениям ДНК (рис. 3). Линия представляет гауссово распределение.

Зная контурную длину ампликона ($L = 435$ нм), размер последовательности которого составляет 1414 п.н., мы определили расстояние между нуклеотидными остатками ампликона: $h = 0,31$ нм. Из наиболее распространенных А-, В- и Z-семейств двойной спирали ДНК наибольшие колебания расстояния h между нуклеотидами характерны для А-формы ДНК - от 0,26 до 0,33 нм согласно данным рентгеноструктурного анализа. Также известно, что в А-форму переходят молекулы ДНК при уменьшении относительной влажности ниже 76% [8,9]. Следует отметить, что приведенные выше литературные данные были получены для кристаллической формы ДНК в волокнах. При экстраполяции же этих данных на молекулы ДНК, находящиеся в растворе, а также на геномную ДНК *in vivo*, на наш взгляд, необходимо учитывать несколько важных моментов.

Кроме процедуры высушивания образца, которая может индуцировать переход В \rightarrow А молекул ДНК, существенное влияние на конформацию ДНК оказывают поверхностные свойства слюды - подложки, на которой адсорбированы молекулы ДНК. Известно, что поверхностные свойства слюды, и прежде всего поверхностная плотность заряда, в водном растворе электролита определяются суперпозицией

поверхностных зарядов в соответствии с их множественными изоэлектрическими точками. Поскольку на поверхности слюды экспонируются силанольные группы в соотношении, значительно превышающем количество имино- и аминогрупп, поверхность слюды отрицательно заряжена в широком интервале рН [10], включая и нейтральные значения рН, при которых адсорбируются молекулы ДНК для АСМ-визуализации.

В то же время известно, что, например, при силиконировании производными аminosилана значения pK аминогрупп аminosилана вблизи поверхности слюды понижаются на 3-6 единиц рН по сравнению со значением pK аминогрупп в растворе [11,12], что свидетельствует о непосредственном влиянии поверхности слюды на адсорбированные на ней молекулы.

Наши данные коррелируют с результатами ряда других работ [7,13]. В работе [7] посредством АСМ были измерены значения контурной длины четырех фрагментов ДНК длиной 1008 - 1055 п.н. Определенное нами по данным работы [7] значение l для этих ампликонов составило 0,31 - 0,33 нм, а для фрагмента ДНК длиной 538 п.н. (согласно работе [13]) - 0,32 нм, что также соответствует характерному расстоянию между парами нуклеотидов вдоль оси спирали А-формы ДНК.

Визуализация и измерение длины единичных молекул ДНК после амплификации в полимеразной цепной реакции показали, что после проведения ПЦР синтезируются фрагменты ДНК не строго фиксированной длины (как можно было ожидать и о чем свидетельствуют результаты гель-электрофореза после проведения ПЦР), а ампликоны с распределением контурной длины. Неоднородность контурной длины ампликонов в нашей работе составляет ~ 7%, а в работах [7] и [13] - ~ 11% и 6% соответственно. По нашему мнению, наличие гауссова распределения контурной длины ампликонов, визуализированных АСМ, может быть объяснено не ошибками ДНК-полимеразы при синтезе ампликона (вероятность которых при синтезе ампликона длиной ~ 1400 п.н. крайне низка), а неоднородной поверхностной плотностью заряда слюды, на которой адсорбированы молекулы ДНК в присутствии ионов магния. Локальное распределение плотности заряда вблизи сайтов адсорбции молекулами ДНК может приводить к изменению конформации фрагмента ДНК, например, к переходу В → А, что, в свою очередь, приводит к уменьшению контурной длины ДНК.

ВЫВОДЫ

Измерение с помощью атомно-силовой микроскопии контурной длины линейных молекул ДНК, амплифицированных после проведения полимеразной цепной реакции, показало, что, несмотря на использование высокоточных видов термостабильной ДНК-полимеразы, в процессе ПЦР синтезируются фрагменты молекул ДНК с контурной длиной (435 ± 15) нм. Определенное нами расстояние между нуклеотидными остатками $h = 0,31$ нм вдоль оси спирали дуплекса находится в пределах величины, характерной для ДНК в А-форме. Сделано предположение, что основными факторами, индуцирующими переход В → А молекул ДНК, адсорбированных на поверхности свежесколотой слюды, после высушивания образца в буфере, содержащем ионы магния, являются как сама процедура высушивания образца, так и поверхностные свойства слюды.

Автор выражает благодарность д-ру А. Шестопаловой за полезные дискуссии и д-ру О. Лиманской за критические замечания и помощь при подготовке статьи.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Japanese Society for the Promotion of Science (Япония).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lvubchenko Y., Jacobs B., Lindsav S.* // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20, № 15. P. 3983-3986.
2. *Lyubchenko Y., Gall A., Shlyakhtenko L., Harrington R., Jacobs B., Oclen P., Lindsav S.* // J. Biomol. Structure and Dynamics. 1992. V. 10, № 3. P. 589-606.
3. *Okajima T., Arakawa H., Alum M., Sekiguchi H., Ikai A.* // Biophys. Chem. 2004. V. 107. P. 51-61.
4. *Kodama T., Ohtuni H., Arakawa H., Ikai A.* // Chem. Phys. Lett. 2004. V. 385. P. 507-511.
5. *Лиманский А.* // Биополимеры и клетка. 2001. Т. 17, № 4. С. 292-297.
6. *Berge T., Jenkins N., Hopkirk R., Waring M., Edwardson J., Henderson R.* // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30, № 13. P. 2980-2986.
7. *Rivetti C., Codeluppi S., Died G., Bustamante C.* // Hi. Mol. Biol. 2003. V. 326. P. 1413-1426.
8. *Perez A., Nov A., Lankas F., Luaue Q., Orozco M.* // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32, № 20. P. 6144-6156.
9. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. 584 с.
10. *Butt H.* // Biophys. J. 1991. V. 60. P. 1438-1444.
11. *Vezenov D., Nov A., Rozsnvai L., Lieber C.* // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 2006-2015.

12. Zhang H., He H., Wang J., Mu T., Liu Z. // *Appl. Phys.* 1998. V. A66. P. S. 269-S271.
13. Lvsetska M., Knoll A., Boehringer D., Hev T., Krauss G, Kruusch G. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30, № 12. P. 2686-2691.

The Visualization of Amplicons after Polymerase Chain Reaction

A. Limanskii

*Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine,
ul. Pushkinskaya 14, Kharkov, 61057 Ukraine*

*Laboratory of Plasma Membrane and Nuclear Signaling, Graduate School of Biostudies,
Kyoto University, Kyoto, 606-8502, Japan*

Linear DNA molecules amplified by the polymerase chain reaction were visualized by atomic force microscopy. The measured contour length of the PCR product of 1414 bp sequence was 435 ± 15 nm. Considering that the calculated value of the distance between the nucleotides along the duplex axis is 0.31 nm, it was assumed that linear DNA molecules on the surface of mica, which serves as a support in the atomic force microscopy method, are in the A form. The influence of surface properties of the mica and the sample drying procedure on the conformation of adsorbed DNA molecules is discussed. Possible reasons for the Gaussian distribution of the contour length of the synthesized amplicon are considered.

Key words: amplicon, atomic force microscopy, polymerase chain reaction