

Форма́мид и глицерин в секвенировании GC-богатой ДНК

С. М. Кваша^{1, 2}, Е. Р. Забаровский^{2, 3, 4}, В. И. Кашуба^{1, 2, 3}, А. В. Рындич¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
E. mail: kvashasergei@usa.net

² Центр геномных исследований, Каролинский институт
Стокгольм, 17177, Швеция

³ Микробиологический и опухолевый центр, Каролинский институт
Стокгольм, 17177, Швеция

⁴ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Ул. Вавилова, 32, 117984, Москва, Россия

Известно, что формамид и глицерин повышают качество секвенирования. В данной работе проведено сравнение влияния различных концентраций формамида и глицерина на секвенирование GC-богатой матрицы и показано, что наиболее эффективным является добавление к реакционной смеси 5 % формамида или 7,5–10 % глицерина.

5'-Нетранслируемые области факторов роста, транскрипционных факторов, компонентов сигнальной трансдукции имеют высокий GC-состав [1]. В то же время секвенирование GC-богатой ДНК связано с определенными трудностями из-за высокой температуры ее плавления. GC-богатые области ДНК могут образовывать вторичные структуры, затрудняющие на определенных стадиях прохождения полимеразной реакции, в частности, при денатурации матрицы, отжиге праймеров, синтезе нуклеотидной цепи полимеразой [2].

В предыдущих сообщениях было показано, что добавление к реакционной смеси таких реагентов, как формамид и глицерин, улучшает качество секвенирования GC-богатой ДНК. Но при этом отсутствовало сравнение влияния различных концентраций формамида и глицерина на этот процесс. Поэтому целью наших экспериментов было определение оптимальной концентрации формамида и глицерина для эффективного секвенирования GC-богатой ДНК.

В качестве матрицы для секвенирования был использован 5'-конец (1–2031 п. н.) гена калиевого канала человека Kv1.7 (регистрационный номер в GenBank AJ310479), содержащего 78,6 % гуаниновых и цитозиновых нуклеотидов.

Секвенирование осуществляли с помощью ABI Prism[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) на секвенаторе ABI 310 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA), согласно протоколу изготовителя.

Предварительные эксперименты показали, что секвенирование 5'-конца гена калиевого канала человека Kv1.7 без добавления формамида и глицерина было неэффективным (150 п. н.).

Не наблюдалось улучшений в эффективности секвенирования после денатурации ДНК при помощи NaOH [3] или после прогрева ДНК при 94 °C на протяжении 5 мин перед полимеразной реакцией. Повышение температуры денатурации до 96 °C также не оказало никакого влияния на качество секвенирования.

Сан и др. [4] предположили, что быстрая ренатурация матрицы из-за высокого GC-состава может препятствовать амплификации ДНК, что

приводит к низкой эффективности секвенирования. Поэтому были проведены реакции секвенирования с добавлением формамида и глицерина в различных концентрациях.

В предыдущих сообщениях было показано, что добавление к реакционной смеси 10 % формамида значительно повышает эффективность секвенирования [5, 6].

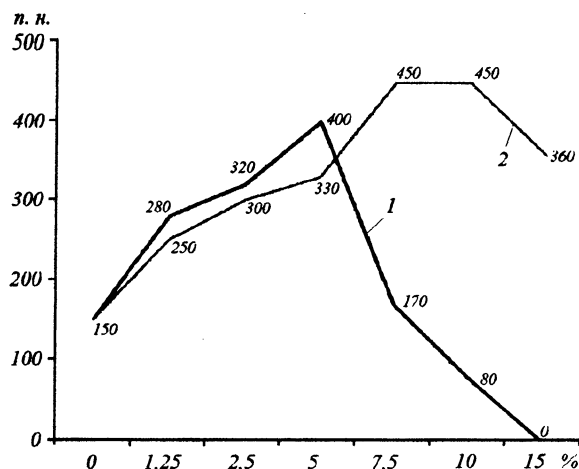
Присутствие формамида в реакционной смеси в низких концентрациях (1,25 и 2,5 %) позволило незначительно повысить эффективность секвенирования 5'-конца гена калиевого канала человека Kv1.7 (280 и 310 п. н. соответственно). Присутствие же формамида в концентрации 5 % повысило эффективность этого процесса до 400 п. н. Дальнейшее увеличение концентрации формамида (7,5 и 10 %) привело к значительному снижению эффективности секвенирования (170 и 80 п. н. соответственно). Концентрация формамида 15 % в реакционной смеси полностью ингибировала реакцию (рисунок).

Таким образом, присутствие в реакционной смеси 5 % формамида является наиболее эффективным для секвенирования 5'-конца гена калиевого канала человека Kv1.7, а не 10 %, как было описано для секвенирования гена p53 [5]. Это можно объяснить использованием в полимеразных реакциях различных ферментов. Также нужно отметить тот факт, что в секвенировании гена p53 была использована лишь одна концентрация формамида (10 %) и не была проведена проверка различных концентраций формамида для выбора оптимальной.

Присутствие глицерина в реакционной смеси в низких концентрациях (1,25 и 2,5 %) привело к возрастанию эффективности этого процесса (250 и 300 п. н. соответственно). Концентрация глицерина 5 % в реакционной смеси повысила эффективность секвенирования лишь до 330 п. н. Одинаковое влияние на секвенирование имело присутствие в реакционной смеси 7,5 и 10 % глицерина (450 п. н.). Повышение концентрации глицерина до 15 % привело к снижению эффективности секвенирования (360 п. н.) (рисунок).

Таким образом, присутствие в реакционной смеси 7,5—10 % глицерина является оптимальной концентрацией для секвенирования 5'-конца гена калиевого канала человека Kv1.7.

Эффект формамида может объясняться полной денатурацией GC-богатой ДНК и предотвращением ренатурации одноцепочечных молекул ДНК. В то же время формамид понижает устойчивость фермента к высокой температуре. Поэтому 5 %-я концентрация формамида является оптимальной



Влияние различных концентраций формамида (1) и глицерина (2) на эффективность секвенирования

для секвенирования GC-богатой матрицы. Дальнейшее увеличение его концентрации приводит к уменьшению эффективности секвенирования.

Предотвращение ренатурации одноцепочечных молекул ДНК и повышение устойчивости фермента к высокой температуре может объяснить эффект глицерина. Присутствие 7,5—10 % глицерина в реакционной смеси является оптимальной концентрацией для секвенирования GC-богатой матрицы. Однако увеличение его концентрации до 15 % вызывает падение эффективности секвенирования. Возможно, глицерин в концентрации выше 10 % ингибирует активность ферментов.

В заключение следует отметить, что в наших экспериментах показано влияние различных концентраций формамида и глицерина на эффективность секвенирования GC-богатой ДНК. Наилучшие результаты были получены при добавлении к реакционной смеси 5 % формамида или 7,5—10 % глицерина.

S. M. Kvasha, E. R. Zabarovsky, V. I. Kashuba, A. V. Rynditch

Formamide and glycerol in sequencing of GC-rich DNA

Summary

Formamide and glycerol are known to increase the sequencing efficiency. We compared the ability of different concentration of these co-solvents to improve the sequencing results of GC-rich template. Herein, we report that addition of 5 % formamide and 7.5—10 % glycerol is the most effective for sequencing GC-rich templates.

С. М. Кваша, Є. Р. Забаровський, В. І. Кашуба, А. В. Риндич

Формамід і гліцерин у секвенуванні GC-багатої ДНК

Резюме

Відомо, що формамід та гліцерин підвищують ефективність секвенування. В даній роботі порівняно вплив різних концентрацій формаміду та гліцерину на секвенування GC-багатих матриць і показано, що найефективнішим є додавання до реакційної суміші 5 % формаміду або 7,5–10 % гліцерину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control // *J. Cell Biol.*—1991.—115, N 4.—P. 887—903.
2. Hengen P. N. Cycle sequencing through GC-rich regions // *Trends Biochem. Sci.*—1996.—21, N 1.—P. 33—34.

3. Agarwal R. K., Perl A. PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH // *Nucl. Acids Res.*—1993.—21, N 22.—P. 5283—5284.
4. Sun Y., Hegamyer G., Colburn N. H. PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun // *Biotechniques.*—1993.—15, N 3.—P. 372—374.
5. Zhang W., Reading C., Deisseroth A. B. Effect of nucleotide concentration on specificity of sequence amplification // *Trends Genet.*—1992.—8, N 10.—P. 332.
6. Zhang W., Hu G., Deisseroth A. Improvement of PCR sequencing by formamide // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19, N 23.—P. 6649.

УДК 577.113.5
Надійшла до редакції 22.01.2001