

ОПТИМИЗАЦИЯ КЛОНИРОВАНИЯ ДЛИННОРАЗМЕРНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК В КОНСТРУКЦИИ pGEM, СОДЕРЖАЩЕЙ КОНЦЕВЫЕ ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ ЛИНЕЙНЫХ ПЛАЗМИД ИЗ МИТОХОНДРИЙ *ZEА МАУS*

А.В. Панфилов¹, Ю.М. Константинов², М.В. Кулинченко²

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск,
e-mail: panfilov.alexander@mail.ru

²ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: mk100171@yahoo.com

Оптимизация условий (реакционное пространство, термодинамические и кинетические факторы) клонирования молекул длинноразмерных фрагментов ДНК является важной практической и экспериментальной задачей в современной молекулярной биологии, генетических исследованиях и структурной биохимии. Анализ реакционного пространства подразумевает оптимизацию проведения условий реакции в водной, водно-органической среде с изменением рН состава, концентрации реагента и субстрата, катализатора (фермента) и кофактора матричной реакции (Parker et al., 2007). Термодинамический параметр включает в себя изменение энтропийного фактора, другими словами, изменение температурного режима матричного синтеза двунитевой и кольцевой ДНК при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществление матричного синтеза возможно в том случае, если ферментативный процесс протекает, в основном, с наименьшим энергетическим барьером (так называемая энергия активации реакции E_a) или ферментативная реакция идет по-другому кинетическому маршруту - это кинетический фактор (Лаврик, 2012).

Клонирование позволяет “гибко манипулировать” ДНК-последовательностями, что облегчает матричный синтез заданных молекулярных конструкций, как двунитевых, так и кольцевых молекул ДНК (Marchand et al., 2012). Целью работы является оптимизация условий клонирования (рис.1) молекул ДНК размером 7-10 т.п.н. в генетических конструкциях pGEM-IRSI-IR2.3 и pGEM-IR2.3 (размером 3,4 и 3,24 т.п.н. соответственно), содержащих концевые инвертированные повторы линейных митохондриальных плазмид из кукурузы (*Zea mays*), SI (6,4 т.п.н.) и S3 (2,3 т.п.н.).

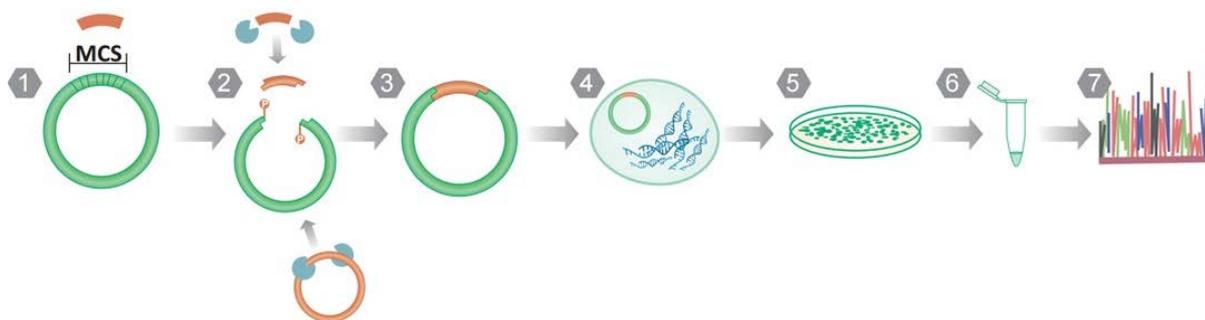


Рис. 1. Схема клонирования (по: GenScriptUSAInc, 2012).

1 – амплифицируемая плаزمида и длинноразмерный фрагмент ДНК, содержащие сайты рестрикции; 2 – ферментативный гидролиз фосфородиэфирных связей субстрата ПЦР и вектора эндонуклеазами рестрикции; 3 – лигирование продуктов рестрикции; 4, 5 – биотрансформация клеточной культуры *E. coli*; 6 – изолирование рекомбинантной плазмиды, 7 – секвенирование рекомбинантной последовательности ДНК.

В представленной работе использовалась классическая амплификация интересующей последовательности фрагмента ДНК из митохондриального генома *Brassica napus* (GenBank: AP006444.1; позиции 120051-130588) с помощью олигонуклеотидов (праймеров), в последовательности которых, в позиции 5', включены сайты для распознавания эндонуклеазами рестрикции. В нашей схеме клонирования были использованы сайты рестрикции *Bam*HI, *Eco*RV, *Mlu*I, *Nco*I, *Pst*I. Для оптимизации условий обработки ДНК эндонуклеазами рестрикции реакцию проводили в 20 мкл и варьировали следующие параметры: буферный раствор, способ очистки ДНК, объем пробы ДНК. Буферный раствор добавляли исходя из концентрации полученного субстрата (ПЦР продукта) и сайта рестрикции соответствующего длиннорамерного фрагмента ДНК по 2 мкл (рис. 2):

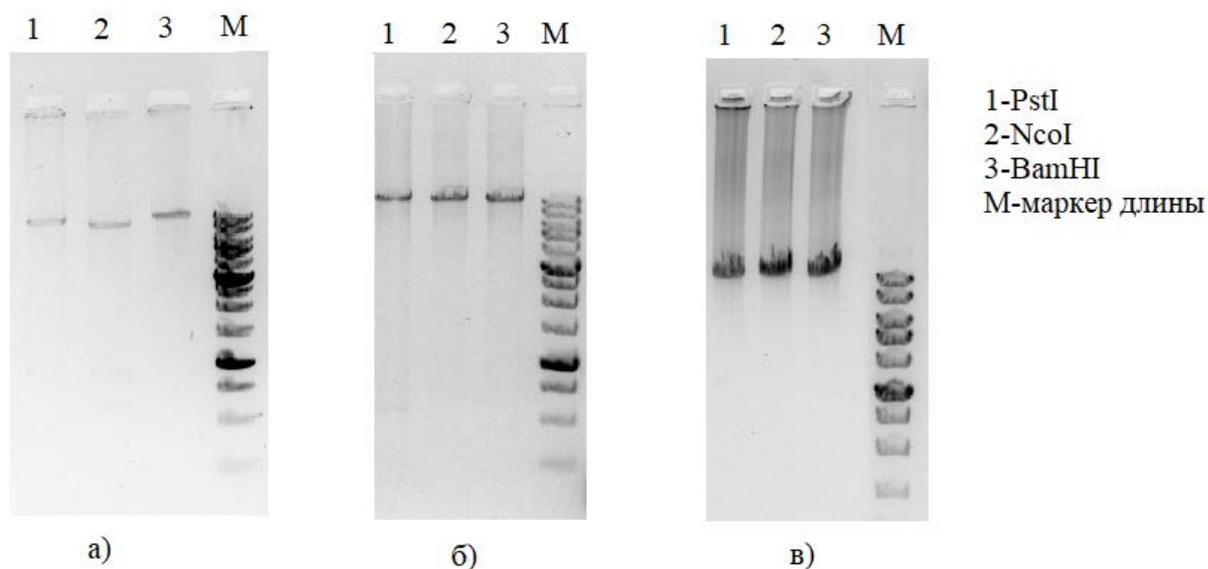


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения рестрицированного продукта ПЦР в зависимости от условий проведения матричного синтеза:

а) оптимизация буферного раствора; б) оптимизация условий очистки; в) оптимизация объема пробы ДНК.

Анализируя результат электрофоретического разделения ПЦР продукта при оптимизации буферной среды (рис. 2, а), следует сделать вывод, что полученные молекулы ПЦР не фрагментированы, содержат минимальную концентрацию олигомерных фрагментов и не включившихся белок-ДНК комплексов. Что касается оптимизации условий очистки ПЦР продукта (рис. 2, б), наилучшие результаты были достигнуты при экстракции водно-органической фазой фенол-хлороформ-изопропанольным раствором, при этом мы наблюдаем увеличение концентрации ПЦР продукта. Оптимизируя объем рестриktionной среды (реакционное пространство составляло 40 мкл), рассчитанный из единицы активности фермента, пришли к результату, что увеличение реакционного объема приводит к полной фрагментации субстрата ПЦР (рис. 2, в). При этом, мы наблюдаем частичную фрагментацию ПЦР продукта, возможно это происходит из-за того, что фенол частично вступает во взаимодействие с кофактором (Mg^{2+}) полимеразной реакции.

Таким образом, при пошаговом анализе условий клонирования длиннорамерных фрагментов ДНК, мы пришли к следующим заключениям: (1) не единичный, а комбинация буферов позволяет синтезировать в ходе полимеразной цепной реакции цельные фрагменты молекул ДНК, (2) для получения заданных молекулярных конструкций определенной размерности в реакции рестрикции оптимально использовать интервал реакционного объема 10–20 мкл.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00603), с использованием оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.

Литература

Лаврик О.И., Дырхеева Н.С. Основы ферментативного катализа. – М.: Наука, 2012. – С. 95.

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. Molecular Cell Biology, 4th edition. – New York Book. – 2000.

Marchand J.A., Peccoud J. Building block synthesis using the polymerase chain assembly method // *Methods Mol Biol.* – 2012. – V. 852. – P. 3–10.

Parker J.B., Bianchet M.A., Krosky D.J., Friedman J.I. Enzymatic capture of an extrahelical thymine in the search for uracil in DNA // *Nature.* – 2007. – V. 449. – P. 433–437.