



УДК 547.963.32.057:577.113.083.3

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЗОНДОВ
И ИХ ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
В НЕРАДИОАКТИВНЫХ ГИБРИЗАЦИОННЫХ ТЕСТАХ

Бросалина Е. В., Власов В. В., Грачев С. А.,
Демченко Е. Н.***

*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского
отделения Академии наук СССР;*

** Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;*

*** Институт клинической иммунологии Сибирского отделения
Академии медицинских наук СССР, Новосибирск*

Предлагаются простые способы синтеза 2,4-динитрофенильных, дансильных или биотинных производных нуклеиновых кислот. На первой из двух стадий синтеза в полинуклеотидную цепь вводится первичная аминогруппа переаминированием цитидиновых звеньев *O*-(4-аминобутил)гидроксиламином или же меркурированием их с последующей обработкой β-меркаптоэтиламино. Продемонстрирована возможность использования одноцепочечной ДНК, несущей 2,4-динитрофенильные группы, в качестве нерадиоактивного гибридизационного зонда. Dnp-ДНК-дуплексы детектировали с помощью мышиных антител на 2,4-динитрофенильные группы с последующей обработкой конъюгатом вторых антител с пероксидазой. Использование катализируемой пероксидазой хемилюминесцентной реакции окисления люминола в присутствии перекиси водорода позволяет определить 10 нг ДНК-зонда.

Использование в качестве гибридизационных зондов нерадиоактивно меченных нуклеиновых кислот может сделать метод молекулярной гибридизации доступным для широкого использования в научных и прикладных исследованиях [1, 2]. Одно из основных направлений развития нерадиоактивных гибридизационных методов в настоящее время связано с использованием комплексов биотин-авидин (или стрептавидин) [3]. Биотинированные ДНК-зонды по завершении гибридизации выявляют с помощью конъюгатов авидина и ферментов, способных катализировать образование окрашенных продуктов. Получают эти зонды с помощью нуклеотрансляции в присутствии биотинированного аналога dTTP [4] или dCTP [5], являющихся субстратами ДНК-полимеразы I *E. coli*.

Ферментативный метод биотинирования ДНК имеет ряд недостатков, связанных с необходимостью использования высокоочищенных ферментов, специальных биотинированных субстратов, подбора условий ферментативной реакции для данного типа ДНК-зонда. Другой используемый подход — не прямое мечение нуклеиновых кислот с помощью биотинированных белков [6, 7] — также не всегда приемлем, поскольку накладывает определенные ограничения на условия проведения гибридизации.

Более удобным, по нашему мнению, является введение функциональных групп (в том числе биотиновой) в ДНК-зонды путем прямой химической модификации ДНК. На перспективность этого подхода указывают

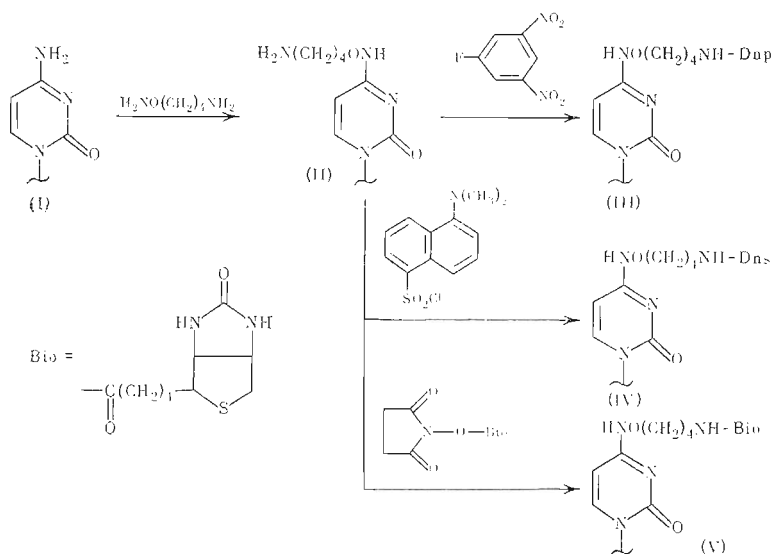
Использованы следующие нестандартные сокращения: Dns, Dnp, Bio — производные, содержащие соответственно дансильную, 2,4-динитрофенильную или биотиновую группы; оцДНК — одноцепочечная, дцДНК — двуцепочечная ДНК; БСА — бычий сывороточный альбумин; Dnp-hg-оцДНК — ДНК, несущая динитрофенильные группы, введенные с помощью модификации ацетатом ртути; Dnp-оцДНК — ДНК, несущая динитрофенильные группы, введенные с помощью переаминирования цитидиновых звеньев. В работе использовали олигонуклеотиды только дезоксирибы, поэтому префикс «d» всюду опущен.

результаты, полученные в опытах по химической модификации нуклеиновых кислот *N*-ацетоксид-*N*-2-ацетиламинофлуореном и детекции модифицированных молекул с помощью специфических антител [8], а также данные работы [9], в которой биотин ковалентно присоединяли к ДНК действием фотоактивируемого производного биотина — *N*-(4-азидо-2-нитрофенил)-*N'*-(*N*-*d*-биотинил-3-аминопропил)-*N*-метил-1,3-пропандиамина.

Цель настоящей работы состоит в разработке простого химического метода введения биотиновой или другой гаптенной группы в нуклеиновые кислоты, а также исследование возможности использования таких модифицированных нуклеиновых кислот в качестве зондов для гибридизационного анализа.

В первом использованном нами подходе ДНК модифицировали в две стадии: путем переаминирования цитидиновых звеньев (I) в составе ДНК обработкой *O*-(4-аминобутил)гидроксиламином и последующего ацилирования первичных аминогрупп (II) с помощью 2,4-динитрофторбензола, дансилхлорида или *N*-оксисукцинимидного эфира биотина (производные (III), (IV) и (V) соответственно (схема 1)).

Схема 1



Условия переаминирования были выбраны на основании данных о кинетике реакции, которые в свою очередь получали с помощью электрофоретического анализа продуктов модификации олигонуклеотидов (рис. 1). В случае олигонуклеотида рААСА (VI), содержащего единственный цитозинный остаток, образуется продукт, обладающий меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходный олигонуклеотид (рис. 2). Другой олигонуклеотид, рАСССТГТСССАГТ (VII), дает смесь модифицированных на разную глубину производных, которые хорошо разделяются электрофорезом (кроме увеличения молекулярной массы каждый остаток приносит положительно заряженную в условиях электрофореза первичную аминогруппу, рис. 1, 2). Отметим, что олигонуклеотидные производные с высокой степенью модификации обладают пониженной растворимостью в нейтральных буферных растворах, но легко растворимы в слабощелочных растворах (рН 9,5) за счет частичного депротонирования аминогрупп и, по-видимому, разрушения внутренних солей.

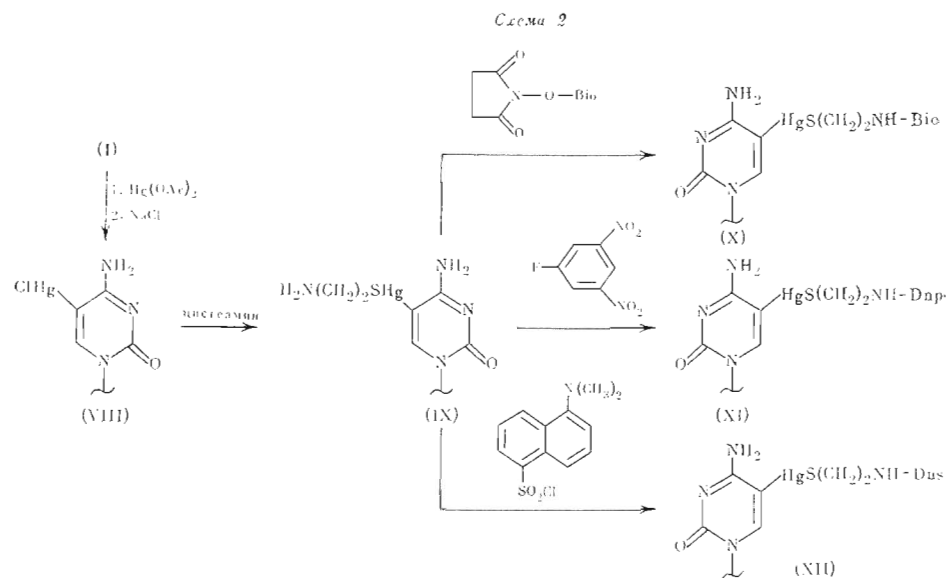
На рис. 1 представлена кинетика накопления продуктов модификации тетрадекануклеотида (VII) при 56°C . В дальнейшем время и температуру, необходимые для достижения требуемой глубины модификации, оценивали по данным, представленным на рис. 1 и 2, или же на основании аналогичных кинетических данных.

Реакция биотинирования аминопроизводного (II) в выбранных нами условиях протекает количественно (рис. 3). В случае тетрадекануклеотида (VI) образуется биотиновое производное, подвижность которого выше

подвижности аминокислотного. Биотиновые же производные тетрадекануклеотида (VII) со степенью модификации 1–5 остатков биотина на молекулу олигонуклеотида обладают меньшей электрофоретической подвижностью, чем соответствующие аминокислотные производные. При глубине модификации 5–6 остатков биотина на молекулу олигонуклеотида (VII) происходит инверсия относительной подвижности производных из-за смены соотношения заряда и массы, и эти биотинированные олигонуклеотиды движутся при электрофорезе быстрее, чем соответствующие аминокислотные производные.

Наличие биотиновых групп в олигонуклеотидах доказывали связыванием с авидином (рис. 4) — такие комплексы стабильны в условиях электрофореза в присутствии 7 М мочевины.

Аналогичным образом синтезированы Dns- и Dnp-производные олигонуклеотида (VII) (рис. 5), а также Bio, Dns- и Dnp-производные однопечочной ДНК (оцДНК) фага M13mp9 (степень модификации 2%).



Второй подход (также двухстадийный), который мы применили для введения функциональных групп в нуклеиновые кислоты, основан на их способности в мягких условиях взаимодействовать с солями ртути. Поскольку продукты такого ковалентного взаимодействия обладают высокой реакционной способностью по отношению к меркаптанам, эту реакцию оказалось возможным использовать для дальнейшей модификации с целью введения функциональных групп (схема 2), как это было показано нами ранее на примере введения 2,4-динитрофенильных групп в полиуридилловую кислоту [10]. На основании последней работы были выбраны условия получения Dns, Dnp и Bio-производных ДНК с заданной степенью модификации (2%).

Биотинированная по этой схеме оцДНК фага M13mp9 при добавлении авидина меняла электрофоретическую подвижность в 1% агарозном геле, что свидетельствует об образовании комплексов (данные не приведены). Введение в ДНК Dns- и Dnp-групп контролировали спектрофотометрически, как описано в работе [10].

Несмотря на меньшую стабильность производных нуклеиновых кислот, полученных с помощью предварительной модификации ацетатом ртути [11], такой способ несколько предпочтительнее описанного выше метода, основанного на переаминировании, поскольку не затрагивает функциональные группы нуклеиновых оснований, участвующие в комплементарном взаимодействии. Эти производные нуклеиновых кислот должны быть особенно удобны при использовании «сэндвичевых» систем гибридизации в растворе [12].

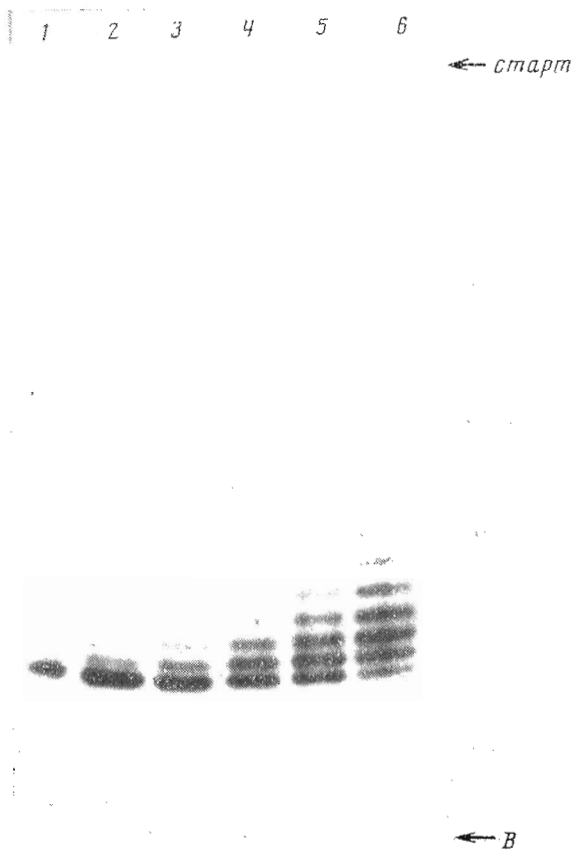


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ продуктов модификации олигонуклеотида рАСССТТСТСССAGT (VII) O-(4-аминобутил)гидроксиламином. Инкубация при 56° С в течение 0 (1), 15 (2), 30 (3), 60 (4), 90 (5), 120 мин (6). Условия электрофореза (здесь и на рис. 2-5): 16% ПААГ (1/30 бисакриламида) в 50 мМ трис-борате (рН 8,3) с 0,5 мМ EDTA в 7 М мочевице. В — бромфеноловый синий

Детекция модифицированных нуклеиновых кислот с помощью антител. Антитела на Dnp- и Bio-группы были получены иммунизацией мышцей линии BaLB соответствующими производными бычьего сывороточного альбумина, антитела на Dns-группы — иммунизацией кролика. Содержание антител на всех стадиях выделения определяли по связыванию с соответствующими ³²P-мечеными производными олигонуклеотидов с последующим осаждением полиэтиленгликолем. В процессе выделения оказалось, что связывание антител с биотином сильно ингибируется ацетатом аммония, а перевод белка в буферный раствор, содержащий 20 мМ трис-HCl, рН 7,5, и 0,15 М NaCl, приводит к восстановлению активности антител. Во всех случаях использовалось аффинное выделение антител на агарозе с ковалентно присоединенными Dns-, Dnp- или Bio-группами.

Данные по электрофоретическому анализу антител представлены на рис. 6. Видно, что в случае Dnp-антител достигается достаточно высокая степень очистки (выделена определенная фракция иммуноглобулинов). В то же время высокая гидрофобность дансильных групп приводит к значительной сорбции на Dns-агарозе кроличьего альбумина, и этот комплекс не разрушается при отмывке смолы большими объемами нейтральных буферных растворов, но легко разрушается в процессе элюции антител 0,1 М уксусной кислотой (рН 3,0). Поэтому в данном случае аффинно очищенная фракция иммуноглобулинов содержит альбумин.

Полученные антитела были применены для детекции ДНК, модифицированной соответствующими группами. Детекцию проводили с помощью конъюгата вторых антител (кроличьих — к мышечным IgG в слу-

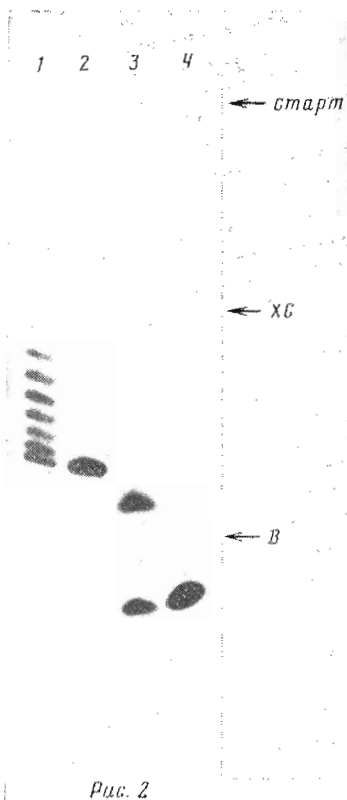


Рис. 2

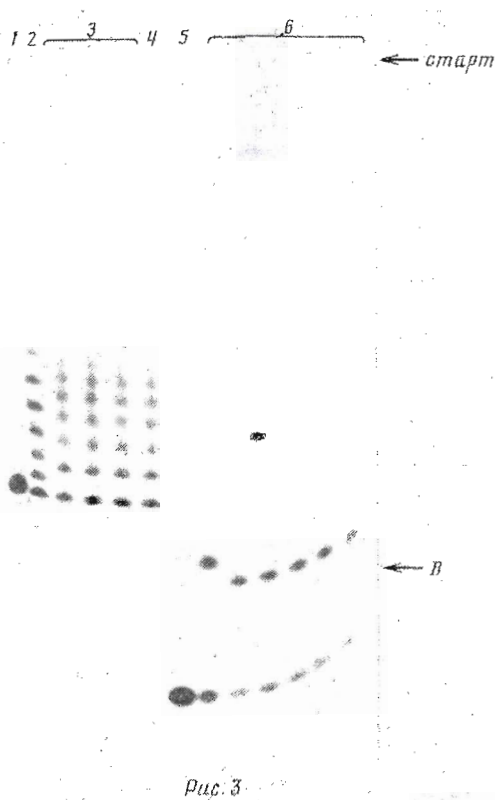


Рис. 3

Рис. 2. Электрофорез продуктов модификации *O*-(4-аминобутил)гидроксиламином олигонуклеотидов рАСССТТСТСССАГТ (VII) (1) и рААСА (VI) (3); 2 и 4 — исходные тетрадека- и тетрауклеотид. ХС — ксиленицианол

Рис. 3. Электрофорез олигонуклеотидов: 1 — тетрадекануклеотид (VII), 4 — тетрауклеотид (VI); 2, 5 — они же после модификации *O*-(4-аминобутил)гидроксиламином в течение 20 ч при 37° С; 3, 6 — после проведения второй стадии (обработки *N*-оксисукцинимидным эфиром биотина)

чае Dnp-ДНК и козых — к кроличьим IgG в случае Dns-ДНК) с пероксидазой хрена; в качестве хромогенного субстрата использовали 4-хлор-1-нафтол, который под действием фермента в присутствии перекиси водорода превращается в окрашенный нерастворимый продукт. Минимальное определяемое количество первых антител — 1 нг (рис. 7а).

При использовании Bio-антител для регистрации Bio-ДНК (степень модификации 2%), иммобилизованной на нитроцеллюлозе, было показано, что антитела перекрестно реагируют с бычьим сывороточным альбумином — добавление его в инкубационную смесь в концентрации 10 мг/мл приводило к сильному увеличению фона и уменьшению интенсивности окрашивания областей фильтра с иммобилизованной ДНК. Замена белка-носителя на овальбумин (7 мг/мл) значительно уменьшила фон.

Оптимальные концентрации белка-носителя, первых антител, конъюгата вторых антител с пероксидазой были подобраны экспериментально. В контрольных экспериментах при использовании нативной (небиотинированной) ДНК было обнаружено, что Bio-антитела обладают высоким неспецифическим сродством к ДНК (детектируется до 10 нг ДНК), причем комплексы не разрушаются 0,2 М NaCl. Эти комплексы оказались стабильными в условиях неденатурирующего электрофореза (рН 8,3); кроме того, фракция Bio-антител в этих же условиях несет высокий положительный заряд. Отметим, что аналогичные комплексы с Bio-олигонуклеотидами не регистрировались методом осаждения иммунных комплексов полиэтиленгликолем. Проведенное исследование показало, что полученные нами антитела к биотину не пригодны для детекции модифицированных молекул ДНК.

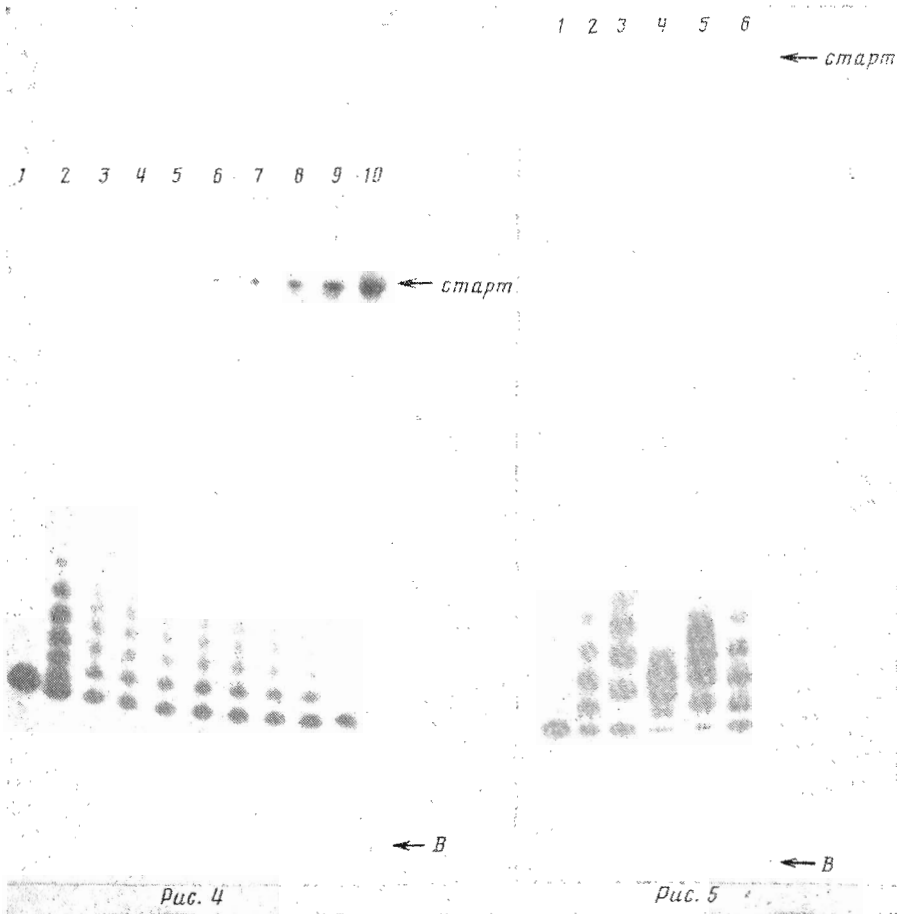


Рис. 4. Электрофорез олигонуклеотида (VII) (1), продуктов его переаминирования *O*-(4-аминобутил)гидроксиламинном (2), последующего биотинирования (3), а также комплекса *Bio*-(VII) с авидином при соотношении компонентов 64:1 (4), 32:1 (5), 16:1 (6), 8:1 (7), 4:1 (8), 2:1 (9), 1:1 (10)

Рис. 5. Электрофорез тетрадекануклеотида (VII) (1), продуктов его модификации *O*-(4-аминобутил)гидроксиламинном (2, 6) и последующей обработки *N*-оксисукцинимидным эфиром биотина (3), 2,4-динитрофторбензолом (4) или дансилхлоридом (5)

Высокая гидрофобность дансильных групп не позволяет применять также и *Dns*-антитела в используемой системе детекции из-за присутствия овальбумина в инкубационных смесях, выступающего в роли конкурента иммуноглобулинов за связывание с *Dns*-группами в составе ДНК. Однако *Dns*-антитела могут оказаться полезными при использовании смесей другого состава или для извлечения гибридных молекул из раствора [12] в системах, где необходимо использование нескольких типов взаимодействия антиген — антитело. С немодифицированными нуклеиновыми кислотами *Dns*-антитела не связываются.

Dnp-антитела не дают неспецифического связывания с ДНК и не обладают повышенной гидрофобностью. Использование этой системы позволяет детектировать 1 нг *Dnp*-оцДНК, полученной обоими описанными выше способами, при степени модификации 1 *Dnp*-группа на 50 оснований (рис. 7б, в). Такую же чувствительность имел метод, предложенный в работе [13] для детекции *Bio*-ДНК, полученной ник-трансляцией с биотинным аналогом dTTP, и комплекса стрептавидина с пероксидазой. Авторам этой работы удалось поднять чувствительность метода в 500 раз, увеличив длину мостиковой группы, ковалентно связывающей остаток биотина с гетероциклическим основанием дезоксирибонуклеозидтрифосфата, и используя вместо пероксидазы щелочную фосфатазу в виде конъюгата

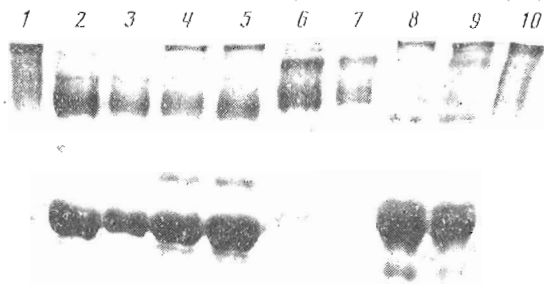


Рис. 6. Электрофорез Dnp- и Dns-антител, выделенных с помощью Dnp- и Dns-агарозы: 1, 10 – фракция IgG (V) по Коу; 9 – белки Dnp-асцитной жидкости; 8 – белки Dnp-агарозы, не связавшиеся с Dnp-агарозой; 6, 7 – аффинно очищенные Dnp-антитела; 5 – белки Dns-сыворотки кролика; 4 – белки Dns-сыворотки кролика, не связавшиеся с Dns-агарозой; 2, 3 – аффинно очищенные Dns-антитела со значительной примесью альбумина. Электрофорез в 7,5% ПААГ, содержащем 0,1% SDS

со стрептавидином. По-видимому, в нашем случае способы повышения чувствительности метода должны быть аналогичными (см. ниже).

Таким образом, нами предложена новая система для выявления нуклеиновых кислот и экспериментально продемонстрирована возможность ее использования. Очевидное преимущество предложенной системы Dnp-ДНК – Dnp-антитела по сравнению с детекцией, основанной на биотин-авидиновом узле, заключается в том, что, несмотря на значительно меньшие константы связывания (обычно для таких антител $K=10^9-10^{10}$), антитела не связываются неспецифически с немодифицированной ДНК, что является необходимым условием при проведении исследований с использованием гибридизации.

Возможность использования Dnp-оцДНК, полученной по схеме 1, для выявления комплементарных нуклеотидных последовательностей гибридизацией была проверена следующим образом: двуцепочечную ДНК бактериофага M13mp9, предварительно денатурированную нагреванием в 0,2 M NaOH, иммобилизовали на нитроцеллюлозном фильтре и гибридизовали с Dnp-оцДНК этого же фага. Детекцию осуществляли, как описано выше, используя Dnp-антитела и конъюгат вторых антител с пероксидазой. Видно, что этим способом действительно возможно обнаружение нанограммовых количеств ДНК. Следовательно, введение динитрофенильных групп этим способом и в таком количестве (модифицировано 2% оснований) не мешает образованию гибридных молекул, а присоединение антител к Dnp-ДНК-дуплексу не приводит к его денатурации.

Использование в качестве субстрата пероксидазы диаминобензидина (в присутствии $NiSO_4$) [14] или детекция с помощью комплексов антител с коллоидным золотом, полученных по методу [15], не привели к увеличению чувствительности метода.

Поэтому на следующем этапе нами был реализован другой способ повышения чувствительности – введение аминокпропильной мостиковой группы с помощью активированного производного динитробензола (XII), полученного последовательным действием 2,4-динитрофторбензола на 6-аминокапроновую кислоту с последующей конденсацией полученного соединения с N-оксисульфанимидом в присутствии динитрофторбензола.

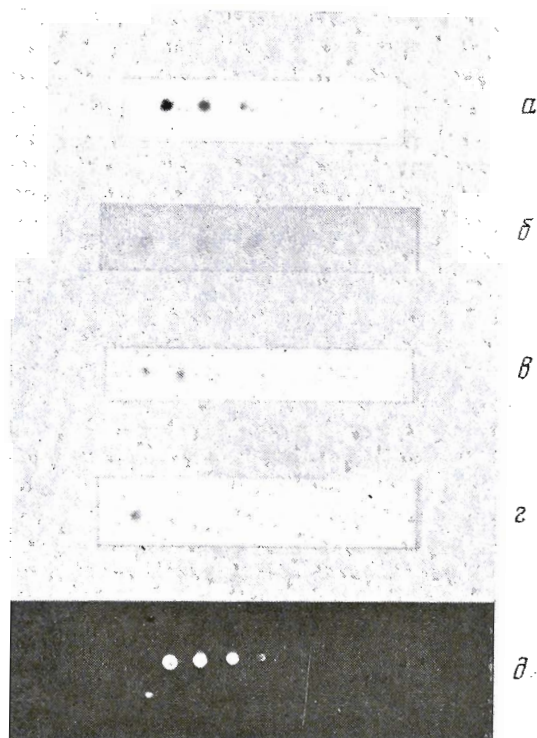
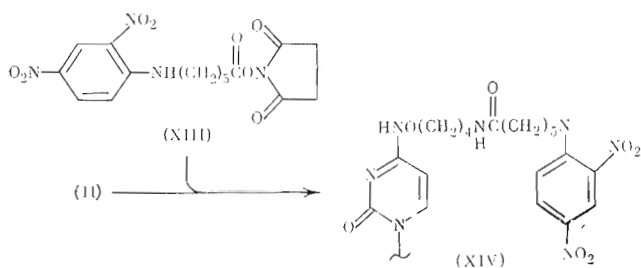


Рис. 7. Детекция Dnp-оцДНК M13mp9 и гибридных Dnp-молекул ДНК с помощью Dnp-антител и конъюгата вторых антител с пероксидазой: а – Dnp-антитела (1 мкг, 100, 10, 1 нг, 100, 10 нг); б – Dnp-оцДНК (100, 10, 1 нг, 100, 10, 1 нг, контроль); в – Dnp-hg-оцДНК (100, 10, 1 нг, 100, 10 нг, контроль). В качестве контроля использовали 100 нг оцДНК M13mp9; г – гибридизация дцДНК M13mp9 (200, 50, 10, 2 нг, контроль) с Dnp-оцДНК M13mp9. В качестве контроля использовали 200 нг рBR322 (линейная форма), субстрат – 4-хлор-1-нафтол; д – Dnp-13-оцДНК (800, 160, 40, 10, 2 нг, контроль). В качестве контроля использовали 800 нг оцДНК M13mp9, детекция с помощью хемилюминесцентной реакции окисления люминола

диминда:

Схема 3



В результате синтеза такой ДНК, содержащей модифицированные остатки цитозина (XIV) (модифицировано 2% оснований), чувствительность метода была повышена в 5 раз (200 нг ДНК).

Использование хемилюминесцентной реакции окисления люминола в присутствии перекиси водорода, катализируемой пероксидазой в составе конъюгата со вторыми антителами [16], позволило увеличить чувствительность еще в 20 раз. Таким образом, стала возможной детекция 10 нг ДНК-зонда (XIV) (рис. 7д). Отметим, что применение более чувствительных фотоматериалов или других методов регистрации хемилюминесценции оставляет возможность для дальнейшего повышения чувствительности метода, поскольку фоновая люминесценция в наших опытах практически не регистрируется.

Авторы выражают благодарность П. И. Позднякову (БНИИ МБ, Кольцово) за предоставление гидрохлорида *O*-(4-аминобутил)гидроксиламина, И. В. Куявину (НИБХ) за предоставление олигонуклеотидов, О. С. Федоровой (НИБХ) за ценные советы по совершенствованию системы детекции ДНК-зондов, Л. А. Якубову и О. М. Базановой (НИБХ) за помощь при иммунизации животных.

Экспериментальная часть

В работе использованы акриламид, бисакриламид, трис, EDTA (Serva, ФРГ); биотин, 2,4-динитрофторбензол, дансилхлорид, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, полный и неполный адьюванты Фрейнда, фикола 400 (Sigma, США); полиэтиленгликоль 6000 (Merck, ФРГ); глицин (Reanal, Венгрия); итродцеллюлозные фильтры (Сынопор, ЧССР); сефадексы G-10, G-25, сефакрил S200 (Pharmacia, Швеция); [γ - 32 P]АТФ отечественного производства; тимусная ДНК, T4-полинуклеотидкиназа (ИНКТИ БАВ, Бердск); остальные реактивы отечественные, квалификации х.ч. или ч.д.а.

Dnp-hg-оцДНК М13mp9 получали аналогично poly(Dnp-hg 25 U) [10]. К 25 мкг оцДНК в 75 мл 5 мМ Na-ацетатного буфера, pH 7,2, добавляли 50 мкл ацетата ртути (концентрация 3,2 мг/мл) в том же буфере. Реакционную смесь инкубировали 20 ч при 37° С. Добавляли NaCl до 0,2 М, pH доводили HCl до 4,5, hg-оцДНК осаждали тремя объемами спирта. Осадок тщательно отмывали спиртом, высушивали и растворяли в 100 мкл 0,2 М LiCl. Затем добавляли 10 мкл 1 М раствора β -меркаптоэтиламина (pH доведен HCl до 7,5), инкубировали 5 мин при 20° С. Продукт осаждали 10 объемами 2% LiClO $_4$ в ацетоне, осадок отмывали от β -меркаптоэтиламина ацетоном, растворяли в 100 мкл 0,1 М Na-карбонатного буфера, pH 9,8, добавляли 10 мкл насыщенного раствора 2,4-динитрофторбензола в спирте, инкубировали 45 мин при 20° С. Dnp-hg-оцДНК выделяли осаждением 10 объемами 2% LiClO $_4$ в ацетоне. Осаждение проводили дважды, осадок тщательно отмывали ацетоном.

Реакция олигонуклеотидов или оцДНК с O-(4-аминобутил)гидроксиламином. К 100 мкл раствора олигонуклеотида или оцДНК (0,1 ОЕ $_{260}$) в воде добавляли 8,6 мг *O*-(4-аминобутил)гидроксиламина (до концентрации 0,5 М, pH 5,5). Смесь выдерживали при 56° С, модифицированный олигонуклеотид осаждали 10 объемами 2% перхлората лития в ацетоне, осадок несколько раз промывали ацетоном и сушили в вакууме.

Получение Bio, Dns, Dnp-производных олиго- и полинуклеотидов. Bio-производные (V) или (X). Раствор олигонуклеотида или оцДНК с введенными первичными аминогруппами ((II) или (IX), здесь и далее 0,1 ОЕ $_{260}$) в 100 мкл 0,1 М бикарбоната натрия обрабатывали 10 мкл насыщенного раствора *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в диметилформамиде, выдерживали 1 ч при 20° С. Bio-производные выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-10 или G-25 в зависимости от длины нуклеотидной цепи (элюция 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl).

Dnp-производные (III) или (XI). К раствору соединения (II) или (IX) в 100 мкл 0,1 М Na-карбонатного буфера, pH 9,8, добавляли 10 мкл насыщенного раствора 2,4-динитрофторбензола в спирте, выдерживали 1 ч при 20° С. Dnp-производное выделяли осаждением 5 объемами 2% LiClO $_4$ в ацетоне, осадок тщательно отмывали ацетоном.

Dns-производные (IV) или (XII). К раствору соединения (II) или (IX) в 100 мкл 0,2 М NaHCO $_3$ добавляли 100 мкл насыщенного раствора дансилхлорида в ацетоне и обрабатывали аналогично предыдущему опыту.

Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 16% ПААГ, содержащем 7 М мочевицу, 50 мМ трис-борат (pH 8,3), 0,5 мМ EDTA.

Синтез препаратов для иммунизации животных. Bio-БСА. К раствору 5 мг белка в 2 мл 0,1 М NaHCO $_3$ добавляли 100 мкл насыщенного раствора *N*-оксисукцинимидного эфира биотина в диметилформамиде и через 2 ч при 20° С проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-25 (элюция 5 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,15 М NaCl).

Dns-БСА получали аналогично из 5 мг белка в 1 мл 0,2 М NaHCO $_3$ и 0,5 мл насыщенного раствора дансилхлорида в ацетоне; перед гель-фильтрацией ацетон удаляли в вакууме.

Dnp-БСА получали аналогично из 5 мг белка в 1 мл 0,2 М Na-карбонатного буфера, pH 9,8, и 100 мкл насыщенного раствора 2,4-динитрофторбензола в спирте (1 ч при 20° С).

Мышей Ва1В иммунизировали внутрибрюшинно по следующей схеме: 1-я инъекция – 200 мкг БСА-АГ (антиген) с полным адьювантом Фрейнда, 2-я инъекция через 20 сут – 200 мкг БСА-АГ с неполным адьювантом Фрейнда, 3 – 5-я инъекции с недельными интервалами – по 200 мкг БСА-АГ без адьюванта. Через неделю после последней инъекции прививали асцит (500 мкл/мышь), асцитную жидкость собирали через 9 сут.

Кролика иммунизировали подкожно по схеме: 1-я инъекция – 1,5 мг Dns-БСА с полным адьювантом Фрейнда, 2 – 6-я инъекции (с недельными интервалами) – по 0,5 мг Dns-БСА с неполным адьювантом Фрейнда.

Регистрация антител на дансилную, динитрофенильную, биотиновую группы, входящие в состав ДНК. 50 мкл сыворотки или ее соответствующего разведения инкубировали с 50 мкл 5'- 32 P-меченого олигонуклеотида, несущего соответствующие

функциональные группы (концентрация 10^{-7} – 10^{-6} М), в 20 мМ трис-НСl (рН 7,5) с 0,15 М NaCl при 4° С в течение 10 мин. При 4° С добавляли 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,15 М NaCl, 0,5% овальбумина, затем 700 мкл холодного 17% полиэтиленгликоля-6000 в 0,15 М NaCl. Смесь тщательно перемешивали, центрифугировали на микроцентрифуге 5 мин при 10 000 об/мин. Осадок суспендировали в 200 мкл воды. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном счетчике по Черенкову.

[32 P]-5'-концевую метку вводили в олигонуклеотиды перед синтезом их производных с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]АТФ.

Приготовление Dns- и Dnp-агарозы. 3 г CNBr-агарозы, промытой на фильтре 600 мл 0,1 М HCl, обрабатывали 4 г 1,8-дламинооктана в 15 мл воды (рН доведен HCl до 8,5) в течение 16 ч при 20° С и полученную NH₂-агарозу отмывали 500 мл 0,1 М NaHCO₃, 1 М NaCl и 200 мл 0,1 М СН₃COOH, чередуя эти растворы с 1 М NaCl. К 1,5 г NH₂-агарозы в 10 мл 0,2 М NaHCO₃ добавляли 1 мл насыщенного раствора 2,4-динитрофторбензола в спирте или 7 мл насыщенного раствора динитрохлорида в ацетоне; после инкубации в течение 16 ч при 20° С промывали соответственно 300 мл спирта или 300 мл ацетона. Затем Dns- и Dnp-смолы последовательно промывали на фильтре 100 мл 0,1 М NaHCO₃; 10 мл 0,5% овальбумина в воде; 100 мл 0,1 М NaHCO₃, 1 М NaCl; 100 мл 0,1 М уксусной кислоты, содержащей 1 М NaCl; 300 мл 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, с 0,15 М NaCl (ТС-буфер).

Выделение Dns- и Dnp-антител. 5 мл асцитной жидкости, предварительно осветленной центрифугированием, инкубировали 16 ч при 4° С с 4 мл Dns- или Dnp-агарозы, смолу тщательно отмывали буфером ТС, антитела элюировали тремя порциями 0,1 М уксусной кислоты (общий объем 10 мл) и немедленно нейтрализовали аммиаком. Замену ацетата аммония на ТС-буфер осуществляли с помощью многократного центрифугирования при 1000g на фильтрах Amicon-25.

Выделение Bio-антител. К 5 мл асцитной жидкости, осветленной центрифугированием, добавляли сухой сульфат аммония до 40% насыщения, осадок после центрифугирования обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным ТС-буфером. Белковую фракцию инкубировали с 10 мл Bio-сефарозы и далее выделяли как в предыдущем опыте.

Антитела и биологические жидкости на разных стадиях очистки анализировали электрофорезом в 7,5% ПААГ, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия.

Гибридизация и детекция молекул, содержащих антигенные группы. Гибридизация проводилась в условиях, описанных в работе [8], с некоторыми изменениями. Исходные растворы: 50×FGG (1% фикола-400, 0,5% гепариниод, 1% глицин), 20×SSC (3 М NaCl, 0,3 М натрий-цитрат, рН 7,0). Пробы дцДНК в 0,2 М NaOH инкубировали 5 мин при 90° С, охлаждали во льду, наносили на влажные нитроцеллюлозные фильтры (размер пор 0,22 мкм), выдерживали 2 ч при 80° С в вакууме. Предгибридизацию проводили 3 ч при 65° С в 2×SSC/5×FGG, содержащем 100 мкг/мл тимусной ДНК-носителя, предварительно денатурированного нагреванием в 50% формамиде.

Гибридизацию проводили в 2×SSC/1×FGG/25 мМ К-фосфат/2 мМ EDTA, рН 7,0. Пробу модифицированной оцДНК выдерживали 5 мин при 90° С в 50% формамиде, добавляли в гибридизационную смесь до концентрации 0,5 мкг/мл и выдерживали в течение ночи при 65° С. Фильтры отмывали 30 мин при 65° С в 1×SSC/2×FGG, 10 мин при 65° С в 1×SSC/2×FGG и 2 раза по 10 мин при 20° С в 1×SSC. Последний раз фильтры промывали 0,2×SSC при 20° С.

Нитроцеллюлозные фильтры с Bio, Dns, Dnp-оцДНК или фильтры после гибридизации инкубировали в растворе, содержащем ТС-буфер, овальбумин (7 мг/мл), $1/_{200}$ объема соответствующих антител (исходный раствор – 1 мг/мл), в течение ночи при 4° С или 4 ч при 20° С. Фильтры промывали несколько раз ТС-буфером, затем инкубировали в смеси этого буфера, овальбумина (7 мг/мл), 0,05% Твин-20 и $1/_{400}$ объема раствора конъюгата вторых антител с пероксидазой 2 ч при 20° С. Фильтры промывали несколько раз тем же буфером, один раз 5 мМ трис-НСl, рН 7,5, и помещали в раствор, содержащий 5 мМ трис-НСl (рН 7,5), $1/_{20}$ объема раствора 4-хлор-1-нафтола (исходный раствор в метаноле – 3,6 мг/мл), $1/_{1000}$ объема 30% перекиси водорода. Инкубировали 1 ч при 20° С. Затем фильтры промывали водой, сушили на воздухе.

Dnp-производное ϵ -аминокапроновой кислоты получали по методу [17] с некоторыми изменениями; N-оксисукцинимидный эфир биотина и Dnp-аминокапроновой кислоты получали по методу [18]; для выделения авидина использовали комбинацию известных методов, как описано в работе [19]. Используемые в работе методики получения конъюгата IgG с пероксидазой хрена, получения коллоидного золота и его комплексов с антителами подробно описаны в работе [15]. Хемолюминесцентное излучение детектировали, экспонируя нитроцеллюлозные фильтры с рентгеновской пленкой РТ-1 в течение 10 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brakel C. L., Engelhardt D. L. // Rapid detection and identification of infectious agents/Eds Kingsbury D. T., Falkow S. N. Y.: Acad. Press, 1985. P. 235–244.
2. Lowe J. B. // Clin. chim. acta. 1986. V. 157. № 1. P. 1–32.
3. Neumann R., Rudloff P., Eggers H. J. // Naturwissenschaften. 1986. B. 73. № 9. S. 553–555.

4. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 11. P. 6633-6637.
5. Gillam I. C., Tener G. M. // Anal. Biochem. 1986. V. 157. № 2. P. 199-207.
6. Renz M., Kurz C. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 8. P. 3435-3444.
7. Syvänen A.-C., Alanen M., Söderlund H. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 8. P. 2789-2802.
8. Tchen P., Fuchs R. P., Sage E., Leng M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 11. P. 3466-3470.
9. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. C., Symons R. H. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 3. P. 745-761.
10. Бросалина Е. В., Власов В. В., Годовиков А. А. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 237-239.
11. Dale R. M. K., Martin E., Livingstone D. C., Ward D. C. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 11. P. 2447-2457.
12. Syvänen A.-C., Laaksonen M., Söderlund H. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 12. P. 5037-5048.
13. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 13. P. 4045-4049.
14. Scopi L., Larsson L. I. // Histochemistry. 1986. V. 84. № 2. P. 221-230.
15. Roth I. // Techniques in immunocytochemistry. V. 2/Eds Bullock G. R., Petrus P. L.: Acad. Press, 1983. P. 217-285.
16. Matthews I. A., Batki A., Nyndes C., Kricka L. S. // Anal. Biochem. 1985. V. 151. № 2. P. 205-209.
17. Дэвени Т., Гергей Я. // Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. С. 273.
18. Bayer E., Wilchek M. // Meth. Enzymol. 1974. V. 34. P. 265-267.
19. Бросалина Е. В., Грачев С. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248-256.

Поступила в редакцию

9.II.1987

После доработки

6.VI.1987

CHEMICAL APPROACHES TO PREPARATION OF DNA PROBES AND THEIR IMMUNOCHEMICAL DETECTION USING NONRADIOACTIVE HYBRIDIZATION METHODS

BROSALINA E. B., VLASSOV V. V., GRACHEV S. A.*, DEMCHENKO E. N.**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR:*

* *Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*

** *Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Simple and efficient chemical approaches to preparation of DNA probes carrying 2,4-dinitrophenyl, dansyl or biotin residues were developed. The residues were introduced using following DNA derivatization procedures: a) transamination of cytidine residues with O-(4-aminobutyl)hydroxylamine; b) mercuration of pyrimidine residues followed by β -mercaptoethanol modification. It was shown that 2,4-dinitrophenyl-containing DNA probes can be used for nonradioactive hybridization detection of nucleic acids. DNP - DNA : DNA complexes were detected using mouse antibodies specific to 2,4-dinitrophenyl groups, which were developed with peroxidase-conjugated antimouse immunoglobulins. Peroxidase-catalyzed chemoluminescent reaction of luminol oxidation with hydrogen peroxide allowed to detect 10 picograms of the dinitrophenylated single-stranded DNA probe.