



УДК 577.113.4:577.336

**ПОЛУЧЕНИЕ ДНК, НЕСУЩЕЙ АЛИФАТИЧЕСКИЕ АМИНОГРУППЫ,  
И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПРОИЗВОДНОГО  
В КАЧЕСТВЕ ЗОНДА ПРИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ***Адаричев В. А., Дымыщев Г. М.,\* Калачиков С. М.,  
Поздняков П. И., Салганик Р. И.**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Академии наук СССР, Новосибирск;  
Новосибирский государственный университет*

Предложен метод введения в ДНК алифатических аминогрупп, к которым могут быть присоединены как флуорохромы, так и другие «сигнальные» соединения, реагирующие с аминогруппами. Метод основан на взаимодействии остатка цитозина в составе полинуклеотида с 4-аминооксибутиламином. Описан синтез 4-аминооксибутиламином. Показано, что ДНК, модифицированная по введенным аминогруппам флуоресценцизотопианатом, может быть использована в качестве зонда при молекулярной гибридизации.

Ранее нами был предложен метод получения флуоресцентно меченой ДНК путем алкилирования оснований 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламином с последующим присоединением флуорохромов по введенным аминогруппам. Оказалось, что такая модификация не препятствует образованию комплементарных комплексов; это было продемонстрировано автордиографией и флуоресценцией гибридов в экспериментах по дот-гибридизации [1]. При подготовке таким способом ДНК в качестве зонда для молекулярной гибридизации вследствие алкилирования и выдерживания в условиях флуорохромирования часть алкилпуринов отщепляется [1, 2]. Это может приводить к частичной потере флуоресцентной метки и расщеплению ДНК поapurиновым сайтам [3].

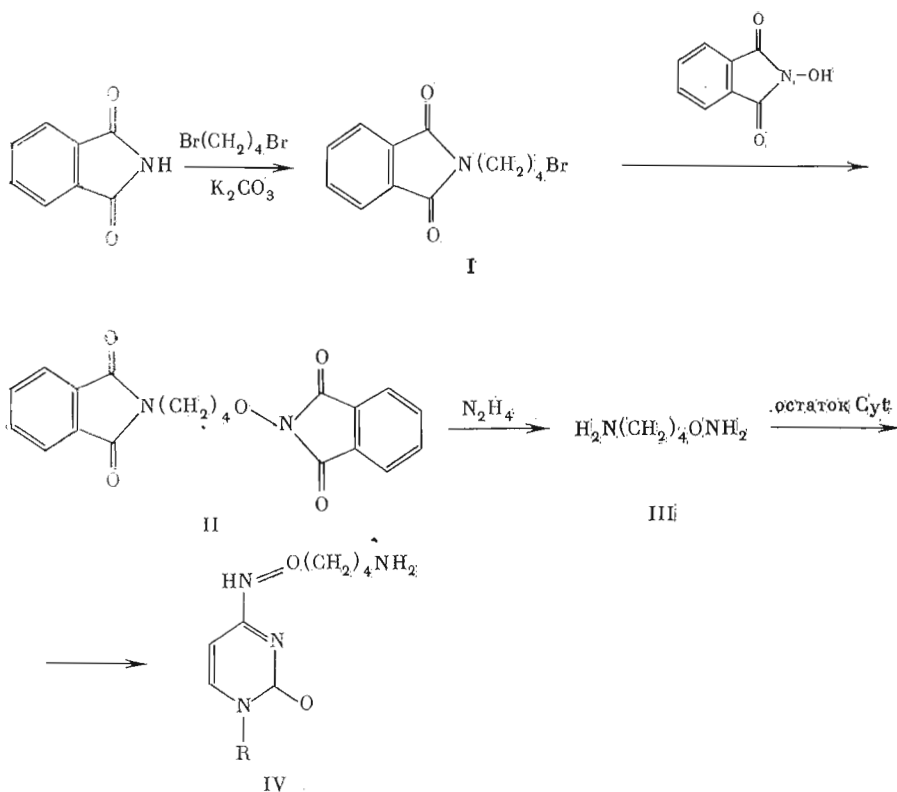
В настоящей работе мы предлагаем метод введения в ДНК алифатических аминогрупп, к которым можно присоединять флуорохромы и другие «сигнальные» соединения. Метод основан на реакции 4-аминооксибутиламином (III) с остатком цитозина в составе полинуклеотида с образованием аминобутоксипроизводного (IV) (схема). Несомненным преимуществом этого метода по сравнению с алкилированием является устойчивость продукта реакции в широком диапазоне pH и температуры [4].

4-Аминооксибутиламин (III) был получен из 1,4-дибромбутана в результате последовательных реакций с фталимидом в присутствии карбоната калия (ср. [5]) и N-оксифталамидом [6] и удаления защитных групп гидролизом.

Присутствие в 4-аминооксибутиламине (III) как амино-, так и аминоксигруппы доказано качественными реакциями с пингидрином и пикрилхлоридом [7], дающими соответственно фиолетовое и темно-коричневое окрашивание. В спектре ПМР наблюдаются три группы сигналов, принадлежащих «внутренним» ( $\beta$ - и  $\gamma$ -) и «концевым»  $\alpha$ - и  $\delta$ -метилеповым звеньям с химическим сдвигом  $\delta$  1,80; 3,06 и 4,15 м. д. соответственно, что согласуется со структурой соединения (III).

Введение в ДНК алифатических аминогрупп осуществляли в 0,5 М растворе 4-аминооксибутиламином (рН 5,5) при 100° С с последующей очисткой от избытка реагента гель-фильтрацией. Степень модификации ДНК оценивали по поглощению в видимой области (485 нм) остатков FITC, присоединенных к ДНК в условиях 20–50-кратного избытка реагента по отношению к введенным алифатическим аминогруппам. В контрольных

\* Сокращения: FITC – флуоресценцизотопианат.



экспериментах присоединение FITC к ДНК, не модифицированной 4-аминооксибутиламином, не наблюдалось.

Мы предлагаем вводить различные химические группировки в нуклеиновые кислоты через производные 4-аминооксибутиламина. Процедура введения метки проста и не требует много времени. Возможность такого пути продемонстрирована нами при получении флуоресцентно меченной ДНК и использовании ее в качестве зонда для молекулярной гибридизации.

Была проведена гибридизация флуорохромированной на 4% [ $^{32}\text{P}$ ]ДНК фага Т7 с немеченой гомологичной ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах. Для опыта было приготовлено по два фильтра с 1,5 и 40 мкг ДНК. После гибридизации, длившейся 80 ч, и последующих отмывок яркая флуоресценция в УФ-свете обнаруживалась на всех фильтрах (рисунок).

При сравнении картин флуоресценции и автордиографии одних и тех же фильтров хорошо видны довольно четкие края пятен флуоресценции и размытые пятна автордиограмм, что свидетельствует о большой разрешающей способности флуоресцентной метки.

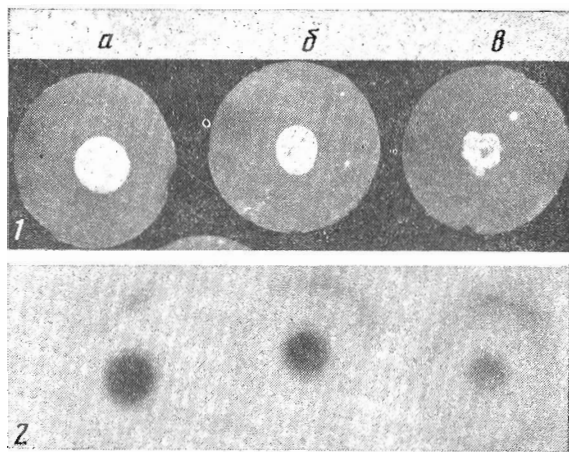
При определении чувствительности предлагаемого метода было установлено, что обнаруживается комплементарная ДНК в концентрации 200 пг/мм<sup>2</sup>.

### Экспериментальная часть

Спектр ПМР снимали на спектрометре WP-80 DS (Bruker-Physik AG, ФРГ) с рабочей частотой 80,1 МГц в растворе D<sub>2</sub>O с гексаметилдисулfoxаном в качестве внутреннего стандарта.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) в системах: CHCl<sub>3</sub> — CH<sub>3</sub>OH, 9:1 (А), CHCl<sub>3</sub> — CH<sub>3</sub>OH — конц. NH<sub>4</sub>OH, 2:2:1 (Б). В работе использовали флуорохром FITC (Fluka, Швейцария). ДНК фага Т7 была любезно предоставлена Е. Ф. Зайчиковым (НИИХ). Ник-трансляцию ДНК проводили как описано в работе [1].

**4-Аминооксибутиламин.** Смесь 49 г (0,33 моль) фталамида, 23 г (0,165 моль) безводного K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 207 г (1 моль) 1,4-дибромбутана (получен по методу [8]) кипятили 12 ч при 180–190° С, время от времени перемешивая. После завершения реакции (ТСХ в системе А) отфильтровали, избыток дибромбутана отогнали в вакууме



Флуоресценция (1) и автордиография (2) гибридов модифицированной FITC [ $^{32}\text{P}$ ]ДНК фага Т7 с гомологичной ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах в количествах 10 (а), 5 (б), 1 мг (в)

и полученный продукт (1), однородный по данным ТСХ в системе А ( $R_f$  0,70), использовали без дополнительной очистки. 75 г (0,25 моль) соединения (1) и 45 г (0,27 моль) *N*-оксифталимида растворили в 250 мл абс. DMF при 60° С, добавили 38 мл (0,27 моль) триэтиламина и выдержали 18 ч при 20° С. После завершения реакции ( $R_f$  0,60 в системе А) реакционную смесь вылили в 1 л воды, выпавший осадок отфильтровали, промыли слабой щелочью, водой до нейтрального значения pH и высушили на воздухе. Полученное соединение (II) (75 г, 0,2 моль) суспендировали в 200 мл этанола, добавили 20 мл (0,4 моль) гидразингидрата и смесь выдержали 4 ч при 60° С, а затем 2 сут при 20° С. К реакционной смеси добавили равный объем воды, довели pH до 1–2 (конц. HCl), выпавший гидразид фталевой кислоты отфильтровали, а водно-спиртовой раствор упарили. Остаток в минимальном объеме воды подщелочили NaOH, упарили, вещество извлекли метанолом и перегнали. Выход 4-аминооксибутиламина 12 г, т. кип. 93–95° С/10 мм. Основание в метаноле добавленным HCl перевели в дигидрохлорид  $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ , осажденный эфиром. Вещество однородно по данным ТСХ в системе Б. Выход 17,36 г (30%), считая на исходный фталамид. Спектр ПМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , м.д.): 1,8 (4H, 2- $\text{CH}_2$ , 3- $\text{CH}_2$ ), 3,06 (2H, 1- $\text{CH}_2$ ), 4,15 (2H, 4- $\text{CH}_2$ ); соотношение интенсивностей сигналов соответствует рассчитанному. По  $T_{\text{пл}}$  (232° С) и спектру ПМР синтезированное нами соединение не отличается от образца, полученного другим способом [9] и любезно предоставленного Р. М. Хомутовым (ИМБ, Москва) для сравнения.

**Введение в ДНК алифатических аминогрупп.** К водному раствору денатурированной нагреванием [ $^{32}\text{P}$ ]ДНК (1 мг/мл) добавляли равный объем 1 М водного раствора солянокислого 4-аминооксибутиламина, оттитрованного NaOH до pH 5,5. Для получения ДНК, модифицированной на 4%, реакционную смесь прогрели 20 мин при 100° С. От непрореагировавшего реагента модифицированную ДНК отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

**Флуорохромирование ДНК.** К водному раствору модифицированной 4-аминооксибутиламином ДНК (0,5 мг/мл) добавляли равный объем FITC (2 мг/мл) в 0,4 М  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9. Смесь выдерживали 2 ч при 37° С, затем ДНК осаждали этанолом и хроматографировали на сефадексе G-50 в 0,04 М  $\text{NaHCO}_3$ . Степень модификации ДНК определяли по формуле  $(A_{485}/A_{260}) \cdot (\epsilon_{260}/\epsilon_{485}) \cdot 100\%$ , где  $A_{485}$  и  $A_{260}$  – поглощения раствора модифицированной ДНК при 485 и 260 нм.  $\epsilon_{260}$  – молярный коэффициент поглощения ДНК в расчете на мономер ( $6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $\epsilon_{485}$  – молярный коэффициент поглощения FITC, присоединенного к ДНК, при pH 7,5 ( $23000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

**Дот-гибридизацию** флуорохромированной [ $^{32}\text{P}$ ]ДНК фага Т7 с гомологичной ДНК проводили как описано в работе [1]. После гибридизации высушенные фильтры фотографировали при УФ-освещении на пленку РФ-3 через светофильм ЖЗС-6; автордиографию проводили с рентгеновской пленкой РМ-1.

Авторы благодарят В. А. Петренко (ВНИИМБ, Кольцово Новосибирской обл.) за ценные советы и плодотворное обсуждение.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фрумгарц Л. А., Киприянов С. М., Калачиков С. М., Дударева Н. А., Дымшиц Г. М., Карпова Г. Г., Салаганик Р. И. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1508–1513.
2. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Ноговицына Г. К. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1974. Вып. 6. С. 125–135.
3. Шабарова З. А., Богданов А. А. // Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 373.

4. Петренко В. А., Спирич Г. В. // Молекулярн. биология, 1982. Т. 16. № 3. С. 644—647.
5. Синтезы органических препаратов. Сб. 1./ Ред. Гильман Г. М.: ИЛ, 1949. С. 143—145.
6. Bauer L., Suresh K. L. // J. Org. Chem. 1963. V. 28. № 6. P. 1604—1608.
7. Коренман И. М. // Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. С. 133, 167.
8. Wilson C. L. // J. Chem. Soc. 1945. № 1. P. 48—51.
9. Недоспасов А. А., Холмутов Р. М. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1978. № 10. С. 2397—2400.

Поступила в редакцию

12.XII.1986

После доработки

6.II.1987

**INTRODUCTION OF ALIPHATIC AMINO GROUPS INTO DNA AND THEIR  
LABELLING WITH FLUOROCHROMES IN PREPARATION OF MOLECULAR  
HIBRIDISATION PROBES**

**ADARICHEV V. A., DYMSHITS G. M.\*, KALACHIKOV S. M., POZDNYAKOV P. I.,  
SALGANIK R. I.**

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Academy of  
Sciences of the USSR, Novosibirsk;  
\* Novosibirsk State University*

A two-step method of labelling DNA through aliphatic amino groups with various reporter molecules has been developed. The method is based on reaction of cytosine residues of polynucleotide chain with 4-aminooxybutylamine; the latter's synthesis is described. DNA modified on this way with fluorescein isothiocyanate functions a probe in molecular hybridisation. The sensitivity of this method for fluorochrome-labelled DNA probes in the dot hybridisation procedure is about 200 pg per mm<sup>2</sup>.