



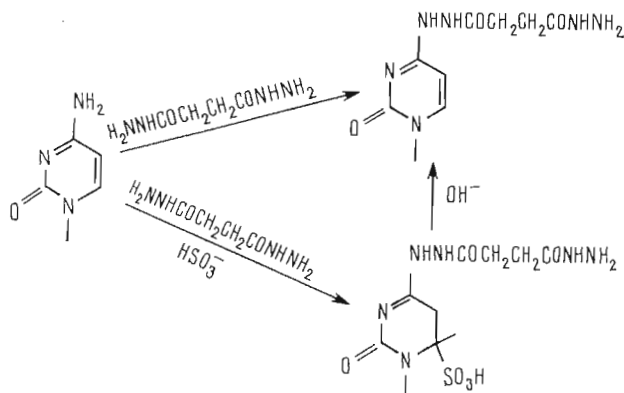
УДК 577.113.4

МОДИФИКАЦИЯ ДНК ДИГИДРАЗИДОМ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ*Турчинский М. Ф., Айбиндер Е. И., Кнорре В. Д.,
Щербо С. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии
наук СССР, Москва*

Предложен двухстадийный химический метод включения в ДНК нерадиоактивных меток. На первой стадии ДНК модифицируют дигидразидами янтарной кислоты при pH 5,0 и 95° С или же при pH 4,5 и 37° С в присутствии бисульфита натрия. На второй стадии через гидразидные группы в ДНК включают остатки флуоресценна или биотина. Биотинилированные этим методом ДНК являются эффективными гибридными зондами.

Нерадиоактивно меченые зонды находят все более широкое применение в гибридном анализе [1], так как в отличие от радиоактивно меченных зондов они стабильны при хранении и безопасны в работе. Методы введения нерадиоактивных меток разнообразны [1] и включают в себя как ферментативные, так и химические способы. Химические методы привлекают в последнее время все большее число исследователей [2–6], как более простые и универсальные. В ряде работ для этих целей используется реакция «переаминирования» цитозина бифункциональными азотистыми основаниями [2–5]. В настоящей работе мы предлагаем использовать легкодоступные реагенты — дигидразиды дикарбоновых кислот — как в присутствии бисульфита, так и без него, на примере дигидразида янтарной кислоты. После такой модификации в ДНК, содержащую гидразидные группы, был введен флуорофор (флуоресценин) или биотин. Этим же методом в ДНК легко могут быть введены разнообразные гаптены, используемые в качестве нерадиоактивных меток для гибридных зондов.

Модификацию ДНК по остаткам цитозина дигидразидами янтарной кислоты (1 М) проводили либо при 95° С и pH 5,0, либо (после предварительной денатурации ДНК) при 37° С в присутствии 1 М бисульфита натрия (pH 4,5).



Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, FITC — флуоресцеинизотиоцианат, SSC — буфер, содержащий 0,3 М NaCl и 0,1 М цитрат натрия, pH 7,0, TBS — буфер, содержащий 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 0,05% твин-20, DMF — диметилформамид.

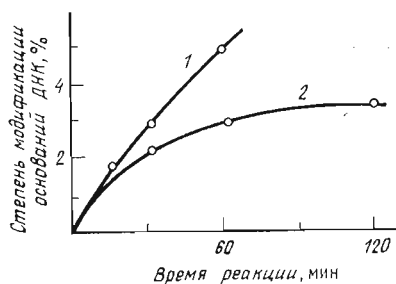


Рис. 1. Скорости модификации ДНК ффага Т7 1 М дигидразидом янтарной кислоты при 95° С, рН 5,0 (1) и 37° С, рН 4,5 в присутствии 1 М бисульфита натрия (2)

В обоих случаях были выбраны значения рН, при которых скорости замещения аминогруппы цитозина на гидразидную максимальны [7, 8]. Поскольку в присутствии бисульфита такая реакция происходит во много раз быстрее, мы проводили ее при 37° С. Для определения степени модификации в зависимости от времени в модифицированные ДНК вводили флуоресцеин (действием FITC) и определяли степень его включения [5] (рис. 1). При 95° С (без бисульфита) скорость модификации вдвое выше, чем при 37° С в присутствии бисульфита. Дигидразид янтарной кислоты гораздо активнее других «переаминирующих» цитозин агентов, в частности, алифатических диаминов [2, 5], и близок к 4-аминооксибутиламину [4], однако более доступен.

Биотин в ДНК, модифицированные дигидразидом янтарной кислоты, вводили с помощью N-оксисукцинимидного эфира ϵ -амидокапроилбиотина [5]. Степень модификации, оптимальная для использования биотинилированных ДНК в качестве гибридизационных зондов, составляет 1–4% от всех оснований, так как при более высоких степенях модификации понижается степень гибридизации и стабильность гибридных молекул [9].

Биотинилированные ДНК ффага λ , полученные обоими методами, были испытаны на их способность к гибридизации с исходной немодифицированной ДНК ффага λ . Для визуализации гибридизованной ДНК (биотинилированной) использовали химико-ферментативную реакцию с щелочной фосфатазой [10]. Для нейлоновых фильтров очень важна процедура «забивки» фильтров белками после гибридизации для подавления неспецифического фона окраски. Наилучшие результаты были получены при забивке смесью желатина и казеина при 30° С. Для связывания фосфатазы с биотинилированными зондами наиболее эффективной оказалась последовательная обработка фильтров стрептавидином и биотинилированной фосфатазой (из кишечника тюленей).

В качестве хромогенных субстратов щелочной фосфатазы использовали пару 5-бром-4-хлориндолил-3-фосфат и тетразолиевый нитроголубой [10]. Для сравнения в тех же условиях проводили гибридизацию и визуализацию, используя в качестве зонда ДНК ффага λ , в которую биотин был введен ранее описанным методом — с помощью переаминирования ДНК смесью этилендиамина — бисульфат при рН 7,4 [5].

Зонды, полученные всеми тремя способами, дали одинаковый результат (рис. 2). Максимально обнаруживаемое количество ДНК составляет 3 пг за 15 ч обработки хромогенными субстратами. Достигаемая чувствительность не является предельной, так как, по данным ряда исследователей, использование полимерных форм фосфатазы из кишечника теленка позволяет значительно повысить чувствительность [10].

Сравнение предлагаемых методов биотинилирования ДНК с другими, основанными на реакциях переаминирования цитозина, показывает следующее. В наиболее мягких условиях, при 37° С, происходит реакция ДНК с дигидразидом янтарной кислоты в присутствии бисульфита. Преимущество этого варианта по сравнению со сходным методом прямого биотинили-

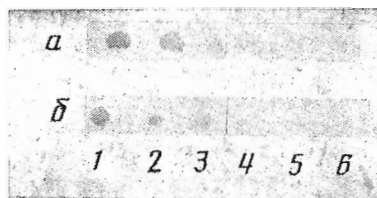


Рис. 2. Гибридизация ДНК фага λ , биотинилированной после модификации дигидразидом янтарной кислоты при 95°C (а) и 37°C в присутствии бисульфита (б), с ДНК фага λ , иммобилизованной на нейлоновых фильтрах в количестве 1 нг (1), 200 нг (2), 80 (3), 16 (4), 3 (5), 0,6 нг (6)

рования ДНК гидразидом биотина в присутствии бисульфита [3] является значительно меньшее время реакции и, следовательно, меньшая степень дезаминирования цитозиновых остатков ДНК [11], а также меньший расход биотина и возможность вводить в ДНК не только биотин, но и другие разнообразные гаптены. Включение дигидразида янтарной кислоты в ДНК без бисульфита происходит в условиях, аналогичных реакции ДНК с 4-аминоксипутиламином [4] и со смесью этилендиамина — бисульфит [5]. По сравнению с первым реагентом дигидразид янтарной кислоты несколько более доступен, так как является коммерческим препаратом. Достоинством обоих реагентов (дигидразида янтарной кислоты и 4-аминоксипутиламина) служит отсутствие в реакционной среде легко окисляющегося бисульфита.

Авторы выражают благодарность В. А. Коваленко за предоставление препаратов стрептавидина и участие в обсуждении работы.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадекс G-50 сверхтонкой (Pharmacia Швеция); желатин, казеин (Difco, США); FITC флуоресцеин изотиоцианат EDTA (Serva, ФРГ); тетразолиевый нитроголубой, 5-бром-4-хлориндолил-3-фосфат (Sigma, США); нейлоновые фильтры Gene Screen Plus (DuPont Nеп. США); Твин-20 Merk, ФРГ); ДНК фагов λ и T7, щелочная фосфатаза из кишечника тюленя (НПО «Биолар», Олайне); остальные реактивы отечественные квалификации х.ч. или ч.д.а.

Дигидразид янтарной кислоты был получен гидразинолизом диэтилсукцината и переосажден спиртом из воды, т. пл. $170\text{--}171^{\circ}\text{C}$ [12]. N-Оксисукцинимидный эфир ϵ -амидокапроилбиотина получен по ранее описанному методу [13].

Модификация ДНК дигидразидом янтарной кислоты. К водному раствору ДНК фага T7 или фага λ (0,2–10,0 мг/мл), прогретому 5 мин при 95°C , добавляли равный объем 2 М раствора дигидразида янтарной кислоты, доведенного уксусной кислотой до pH 5,0 непосредственно перед реакцией, и инкубировали при 95°C от 15 мин до 1 ч, ДНК отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 в 0,1 М натрий-боратном буфере pH 8,5. Фракции ДНК обрабатывались FITC для определения степени модификации [5] или 50 мМ раствором N-оксисукцинимидного эфира ϵ -амидокапроилбиотина в диметилформамиде (100 мкл (5 мкмоль) на 1 мкмоль (300 мкг) оснований ДНК). От избытка биотинилирующего реагента ДНК отделяли на сефадексе G-50 в 0,15 М NaCl и раствор хранили при -20°C .

Модификация ДНК дигидразидом янтарной кислоты и бисульфитом натрия. ДНК фага T7 или фага λ в воде (0,2–10 мг/мл) денатурировали (10 мин при 100°C , 5 мин при 0°C), прибавляли двойной объем 2 М дигидразида янтарной кислоты, доведенного до pH 4,5 уксусной кислотой непосредственно перед началом реакции и один объем 4 М бисульфита натрия, pH 4,5 (конечная концентрация дигидразида янтарной кислоты 1 М,

бисульфита — 1 М). Реакционную смесь инкубировали при 37° С 1–5 ч и обрабатывали как описано выше.

Гибридизация и детекция биотинилированных ДНК. ДНК фага λ (5 мкг/мл) в 0,25 н. NaOH денатурировали 10 мин при 100° С, быстро охлаждали в ледяной бане и разводили охлажденным раствором 0,125 н. NaOH, содержащим 0,02 М NaCl и 0,02 М Na-цитрат, 5-кратно уменьшая концентрацию ДНК при каждом разведении. Растворы ДНК (по 1 мкл) наносили на нейлоновые фильтры, предварительно вымоченные 30 мин в 0,4 М трис-HCl, pH 7,5, и высушенные на воздухе. В качестве контроля тем же способом наносили тимусную ДНК (5 мкг/мл). Фильтры высушивали на воздухе, переносили в предгибридизационный раствор (1 мл на 1 см²), содержащий 1% SDS, 1 М NaCl, 10% декстрансульфат, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, инкубировали 15 мин при 65° С (здесь и далее при постоянном качании), затем добавляли ДНК спермы лосося до концентрации 40 мкг/мл и биотинилированную ДНК (0,2 мкг/мл), предварительно денатурированную в воде (100° С, 10 мин). Гибридизацию вели при 65° С в течение 6–24 ч. По окончании гибридизации фильтры промывали 2×5 мин 2×SSC (0,3 М NaCl, 0,1 М цитрат Na, pH 7,0) (2 мл/см²·кв.) при 20° С, затем 2×30 мин 2×SSC с 1% SDS при 65° С и 2×10 мин 0,1×SSC при 20° С. Дальнейшие процедуры проводились при 30° С. Отмытые фильтры 30–40 мин «забивали» раствором TBS (0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 0,05% Твин-20), содержащим 3% желатин, 1% казеин, затем промывали 5 мин раствором TBS, содержащим 1% желатин. Фильтры инкубировали 10–15 мин в том же растворе с добавлением стрептавидина (1 мкг/мл), отмывали от стрептавидина TBS с желатином 1% (3×5 мин). Затем фильтры переносили в TBS, содержащий биотинилированную фосфатазу (0,5 мкг/мл), полученную по ранее описанному нами методу [5], инкубировали 15–20 мин и отмывали TBS (3×5 мин). После этого фильтры отмывали 5 мин фосфатным буфером (0,1 М трис-HCl (pH 9,5), 10 мМ MgCl, 0,1 М NaCl), переносили в фосфатный буфер, куда добавляли 5-бром-4-хлоридолил-3-фосфат (раствор в DMF (50 мг/мл), 4 мкл/мл буфера) и тетраэтиловый нитроголубой (раствор в 70% DMF (75 мг/мл), 3 мкг/мл буфера). Инкубировали 0,5–15 ч в затемненном месте при комнатной температуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matthews J. A., Kricka L. J. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 169. № 1. P. 1–25.
2. Viscidi R. P., Connely C. J. // *J. Clin. Microbiol.* 1986. V. 23. № 2. P. 311–317.
3. Reisfeld A., Rothenberg J. M., Bayer E. A., Wilchek M. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 142. № 2. P. 519–526.
4. Адарчев В. А., Дымыщ Г. М., Калачиков С. М., Поздняков П. И., Салганик Р. И. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 8. С. 1066–1069.
5. Турчинский М. Ф., Айбиндер Е. И., Свердлов Е. Д. // *Молекуляр. биология.* 1988. Т. 22. № 6. С. 1545–1553.
6. Keller G. N., Cumming C. U., Huang D.-P., Manak M. M., Ting R. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 170. № 2. P. 411–450.
7. Galor L., Mellema J. B., Mondrianakis E. N., Beer M. // *Biochemistry.* 1967. V. 6. № 7. P. 1909–1915.
8. Shulman L. H., Pelka H., Reines S. A. // *Nucl. Acids. Res.* 1981. V. 9. № 5. P. 1203–1217.
9. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 11. P. 6633–6637.
10. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 8. P. 4045–4049.
11. Shapiro R., DiFate V., Welcher M. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1974. V. 9. № 3. P. 906–912.
12. Jensen J., Bak P. // *Z. anorg. und allg. Chem.* 1936. V. 228. № 1. P. 85–92.
13. Costello S. M., Felix R. T., Giese R. W. // *Clin. Chem.* 1979. V. 25. № 8. P. 1572–1580.

Поступила в редакцию
30.XII.1988

OBTAINING HYBRIDISATION PROBES BY DNA MODIFICATION
WITH SUCCINIC DIHYDRAZIDE

TURCZINSKY M. F., AINBINDER E. I., KNORRE V. D., SHCHERBO S. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A two-step chemical method of introduction of nonradioactive labels in DNA was proposed. At first step DNA is modified by succinic dihydrazide at pH 5.0 and 95° C, or at pH 4.5 and 37° C in presence of sodium bisulfite. Then FITC or biotin are joined to the hydrazide groups. DNA modified in this way were shown to be effective hybridisation probes.