



УДК 574.963.32.057 : 577.113.083.3

© 1991 г.

*Н. Н. Карышев, Т. Ю. Бондаренко, И. А. Вторушина,
С. М. Гиприянов*

ВВЕДЕНИЕ АМИНОАЛКИЛЬНЫХ ГРУПП В ГОТОВЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ ПУТЕМ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ ОСТАТКОВ ЦИТОЗИНА

*ВНИИ молекулярной биологии, НПО «Вектор» Минмедпрома СССР,
пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Катализируемое бисульфитом переаминирование остатков цитозина с помощью этилендиамина использовано для неспецифического получения аминоклильных производных готовых синтетических олигонуклеотидов*. Показано, что наличие четырех — шести остатков цитозина в молекуле достаточно для осуществления полного превращения исходного олигомера в смесь его аминоклильных производных. Один из полученных таким образом аминоклильных олигонуклеотидов использован для приготовления биотинилированного гибридационного зонда.

Синтетические олигонуклеотиды, несущие первичные аминогруппы, используются для получения флуоресцентных праймеров [1], носителей для «сэндвич»-гибридизации [2], а также гибридационных зондов, несущих флуорохром, гаптен или фермент (см., например, работу [3] и ссылки в ней). Известные методы синтеза аминоклильных олигонуклеотидов в основном включают в себя трудоемкий синтез интермедиатов с защищенной аминогруппой [4—6]. Присоединение алкилдиамина по концу олигомера требует дополнительной стадии активации этого конца, а также очистки продукта либо ВЭЖХ, либо электрофорезом в ПААГ [7]. В то же время в химии природных нуклеиновых кислот используется катализируемое бисульфитом переаминирование остатков цитозина, позволяющее модифицировать до 40% этого основания в полинуклеотидной цепи. Высокая степень превращения, исключительная доступность и дешевизна применяемых реагентов, а также простота экспериментального воплощения побудили нас использовать этот метод [8] для введения аминоклильных групп в относительно короткие синтетические олигонуклеотиды.

Как известно, реакция переаминирования протекает не до конца [8], поэтому представлялось практически важным исследовать, каким должно быть минимальное количество остатков цитозина в молекуле для полного превращения исходного олигонуклеотида, т. е. введения по крайней мере одной модификации. Для этого несколько очищенных синтетических олигонуклеотидов подвергали переаминированию с помощью этилендиамина в условиях, оптимизированных в работе [8]. Далее модифицированные олигомеры обессоливали гель-фильтрацией и анализировали электрофорезом в ПААГ (рис. 1, 1—4). Рассмотрение радиоавтограммы позволяет сделать вывод, что присутствия четырех — шести остатков цитозина в молекуле достаточно для практически полного превращения исходного олигонуклеотида в смесь замещенных. Заметное уменьшение подвижности олигомеров в геле с увеличением количества введенных за-

* Префикс d (дезокс) далее везде для краткости опущен.

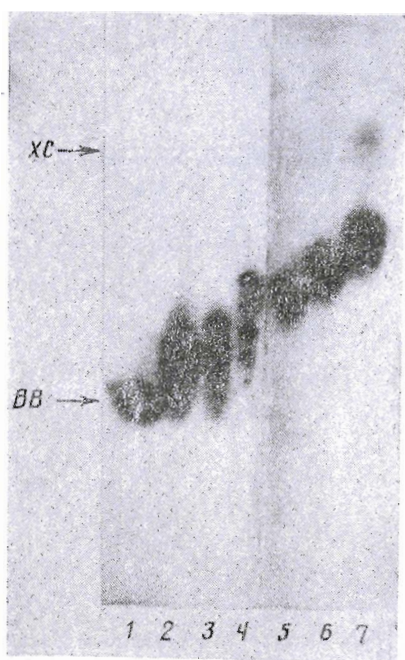


Рис. 1

Рис. 1. Анализ с помощью электрофореза в 20% ПААГ (денатурирующие условия) $5'$ - ^{32}P -фосфорилированных олигонуклеотидов до и после модификации: 1— $d(\text{GATCCATCGATA})$ до модификации; 2—то же после переаминирования; 3— $d(\text{GGCGGCGACCT})$ после переаминирования; 4— $d(\text{AGGTCGCCGCC})$ после переаминирования; 5—немодифицированный 21-мер (1); 6—аминоалкилпроизводное олигонуклеотида (1); 7—его биотинилированное аминоалкилпроизводное. Стрелками указано положение на геле маркеров — бромфенолового синего (BB) и ксиленцианола (XC)

Рис. 2. Детекция ДНК фага M13mp9MH с помощью обычного $5'$ -биотинилированного производного олигонуклеотида (I) (A) и производного, полученного обсуждаемым методом (B). ДНК нанесена в количествах: 700 (1 и 6), 350 (2), 116 (3), 58 (4) и 11,6 (5) нг. Контроль — ДНК фага M13mp9 (6)

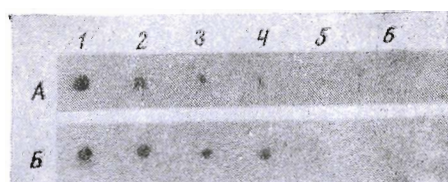


Рис. 2

местителей вполне закономерно и согласуется с литературными данными [9]. На основании этого анализа можно также сделать вывод об отсутствии фрагментации молекул в процессе модификации. Разумеется, такие смеси непригодны для получения праймеров для секвенирования, но их, по нашему мнению, во многих случаях можно использовать при получении носителей и зондов для гибридизации. С целью подтверждения этого мы модифицировали олигонуклеотид $d(\text{GGATCCGTCATGGCAGACACA})$ (I), комплементарный участку одноцепочечной ДНК фага M13mp9MH [10]. После введения аминоалкильных групп и гель-фильтрации олигомер (I) обрабатывали *N*-оксисукцинимидным эфиром биотинил- ϵ -аминокапроновой кислоты. Поскольку относительный вклад введенных заместителей в подвижность 21-членного олигонуклеотида меньше, чем для 12-членного, по радиоавтограмме оценить полноту модификации после переаминирования было невозможно. Однако после введения биотина отсутствие в реакционной смеси немодифицированного олигомера (I) стало очевидным (рис. 1, 5—7). В то же время известный факт количественного протекания биотинилирования олигонуклеотидов, содержащих аминоалкильные группы [2, 9], позволяет надеяться, что практически все молекулы зонда несут как минимум по одному остатку биотина.

Полученный таким образом зонд сравнивали в экспериментах по гибридизации с производным олигонуклеотида (I), несущим фрагмент биотинил- ϵ -аминокапроновой кислоты на $5'$ -конце молекулы. Из рис. 2 можно сделать вывод, что в случае обоих зондов чувствительность и специфичность детекции мишени практически идентичны. Следовательно, переаминирование цитозиновых остатков в относительно коротких синтетических олигонуклеотидах может служить приемлемой альтернативой традиционным способам получения модифицированных олигомеров, содержащих аминоалкильные группы. Отсутствие необходимости в дорогостоящих методах очистки может сделать этот метод особенно привлекательным для небольших лабораторий биологического профиля. В то же время понадобятся дальнейшие исследования для выяснения всего спектра применимости подобных модифицированных олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

Все немодифицированные олигонуклеотиды, а также олигонуклеотид (I) с фрагментом биотинил- ϵ -аминокапроновой кислоты на 5'-конце получены из отечественного коммерческого источника (фирма «Интеллектрон» Межакадемического молодежного объединения, г. Краснообск Новосибирской обл.). Для гибридизации денатурированную нагретым ДНК-мишень наносили при помощи дот-блот-камеры отечественного производства на полоски (1 \times 6 см) нитроцеллюлозного фильтра с диаметром пор 0,45 мкм (Sigma, США). Предгибридизацию и гибридизацию осуществляли при 55° С и концентрации олигонуклеотидных зондов 0,5 мкмоль/мл. Состав растворов, время процедур и способ отмывки те же самые, что и в работе [11]. Детекцию остатков биотина с помощью конъюгата стрептавидин — щелочная фосфатаза и хромогенного субстрата (5-броминдоксилфосфат и нитротетразолий синий) проводили описанным способом [12]. Реактивы для гибридизации были производства фирмы Sigma (США), для детекции биотина и получения модифицированных олигонуклеотидов — отечественные.

Переаминирование олигонуклеотидов. К 50% (об.) раствору этилендиамина в воде добавляли концентрированную HCl до pH 5,5. Полученный раствор доводили до концентрации 20% по этилендиамину и насыщали метабисульфитом натрия при 25° С. Раствор 1—10 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида (I) или других (см. подпись к рис. 1) в воде упаривали досуха и растворяли в 1 мл полученного раствора этилендиамина. Через 15 ч при 25° С реакционную массу наносили на колонку (16 \times 250 мм) с Fraktogel HW-40 (Merck, ФРГ) и элюировали водой, контролируя элюцию с помощью проточного денситометра UA-5 (ISKO, США). Собирали фракцию, соответствующую первому пику. Выход 85—95% от начального оптического поглощения.

Биотинилирование олигонуклеотида (I). К раствору 5 ОЕ₂₆₀ аминоксилпроизводного нуклеотида (I) с предыдущей стадии в 500 мкл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,5) добавляли свежеприготовленный раствор 2 мг N-оксисукцинимидового эфира биотинил- ϵ -аминокапроновой кислоты в 200 мкл свеженережанного диметилформамида, перемешивали и выдерживали 15 ч при 25° С. Олигонуклеотид очищали гель-фильтрацией, как в предыдущей методике. Выход 4,5 ОЕ₂₆₀.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith L. M., Fung S., Hunkapiller M. H., Hunkapiller T. J., Hood L. E. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 13. № 7. P. 2399—2414.
2. Ghosh S., Musso G. F. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 13. P. 5353—5372.
3. Urdea M. S., Warner B. D., Running J. A., Stempien M., Clyne J., Horn N. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 11. P. 4937—4956.
4. Roduit J.-P., Shaw J., Chollet A. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1/2. P. 349—352.
5. Tanaka T., Sakata T., Fujimoto K., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 15. P. 6209—6224.
6. Coull J. M., Weit H. L., Bishoff R. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 3991—3994.
7. Wachter L., Jablonsky J., Ramachandran K. L. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 20. P. 7985—7994.
8. Coultee F., Yolken R. H., Viscidi R. P. // Anal. Biochem. 1989. V. 191. № 1. P. 153—162.
9. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Грачев С. А., Демченко Е. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 12. С. 1644—1654.
10. Петренко В. А., Киприянов С. М., Семенова Л. Н., Акименко З. А., Рукавишников М. Ю., Болдырев А. Н., Поздняков П. И., Гондралин Ю. В. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 3. С. 889—898.
11. Riley L. K., Marshall M. E., Coleman M. S. // DNA. 1986. V. 5. № 4. P. 333—337.
12. Al-Nakim A. H., Hull R. // Biochem. J. 1988. V. 251. № 4. P. 935—938.

Поступила в редакцию
11.III.1990

После доработки
5.XI.1990

N. N. KARPYSHEV, T. Yu. BONDARENKO, I. A. VTORUSHINA, S. M. KIPRIYANOV

INTRODUCTION OF AMINOALKYL FUNCTIONS INTO SYNTHESIZED
OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES VIA TRANSAMINATION OF CYTOSINE
RESIDUES

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

The bisulphite-catalysed transamination of cytosine residues by means of ethylenediamine generally used for the natural nucleic acids modification has been extended on relatively short synthetic oligonucleotides. One of the aminoalkyloligonucleotides thus obtained has been used for preparing a biotinylated hybridisation probe.