



УДК 577.113.4 : 577.164.187

© 1991 г.

М. Ф. Турчинский, С. Н. Щербо, В. Д. Кнорре,
Т. Б. Колесник, Ю. В. Алейник*

ПОЛИФОТОБИОТИН — НОВЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ БИОТИНА В НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;
Научный центр молекулярной диагностики МЗ СССР, Москва

На основе низкомолекулярного олигоэтиленimina (средняя молекулярная масса 600 Да) получен новый реагент для биотинилирования ДНК-зондов — полифотобиотин (ПФБ). Фотоактивной группой является 4-азидосалициловая кислота. Процедура получения биотинилированных ДНК-зондов занимает около 20 мин. На примере ДНК рВВ322 показано, что такие зонды столь же эффективны в гибридизационном анализе, как и получаемые с помощью ферментативного включения в ДНК Bio-4-dUTP.

Для гибридизационного анализа нуклеиновых кислот в последнее время широко применяют олиго- и полинуклеотидные зонды, несущие нерадиоактивные метки [1]. Среди указанных меток чаще всего используют различные производные биотина [2]. Для его включения в ДНК разработан ряд ферментативных [3, 4] и химических [5—11] методов. Одной из особенностей биотиновой метки (как, впрочем, и большинства других нерадиоактивных меток) является то, что в гибридизационные зонды ее можно вводить в довольно ограниченном количестве (как правило, не более 5% (молярных) от числа нуклеиновых оснований зонда, а чаще всего и ниже). В противном случае ухудшаются гибридизационные свойства зонда, в том числе и специфичность. Среди возможных причин этого явления — нарушение комплементарных взаимодействий в модифицированных биотиновыми производными участках полинуклеотидных зондов. Для повышения числа биотинилированных остатков в зонде при сохранении низкой степени его модификации возможно использование полимерных молекул, несущих несколько биотиновых производных [12].

В настоящей работе предложено использовать полимерный фотоактивируемый биотинилирующий агент — производное низкомолекулярного олигоэтиленimina (ОЭИ(600), средняя молекулярная масса 600 Да), содержащее остатки ϵ -амидокапроилбиотина и 4-азидосалициловой кислоты в качестве фотоактивируемой группы. Этот реагент позволяет за один акт фотохимической модификации вводить сразу несколько остатков биотина в ДНК.

Полифотобиотины на основе ОЭИ(600) были получены при действии на указанный реагент смеси ацилирующих агентов — N-оксисукцинимидных эфиров ϵ -амидокапроилбиотина и 4-азидосалициловой кислоты в различных соотношениях. Предварительные опыты показали, что даже при большом избытке ацилирующих агентов только половина аминокислотных групп ОЭИ(600) подвергается ацилированию. Это может быть связано как со значительной разветвленностью ОЭИ(600) и наличием в нем тре

Сокращения: ОЭИ(600) — олигоэтиленимин со средней молекулярной массой 600 Да; ПФБ — полимерный фотобиотин; Bio-4-dUTP — 5-аллиламидадобиотинил-дезоксирибозидинтрифосфат; БСА — бычий сывороточный альбумин (фракция V). Раствор Денхардта: 0,02% фикол, 0,02% поливинилпирролидон, 0,05% БСА. Буфер TE: 10 мМ трис-HCl (pH 7,0), 1 мМ EDTA. Буфер TST: 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), 0,5 М NaCl, 0,05% твин-20. Буфер SSC: 0,15 М NaCl, 15 мМ цитрат натрия (pH 7,0). PCR — полимеразная цепная реакция.

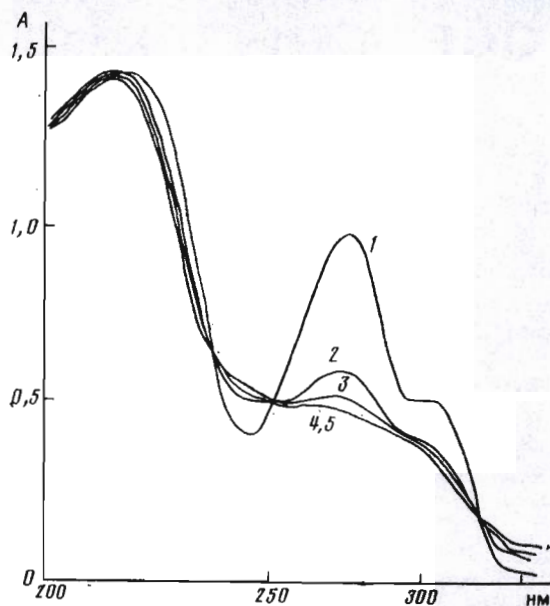


Рис. 1. Спектр поглощения водного раствора ПФБ до (1) и после облучения УФ с λ_{\max} 366 нм в течение 3 (2), 6 (3), 10 (4), 20 мин (5)

тичных аминогрупп, так и со стерическими затруднениями для ацилирования части аминогрупп. Наличие неацилированных аминогрупп в ПФБ обеспечивает высокое сродство данного производного к ДНК, однако образующиеся при этом соли ДНК с фотобиотином малорастворимы. В связи с этим фотобiotинилирование необходимо проводить при низких концентрациях обоих реагентов — 0,1 мг/мл или ниже.

Если в качестве растворителя использовать 70% водный раствор DMSO, в котором соли ДНК с ПФБ лучше растворимы, можно использовать более высокие концентрации реагентов. Для проведения фотореакции нами использовалось излучение от УФ-источника с λ_{\max} 366 нм. В рассматриваемых экспериментальных условиях полное фотопревращение ПФБ протекает достаточно быстро — за 10–20 мин (рис. 1). В аналогичных условиях в данном временном интервале никаких существенных изменений в спектрах поглощения ДНК не наблюдается.

Эффективность биотинилированных ДНК-зондов проверяли методом дот-блот-гибридизации. ДНК-мишенью служила RF-форма ДНК фага M13mp18, а в качестве зонда использовали биотинилированные образцы SS-формы ДНК указанного фага. Сравнение зондов, полученных при биотинилировании ДНК образцами ПФБ, содержащими остатки биотина и 4-азидосалициловой кислоты в различных соотношениях (рис. 2), показало, что их эффективность практически одинакова. Существенное влияние на эффективность зондов оказывает соотношение ДНК — ПФБ в реакционной смеси. Как видно из рис. 3, оптимально соотношение ДНК — ПФБ, равное 1 : 1. По-видимому, повышение степени модификации ДНК с помощью ПФБ выше определенной величины ведет к ухудшению гибридационных свойств зондов. Интересно, что такое же весовое соотношение ДНК — фотобиотин оптимально и для фотобиотина Ферстера [8].

Для ДНК плазмиды pBR322 было проведено сравнение двух биотинилированных зондов: полученного с помощью ПФБ и изготовленного путем ферментативного включения в ДНК Bio-4-dUTP. Приготовление последнего зонда проводили недавно описанным методом [5], в котором последовательно используется реакция с «рассеянной затравкой» и PCR. Оба рассматриваемых ДНК-зонда были использованы в Саузерн-блот-гибридизации с ДНК pBR322, гидролизованной эндонуклеазой рестрикции *CfrI*, в качестве ДНК-мишени. Результаты гибридазации (рис. 4) свидетельствуют, что оба зонда одинаково эффективны.

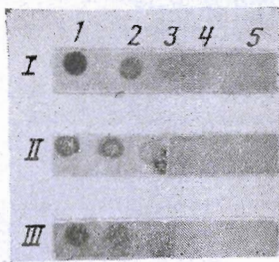


Рис. 2

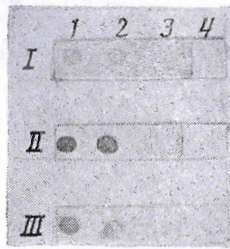


Рис. 3

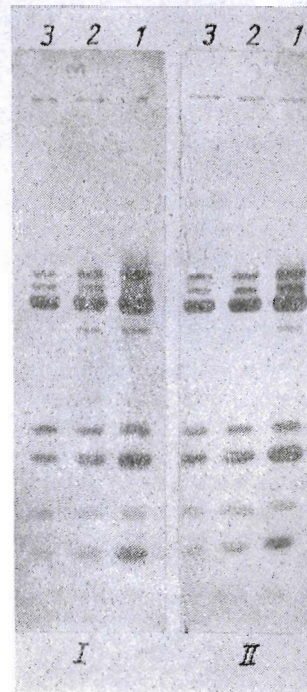


Рис. 4

Рис. 2. Гибридизация SS-ДНК фага M13mp18, биотинилированной ПФБ с молярными отношениями биотин — 4-азидосалициловая кислота 1 : 1 (I), 1 : 2 (II), 1 : 3 (III), с RF-ДНК фага M13mp18, иммобилизованной на нейлоновых фильтрах в количестве 1 нг (1), 200 (2), 40 (3), 8 (4), 1,6 нг (5). Проявление конъюгатом пероксидаза—стрептавидин

Рис. 3. Гибридизация SS-ДНК фага M13mp18, биотинилированной ПФБ (молярные соотношения биотин — 4-азидосалициловая кислота 1 : 1) при весовом соотношении ДНК—ПФБ 1 : 0,5 (I), 1 : 1 (II) и 1 : 2 (III), с RF-ДНК фага M13mp18, иммобилизованной на нейлоновых фильтрах в количестве 200 (1), 40 (2), 8 (3) и 1,6 нг (4). Проявление конъюгатом пероксидаза—стрептавидин

Рис. 4. Гибридизация ДНК rBR322, биотинилированной реакцией с ПФБ (I) и ферментативным включением Bio-4-dUTP (II), с ДНК rBR322 (в количествах 20 (1), 10 (2) и 2 нг (3)), гидролизованной эндонуклеазой рестрикции *Cfr*I и, после гель-электрофореза, иммобилизованной на нейлоновых фильтрах (Саузерн-блот). Проявление комплексом биотинилированная фосфатаза—стрептавидин

Приведенные результаты показывают, что полученный нами ПФБ представляет собой просто синтезируемый и достаточно эффективный биотинилирующий агент для получения ДНК-зондов. Нами были также синтезированы ПФБ на основе более высокомолекулярных полиэтилениминов (со средней молекулярной массой 5000 и 30 000). Синтез таких ПФБ несложен, однако нам не удалось получить с их помощью эффективных ДНК-зондов. Возможная причина этого, по нашему мнению, связана с тем, что данные ПФБ могут вызывать межцепочечные сшивки в ДНК, что затрудняет процесс гибридизации.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБХ АН СССР А. С. Иванову за предоставление препарата олигоэтиленимины и В. А. Коваленко за предоставление конъюгата стрептавидин-пероксидаза и участие в обсуждении работы.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадекс G-25, сверхтонкий (Pharmacia, Швеция), тетразолиевый нитроголубой, 5-бром-4-хлориндолил-3-фосфат, *o*-дианизидин, дезоксинуклеозидтрифосфаты, щелочная фосфатаза из кишечника телянка, БСА (Sigma, США); нейлоновые фильтры Nubond N

(Amersham, Англия); твин-20 (Merck, ФРГ); ДНК фага M13mp18, плазида pBR322, Bio-4-dUTP (НПО «Биолар», Олайне); остальные реактивы отечественные, квалификации х. ч. или ч. д. а.

N-Оксисукцинимидные эфиры ϵ -амидокапроилбиотина [13] и 4-азидосалициловой кислоты [14] получены ранее описанными методами. Стрептавидин и конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена предоставлены В. А. Коваленко. Для проведения фотохимической реакции ПФБ с ДНК использовали УФ-лампу, имеющую максимум излучения 366 нм и мощность 40 Вт (Helling, ФРГ).

Получение полимерного фотобиотина (ПФБ). К раствору 2,2 мг (500 мкмоль аминогрупп) ОЭИ(600) в 100 мкл диоксана быстро добавляли смесь 5 мг (110 мкмоль) N-оксисукцинимидных эфиров ϵ -амидокапроилбиотина и 2,7–8,1 мг (100–300 мкмоль) 4-азидосалициловой кислоты, растворенных в 1 мкл диоксана, оставляли на 1 ч при 20° С. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали 1 мл диоксана, высушивали в вакууме до постоянного веса и растворяли в воде (10 мг/мл) подкисленной уксусной кислотой (20 мкл на 1 мл воды). Нерастворимый осадок отделяли центрифугированием, раствор хранили при 20° С. Хранение в течение года в указанных условиях не привело к изменению свойств раствора ПФБ.

Проведение фотохимической реакции ПФБ с ДНК. К раствору, содержащему 0,1 мг/мл неденатурированной ДНК в буфере TE, добавляли равный объем раствора ПФБ в воде (0,1 мг/мл) и после перемешивания оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Затем реакционную смесь наносили на пленку Parafilm, помещенную на лед, в виде капель по 20–40 мкл и облучали сверху светом УФ-источника. Если объем реакционной смеси был больше, ее облучали в кварцевых кюветах для спектрофотометрии с длиной оптического пути 1 мм. Время окончания фотореакции контролировалось спектрофотометрически по изменениям в спектрах поглощения при облучении в аналогичных условиях раствора ПФБ (200 мкг в 200 мкл). В использованных нами условиях время полного фоторазложения ПФБ составляло 10 мин (рис. 1). К реакционной смеси добавляли 4 М NaOH до концентрации 0,1 М и подвергали скоростной гель-фильтрации, совмещенной с центрифугированием на сефадексе G-25 (сверхтонкий), уравновешенном буфером TE, с предварительным удалением его из свободного объема (объем колонки 10-кратный по отношению к объему реакционной смеси). Пробы биотинилированной ДНК могут храниться в течение нескольких месяцев. Реакцию ДНК с ПФБ можно также проводить в 70% DMSO в воде. В указанных условиях весовое отношение ПФБ — ДНК можно повысить до 10 : 1.

Ферментативное включение Bio-4-dUTP в плазмиду pBR322 [15]. Реакционная смесь содержала:

а) 10 мкл буфера, содержащего 240 мМ трис-HCl (pH 7,5), 24 мМ MgCl₂, 50 мМ β -меркаптоэтанол; 2 мкл 1% БСА, 0,45 мкг ДНК pBR322, гидролизованной эндонуклеазой рестрикции *Pst*I, в 1,5 мл воды, по 2,5 мкл 2 мМ растворов dATP, dCTP и dGTP, 5 мкл 20 мМ раствора Bio-4-dUTP, 2,2 мкг гексануклеотидной фракции гидролизата тимусной ДНК панкреатической ДНКазой в 1,5 мкл воды, 5 мкл 2 М буфера HEPES (pH 8,8), 13,5 мкл воды и 4 мкл (4 ед. акт.) ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). Смесь инкубировали 16–18 ч при комнатной температуре.

б) После окончания реакции отбирали 10 мкл реакционной смеси (оставшаяся часть может храниться при –20° С) и добавляли к ней следующие компоненты: 5 мкл буфера PCR \times 10 (160 мМ (NH₄)₂SO₄, 670 мМ трис-HCl (pH 8,0), 670 мМ MgCl₂, 100 мМ β -меркаптоэтанол, БСА 1,7 мг/мл), по 2,5 мкл 10 мМ растворов dATP, dCTP, dGTP, 7,5 мкл 1,2 мМ Bio-4-dUTP и 1,6 мкл 20 мМ dTTP, 1,5 мкл (3 ед. акт.) ДНК-полимеразы *Termus aquaticus*, 17,4 мкл воды. Проводили 30 циклов: 95° С — 1 мин, 30° С — 1 мин, 70° С — 3 мин. По окончании реакции определяли концентрацию ДНК и использовали зонды без дальнейшей очистки.

Получение комплекса биотинилированная щелочная фосфатаза—стрептавидин. К раствору 1 мг (2100 ед. акт.) щелочной фосфатазы из кише-

ника теленка в 100 мкл буфера I (3 М NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 30 mM триэтаноламин-HCl, pH 7,0) добавляли 5 мкл 100 mM раствора N-оксисукцинимидного эфира ε-амидокапроилбиотина в DMF и оставляли на 2 ч при 20° С. Реакционную смесь подвергали быстрой гель-фильтрации с центрифугированием на сефадексе G-25, сверхтонкий (1,5 мл, буфер из свободного объема удален), уравновешенном буфером I. Биотинилированную фосфатазу хранили при 4° С. 4 мкл биотинилированной фосфатазы вносили в 100 мкл буфера II (0,1 М NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,05% твин-20, 0,1 М трис-HCl, pH 7,5), добавляли 2 мкл (2 мкг) раствора стрептавидина и оставляли на 15—18 ч при 4° С, затем добавляли еще 14 мкл (14 мкг) раствора стрептавидина и оставляли при 4° С на 48 ч, затем хранили при -20° С. Полученный высокоактивный комплекс не уступает по активности коммерческим конъюгатам стрептавидин—щелочная фосфатаза фирмы Calbiochem (США).

Проведение гибридизационного анализа. Образцы ДНК для дот-блот-анализа денатурировали в 0,3 М NaCl, 0,1 М NaOH при 37° С в течение 10 мин. Саузерн-блот-перенос на нейлоновые мембраны проводили по описанной методике [15]. ДНК-мишени фиксировали на фильтрах УФ-облучением в течение 2 мин.

Предгибридизацию проводили 1 ч при 65° С в растворе 5 × SSC, 2 × раствор Денхардта, 6% полиэтиленгликоль 6000, 0,1% SDS. Гибридизацию проводили 16—18 ч при 65° С в указанном растворе, в который добавляли ДНК спермы лосося (дробленая ультразвуком, денатурированная), 50 мкг/мл; концентрация биотинилированной ДНК — зонда составляла 30—100 нг/мл.

По окончании гибридизации фильтры промывали (здесь и далее при постоянном покачивании) 2 × SSC с 0,1% SDS (2 × 15 мин, 20° С), затем 0,1 × SSC с 0,1% SDS (2 × 15 мин при 65° С). Для проявления фильтры обрабатывали 4% раствором желатина в TST (40 мин, 20° С), 1% раствором желатина в TST (15 мин, 20° С), раствором конъюгата стрептавидин—пероксидаза (1—3 мкл/мл) в том же буфере (40 мин, 20° С), отмывали тем же буфером (3 × 10 мин, 20° С) и затем 0,1 М трис-HCl, pH 7,5 (5 мин, 20° С). Проявляли 5—10 мин в растворе 3,4 мг имидазола в 5 мл 0,1 М трис-HCl (pH 7,5), в который добавляли *o*-дианизидин (3 мг в 1 мл этанола) и 8 мкл 30% H₂O₂.

Для проявления конъюгатом стрептавидин—щелочная фосфатаза фильтры обрабатывали TST (1 ч, 20° С), затем раствором, содержащим конъюгат стрептавидин—щелочная фосфатаза (1—3 мкл/мл) в 0,1 М трис-HCl (pH 7,5) и 150 mM NaCl (40 мин, 20° С), отмывали тем же буфером (2 × 15 мин), затем 15 мин фосфатазным буфером (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM трис-HCl, pH 9,5), заливали фосфатазным буфером, в который добавляли 5-бром-4-хлориндолилфосфат (раствор в DMF с концентрацией 50 мг/мл, 4 мкл/мл буфера) и тетразолиевый нитроголубой (раствор в 70% DMF в воде с концентрацией 75 мг/мл, 3 мкл/мл буфера). Инкубировали 0,5—15 ч в затемненном месте при 20° С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matthews J. A., Kricka L. J. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 169. № 1. P. 1—125.
2. Wielchek M., Bayer E. A. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 171. № 1. P. 1—32.
3. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 11. P. 6633—6637.
4. Leary J. J., Brigatti D. J., Ward D. C. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. № 8. P. 4044—4048.
5. Takahashi T., Mitsuda T., Okuda K. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 179. № 1. P. 77—85.
6. Viscidi R. P., Connely C. J. // *J. Clin. Microbiol.* 1986. V. 23. № 2. P. 311—317.
7. Турчинский М. Ф., Айнбиндер Е. И., Свердлов Е. Д. // *Молекуляр. биология.* 1988. Т. 22. № 6. С. 1545—1553.
8. Forster A. C., McInnes J. L., Scingle D. C., Symons R. H. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. № 2. P. 745—761.
9. Arakawa H., Maeda M., Tsuji A., Takahashi T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1989. V. 37. № 7. P. 1831—1833.
10. Турчинский М. Ф., Айнбиндер Е. И., Кнорре В. Д., Щербо С. Н. // *Биоорганич. химия.* 1989. Т. 15. № 10. С. 1341—1345.

11. Вейко Н. Н., Карпухин А. В., Салимов А. Г., Немцова М. В., Спитковский Д. М. // Биотехнология. 1989. Т. 5. № 4. С. 414—419.
12. Al-Hakim A., Hull R. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 24. P. 9965—9976.
13. Costello S. M., Felix R. T., Gieje R. W. // Clin. Chem. 1979. V. 25. № 8. P. 1572—1580.
14. Ji T. H., Ji J. // Anal. Biochem. 1982. V. 121. № 2. P. 286—289.
15. Thomas P. S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 9. P. 5201—5205.

Поступила в редакцию
17.VIII.1990

M. F. TURCHINSKY, S. N. SHCHERBO*, V. D. KNORRE, T. B. KOLESNIK,
U. V. ALEYNIK

POLYPHOTOBIO TIN, A NEW REAGENT FOR INTRODUCING BIOTIN IN NUCLEIC ACID

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

** Scientific Centre of Molecule Diagnostics, Health Ministry of the USSR, Moscow*

A new reagent, polyphotobiotin (PPhB), for labelling DNA probes has been obtained using low molecule oligoethylenimine (M 600 Da). Photoreactive group of PPhB is 4-azido-salicylic acid. The procedure is simple and quick, the reaction time being about 20 min. PPhB-labelled DNA has the same efficiency in the hybridisation analysis as DNA labelled with Bio-4-dUTP via PCR.