



УДК 577.2.08

© 1992 г.

*С. М. Балачиков, В. А. Адаричев, Г. М. Дымина***ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДНК НА МИКРОПОРИСТЫХ МЕМБРАНАХ
С ПОМОЩЬЮ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ***Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Проведено сравнение различных способов иммобилизации ДНК на микропористых капроновых и нитроцеллюлозных мембранах. Высушивание мембран при высокой температуре приводит к менее эффективной иммобилизации ДНК в сравнении с УФ-облучением. Облучение ультрафиолетом позволяет количественно иммобилизовать ДНК на капроновых и нитроцеллюлозных мембранах. Величина гибридизационного сигнала существенно зависит от дозы облучения, применяемой для иммобилизации. При использовании оптимальной дозы облучения (0,6–0,8 кДж/м²) чувствительность выявления ДНК путем гибридизации значительно выше (в 5 раз для нитроцеллюлозных и более чем в 50 раз для капроновых мембранных фильтров) в сравнении с иммобилизацией ДНК на фильтрах при высушивании в вакууме при высокой температуре.

Нитроцеллюлозные микропористые мембранные фильтры широко используются для иммобилизации нуклеиновых кислот в экспериментах по молекулярной гибридизации. Серьезными недостатками нитроцеллюлозных мембран являются необходимость денатурации образцов ДНК перед нанесением на фильтр, плохая сорбция коротких фрагментов, хрупкость мембранного фильтра после его высушивания в вакууме. В настоящее время в экспериментах по молекулярной гибридизации все большее распространение приобретают мембраны из капрона, в которые для повышения эффективности удерживания ДНК введены положительно заряженные группировки.

Условия иммобилизации и гибридизации, применяемые для нитроцеллюлозных фильтров или модифицированных нейлоновых подложек (Gene Screen Plus, Nybond N⁺ и т. п.), оказываются непригодными в случае мембран из немодифицированного капрона, поскольку в условиях гибридизации и постгибридизационных отмывок большая часть сорбированной ДНК смывается с фильтра, несмотря на хорошую первичную сорбцию ДНК на этих мембранах.

Настоящая работа посвящена изучению способов повышения эффективности иммобилизации ДНК (в частности, использованию для этого коротковолнового ультрафиолета) на микропористых мембранах из чистого капрона и нитроцеллюлозы с целью увеличения чувствительности гибридизации. Было проведено изучение влияния различных факторов на первичную сорбцию ДНК на мембране, сравнительное исследование эффективности разных способов иммобилизации ДНК, а также изучение способов подавления неспецифической (фоновой) сорбции радиоактивного зонда на мембране в процессе гибридизации.

Сорбция ДНК на капроновых мембранах. Для эффективной сорбции ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах ее подвергают денатурации и наносят на фильтры в растворах с высокой ионной силой. При снижении кон-

Сокращения: SDS – додецилсульфат натрия, BSA – бычий сывороточный альбумин, раствор Денхардта – 0,02% BSA, 0,02% фиколл, 0,02% поливинилпирролидон.

центрации соли эффективность удержания ДНК на фильтре падает. Денатурированные фрагменты ДНК плохо сорбируются на нитроцеллюлозе [1].

Для изучения эффективности сорбции ДНК на капроновых фильтрах как нативные, так и денатурированные фрагменты ДНК наносили на стопку из трех фильтров в растворах 1,5 М NaCl, 1 М NH₄OAc и в H₂O. Фрагменты ДНК количественно сорбируются на первом капроновом фильтре вне зависимости от их вторичной структуры и ионной силы раствора, в котором их наносят на фильтр. Одноцепочечные ДНК хорошо задерживаются на нитроцеллюлозе в щелочных денатурирующих растворах [2]. При нанесении ДНК на капроновые мембраны в растворе 0,3 М NaOH в зависимости от условий нанесения от 10 до 50% ДНК проходит сквозь фильтр.

Для определения эффективности первичной сорбции фрагментов ДНК на капроновых мембранах в зависимости от их длины ³²P-меченые двухцепочечные фрагменты *Sau3AI* гидролизата ДНК pBR322 были разделены электрофорезом в ПААГ и перенесены на стопку из двух капроновых фильтров в условиях электропереноса. Из рис. 1 видно, что фрагменты ДНК вплоть до 18 п. о. количественно задерживаются капроновыми мембранами.

На капроновых фильтрах природа удерживания ДНК существенно другая, чем на нитроцеллюлозных. Для нитроцеллюлозы необходимость высокой ионной силы и денатурации ДНК перед нанесением на фильтр свидетельствует о том, что сорбция ДНК на мембранах осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий между основаниями ДНК и нитроцеллюлозой [3].

Капроновые мембраны более гидрофильны и содержат значительное количество аминогрупп. Плотность аминогрупп на капроновых мембранах достигает 2–3·10⁻⁷ моль/см² (М. И. Добриков, НИБХ СО АН СССР, личное сообщение), что при пересчете на объем дает расстояние между аминогруппами не более 30–50 Å и соответствует 10–15 нуклеотидам в ДНК. По-видимому, сорбция ДНК на капроновых фильтрах происходит в основном за счет электростатических взаимодействий между аминогруппами капрона и фосфатами в ДНК. В пользу этого говорит более слабое удерживание ДНК в растворе щелочи, а также тот факт, что при введении по аминогруппам капрона гидрофобных арильных группировок характер сорбции меняется и ДНК начинает проходить сквозь фильтр в растворах с низкой ионной силой, в то время как в растворах с высокой ионной силой сорбция идет количественно.

Блокирование фона при гибридизации. Для изучения эффективности различных блокаторов гибридизационного фона нитроцеллюлозные и капроновые фильтры выдерживали в растворах, содержащих различные блокирующие добавки (см. «Экспериментальную часть» и табл. 1), затем прибавляли радиоактивно меченую ДНК до концентрации 8·10⁷ имп/мл·мл, инкубировали 16 ч при 37° С и отмывали как описано в «Экспериментальной части», после чего фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой и просчитывали в сцинтилляторе. Результаты эксперимента приведены в табл. 1.

Ввиду иной химической природы капроновых мембран и их большей способности сорбировать нуклеиновые кислоты эффективность снижения фона растворами различных соединений значительно различается для нитроцеллюлозных и капроновых фильтров, а фон без блокаторов неспецифической сорбции на капроновых мембранах в 8 раз выше, чем на нитроцеллюлозных.

Введение в гибридизационный раствор гепарина или неспецифической ДНК не приводит к значительному снижению фона как на нитроцеллюлозных, так и на капроновых мембранах.

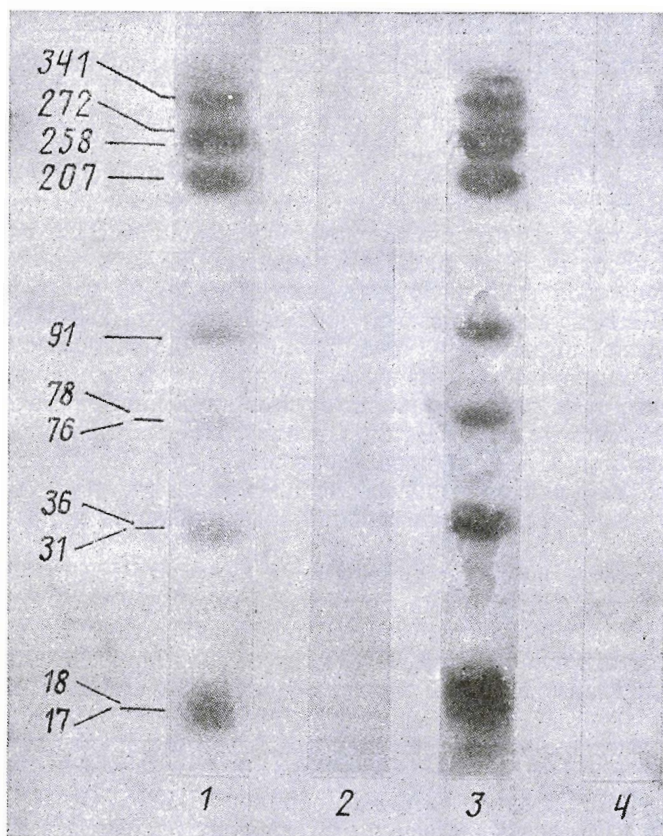


Рис. 1. Электроперенос фрагментов *Sau3AI*-гидролизата ДНК на капроновые мембраны МИФИЛ. Приведены: радиоавтограф фрагментов ДНК, разделенных в 12% ПААГ (1), радиоавтограф геля после переноса ДНК на мембрану из двух капроновых фильтров МИФИЛ (2), а также радиоавтографы первого (3) и второго (4) фильтров после переноса. Слева приведены длины фрагментов ДНК (п. о.)

Использование раствора Денхардта приводит к снижению фона в 3—4 раза как на капроне, так и на нитроцеллюлозе. При этом фон на капроновых мембранах остается неприемлемо высоким.

Наиболее эффективным блокатором на капроновых мембранах является SDS в концентрации 0,5%, приводящий к почти полному подавлению фона (более чем в 300 раз). При повышении концентрации SDS > 0,5% дальнейшего снижения фона не происходит. Введение в гибридизационную смесь раствора Денхардта дополнительно к SDS целесообразно, лишь когда предполагают длительную (более 80 ч) экспозицию с рентгеновской пленкой.

Высокая эффективность растворов детергентов при блокировании связывания ДНК с капроновой мембраной объясняется, по-видимому, тем, что они могут формировать сплошные мицеллярные структуры вдоль капроновых нитей и препятствуют контакту растворов ДНК непосредственно с материалом мембраны.

Растворы детергентов эффективно блокируют сорбцию ДНК на капроновых мембранах не только в процедуре гибридизации, но и при нанесении ДНК на фильтр. Так, нанесение ДНК на фильтр в растворах, содержащих 0,5% SDS или Triton X-100 и высокие концентрации хлорида натрия, приводит к тому, что большая часть ДНК проходит сквозь фильтр и потери

Действие различных соединений в качестве блокаторов неспецифического связывания ДНК-зондов на нитроцеллюлозных и капроновых мембранах в условиях гибридизации

Соединение	Концентрация	Уровень фона, (имп/мин)/см ²	
		нитроцеллюлозная мембрана	капроновая мембрана
Гепарин, мкг/мл	50	747±73	2809±46
	100	454±113	3205±559
	250	410±32	3107±1265
Раствор Денхардта	2×	148±2	1089±20
	4×	151±15	519±7
ДНК, озвученная денатур., мкг/мл	50	422±90	2687±339
	250	523±47	1971±373
SDS, %	0,1	613±13	496±72
	0,6	317±19	35±5 *
	2,5	329±32	78±5 **
Без блокаторов		603±155	3885±213

* В этих случаях фон проявляется лишь на рентгеновской пленке через 36 ч (*) и 12 ч (**) экспонирования. (Реальный счет с фильтра 1—5 (имп/мин)/см²).

в чувствительности гибридизации могут превышать два порядка. Поэтому если в процедуре гибридизации использование детергентов необходимо для снижения неспецифического связывания ДНК зонда с мембраной, то при нанесении ДНК на фильтр присутствия детергентов в растворе ДНК следует избегать.

В приведенном эксперименте для того, чтобы выявить относительную эффективность различных блокаторов, использовали очень высокие концентрации ³²P-меченой ДНК. Очевидно, что при меньших концентрациях зонда эффективность блокирования фона будет возрастать. Так, при снижении концентрации зонда с $8 \cdot 10^7$ до 10^7 имп/мин·мл эффективность снижения фона раствором Денхардта возрастает с 3—4 до 7—9 раз, а при снижении концентрации зонда ниже 10^7 имп/мин·мл фона на нитроцеллюлозе не наблюдали даже в том случае, когда не использовали никаких соединений для его снижения. Тем не менее значительное уменьшение концентрации зонда вряд ли целесообразно по причине снижения скорости гибридизации.

Иммобилизация ДНК на микропористых мембранах с помощью УФ-облучения. При изучении эффективности иммобилизации ДНК на нитроцеллюлозных и капроновых мембранах известные количества высокомолекулярной ДНК наносили на фильтры, высушивали в вакууме при высокой температуре (80°С, 8 мм рт. ст.) или облучали различное время под ультрафиолетом. Фильтры отмывали при 50°С в нескольких сменах раствора, содержащего 50% формамида и 4% SDS (см. «Экспериментальную часть»), после чего определяли количество ДНК, оставшееся на фильтре, и рассчитывали эффективность иммобилизации как отношение количества ДНК, необратимо связавшейся с фильтром, к общему количеству ДНК, нанесенной на фильтр. Условия отмывки фильтров были существенно изменены против обычно используемых в гибридизации [4]. Это было вызвано тем, что при отмывках, применяемых в гибридизации, не вся ДНК, обратимо связанная с фильтром, теряется при одном цикле отмывок. В вы-

Эффективность различных способов иммобилизации ДНК на микропористых мембранах

Способ иммобилизации	Количество ДНК, % от нанесенной	
	капроновая мембрана	нитроцеллюлозная мембрана
Высушивание в вакууме, 80° С, 8 мм рт. ст.		
10 мин	6,4±0,3	9,8±0,2
30 »	7,9±0,8	12,4±0,7
55 »	6,6±0,6	19,6±1,9
90 »	9,2±0,8	20,1±1,5
УФ-облучение в дозе 2,5 кДж/м ²	74,8±5,2	*
Необратимая сорбция без иммобилизации	2,1±0,2	*

* Варианты не были исследованы.

бренных нами условиях повторение цикла отмывок не приводило к дальнейшему уменьшению количества ДНК на капроновых фильтрах.

При иммобилизации ДНК нагреванием в вакууме для нитроцеллюлозных фильтров достаточно 40 мин и для капроновых фильтров 15 мин высушивания. При более продолжительных временах не наблюдается значительного роста эффективности иммобилизации.

Соотношение эффективностей иммобилизации ДНК различными способами представлено в табл. 2. Для капроновых мембран высушивание в вакууме является менее эффективным способом иммобилизации в сравнении с нитроцеллюлозными фильтрами.

Облучение капроновых фильтров ультрафиолетом (четыре ртутные лампы низкого давления ЭДБ-30 в течение 5 мин) приводит к практически количественной (в различных экспериментах от 80 до 95%) иммобилизации ДНК на мембране. Однако при нанесении на фильтр свыше 5 мкг ДНК/см² эффективность иммобилизации начинает падать. При этом предельная емкость капроновых мембран при иммобилизации ДНК в ультрафиолете остается выше емкости нитроцеллюлозных фильтров при их высушивании в вакууме: 100 мкг/см² для капроновых фильтров в сравнении с 16,6 мкг/см² для нитроцеллюлозы.

Иммобилизация фрагментов различной длины на капроновых мембранах. Известно, что на нитроцеллюлозных мембранах короткие фрагменты ДНК плохо иммобилизуются при высушивании в вакууме. Для изучения эффективности иммобилизации фрагментов ДНК различной длины на капроновых мембранах ДНК фага λ или рВR322 гидролизovali эндонуклеазами рестрикции (см. «Экспериментальную часть») и метили по концам с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и подходящего [α -³²P]dNTP. Проводили разделение фрагментов рестрикции в агарозном или полиакриламидном геле, а затем электроперенос на капроновые мембраны. Дорожки, содержащие одинаковое количество рестриктоов, облучали ультрафиолетом различное время. Капроновую мембрану отмывали от несвязавшейся ДНК и проводили радиоавтографию.

При нанесении на капроновые мембраны в варианте дот-гибридизации в отсутствие иммобилизации необратимая сорбция высокополимерной ДНК крайне низка (см. табл. 2). Эффективность необратимой сорбции фрагментов ДНК в зависимости от их размера при электропереносе на капроновый фильтр представлена на рис. 2. Сорбция фрагментов ДНК в этих условиях возрастает с увеличением их длины, и начиная с размера больше 100 п. о.

становится выше, чем в варианте дот-гибридизации. Таким образом, картина необратимой сорбции фрагментов ДНК при электропереносе на капроновые мембраны без дополнительных процедур иммобилизации сходна с картиной иммобилизации фрагментов ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах при их нагревании в вакууме.

Относительно механизма иммобилизации ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах существуют различные точки зрения [3]. Наиболее вероятная причина необратимой сорбции ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах после нагревания в вакууме заключается в возникновении структурных перестроек в мембране под действием сильных механических напряжений, возникающих при высушивании. В результате молекулы ДНК «запутываются» в толще нитроцеллюлозного фильтра так, что им практически невозможно вернуться к исходной конфигурации, существовавшей в момент абсорбции. Вероятно, аналогичные события происходят при переносе ДНК на капроновые мембраны. При переносе под действием электрического поля фрагменты ДНК проникают в толщу мембранного фильтра и благодаря стерическим взаимодействиям необратимо закрепляются там. Плохое удерживание на фильтре высокомолекулярной ДНК при нанесении раствора в варианте дот-гибридизации может объясняться тем, что большая часть ДНК задерживается на поверхности, а не в толще мембранного фильтра.

Необратимая сорбция ДНК при электропереносе достаточно высока, что позволяет использовать фильтры в гибридационных экспериментах без дополнительной иммобилизации (рис. 2). Однако эффективность удерживания фрагментов ДНК зависит от их размера, а также продолжительности переноса, мощности источника питания и т. п. и может меняться от эксперимента к эксперименту. Иммобилизация ДНК при облучении фильтров ультрафиолетом дает надежные результаты.

Нами был проведен анализ кинетики фотоиммобилизации 19 фрагментов ДНК различной длины (от 40 до 24 000 п. о.), на основании которого была получена зависимость, связывающая дозу ультрафиолета, достаточную для иммобилизации фрагмента ДНК, с его размером:

$$I_l^c = (22,3 \pm 4,8) \cdot \frac{c}{l}, \quad (1)$$

где I — доза ультрафиолета при длине волны 254 нм (кДж/м^2), c — доля фрагмента (в процентах), которую необходимо иммобилизовать, l — длина фрагмента в нуклеотидах.

Для 100%-ного уровня иммобилизации данная зависимость представлена на рис. 3. Пользуясь уравнением (1), можно оценить суммарный квантовый выход «реакции фотоиммобилизации». Принимая коэффициент молярного поглощения основания ДНК равным $10\,000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и рассчитав эффективное сечение основания в ДНК по формуле [5]

$$k = 2300 \cdot \frac{\varepsilon}{N},$$

где k — эффективное сечение (см^2), ε — молярный коэффициент поглощения основания ДНК, N — число Авогадро, можно записать:

$$\varphi = (1,28 \cdot 10^{17} \cdot I_l^{100} \cdot k)^{-1}, \quad (2)$$

где φ — квантовый выход, I_l^{100} — доза ультрафиолета, экстраполированная для иммобилизации на 100% «фрагмента» ДНК длиной в 1 нуклеотид, $1,28 \cdot 10^{17}$ — коэффициент для перевода энергии из кДж/м^2 в квант/см^2 при длине волны 260 нм. Подставив значение I_l^{100} и эффективного сечения в формулу (2), получаем значение квантового выхода $\varphi = 10^{-4}$. В работе [6]

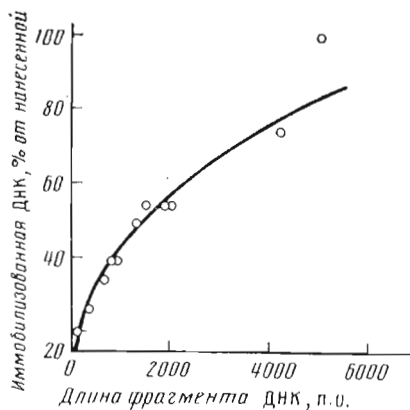


Рис. 2. Эффективность необратимой сорбции фрагментов ДНК на капроновой мембране в зависимости от их размера при электропереносе

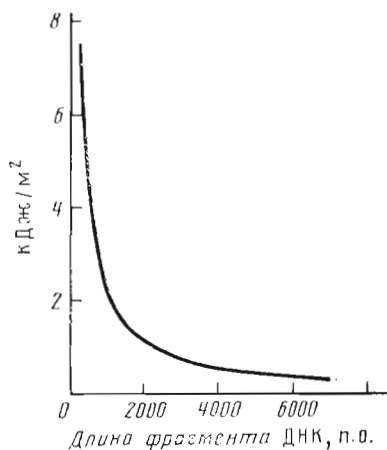


Рис. 3. Связь между дозой ультрафиолета, необходимой для количественной иммобилизации фрагментов ДНК, и их размером

высказано предположение, что в основе механизма фотоиммобилизации ДНК на капроновых мембранах лежит образование ковалентных связей между основаниями в ДНК (в основном тимином) и аминогруппами на капроновых мембранах. Если учесть, что расстояние между аминогруппами на капроновых мембранах соответствует 10–15 основаниям в ДНК, квантовый выход реакции при таком механизме должен быть близок к 10^{-3} .

Обсуждение конкретных химических механизмов фотоиммобилизации ДНК лежит за пределами тематики данной работы. Значения квантовых выходов для известных фотореакций ДНК в растворах, как правило, также не превышают 10^{-3} – 10^{-4} [7], но сам характер фотоаддуктов может значительно меняться при изменении количества связанной с ДНК воды или при переходе ДНК в необычное окружение, как, например, описано в работе [8].

Важно заметить, что при использовании для иммобилизации фрагмента ДНК длиной l дозы ультрафиолета, превышающей l^{100} , могут возникать множественные сшивки ДНК с мембраной, а это в ряде случаев будет создавать препятствия при гибридизации.

Зависимость величины гибридизационного сигнала от дозы облучения ультрафиолетом при иммобилизации. Фотоиммобилизации ДНК ультрафиолетом используется для получения аффинных ДНК-сорбентов в хроматографии [9]; описано использование ультрафиолетового облучения для иммобилизации ДНК на пейлоновых мембранах [4, 6], но авторы этих работ не изучали влияния длительности фотоиммобилизации ДНК на чувствительность ее выявления при гибридизации, удовлетворившись дозой ультрафиолета, необходимой для количественной иммобилизации ДНК на фильтре.

На рис. 4 представлена зависимость эффективности гибридизации, выраженной как отношение количества гибридизовавшегося ДНК-зонда к количеству ДНК, нанесенной на фильтр, от дозы ультрафиолета при иммобилизации ДНК. Для сравнения на этом же рисунке приведена кинетика иммобилизации самого зонда (средний размер фрагментов около 600 нуклеотидов). Несмотря на то что количество иммобилизованной ДНК при дозе 2,6 кДж/м² достигает 74%, гибридизационный сигнал начинает резко падать. О падении эффективности гибридизации при длительной фотоиммобилизации РНК на мембранах Gene Screen упоминается в работе

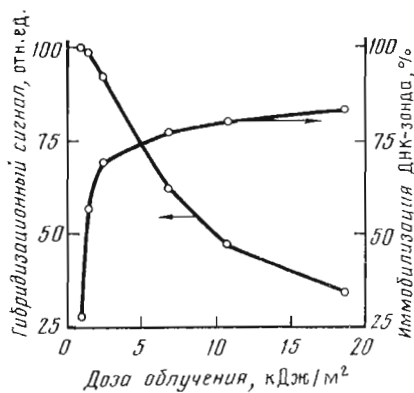


Рис. 4. Зависимость эффективности гибридизации от дозы облучения ультрафиолетом при иммобилизации ДНК (средний размер фрагментов 600 нуклеотидов)

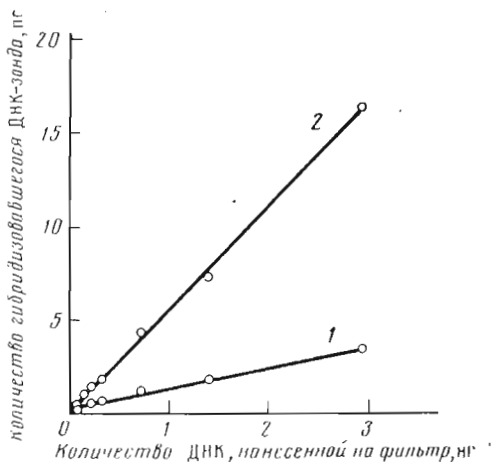


Рис. 5. Величина гибридизационного сигнала на нитроцеллюлозных фильтрах при различных способах иммобилизации ДНК: 1 — высушивание в вакууме 1 ч при 80° С; 2 — облучение ультрафиолетом в дозе 0,6 кДж/м²

[10], но автор связывает это не с влиянием дозы ультрафиолета, а с высыханием и скручиванием мембраны во время облучения. В наших экспериментах этого не происходило.

Причиной падения эффективности гибридизации после длительного облучения ультрафиолетом может служить повреждение ДНК. В обзоре [7] указано, что при облучении растворов ДНК дозами ультрафиолета в интервале 0,59–3 кДж/м² число повреждений линейно зависит от дозы и составляет 1–5% оснований в ДНК. Кроме того, при дозе облучения, превышающей необходимую для иммобилизации фрагментов ДНК, равных размеру зонда, расстояние между шивками ДНК с мембраной становится меньше размера зонда, что также может понижать эффективность гибридизации. Вероятно, та же причина приводит к падению эффективности гибридизации после продолжительного щелочного блоттинга (другого способа ковалентной иммобилизации ДНК) [11].

Чувствительность гибридизации ДНК фага λ с гомологичной ДНК, иммобилизованной ультрафиолетом на капроновых мембранах в дозе 0,6–0,8 кДж/м², в 5 раз выше, чем с ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных мембранах при их высушивании в вакууме. Повышение чувствительности гибридизации при облучении фильтров ультрафиолетом, очевидно, связано с большей эффективностью иммобилизации ДНК (эффективность иммобилизации ДНК на нитроцеллюлозе при высушивании в вакууме составляет 20%, а эффективность иммобилизации ДНК такого размера на капроновой мембране при дозе облучения 0,6 кДж/м² достигает 100%).

Использование ультрафиолета для повышения эффективности иммобилизации ДНК на нитроцеллюлозных мембранах также позволяет повысить чувствительность гибридизации. На рис. 5 приведен результат эксперимента по сравнению чувствительности гибридизации ДНК фага λ с гомологичной ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре как высушиванием в вакууме, так и при фотсимуляции ультрафиолетом в дозе 0,6 кДж/м². Использование ультрафиолета для иммобилизации ДНК и в этом случае позволяет повысить чувствительность гибридизации в 4,5 раза.

Облучение ультрафиолетом обеспечивает высокую эффективность иммобилизации ДНК на твердых подложках, изначально имеющих низкий уровень необратимой сорбции ДНК, и тем самым повышает чувствительность гибридизации. Кроме того, в тех случаях, когда размер иммобилизуемой ДНК превышает размер зонда, подбор оптимальной дозы облучения позволяет сохранить высокую эффективность гибридизации за счет введения минимального количества сшивок ДНК с мембраной и ограничения числа повреждений в ДНК.

Авторы с одинаковым успехом использовали ультрафиолет для фотоиммобилизации ДНК на нитроцеллюлозных мембранах HANU и HAWP (Millipore), BA-85 (Schleicher und Schüll), капроновых мембранах МИФИЛ, тефлоновых мембранах МФФ-3, модифицированных нейлоновых мембранах Gene Screen Plus (NEN) и иммунологических планшетах Titerteck (Flow Laboratories). Поскольку в указанном способе иммобилизации «активным началом» является сама ДНК, вероятно, его можно использовать практически для любых материалов, обладающих первичной сорбцией ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали капроновые мембраны МИФИЛ производства завода «Химифил», нитроцеллюлозные мембраны HANU и HAWP (Millipore) и BA 85 (Schleicher und Schüll); рестриктазы *Hind*III, *Eco*RI, ДНК фага λ (НПО «Фермент»); ДНК pBR322, рестриктазу *Sau*3AI, ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова) из *E. coli*, ДНК-полимеразу I из *E. coli* (КТМК ИЦиГ); ДНКазу I (Worthington); BSA (Fluka), фиколл-400, декстрансульфат (Pharmacia), поливинилпирролидон (ВДН), гепарин (Spofa), SDS (Sigma), [α - 32 P]dCTP (отечественное производство), формамид (Merck). Высокополимерную ДНК из печени крысы выделяли как описано в работе [12].

ДНК метили ник-трансляцией или со статистической олигонуклеотидной затравкой, как описано в работе [13], до удельной активности $5 \cdot 10^3$ – 10^9 имп/мин·мкг.

Нанесение ДНК на микропористые мембраны. Перед нанесением на мембранные фильтры готовили серию разведений ДНК в воде. ДНК денатурировали 5 мин при 100°C и охлаждали во льду. ДНК наносили на фильтры через аппарат для микрофильтрации «Minifold I» в объеме 20–80 мкл. В некоторых случаях к раствору денатурированной ДНК добавляли 3,5 М NH_4OAc , 5 М NaCl , 20% SDS или 1 М NaOH до желаемой концентрации. При работе с нитроцеллюлозными фильтрами во всех случаях ДНК наносили в растворах, содержащих 1,5 М NH_4OAc .

При изучении иммобилизации фрагментов ДНК различной длины ДНК фага λ гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Hind*III и *Eco*RI 1 ч при 37°C в буфере, содержащем 100 мМ NaCl , 50 мМ трис- HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl_2 , при концентрации ДНК 0,25 мкг/мкл и концентрации ферментов 0,75 ед. акт./мкл. ДНК плазмиды pBR322 гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *Sau*3AI 1 ч при 37°C в буфере, содержащем 100 мМ NaCl , 50 мМ трис- HCl (рН 7,5), 10 мМ MgCl_2 , при концентрации ДНК 0,25 мкг/мкл и концентрации фермента 0,75 ед. акт./мкл. Полученные фрагменты ДНК метили по концам с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) как описано в работе [14]. *Sau*3AI-фрагменты ДНК pBR322 разделяли электрофорезом в 12% ПААГ и проводили электроперенос на капроновые мембраны 1,5 ч при 60 В/250 мА в буфере TBE (90 мМ трисборат, 2,5 мМ EDTA, рН 8,3). *Hind*III/*Eco*RI-фрагменты ДНК фага λ разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле и проводили электроперенос на капроновые мембраны 12 ч при 60 В/250 мА в буфере TAE (40 мМ трисацетат, 2,5 мМ EDTA, рН 7,5). После переноса ДНК денатурировали на

фильтрах как описано в работе [15], затем проводили иммобилизацию как описано ниже.

Иммобилизацию ДНК на капроновых и нитроцеллюлозных фильтрах после нанесения или переноса проводили, высушивая их в вакууме при 80°С и давлении 6–8 мм рт. ст. либо освещая различное время четырьмя ртутными лампами низкого давления ЭДБ-30 с расстояния 17 см. Мощность источника ультрафиолета составляла 44 Вт/м² при длине волны 260 нм.

Дозу облучения при длине волны 260 нм определяли по реакции гидратации уридина. 1 мМ раствор уридина помещали под источник ультрафиолетового излучения и измеряли изменение поглощения раствора при длине волны 260 нм через различные промежутки времени, после чего дозу ультрафиолета рассчитывали по формуле (Э. И. Будовский, ИОХ АН СССР, личное сообщение)

$$I_0 = \frac{6,02 \cdot 10^{20}}{\epsilon \phi t} \cdot \lg \frac{10^{A_0} - 1}{10^{A_t} - 1},$$

где I_0 — интенсивность падающего света (квант/см²·мин), A_0 — начальное поглощение раствора уридина при длине волны 260 нм и длине пути 1 см, A_t — поглощение уридина через t мин после начала облучения, ϕ — квантовый выход реакции гидратации уридина ($2,16 \cdot 10^{-2}$), ϵ — молярный коэффициент поглощения уридина при длине волны 254 нм ($8,9 \cdot 10^3$), t — время облучения в минутах. Значение I_0 переводили в джоули, пользуясь соотношением 1 Дж = $1,28 \cdot 10^{18}$ квантов при длине волны 260 нм.

Для определения количества ДНК, необратимо связанной с фильтром, фильтры отмывали в растворе, содержащем 50% формамида, 1,2 М NaCl, 100 мМ трис-HCl (рН 8,0), 4% SDS (две смены по 20 мин при 50°С). После этого фильтры разрезали, высушивали и просчитывали в диоксановом сцинтиллаторе либо по Черенкову на счетчике Minibeta (LKB).

Для изучения эффективности блокирования фона кусочки нитроцеллюлозных и капроновых фильтров размером 1×1 см инкубировали 1 ч при 37°С в растворе, содержащем 100 мМ трис-HCl (рН 8,0), 50% формамида, 10% декстрансульфата, 300 мМ NaCl, к которому добавляли либо гепарин, либо 20% SDS, либо раствор Денхардта, либо озвученную денатурированную ДНК из печени крысы до желаемой концентрации (см. табл. 1), либо воду (фон без блокаторов). Через 1 ч к растворам добавляли меченую ДНК фага λ до концентраций $8 \cdot 10^7$ имп/(мин·мл) и инкубировали 12 ч при 37°С. Фильтры отмывали в двух сменах раствора, содержащего 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl (рН 8,0), при 65°С и затем в двух сменах раствора, содержащего 150 мМ NaCl, при 20°С. После этого фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой и просчитывали в сцинтиллаторе.

Гибридизация. Нитроцеллюлозные и капроновые фильтры с иммобилизованной ДНК фага λ предгибридизовали 1 ч при 37°С в растворе, содержащем 50 мМ трис-HCl (рН 8,0), 50% формамида, 10% декстрансульфата, 0,5% SDS, 4-кратный раствор Денхардта, 300 мМ NaCl, 50 мкг/мл озвученной денатурированной негомологичной ДНК. Затем добавляли меченый зонд и вели гибридизацию 16 ч при 37°С. Фильтры отмывали дважды в 1% SDS при 65°С и затем в 150 мМ NaCl при 20°С.

Радиоавтографию фильтров проводили в кассетах с рентгеновской пленкой РМ-1 и усиливающими экранами ЭУ-И1 при –20°С, после чего фильтры разрезали и просчитывали в сцинтиллаторе. При величине счета ниже 2000 имп/мин количество гибридизовавшейся ДНК определяли денситометрически, сравнивая значения оптической плотности, получаемые в опытах, со значениями оптической плотности на калибровочных кривых, полученных из радиоавтографии известных количеств меченого зонда, иммобилизованного на капроновом фильтре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nygaard A. P., Hall B. D. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1963. V. 12. № 2. P. 98-104.
2. Gillespie D. // Meth. Enzymol. 1968. V. 12B. P. 641-668.
3. Seed B. // Genetic Engineering. Principles and Methods. N. Y.: 1982. V. 4. P. 91-102.
4. Cannon G., Heinhorst S., Weissbach A. // Anal. Biochem. 1985. V. 149. № 2. P. 229-237.
5. Паркер С. Фотоломнесценция растворов. М.: Мир, 1972. С. 25.
6. Church G. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 1991-1995.
7. Rahn R. O. // Photochemical and Photobiological Reviews. N. Y., 1979. V. 4. P. 267-330.
8. Rahn R. O. // Photochemical and Photobiological Reviews. N. Y., 1979. V. 4. P. 289.
9. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 391-394.
10. Khanjian E. W. // Mol. Biol. Rep. 1986. V. 11. № 2. P. 107-115.
11. Rigand G., Grange T., Pictet R. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 2. P. 857.
12. Дашкевич В. С., Дымшиц Г. М., Салганик Р. И. // Молекулярн. биология. 1968. Т. 2. № 4. С. 562-567.
13. Протопопов М. О., Калачиков С. М. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии/Ред. Салганик Р. И. Новосибирск: Наука, 1990. С. 29-34.
14. Gaastra W., Josephsen J. // Meth. Mol. Biol. 1984. V. 2. P. 273-276.
15. Иванов С. В., Поганов В. А., Калачиков С. М. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии/Ред. Салганик Р. И. Новосибирск: Наука, 1990. С. 35-38.

Поступила в редакцию
26.II.1991

После доработки
10.VII.1991

S. M. KALACHIKOV, V. A. ADARICHEV, G. M. DYMSHITS

ULTRAVIOLET CROSS-LINKING OF DNA TO MICROPOROUS MEMBRANES

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

Various techniques of DNA immobilization onto nitrocellulose and nylon microporous membranes have been compared. Despite a strong primary adsorption of DNA onto these membranes during blotting procedures, poor retention of the target DNA and low hybridization signals are obtained after hybridization and washings. Covalent cross-linking of DNA upon UV irradiation leads to a quantitative immobilization of target DNA. Quantum yield of DNA photoimmobilization estimated for a single base in DNA is about 10^{-4} . UV irradiation dose sufficient for immobilization of DNA fragment of a known length can be calculated by the formula $I_t^c = (22.3 \pm 4.8)c/l$, where l is the DNA fragment length (in base pairs), c is the DNA part (%) to be immobilized. The UV irradiation dose about 0.6-0.8 kJ/m² is optimal for most hybridization experiments. Doses higher than 0.8-1 kJ/m² may cause a loss in the hybridization efficiency. Under optimal immobilization conditions, hybridization signals increasing five-fold for nitrocellulose membranes and fifty-fold for uncharged nylon membranes as compared with baking these membranes in vacuum.