



УДК 577.113.4

© 1994 М. И. Добриков, Т. А. Приходько,  
И. В. Сафронов, Г. В. Шишкин

## ВВЕДЕНИЕ БИОТИНОВЫХ МЕТОК В ОДНОЦЕПОЧЕЧНУЮ ДНК БЕЗ РАЗРЫВА МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН*

Ключевые слова: ДНК одноцепочечные, биотиновая метка.

Проведено сравнение свойств биотинилированных одноцепочечных ДНК фага M13 (bio-ДНК), полученных с помощью фотореагентов: N-метил-N-[3-(4-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамин (I), N-метил-N-[3-(2-нитро-5-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамин (II) и химических реагентов:  $\gamma$ -гидразида глутаминовой кислоты (III), O-(4-аминобутил)гидроксиламина (IV) (биотиновые остатки вводили последующим ацилированием модифицированной ДНК N-оксисукцинимидным эфиром N-биотиниламинокапроновой кислоты). Применение фотореагента (I) позволяет вводить до 15 остатков биотина на 1000 нуклеотидов (15 bio/kN), а фотореагента (II) — 3—5 bio/kN, но в обоих случаях наблюдается деградация цепи оДНК M13. Переаминирование с помощью реагентов (III) и (IV) в присутствии бисульфита позволяет получать bio-оДНК M13, несущие 4—30 bio/kN. Подобраны условия проведения этой реакции, при которых не наблюдается разрушения цепи оДНК M13 и сохраняются гибридизационные свойства.

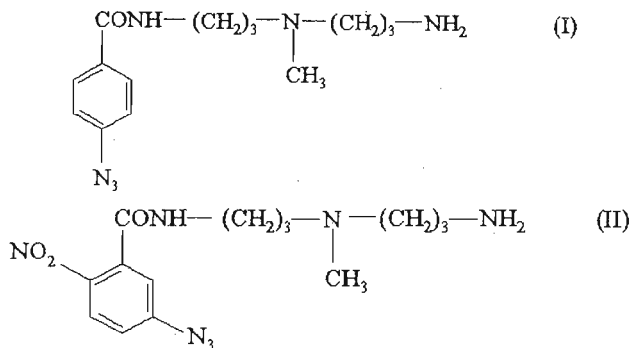
Чувствительность нерадиоактивного твердофазного гибридизационного анализа нуклеиновых кислот (НК) в основном определяется используемой системой детекции и свойствами ДНК-зонда. В предыдущем сообщении рассмотрены параметры, определяющие чувствительность систем визуальной детекции при выявлении иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре (NC) bio-ДНК [1]. Из описанных к настоящему времени методов получения bio-ДНК-зондов одним из наиболее перспективных выглядит предложенный в работе Форстера и др. [2]. Он предусматривает клонирование исследуемой последовательности в РФ дДНК фага M13, отбор, выделение и биотинилирование циклической оДНК фага M13, несущей нужную вставку. Одноцепочечная форма обеспечивает высокую эффективность гибридизации, а M13-вектор предоставляет дополнительно к вставке 7200 нуклеотидов оДНК для мечения остатками биотина, что заметно повышает чувствительность детекции зонда, особенно при небольшом размере зондирующей последовательности. В настоящее время для биотинилирования оДНК широко

Использованы сокращения: оДНК, дДНК — одно- и двухцепочечная ДНК; bio-ДНК — биотинилированная ДНК; bio/kN — количество биотиновых остатков на 1000 нуклеотидов ДНК; bio-Asp-ONSu — N-оксисукцинимидный эфир N-биотиниламинокапроновой кислоты; РФ дДНК M13 — двухцепочечная репликативная форма ДНК фага M13.

применяется предложенный в работе [2] фотореагент N-метил-[N-3-(4-азидо-2-нитрофениламино)пропил]-N'-биотинил-1,3-пропилендиамин (фотобиотин). Метка вводится облучением видимым светом раствора ДНК с фотореагентом. Биотиновые остатки включаются в ДНК с хорошей эффективностью только в растворах с низкой ионной силой благодаря электростатическому притяжению положительно заряженного реагента к полианиону-ДНК. Подобраны условия проведения реакции, при которых в оДНК М13 вводится до 10 био/кН без существенного разрушения цепи оДНК и заметной потери гибридизационных свойств. Применение био-оДНК-зондов, полученных по приведенной выше методике, позволяет обнаруживать  $6 \cdot 10^{-18}$  моль ДНК-«мишени» в дот-блот-гибридизации на нитроцеллюлозном фильтре [2]. Другой способ, основанный на фотомодификации ДНК N-(4-азидо-2-нитробензоил)-1,6-гептаметилендиамином с последующим ацилированием био-Асп-ONSu, обеспечивает такой же уровень биотинилирования оДНК, но при этом разрушается цепь оДНК [3].

Целью данной работы было подобрать способ увеличения степени биотинилирования оДНК, при котором не происходит существенной деградации полидезоксирибонуклеотидной цепи и сохраняются гибридизационные свойства. Нами исследованы с этой позиции два варианта получения био-оДНК фага М13. В обоих случаях биотиновые остатки вводили в две стадии. Сначала присоединяли первичные алифатические аминогруппы, которые затем ацилировали био-Асп-ONSu. В первом варианте алифатические аминогруппы вводили с помощью фотореагентов, по методике, описанной в работе [2, 3], во втором — бисульфиткатализируемым переаминированием остатков цитозина.

Для фотохимического введения аминогрупп мы опробовали 4-азидобензоильную и 2-нитро-5-азидобензоильную фотоактивные группы и, кроме того, использовали двухзарядный «спейсер» для электростатического притяжения фотореагента к ДНК. Были синтезированы N-метил-N-[3-(4-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамин (I) и N-метил-N-[3-(2-нитро-5-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамин (II):



Для био-оДНК, полученных с помощью реагентов (I) и (II), оценивали степень биотинилирования по связыванию со стрептавидином в растворе. Кроме того, серийные разведения био-оДНК иммобилизовали на нитроцеллюлозном фильтре и проводили визуализацию с помощью конъюгата авидин — коллоидное золото с последующим физическим серебряным усилением (способ А) или конъюгатом стрептавидина с щелочной фосфомоноэстеразой (способ Б). Сигналы фотометрировали и по полученным данным строили кривые зависимости оптического поглощения (А) от поверхностной концентрации био-оДНК. Для каждой кривой определяли параметр  $S_{0,1}$ , численно равный поверхностной концентрации био-оДНК ( $\text{пг}/\text{мм}^2$ ), при которой величина А превышает уровень фона на 0,1 ОЕ. Этот параметр является критерием чувствительности для методов колориметрической детекции и обоснован ранее в работе [1] (см. также «Экспериментальную часть»). Степень биотинилирования и  $S_{0,1}$ , измеренные для ряда препаратов

Характеристики препаратов био-ДНК М13 в зависимости от способа и условий биотинилирования

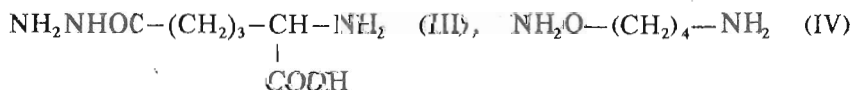
Реагенты	Фотореагент нукл.ДНК моль/моль	Условия реакции	Степень биотини- лирова- ния *, био/кН	S <sub>0,1</sub> , пг/мм <sup>2</sup> при детекции **	
				А	Б
(I)	2 : 5	λ > 290 нм	13±2	0,6	1,5
(II)	1 : 3	λ > 310 нм	5±1	1,5	6,0
Фотобиотин	2 : 5	λ > 310 нм	5±1	1,5	6,0
0,5 М (III), 1,0 М NaHSO <sub>3</sub>	—	40° С, 30 ч	4±1	1,0	4,0
0,25 М (III), 0,6 М NaHSO <sub>3</sub>	—	20° С, 100 ч	6±1	0,7	2,0
0,5 М (IV), 0,5 М NaHSO <sub>3</sub>	—	20° С, 15 ч	12±2	0,2	0,7
0,5 М (IV), 0,5 М NaHSO <sub>3</sub>	—	5° С, 300 ч	26±4	0,1	0,3

\* При использовании реагентов (I) — (IV) остатки биотина вводили на второй стадии ацилированием био-Асп-ОНСу первичных алифатических аминогрупп, введенных на первой стадии. Остатки биотина вводили в одну стадию в случае фотобиотина; далее степень биотинилирования оценивали по связыванию био-оДНК со стрептавидином.

\*\* А — детекция с помощью конъюгата авидин — коллоидное золото с последующим физическим серебряным усилением; Б — детекция с помощью конъюгата стрептавидин — щелочная фосфономонэстераза.

био-оДНК, полученных разными способами, приведены в таблице. Видно, что величина S<sub>0,1</sub> зависит от степени биотинилирования при выявлении как способом А, так и Б. Фотореагент (I) позволял вводить в 3 раза больше остатков биотина, чем (II) или фотобиотин. Однако, по данным электрофореза, при фотомодификации оДНК М13 реагентами (I) и (II) происходило быстрое расщепление полидезоксинуклеотидной цепи. Изменение состава буфера и условий экспозиции не давало существенного снижения степени деградации оДНК М13. Кроме того, при хранении в растворе (4° С) и в замороженном виде (—10° С) наблюдалось образование осадков в образцах био-оДНК М13, меченных с помощью фотореагентов (I) и (II), а чувствительность обнаружения оставшейся в растворе био-оДНК существенно падала. При фотомодификации фотобиотином деградации оДНК М13 не наблюдалось, а полученные препараты био-оДНК М13 не меняли своих свойств при хранении. Таким образом, реагенты (I) и (II) оказались непригодны для получения полноразмерных стабильных био-оДНК М13.

Для химического введения аминогрупп мы использовали реакцию переаминирования по С4-положению оснований цитозина. Эта реакция строго специфична для одноцепочечных участков ДНК [4, 5]. Описано применение реакции переаминирования для биотинилирования двухцепочечных ДНК в прямом [6, 7] и бисульфиткатализируемом вариантах [7—9]. Наиболее «мягко» экзоциклическая аминогруппа цитозина в составе ДНК замещается при рН 4—4,5 гидразидами карбоновых кислот [7, 8]. В этих условиях модифицируется 1—3% нуклеотидов без потери гибридизационных свойств, однако данные о сохранности полидезоксинуклеотидной цепи не приведены. Мы контролировали сохранность использованной в нашей работе оДНК фага М13 электрофорезом в 1% агарозном геле и обнаружили, что полоса, соответствующая оДНК фага М13, не сохраняется при рН ниже 5,5 при переаминировании γ-гидразидом глутаминовой кислоты (III) и O-(4-аминобутил)гидроксиламином (IV) в присутствии бисульфита:



Повышение рН с 4,5 до 5,5, как было показано при исследовании механизма бисульфиткатализируемого замещения при С4-положении цитозина [10—12],

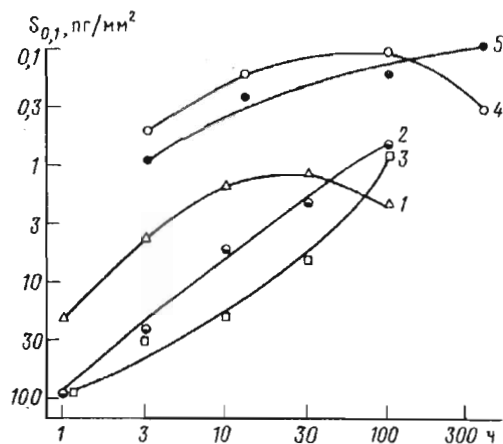


Рис. 1. Зависимость ( $S_{0,1}$ ) колориметрической детекции иммобилизованных на нитроцеллюлозном фильтре препаратов bio-одНК М13 от времени и условий проведения переаминирования. одНК М13 переаминировали от 1 до 500 ч при pH 5,5 в 0,5 М (III)/1 М  $\text{NaHSO}_3$  при 40° С (1); 0,5 М (III)/0,2 М  $\text{NaHSO}_3$  при 40° С (2); 0,25 М (III)/0,6 М  $\text{NaHSO}_3$  при 20° С (3); 0,5 М (IV)/0,5 М  $\text{NaHSO}_3$  при 20° С (4); 0,5 М (IV)/0,5 М  $\text{NaHSO}_3$  при 5° С (5) и затем ацилировали bio-Асп-ОНСу. Визуализацию проводили с помощью конъюгата авидин — коллоидное золото с последующим физическим серебряным усилением

приводит к 2—3-кратному снижению скорости переаминирования и возрастанию скорости дезаминирования цитозина и его N-экзо-замещенных производных. Известно также, что повышение концентрации бисульфита выше 1 М ведет к исполнителюному возрастанию скорости дезаминирования, практически не влияя на скорость переаминирования [10—12]. Отмечено влияние температуры и времени реакции на соотношение продуктов переаминирования и дезаминирования цитидина [5]. Кроме того, наблюдалось значительное снижение скорости реакции и изменение соотношения продуктов переаминирования и дезаминирования остатков цитозина в составе одНК по сравнению с цитидином [5]. В нашем случае прохождение реакции дезаминирования на значительную глубину может привести к снижению гибридизационных свойств и уменьшению степени биотинилирования одНК М13.

Поэтому для подбора условий введения биотиновых групп в одНК М13 при pH 5,5 мы провели ряд экспериментов, в которых на стадии переаминирования изменяли температуру, концентрацию  $\text{NaHSO}_3$  и время реакции. Для полученных после биотинилирования препаратов bio-одНК М13 определяли  $S_{0,1}$  при выявлении способом А (см. рис. 1). Кривые зависимости  $S_{0,1}$  выявления препаратов bio-одНК, полученных при переаминировании реагентом (III) в 1 М  $\text{NaHSO}_3$  и реагентом (IV) в 0,5 М  $\text{NaHSO}_3$ , от времени реакции имеют куполообразный вид с максимумом в районе 30 и 100 ч соответственно (т. е. в реакции наступает момент, когда скорость переаминирования становится меньше скорости дезаминирования продукта переаминирования). В остальных случаях «куполо» не было. Из приведенных данных видно, что с реагентом (IV) переаминирование проходит с большей скоростью и на большую глубину, чем с реагентом (III). По данным электрофореза в 1% агарозном геле, во всех случаях сохранялась полоса, соответствующая одНК М13.

Для тестирования гибридизационных свойств использовали РФ дДНК М13, а также пару клонов одНК М13, вставки которых несут взаимно комплементарные последовательности размером 250 нуклеотидов. Способ получения, строение и свойства этих клонов подробно описаны в работе [13]. Клон, вставка которого комплементарна 390-му нуклеотидному фрагменту РНК вируса гепатита А (одНК М13 HAVP1), биотинилировался и использовался в качестве зонда. В качестве «последовательностей-мишеней» использовали 7200-ю нуклеотидную «минус»-цепь РФ дДНК М13, комплементарную векторной части зонда, и 250-й нуклеотидный фрагмент вставки клона одНК М13 HAV19. Сохранность гибридизационных свойств одНК при биотинилировании оценивали по изменению чувствительности нерадиоактивной твердофазной дот-гибридизации с увеличением

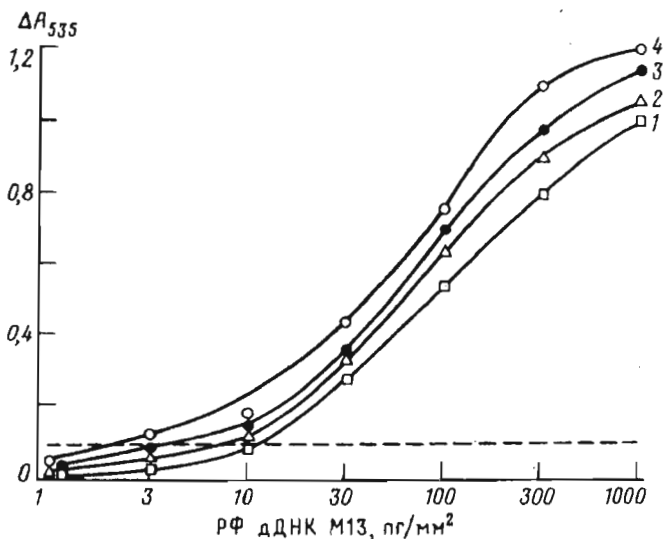


Рис. 2. Денситограммы определения РФ дДНК М13 нерадиоактивной дот-гибридизацией на нитроцеллюлозном фильтре при использовании в качестве зондов био-оДНК М13 HAVP1 со степенью биотинилирования 4 (1), 6 (2), 12 (3), 26 био/кН (4) и визуализации присоединенного био-зонда с помощью конъюгата стрептавидин — щелочная фосфоэстераза. Зонды были получены бисульфиткатализируемым переаминированием оДНК М13 HAVP1 с помощью реагента (IV) и последующим ацилированием введенных аминогрупп био-Аср-ONSu

величины био/кН, как это предложено в работе [2], с той разницей, что для сравнения использовался критерий чувствительности ( $S_{0,1}$ ). С помощью реагента (IV) были получены био-оДНК-зонды, несущие от 4 до 26 био/кН. Эти зонды применяли для детекции иммобилизованных на нитроцеллюлозном фильтре РФ дДНК М13 и оДНК М13 HAV19 в нескольких, описанных в литературе условиях проведения нерадиоактивной дот-гибридизации. Наибольшее различие величины  $S_{0,1}$  с хорошей воспроизводимостью было получено при гибридации в растворе био-оДНК М13 HAVP1 (100 нг/мл) при 62° С в присутствии декстрансульфата и визуализации конъюгатом стрептавидин—щелочная фосфатаза. Предельная чувствительность ( $S_{0,1}$ ) определения оДНК М13 HAV19 и РФ дДНК М13 была одинаковой, но достигалась через 30 и 10 ч гибридации соответственно. Денситограммы определения РФ дДНК М13 методом нерадиоактивной дот-гибридизации представлены на рис. 2. Увеличение степени биотинилирования био-оДНК М13 HAVP1 приводит к пропорциональному увеличению чувствительности определения РФ дДНК, что возможно только при сохранении гибридационных свойств. Кроме того, была показана пригодность данных био-оДНК-зондов для обнаружения РНК вируса гепатита А в пробах сыворотки крови человека [14].

Таким образом, применение бисульфиткатализируемой реакции переаминирования при С4-положении основания цитозина реагентами (III) и (IV) позволяет получать полноразмерные био-оДНК фага М13 при сохранении гибридационных свойств. При применении фотореагентов (I) и (II) не удастся избежать деградации оДНК. Полученная с помощью реагента (IV) био-оДНК М13 HAVP1 позволяет надежно обнаруживать 2 пг ( $10^{-18}$  моль) РФ дДНК М13 или оДНК М13 HAV19 в нерадиоактивном дот-гибридационном тесте.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали пластинки для ТСХ Silufol UV-254 (где не указано особо), конъюгат стрептавидин—щелочная фосфатаза производства НПО «Вектор», 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитротетразолиевый синий (Serva, ФРГ),

фотобиотин (Sigma, США), лаурилсульфат натрия, поливинилпирролидон, трис(оксиметил)аминометан (трис) и фикол (Fluca, Швейцария), сорбенты для гель-фильтрации марок Sephadex (Pharmacia, Швеция) и Ultrogel (IBF, Франция), нитроцеллюлозные фильтры марки BA-85 (0,45 мкм, Schleicher und Schüll, ФРГ). Все препараты ДНК фага M13 любезно предоставлены С. М. Зелениным (НИБХ СО РАН, Новосибирск). Все реакции, кроме специально указанных случаев, проводили при комнатной температуре. Все рабочие растворы готовили на бидистиллированной воде. Стандартные буферные растворы: 1×SSC (0,15 М NaCl/0,015 М тринатрийцитрат), 1×DS (0,02% БСА/0,02% поливинилпирролидон-400 000/0,02% фикол-400/20 mM трис-HCl, pH 7,5/0,5 мг·мл<sup>-1</sup> озвученной ДНК из молок сельди), 1×SET (0,15 М NaCl/0,02 М трис-HCl/1 mM EDTA). ИК-спектры снимали на приборе UR-20 в таблетках KBr, УФ-спектры — на спектрофотометре UV-VIS, ЯМР-спектры — на приборе Bruker-200-SY, масс-спектры — на приборе Finnigan MAT 8200 (США). Приведены химические сдвиги (δ, м. д.).

Конъюгат авидин—коллоидное золото получали как описано в [15], синтез γ-гидразида глутаминовой кислоты проводили по методике [16], N-оксисукцинимидные эфиры 4-азидобензойной (V) и 2-нитро-5-азидобензойной (VI) кислот синтезировали по методикам [17] и [18] соответственно, N-ди(γ-аминопропил)метиламин (VII) получали как описано в работе [19], препараты био-ДНК с помощью фотореагентов фотобиотин, (I) и (II) синтезировали как описано в работе [2] при указанных отношениях фотореагент—нуклеотид ДНК (см. таблицу).

*N-Метил-N-[3-(4-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамин (I)*. К раствору 0,43 г (3 ммоль) триамина (VII) в 4 мл диоксана по каплям прибавляли взвесь 0,26 г (1 ммоль) эфира (V) в 3 мл диоксана и перемешивали 1 сут. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали дважды диоксаном, объединенный супернатант упаривали досуха. К маслянистому остатку добавляли 3 мл воды, затем 4 мл 1 М раствора NaOH и экстрагировали этилацетатом (10 мл×3), экстракт высушивали MgSO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, остаток (0,22 г) очищали с помощью ТСХ на силикагеле, элюент: спирт — водный аммиак, 4:1 (детекция нингидрином; R<sub>f</sub> 0,27). Выход моноамида (I) 0,14 г (48,3%). ИК-спектр (ν, см<sup>-1</sup>): 1550, 1650 (CONH); 2100 пл., 2130 (—N<sub>3</sub>). УФ-спектр (EtOH, λ<sub>max</sub>(lge)): 273 (4,37) пл.; 288 (3,98). ПМР-спектр (CDCl<sub>3</sub>): 1,58 и 1,83 (4H, 2м, —C—CH<sub>2</sub>—C—); 2,23 (3H, NCH<sub>3</sub>); 2,46 (4H, м, —CH<sub>2</sub>—N—CH<sub>2</sub>—); 2,71 (2H, м, —CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,51 (2H, м, —CONHCH<sub>2</sub>—); 7,03 и 7,74 (4H, 2д, аром. H); 8,27 (1H, уш., —NH—). Найдено (масс-спектрометрически): M<sup>+</sup> 290,1834. C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>ON<sub>6</sub>. Вычислено: M<sup>+</sup> 290,1855.

*Дигидрохлорид N-метил-N-[3-(2-нитро-5-азидобензоиламино)пропил]-1,3-пропилендиамина (II)*. К 0,52 г (3,6 ммоль) триамина (VII) в 6 мл диоксана добавляли по каплям 0,31 г (1,0 ммоль) эфира (VI) в 7 мл диоксана. Смесь перемешивали 1,5 ч, осадок отделяли центрифугированием, промывали дважды диоксаном, объединенный супернатант упаривали досуха. К смолистому остатку добавляли 6 мл воды и 10 мл 1 М раствора KOH, экстрагировали n-бутанолом (15 мл×10), экстракт высушивали MgSO<sub>4</sub>, упаривали досуха. Остаток (1,18 г) хроматографировали на колонке (2×18 см) со смолой дауэкс 50W×4 (200—400 меш) в градиенте концентрации HCl (2 → 4 н.) в 66% MeOH (по 300 мл). Контроль осуществляли на длине волны 290 нм в проточной кювете. Выход соединения (II) 0,24 г (59,2%). ТСХ-контроль, R<sub>f</sub> 0,52 (спирт — водный аммиак, 4:1, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, детекция нингидрином). ИК-спектр: 1350 и 1530 (—NO<sub>2</sub>); 1580 и 1650 (CONH); 2130 (—N<sub>3</sub>). УФ-спектр (λ<sub>max</sub>): 232, 317. ПМР-спектр (D<sub>2</sub>O): 2,14 (4H, м, —C—CH<sub>2</sub>—C—); 3,14 (4H, м, —NH—CH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 3,36 (3H, —NCH<sub>3</sub>); 3,54 (4H, м, —CH<sub>2</sub>—N—CH<sub>2</sub>—); 7,37 и 7,42 (2H, 2д, аром. H); 8,29 (1H, д, аром. H). Аналитический образец не получали.

*Получение препаратов био-ДНК с помощью O-(4-аминобутил)гидроксиламина (IV).* В 300 мл H<sub>2</sub>O растворяли 50 мг Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 88 мг дигидрохлорида (IV), 20 мг морфолиноэтансульфокислоты (MES) и 0,5 мг гидрохинона. Раствор оттитровывали до pH 5,5 11 М NaOH и добавляли H<sub>2</sub>O до 0,5 мл. К 30 мкл полученного раствора добавляли 20 мкл раствора 1—2 мг/мл оДНК фага M13 и выдерживали заданное время. Модифицированную ДНК отделяли гель-фильтрацией на колонке объемом 200 мкл с сорбентом Sephadex G-50 superfine, уравновешенным смесью 0,1 М триэтаноламин — HCl, pH 7,5. К полученному препарату ДНК, несущему первичные аминогруппы, добавляли 1/5 объема раствора 5 мг/мл био-Асп-ONSu в диметилформамиде. Через 2 ч био-ДНК отделяли гель-фильтрацией на колонке объемом 500 мкл с сорбентом Sephadex G-50 superfine, уравновешенным раствором 0,1 М трис-HCl, pH 7,5/1 мМ EDTA/0,1% NaN<sub>3</sub>. Сохранность оДНК M13 контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в 40 мМ трис-боратном буфере, pH 8,2, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия.

*Получение препарата био-ДНК с помощью реагента (III)* проводили в основном так же, как с реагентом (IV), с той разницей, что концентрации Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, реагента (III) и величину pH изменяли в зависимости от условий опыта.

*Выявление био-ДНК с помощью конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза (способ Б).* Готовили серийные 10<sup>1/2</sup>-кратные разведения образцов био-ДНК в растворе, содержащем 10 мкг/мл денатурированной озвученной ДНК из молока сельди в буфере 6×SSC. Аликвоты (5 мкл) наносили на нитроцеллюлозный фильтр, смоченный раствором 20×SSC. Затем фильтр промокали на фильтровальной бумаге и высушивали в вакуумном шкафу (10—15 мм рт. ст., 65—80° С, 2 ч). Дальнейшие процедуры проводили как описано в работе [20]. По окончании ферментативного проявления фильтр высушивали и полученные сигналы фотометрировали в отраженном свете на денситометре ДО-1. Превышение сигнала над фоном на 0,1 ОЕ считали достоверным (паспортная приборная ошибка 0,03 ОЕ) и принимали за чувствительность (S<sub>0,1</sub>).

*Выявление био-ДНК с помощью конъюгата авидин—коллоидное золото с последующим физическим серебряным усилением (способ А)* проводили как описано в [1], с той разницей, что использовали конъюгат, полученный методом [15].

*Связывание препаратов био-ДНК со стрептавидином в растворе.* К 50 мкл раствора био-ДНК в 0,15 М NaCl (50—1000 мкг/мл) добавляли 250 мкл раствора стрептавидина в 0,15 М NaCl с концентрацией 1 мг/мл (соотношение стрептавидин/цитидин ~2). Через 20 мин комплекс био-ДНК—стрептавидин отделяли от несвязавшегося белка гель-фильтрацией на колонке объемом 4 мл с сорбентом Ultrogel AcA-34 в 0,15 М NaCl на приборе «Миллихром-2» с детекцией при 210 и 260 нм. Соотношение стрептавидин/нуклеотид в образовавшемся комплексе оценивали по соотношению A<sub>210</sub>/A<sub>260</sub> по методу [21], исходя из известных ε<sub>260</sub> для стрептавидина (1,1·10<sup>5</sup> М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [22]) и нуклеотидов ДНК (7·10<sup>3</sup> М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>), а также экспериментально определенных A<sub>210</sub>/A<sub>260</sub> для стрептавидина и био-ДНК в предположении, что спектрофотометрические характеристики не изменяются при образовании комплекса.

*Гибридизация.* 10<sup>1/2</sup>-кратные разведения РФ дДНК M13 и оДНК M13 HAV 19 готовили в растворе, содержащем 10 мМ трис-HCl, 1 мМ EDTA и 0,1 мг/мл озвученной ДНК из молока сельди, обрабатывали 5 мин на водяной кипящей бане, быстро охлаждали и добавляли к ней 1/2 объема 20×SSC. Аликвоты (5 мкл) наносили на нитроцеллюлозный фильтр, смоченный 20×SSC, фильтр промокали на фильтровальной бумаге и высушивали в вакуумном шкафу (65—80° С, 10—15 мм рт. ст.). Предгибридизацию проводили 1—2 ч в растворе состава 5×SSC и 5×DS при 65° С. Гибридизацию осуществляли в течение 8—40 ч при 62° С в растворе, содержащем 5×SSC, 1×DS, 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 0,3 мг/мл озвученной ДНК молока сельди, 10% декстрансульфат-500 000 и 100 нг/мл био-ДНК M13 HAV 1. Затем фильтры промывали последовательно в растворе,

содержащем 2×SET и 0,1% лаурилсульфат натрия 2 раза по 5 мин, в 0,2×SET — 0,1% лаурилсульфат натрия 2 раза по 5 мин и 3 раза по 15 мин при 50° С. Визуализацию проводили способом Б.

Данная работа частично финансировалась из средств ГНТП 08.05 «Новейшие методы биоинженерии», направление — «Инженерная энзимология».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добриков М. И., Сафронов И. В., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. «Хим. наука». 1989. Вып. 4. С. 3—8.
2. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. C., Symons R. H. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 3. P. 745—761.
3. Вейко Н. Н., Карпунин А. В., Салимов А. Г., Спитковский Д. М. // Химия природн. соединений. 1989. № 2. С. 259—263.
4. Hayatsu H., Ukita T. // Biochim. et biophys. acta. 1966. V. 123. № 3. P. 458—470.
5. Draper D. E. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 2. P. 989—1002.
6. Адарчев В. А., Дымищ Г. М., Калачиков С. М., Поздняков П. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1066—1069.
7. Турчинский А. Ф., Айбиндер Е. И., Кнорре В. Д., Щербо С. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 15. № 10. С. 1341—1345.
8. Reisfeld A., Rothenberg J. M., Bayer E. A., Wilchek M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 142. № 2. P. 519—526.
9. Турчинский М. Ф., Айбиндер Е. И., Свердлов Е. Д. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. Вып. 6. С. 1545—1552.
10. Sono M., Wataya Y., Hayatsu H. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 14. P. 4745—4749.
11. Shapiro R., DiFate V., Welcher M. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 3. P. 906—912.
12. Boni I. V., Budovsky E. I. // J. Biochem. 1973. V. 73. № 4. P. 821—830.
13. Каргинов В. А., Зеленин С. М., Бондарь А. А., Николаева Е. С., Наумов В. А., Волчек И. А., Попова В. С., Кусов Ю. Ю., Грабко В. И., Казачков Ю. А., Балаян М. С., Царев С. А., Свердлов Е. Д., Арсенян С. Г., Мертвецов Н. П. // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусология. 1988. № 7. С. 39—42.
14. Будяк Е. В., Сафронов И. В., Батурина И. И., Синагатуллина Н. Н., Наумов В. А., Хомяков А. Г., Шишкин Г. В., Орешкова С. Ф., Вейко Н. П., Карпунин А. В., Файзуллин Л. З., Мертвецов Н. П. // Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусология. 1992. № 9—10. С. 5—8.
15. Добриков М. И., Сафронов И. В., Шишкин Г. В. Способ получения конъюгата авидина с коллоидным золотом: А. с. № 1638163 СССР // Б. И. 1991. № 12. С. 74.
16. Akabori S., Natita K. // Proc. Jap. Acad. 1953. V. 29. P. 264—265 // C. A. 1955. V. 49. № 864.
17. Galardy R. E., Craid L. C., Jamisson J. O., Prints M. P. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 11. P. 3510—3518.
18. Lewis R. V., Roberts M. F., Dennis E. A., Fllison W. C. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 25. P. 5650—5654.
19. Стренихеев А. А., Богданов М. Н. // Сб. статей по общей химии. М.—Л.: Наука, 1953. Т. 2. С. 1462—1463.
20. Chan V. T.-W., Fleming K. A., McGee J. J. D. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 22. P. 8083—8090.
21. Свердлов О. В. Электронные спектры в органической химии. Л.: Химия, 1985. С. 185—193.
22. Green N. M. // Adv. Prot. Chem. 1975. V. 29. P. 85—133.

Поступила в редакцию  
3.II.1993

После доработки  
11.XI.1993



**INTRODUCTION OF BIOTIN GROUPS IN SINGLE-STRANDED DNA  
WITHOUT NICKING OF INTERNUCLEOTIDE BONDS**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk*

Properties of biotinylated M13 single-stranded (ss) DNA, obtained by several two-step procedures, were investigated. In the first step, aliphatic amino groups were introduced in ss M13 DNA using N-methyl-N-[3-(4-azidobenzoylamino)propyl]-1,3-ethylenediamine (I) and N-methyl-N-[3-(5-azido-2-nitrobenzoylamino)propyl]-1,3-ethylenediamine (II) through photoreaction, whereas glutamic acid  $\gamma$ -hydrazid (III) and O-(4-aminobutyl)hydroxylamine (IV) led to a similar result via transamination. In the second step these groups were acylated by N-hydroxysuccinimide ester of  $\omega$ -(N-biotinyl)aminocaproic acid. Reagents (I) and (II) allow to introduce 15 and 5 biotin residues per 100 nucleobases (bio/kN) of M13 ss DNA, respectively, but both destroy the DNA chain. Reaction conditions of bisulfite-catalyzed transamination that do not cause destruction of ss DNA chain were found. Bio-DNA probes, obtained with the use of transaminating reagents were stable and did not lose hybridization properties. In these circumstances reagents (III) and (IV) allow to obtain M13 ss bio-DNA probes, bearing 6 and 26 bio/kN. Using these probes,  $(1-3) \cdot 10^{-18}$  moles/mm<sup>2</sup> of target filter-bound DNA can be significantly detected.