



УДК 577.113.4

© 1990 г.

*Т. И. Венер, М. Ф. Турчинский, В. Д. Кнорре,
А. Н. Генералова, Ю. В. Лукин, С. Н. Щербо,
С. И. Туркин, В. П. Зубов*

ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОКРАШЕННЫХ ЛАТЕКСОВ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Гибридационный анализ нуклеиновых кислот (НК), иммобилизованных на мембранах, широко используется для поиска уникальных нуклеотидных последовательностей. При мечении полинуклеотидных (ПНК) зондов традиционно употребляют радиоактивные изотопы (^{32}P , ^{125}I , ^{35}S) [1]. Однако такие зонды обладают коротким «временем жизни» и небезопасны в работе, что ограничивает возможность их применения, особенно в диагностических целях. Поэтому все более широкое применение в клинических исследованиях находят нерадиоактивно меченные зонды.

Методы нерадиоактивного мечения ПНК-зондов можно разделить по способу детекции «гибридационного сигнала»: а) прямая регистрация — метки (ферменты [2], флуорофоры [3]) вводят непосредственно в ПНК-зонд; б) опосредованная регистрация — в ПНК-зонды вводят специфические лиганды, детекцию которых после гибридазации осуществляют с помощью конъюгатов лиганд-специфических белков с Eu^{3+} [4], ферментами [5], коллоидным золотом [6]. Однако методы прямой регистрации обладают, как правило, низкой чувствительностью, а большинство методов опосредованной регистрации требуют использования дорогих реагентов и сложной аппаратуры, хотя и обеспечивают довольно высокую чувствительность.

Корпускулярные носители-метки (типа коллоидного золота) представляют особый интерес, так как обеспечивают простой и эффективный способ детекции «гибридационного сигнала», а совершенствование конструкции таких меток открывает путь к дальнейшему повышению чувствительности метода. С этой целью нами предложено использовать в качестве корпускулярного носителя-метки окрашенные полиакролеиновые латексные частицы (PAL), содержащие флуоресцентный краситель пиронин Ж [7] и несущие на своей поверхности молекулы стрептавидина (S) (рис. 1). Связывающая емкость PAL диаметром 2 мкм по стрептавидину составляет до 15 нмоль на 100 мг полимера. После гибридазации иммобилизованной на мембране НК-мишени с ПНК-зондом, несущим метку — биотин, детекция гибридов осуществляется с помощью PAL-S визуально в видимом или УФ-свете.

Для проведения гибридазации в качестве модельной тест-системы использовали ДНК фага λ , иммобилизованную на нейлоновом фильтре в количествах от 1,6 пг до 1 нг. Иммобилизованную ДНК гибридовали биотинилированным зондом — комплементарным фрагментом ДНК фага λ . Биотин вводили реакцией бисульфит-катализируемого трансаминирования по цитозиновым остаткам с последующей обработкой продуктов реакции производным N-оксисукцинимидного эфира биотина [8].

После гибридазации НК-мишени с ПНК-зондом [9] биотинилированный гибрид проявляли 0,1–0,5% суспензией латексного конъюгата PAL-S. Фильтр отмывали, рассматривали, фотографировали в УФ-свете ($\lambda_{\text{max}}=365\text{ нм}$).

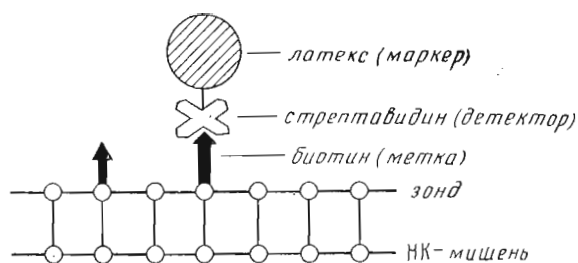


Рис. 1

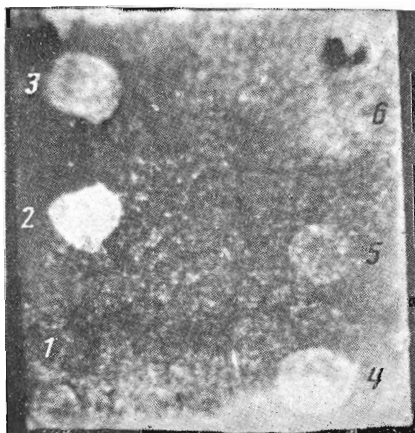


Рис. 2

Рис. 1. Опосредованная детекция биотинилированного гибрида с помощью латексного конъюгата PAL-S

Рис. 2. Дот-гибридизация ДНК фага λ , иммобилизованной на нейлоновом фильтре. Проявление с помощью PAL-S. Фотография в УФ-свете (365 нм): 1 — контрольная ДНК из спермы лосося (10 нг), 2—6 — ДНК фага λ : 1 нг, 200 нг, 40, 8, 1,6 нг соответственно

На фотографии фильтра, на котором проводили дот-гибридизацию ДНК фага λ (рис. 2), в местах нанесения ДНК в УФ-свете хорошо видны флуоресцирующие пятна; чувствительность анализа 1,6 пг ДНК. В видимом свете окрашенные пятна в местах нанесения ДНК обнаруживаются вплоть до 200 пг ДНК. Гетерологическая ДНК из спермы лосося, нанесенная на мембрану, в количестве 10 нг флуоресцентного сигнала не дает, что указывает на специфичность анализа.

Как видно из представленных результатов, использование флуоресцентного конъюгата PAL-S для детекции гибридов позволило достичь высокой чувствительности анализа за счет усиления «гибридизационного сигнала», так как в отличие от флуоресцентно меченного ПНК-зонда полимерная частица содержит сотни тысяч молекул маркера.

Таким образом, предложенный вариант латексного гибридизационного анализа не уступает по чувствительности большинству существующих методов гибридизационного анализа. Кроме того, латексный анализ отличается методической простотой и экспрессностью, поскольку не требует использования специальной аппаратуры, и детекция гибридов осуществляется в одну стадию.

В дальнейшем метод может найти широкое применение для нерадиоактивного скрининга бактериальных колоний или фаговых бляшек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haase A. T., Walker D., Stowring L. // Science. 1985. V. 227. P. 189—191.
2. Renz M., Kurz C. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. P. 3435—3444.
3. Адаричев В. А., Дымищ Г. М., Калачников С. М., Поздняков П. Н., Салганик Р. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1066.
4. Dahlen P., Syvanen A.-C., Hurskainen P. // Mol. Cell. Probes. 1987. V. 1. P. 159—168.
5. Nagata Y., Yokota H., Kosuda O., Yokoo K. // FEBS Lett. 1985. V. 183. P. 379—382.
6. Dattagupta N., Busse W. D. Method for the detection of nucleic acid hybrids: EP Patent 0267521. 1986.
7. Лукин Ю. В., Бахарев В. Н., Заиченко А. С., Воронов С. А., Зубов В. П., Грицкова И. А., Праведников А. Н. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 1. С. 159—161.

8. Турчинский М. Ф., Айбиндер Е. И., Свердлов Е. Д. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. № 6. С. 1545-1553.
9. Bresser J., Gillespie D. // Anal. Biochem. 1983. V. 129. P. 357-364.

Поступило в редакцию
20.VII.1989
После доработки
3.X.1989

T. I. VENER, M. F. TURCHINSKY, V. D. KNORRE, A. N. GENERALOVA,
Yu. V. LUKIN, S. N. SCHERBO, S. I. TURKIN, V. P. ZUBOV

NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION ANALYSIS USING STAINED
LATEX PARTICLES

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

Method of the latex hybridization analysis has been developed: after hybridization of NA-target with biotinylated probe visualization of hybrids was carried out using latex particles, containing fluorescent dye pyronin G and coated with streptavidin. Due to incapsulation of the fluorescent dye in polymer particles sensitivity of the analysis was increased by several orders of magnitude in comparison with methods, using fluorescently labelled probes. Possessing a number of advantages, the method yields to none of any other methods of NA hybridization analysis in sensitivity.