БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 16 * № 5 * 1990

УДК 577.113.4
© 1990 г.

Н. Н. Карпышев, Т. Ю. Бондаренко, С. М. Киприянов

ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИБРИДИЗАЦИОННЫХ ЗОНДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ДЕЙСТВИЕМ ГИДРАЗИДОВ ПРОИЗВОДНЫХ БИОТИНА НА ДНК

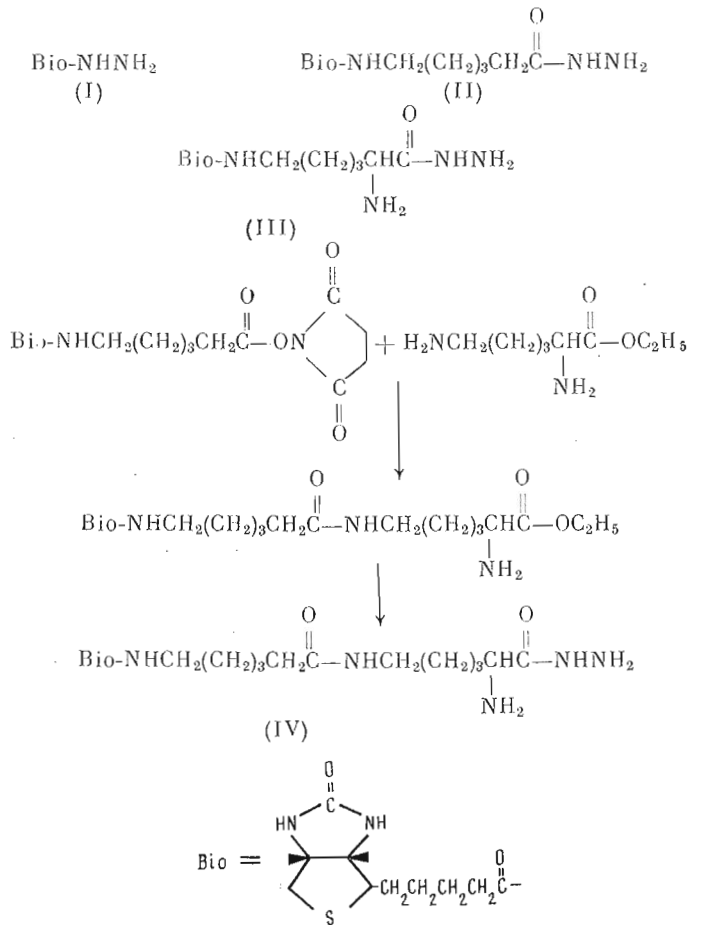
ВНИИ молекулярной биологии НПО «Вектор» Минмедбиопрома СССР, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Сравнивали эффективность ДНК-зондов в модельной системе неизотопной гибридизационной детекции нуклеиновых кислот. Зонды получали действием на ДНК каждого из четырех гидразидов, различающихся строением производных биотина. Наибольшей чувствительности детекции позволил достичь зонд, полученный с использованием биоцитингидразида. Обсуждается связь между строением гидразидов и эффективностью биотинилированных зондов.

Химическая модификация нуклеиновых кислот при помощи различных производных биотина — один из альтернативных методов получения зондов для неизотопной гибридизационной диагностики. Относительно малые стоимость и трудоемкость этого метода делают его конкурентоспособным с ферментативными, основанными на использовании трифосфатов биотинилированных нуклеозидов [1]. Для химического введения в ДНК остатков биотина предложен ряд методов и реагентов. Так, способность азидной группы фотохимически превращаться в активный нитрен используется при мечении нуклеиновых кислот фотобиотином [2]. В аналогичном методе [3] в качестве фотоактивной группы использовано производное псоралена. *п*-Диазабензоилбиоцитин содержит активную диазагруппу, способную реагировать с пуринами [4]. Биотинилированные полиамины или основные белки (гистон H1, цитохром *c*) присоединяли к ДНК при помощи бифункциональных сшивающих реагентов [5, 6]. В двухстадийном методе биотинилирования ДНК использовали переаминирование цитозинового гетероцикла 0-(4-амино)бутилгидроксиламином с последующим ацилированием ДНК N-оксисукцимидным эфиром биотина [7]. Гидризид биотина также использовали в реакции переаминирования цитозиновых остатков [8].

Последний метод [8], на наш взгляд, имеет определенные преимущества перед остальными перечисленными. Будучи одностадийным, он в то же время использует стабильное и безопасное при производстве, хранении и в работе, легко доступное коммерчески и синтетически соединение. Авторы цитируемой разработки [8] высказали предположение, что использование реагентов, более растворимых в среде реакции, а также имеющих «спейсерную» группу между гидразидной и биотиновой частями молекулы, могло бы повысить чувствительность получаемых зондов. Однако такие модификации биотинилирующих реагентов могут отразиться на их способности реагировать с ДНК, а также на специфичности взаимодействия биотинилированной ДНК с мишенью.

Ввиду того что в настоящее время коммерчески доступно несколько гидразидов производных биотина (I—III, см. схему), мы сочли практически важным определить их сравнительную пригодность при получении биотинилированных зондов. Мы также синтезировали гидразид ε-(ε-биотинил-



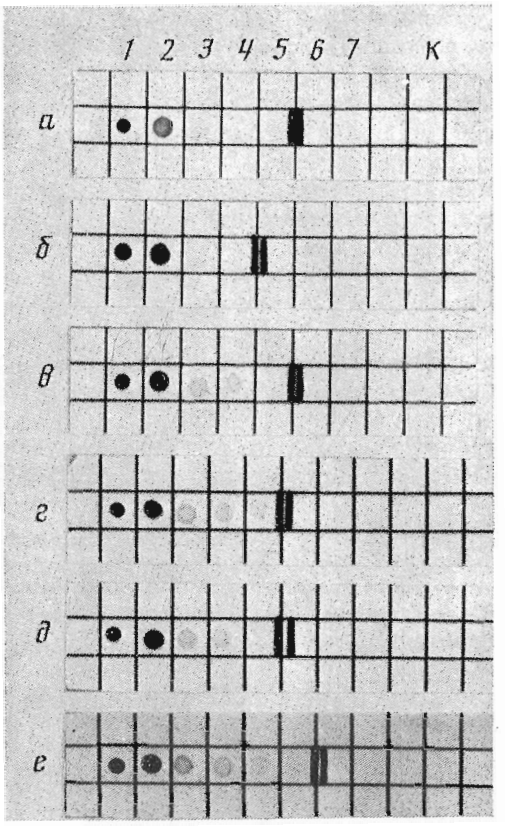
аминокапроил)-L-лизина (IV), обладающий как протяженной «спейсерной» группой, так и сравнительно хорошей растворимостью в воде. Данный гидразид (IV) получали действием N-оксисукцинимидного эфира биотинил-аминокапроновой кислоты на этиловый эфир лизина с последующим гидразинолизом промежуточного сложного эфира. Направленность ацилирования специально нами не изучалась, однако повышенная реакционная способность ε-аминогруппы по сравнению с α-аминогруппой лизина, а также трехкратный избыток этилового эфира *L*-лизина в данной реакции позволяют считать ацилирование в положение ε преобладающим. Хроматографическая гомогенность и сравнительно узкий диапазон температуры плавления гидразина (IV) дают также основания говорить о его индивидуальности.

В качестве мишени мы использовали одноцепочечную кольцевую ДНК M13mp9HA, содержащую клонированный ген гемагглютинина вируса гриппа [9], в качестве зонда — ДНК M13mp8HA (fHAM 81) с геном гемагглютинина, клонированным в обратной ориентации [10]. Отрицательным

Предельные концентрации гидразидов (I) – (IV) в условиях переаминирования

Гидразид	Молекулярная масса	Концентрация насыщенного раствора	
		мг в 100 мкл	мкМ
I	258	1	40
II	371	1	30
III	386	4	100
IV	499	5	100

контролем служила ДНК фага M13mp9 [11]. Модификацию ДНК-зонда осуществляли в условиях, оптимизированных авторами работы [8]: при 37° С в ацетатном буфере, pH 4,5, при концентрации бисульфита 1 М. Гидразиды (I)—(IV) брали в количествах, позволяющих достичь их концентрации насыщения в данных условиях (см. таблицу), причем для достижения насыщения гидразиды добавляли при 37° С порциями по 1 мг с интервалами по 10 мин до неполного растворения последней порции. Для отделения биотинилированной ДНК от низкомолекулярных соединений использовали гель-фильтрацию как более быстрый метод по сравнению с диализом, предложенным авторами работы [8]. Полученные таким образом зонды использовали в параллельных опытах по гибридизации на нитроцеллюлозных мембранах с последующими последовательными обработками конъюгатом стрептавидин—пероксидаза и раствором, содержащим 4-хлор-1-нафтол и перекись водорода [6].



Детекция ДНК дот-гибридизацией. На мембраны нанесены следующие количества ДНК-мишени: *1* — 150, *2* — 15, *3* — 1,5 нг, *4* — 500, *5* — 250, *6* — 125, *7* — 25 пг. *К* — контрольная ДНК (150 нг). Для гибридизации использованы ДНК-зонды, модифицированные одним из гидразидов (указаны гидразид и время реакции переаминирования (ч)): *а* — (I), 24; *б* — (II), 24; *в* — (IV), 24; *г* — (IV), 48; *д* — (IV), 72; *е* — (III), 24 ч. Двойной чертой обозначен предел визуальной детекции через 10 мин после добавления проявляющего раствора субстратов

На чувствительность детекции, очевидно, влияют при прочих равных условиях степень модификации остатков цитозина биотином [8] и стерические препятствия взаимодействию биотин—стрептавидин, уменьшающиеся с увеличением длины спейсерной группы [5, 6]. Строгая оценка влияния каждого из этих параметров в отдельности трудоемка и для наших практических целей весьма софистична. Поэтому конечный результат детекции как интегральная характеристика влияния любых факторов вполне может служить, на наш взгляд, мерой эффективности биотинилирующих реагентов.

Наилучшие результаты (рисунок) дает использование биоцитингидразида (III), который имеет самую высокую растворимость среди исследованных гидразидов и, кроме того, спейсерную группу (7 атомов). Впрочем, как видно на примере гидразидов (I) и (II), само по себе наличие спейсерной группы не приводит к такому увеличению чувствительности зондов, какого можно было бы ожидать на основании литературных данных [5]. Вероятно, подобное преимущество не может компенсировать уменьшения количества вводимых в ДНК остатков биотина в результате меньшей мольной концентрации биотинилирующего агента. Нельзя исключить и влияния стерических факторов в реакции переаминирования.

Несколько неожиданным оказалось для нас то обстоятельство, что сравнительно хорошо растворимый в воде и имеющий протяженную спейсерную группу гидразид (IV) практически не имеет преимуществ перед биотингидразидом (I). Увеличение времени переаминирования (см. рисунок) также не дало ощутимого увеличения чувствительности детекции.

Таким образом, нами не обнаружено очевидной корреляции между чувствительностью гибридизационных зондов, с одной стороны, и между растворимостью биотинилирующих реагентов или размером их спейсерных групп — с другой. В самом деле, различия растворимости гидразидов (I)—(IV) в мольном выражении невелики, а введение дополнительных группировок атомов в принципе может неблагоприятно сказаться на скорости переаминирования. Тем не менее, основываясь на данных по гибридизационной детекции, а также на стоимости и доступности исследованных гидразидов (I)—(IV), для получения биотинилированных ДНК мы можем рекомендовать биоцитингидразид (III), предложенный ранее [12] для введения остатков биотина в полисахариды и гликопротеины. Необходимо также отметить, что при использовании зонда, полученного через гидразид (III), наблюдался равномерный слабый фон (окрашивание материала мембраны при проявлении гибридов фермент-субстратной реакцией). Этот фон не мешал определению ДНК-мишени в наименьших по сравнению с другими зондами количествах и не сопровождался неспецифической детекцией контрольной ДНК.

Экспериментальная часть

Гибридизацию проводили на нитроцеллюлозных мембранах НА (Millipore, США). Масс-спектр в режиме бомбардировки быстрыми атомами снимали на масс-спектрометре 7070 HS (VG, Англия) с эмиссией нейтральными атомами аргона из глицериновой матрицы. Контроль оптического поглощения растворов осуществляли на спектрофотометре Perkin—Elmer 550 (ФРГ). ТСХ осуществляли на пластинках с закрепленным слоем силикагеля 60F (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — этанол — 25% NH_4OH, 65 : 35 : 5. Пятна веществ обнаруживали нингидрином, а также прокаливанием хроматограмм в открытом пламени. ДНК нативного и рекомбинантных фагов выделяли по описанной ранее методике [13]. В работе использовали конъюгат стрептавидин — пероксидаза хрена (Sigma, США), фиколл 70 (Pharmacia, Швеция), сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), додецилсульфат натрия и тритон X-100 (Serva, ФРГ), дигидрохлорид этилового эфира *L*-лизина (Fluka, Швейцария). Остальные реактивы были отечественными, в том числе N-оксисукцинимидный эфир ε-биотиниламинокапроновой кислоты, гидразид биотина (I), гидразид ε-биотиниламинокапроновой кислоты (II), биоцитингидразид (III) — отечественного производства.

Гидразид ε-(ε-биотиниламинокапроил)-L-лизина (IV). Раствор 247 мг (1 ммоль) дигидрохлорида этилового эфира *L*-лизина, 151 мг (0,33 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира ε-биотиниламинокапроновой кислоты и и 0,7 мл триэтиламина в 3 мл диметилформамида выдерживали 24 ч при 20° С. Растворитель удаляли в вакууме, остаток наносили на колонку (25 × 80 мм) с силикагелем L 40/100 мкм, элюируя вещества системой для ТСХ. Собирали фракцию с R_f 0,63, элюент упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл метанола, добавляли 1 мл гидразингидрата. Через 18 ч при 20° С реакционную массу упаривали, остаток растворяли в 5 мл этанола и осаждали добавлением трехкратного объема эфира. Выход 90 мг (54%), R_f 0,44, т. пл. 159—160° С. Масс-спектр: 500,0 $(M + H)^+$. Элементный анализ соответствует рассчитанному.

Биотинилирование ДНК. Раствор 12 мкг МНК M13 mp8HA (f HAM 81) в 50 мкл воды смешивали с 50 мкл ацетатного буфера (pH 4,5, ионная сила 1) в полипропиленовой пробирке емкостью 1,5 мл. Добавляли 10 мг метабисульфита натрия и один из гидразидов (I)—(IV) до концентрации, указанной в таблице. Пробирку закрывали и выдерживали при 37 ± 0,5° С необходимое время (см. рисунок). Добавляли воду до полного растворения осадка и наносили на колонку (1 × 20 см) с сефадексом G-50. Биотинилированную ДНК элюировали водой и до использования хранили при —10° С.

Гибридизация и проявление. Нитроцеллюлозные мембраны разрезали на полоски 6,0 × 1,5 см. Растворы предварительно денатурированной нагревом и охлаждением ДНК M13 mp9HA в нужных количествах

(см. рисунок) наносили на мембраны и иммобилизовали 2 ч при 80° С (15 мм). Предгибридизацию проводили в плотно закрытых сцинтилляционных флаконах в условиях, описанных в монографии [14]. Гибридизацию осуществляли в тех же условиях в течение 20 ч при концентрации биотинилированного зонда 0,5 мкг/мл. Визуальную детекцию с использованием проявления конъюгатом стрептавидин—пероксидаза и раствора субстратов на основе 4-хлор-1-нафтола и H_2O_2 осуществляли описанным способом [6]. Отмытые водой и высушенные блоты хранили до фотосъемки в темноте при 4° С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matthews J. A., Kricka L. J.* // Anal. Biochem. 1988. V. 169. № 1. P. 1—25.
2. *Forster A. C., McInnes J. L., Scindle D. C., Symons R. H.* // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 4. P. 745—761.
3. *Sheldon E. L., Levensen C. H., Mullis K. B., Rappoport H.* 1985. Eur. Pat. Appl. 156287.
4. *Rothenberg J. M., Wilchek M.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 14. P. 7197.
5. *Al-Hakim A. H., Hull R.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 24. P. 9965—9976.
6. *Al-Hakim A. H., Hull R.* // Biochem. J. 1988. V. 251. № 3. P. 935—938.
7. *Бросалина Е. Б., Власов В. В., Грачев С. А., Демченко Е. Н.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 12. С. 1644—1654.
8. *Reisfeld A., Rothenberg J. M., Bayer E. A., Wilchek M.* // Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1987. V. 142. № 2. P. 519—526.
9. *Петренко В. А., Киприянов С. М., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Поздняков П. И., Сиволобова Г. Ф., Ерошкин А. М., Куличков В. А., Сандахчиев Л. С.* // Докл. АН СССР. 1988. Т. 299. №. 6. С. 1506—1509.
10. *Петренко В. А., Киприянов С. М., Семенова Л. Н., Акименко З. А., Рукавишников М. Ю., Болдырев А. Н., Поздняков П. И., Кондрахин Ю. В.* // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 3. С. 889—898.
11. *Messing J., Vieira J.* // Gene. 1982. V. 19. № 3. P. 269—276.
12. *Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M.* // Anal. Biochem. 1988. V. 170. № 2 P. 271—281.
13. *Петренко В. А., Сиволобова Г. Ф., Семенова Л. Н., Болдырев А. Н., Каргинов В. А., Гуторов В. В.* // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 1985. № 8. С. 38—44.
14. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 303—306.

Поступила в редакцию
26.VI.1989

N. N. KARPYSHEV, T. Yu. BONDARENKO, S. M. KIPRIYANOV

ESTIMATION OF RELATIVE EFFICIENCES OF HYBRIDISATION PROBES OBTAINED BY ACTION OF HYDRAZIDES OF BIOTIN DERIVATIVES ON DNA

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo, Novosibirsk Region

Efficiencies of biotinylated DNAs as hybridisation probes in a model system of nonradioactive detection were compared. Probes were obtained by interaction of single-stranded DNA and each of four different hydrazides of biotin derivatives. The most sensitivity in detection of complementary target was obtained using (biocytin hydrazide)-treated DNA. Relations between hydrazide structures and sensitivity of biotinylated probes are discussed.