



УДК 577.113.4.083

© 1991 г.

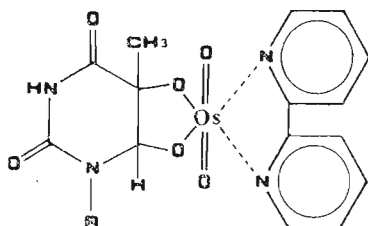
А. Е. Кабаков, Л. Н. Бровка, В. К. Подгородниченко,
А. М. Поверенный

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ДНК, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ТЕТРАОКСИДОМ ОСМИЯ В ПРИСУТСТВИИ 2,2'-БИПИРИДИНА

Институт медицинской радиологии АМН СССР, Обнинск

Получены моноклональные антитела (IgG), реагирующие с ДНК, химически модифицированной тетраоксидом осмия в присутствии 2,2'-бипиридина, и не взаимодействующие с немодифицированной ДНК, а также с модифицированными и немодифицированными РНК и белками. Специфичность реакции обусловлена взаимодействием IgG с модифицированным остатком дезокситимидина, входящим в состав эпитопа. Обсуждается возможное применение полученных антител в исследованиях структуры ДНК и для иммунодетекции специфических полинуклеотидных последовательностей.

В присутствии пиридина или 2,2'-бипиридина тетраоксид осмия образует стабильные аддукты с пиримидиновыми основаниями [1—3]:



Из-за стерических особенностей *B*-формы ДНК А·Т- и G·C-пары недоступны для данного реагента. Напротив, неспаренные основания, экзспонированные в местах расплетения или некоторых структурных искажений двойной спирали ДНК, активно реагируют с OsO₄-бипиридиновым комплексом. Известно, что OsO₄ в присутствии пиридина или 2,2'-бипиридина модифицирует однонитевую ДНК [1, 4], крестообразные структуры [5, 6], участки перехода *B*-формы в *Z*-ДНК [7—9] и некоторые необычные гомопурино-гомопиримидиновые последовательности [10, 11]. Очевидно, что специфические антитела к аддуктам могли бы использоваться для детекции модифицированной ДНК и иммулокализации участков ДНК с неспаренными основаниями.

Ранее сообщалось о получении поликлональных антител к ДНК, модифицированной OsO₄ в присутствии пиридина [3]. В настоящей работе получена стабильная гибридная линия 4D10, которая секретирует моноклональные антитела, принадлежащие к подклассу IgG1 и реагирующие с ДНК, модифицированной OsO₄ в присутствии 2,2'-бипиридина (bpOs-ДНК). Специфичность связывания исследовалась методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Как показано на рис. 1, антитела 4D10 сильно реагируют с bpOs-ДНК и bpOs-poly[d(A-T)]. При этом они практически не взаимодействуют с немодифицированной ДНК, а также с модифицированными РНК, poly [d(I-C)] и бычьим сывороточным альбумином (BSA) (рис. 1). Высокая реактивность антител по отношению к bpOs-poly[d(A-T)] и негативная

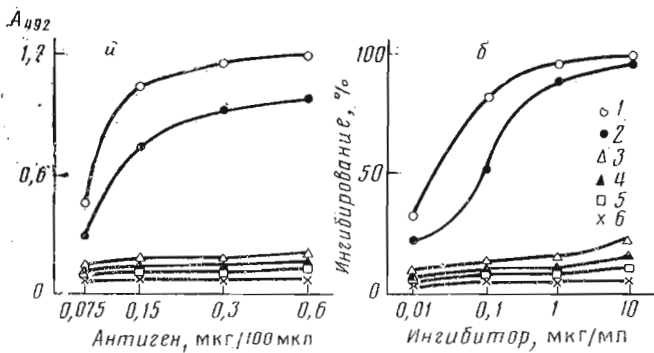


Рис. 1. Реактивность антител 4D10 (ELISA): а — прямое связывание IgG (10 мкг/мл) с различными антигенами; б — конкурентное связывание IgG с адсорбированной bpOs-ДНК в присутствии в жидкой фазе различных ингибиторов. 1 — bpOs-ДНК, 2 — bpOs-poly[d(A-T)], 3 — bpOs-РНК, 4 — денатурированная немодифицированная ДНК, 5 — bpOs-poly[d(I-C)], 6 — bpOs-BSA

реакция с модифицированными РНК и poly[d(I-C)] свидетельствуют о важной роли модифицированного остатка дезокситимидина в специфическом узнавании bpOs-ДНК антителами 4D10. Специфичность реакции была также подтверждена «дот-блот»-анализом: IgG не реагировали с немодифицированной ДНК и bpOs-РНК. В то же время наблюдалась мощная реакция с модифицированными ДНК и poly[d(A-T)] (рис. 2). С помощью «дот-блот»-анализа удавалось определить до 0,04 пг bpOs-ДНК. Антитела 4D10 также не взаимодействовали с тиминовыми гликолями, полученными при обработке ДНК OsO₄ без 2,2'-бипиридина. Отсутствие перекрестных реакций с клеточными белками было установлено с помощью иммуноблоттинга на тотальном экстракте клеток HeLa (данные не приводятся).

Специфичность и высокая чувствительность реакции антител 4D10, вероятно, позволят применить их для детекции ДНК, модифицированной *in situ*. Так как OsO₄ в комплексе с 2,2'-бипиридином является специфическим реагентом для селективного мечения ДНК непосредственно в живых клетках [9, 11, 12], открывается возможность для иммулокализации неспаренных тиминсодержащих участков в плазидах и хромосомах.

Для идентификации специфических нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК обычно используют гибридизацию с радиоактивно меченными комплементарными фрагментами. В последнее время, однако, вместо автордиографии часто применяют метод иммунодетекции с использованием химической модификации нуклеотидов, специфических антител к продукту модификации и иммуноферментной реакции, которая после гибридизации локально окрашивает места образования комплексов «антиген—антитело» [13—15]. Модификация тетраоксидом осмия в присутствии бипиридина представляется удобной для этой цели, поскольку не затрагивает часть пиримидинового кольца, участвующую в образовании водородных связей (см. формулу). Отсутствие неспецифического связывания с ДНК, РНК и клеточными белками предполагает возможность иммунодетекции с антителами 4D10 при гибридизации *in situ*.

Экспериментальная часть

ДНК из тимуса теленка, poly[d(A-T)], poly[d(I-C)] (Sigma, США), РНК из дрожжей и BSA (Serva, ФРГ) модифицировали OsO₄ с 2,2'-бипиридином (Merck, ФРГ) по известной методике [3]. В брюшную полость мышей Balb/c с 3-недельным интервалом вводили bpOs-ДНК в комплексе с метилированным BSA (по 60 мкг ДНК на мыш). На 4-е сут после 5-й инъекции спленциты сливали с клетками миеломы X63. Ag.8.653 с помощью 50% полиэтиленгликоля 1500 (Serva, ФРГ). Первичные популяции проверяли методом ELISA. Отобранные гибридомы клонировали,

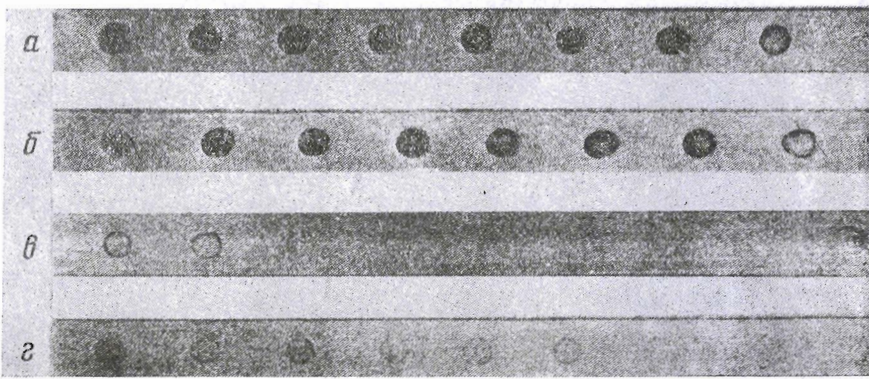


Рис. 2. «Дот-блот»-анализ с антителами 4D10. Различные количества антигенов сорбированы на нитроцеллюлозной мембране с 5-кратным разведением — от 3125 нг в 1-й точке до 0,04 нг в 8-й: а — BrOs-DНК ; б — BrOs-poly[d(A-T)] ; в — BrOs-PHK ; г — немодифицированная денатурированная ДНК

реклонировали и переводили в асцит *in vivo*. Изотипы иммуноглобулинов определяли иммунодиффузией, используя набор фирмы Miles (США). Фракцию IgG выделяли из асцитной жидкости хроматографией на DEAE-целлюлозе. ELISA проводили на 96-луночных плашках (Nunc, Дания), используя конъюгированные с пероксидазой антитела против мышиных IgG (Amersham, Англия) в разведении 1 : 1200. Методика конкурентного связывания была описана ранее [3]. В «дот-блот»-анализе [16] и при иммуноблоттинге [17] использовали нитроцеллюлозу (Bio-Rad, США), асцитную жидкость, разведенную в соотношении 1 : 300, биотинилированные антитела против мышиных IgG (1 : 400) и разведенный в 300 раз биотин-стрептавидин-пероксидазный комплекс (Amersham, Англия). Окрашивание дотов происходило в присутствии 0,05% 4-хлор-1-нафтола (Merck, ФРГ) и 0,01% H_2O_2 .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang C. H., Beer M., Marzilli L. G. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. № 1. P. 33—38.
2. Glikin G. C., Vojtiskova M., Rena-Descalzi L., Palecek E. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 4. P. 1725—1735.
3. Palecek E., Krejцова A., Vojtiskova M., Podgorodnichenko V., Ilyina T., Povereniy A. // *Gen. Physiol. and Biophys.* 1989. V. 8. № 3. P. 491—504.
4. Lukasova E., Vojtiskova M., Jelen F., Sticzay T., Palecek E. // *Gen. Physiol. and Biophys.* 1984. V. 3. № 1. P. 175—191.
5. Lilley D. M. J., Palecek E. // *EMBO J.* 1984. V. 3. № 5. P. 1187—1192.
6. McClellan J. A., Lilley D. M. J. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 197. № 3. P. 707—721.
7. Johnston H., Rich A. // *Cell*. 1985. V. 42. № 3. P. 713—724.
8. Galazka G., Palecek E., Wells R. D., Klysik J. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 15. P. 7092—7098.
9. Palecek E., Rasovska E., Boublikova P. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 150. № 2. P. 731—738.
10. Weinreb A., Collier D. A., Birshtein B. K., Wells R. D. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 3. P. 1352—1359.
11. Karlovsky P., Pecinka P., Vojtiskova M., Makaturova E., Palecek E. // *FEBS Lett.* 1990. V. 274. № 1, 2. P. 39—42.
12. McClellan J. A., Boublikova P., Palecek E., Lilley D. M. J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. № 11. P. 8373—8377.
13. Keller G. H., Cumming C. V., Huang D. P., Manak M. M., Ting R. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 170. № 2. P. 441—450.
14. Lund V., Lindqvist B., Eggset G. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 2. P. 539—551.
15. Куселева В. И., Турчинский М. Ф., Поверенный А. М. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 7. С. 991—992.
16. Hawkes R., Niday E., Gordon J. // *Analyt. Biochem.* 1982. V. 119. № 1. P. 142—147.
17. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 9. P. 4350—4354.

Поступила в редакцию
14.XII.1990

После доработки
3.IV.1991

**A MONOCLONAL ANTIBODY TO DNA MODIFIED WITH OSMIUM
TETROXIDE AND 2,2'-BIPYRIDINE**

Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences of the USSR, Obninsk

A monoclonal antibody (IgG) has been produced that binds to DNA modified with osmium tetroxide and 2,2'-bipyridine and does not react with unmodified DNA and modified or unmodified RNA and proteins. The reaction specificity is due to the presence of the modified deoxythymidine residue within the epitope. Possible use of the antibody for studies of DNA structure and detection of cDNA probes is discussed.