



УДК 577.213.3

© 1992 г. И. Шерберг, С. Дзехцер

ПОЛУЧЕНИЕ 5-[¹²⁵I]ИОД-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТА И ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕНОГО НУКЛЕОТИДА В ДНК МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Чикагский университет, Чикаго, Иллинойс, США

Радиоактивный изотоп иода был введен в дезоксиуридинтрифосфат иодированием 5-хлормеркуро-2'-дезоксуридинтрифосфата. Очищенный последовательными хроматографиями на тиопропилсефарозе QM, DEAE-целлюлозе меченый иодированный нуклеотид включался в ДНК в условиях полимеразной цепной реакции, конкурируя исключительно с ТТР. Синтезированная иодированная ДНК не утрачивает изотопную метку в условиях температурной и ампиачной обработки.

5-Иоддезоксуридин эффективно включается в ДНК в клетках бактерий [1] и животных [2]. Однако, несмотря на то что иодуридилаты являются хорошими субстратами для большинства полимераз [3], меченные иодом нуклеотиды ограничено используются при синтезе нуклеиновых кислот *in vitro*, вероятно, в силу способности 5-иодурацильных производных гидратироваться по ненасыщенной связи, а затем утрачивать галогидный заместитель [4]. Чтобы определить, насколько эти свойства 5'-иодуридилатов ограничивают их использование для приготовления гибридационных проб, мы решили синтезировать 5-[¹²⁵I]иод-2'-дезоксуридин-5'-трифосфат (¹⁰dUTP) и испробовать его в качестве субстрата для *Taq*-ДНК-полимеразы в условиях полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5], а меченую иодированную ДНК испытать на устойчивость в денатурирующих условиях.

Синтез иодированных уридилатов был описан Дейлом при использовании иода и 5-меркурированных интермедиатов [6]. Достоинство такого подхода в том, что продукты реакции легко могут быть отделены от не подвергшегося иодированию меркурированного соединения путем ковалентного связывания последнего с меркаптогруппами носителя. Такой метод очистки был использован при получении меченого 5-иоддезоксуридина [7]. Мы адаптировали эту методику для получения и очистки ¹⁰dUTP.

Коммерчески доступный хлормеркурированный дезоксиуридинтрифосфат был подвергнут иодированию с помощью Na¹²⁵I и катализатора Iodo-beads, представляющего собой хлорамин-Т, иммобилизованный на полистирольных шариках. Меченный радиоактивным иодом нуклеозидтрифосфат был очищен с помощью двух последовательных хроматографий на колонках с тиопропилсефарозой и DEAE-целлюлозой.

Можно было ожидать, что при копировании матричной ДНК 5-иоддезоксинуклеозидтрифосфат будет встраиваться *Taq*-ДНК-полимеразой в положения, предназначенные для тимидиновых звеньев. Действительно, как показал электрофоретический анализ изотопномеченой ДНК, синтезированной в условиях ПЦР, иодированный нуклеотид конкурирует только с dTTP (рис. 1). Далее мы установили условия оптимального включения в ДНК ¹⁰dUTP в зависимости от концентрации dTTP: включение меченого нуклеотида было минимальным при концентрации dTTP 0,5 мкМ и

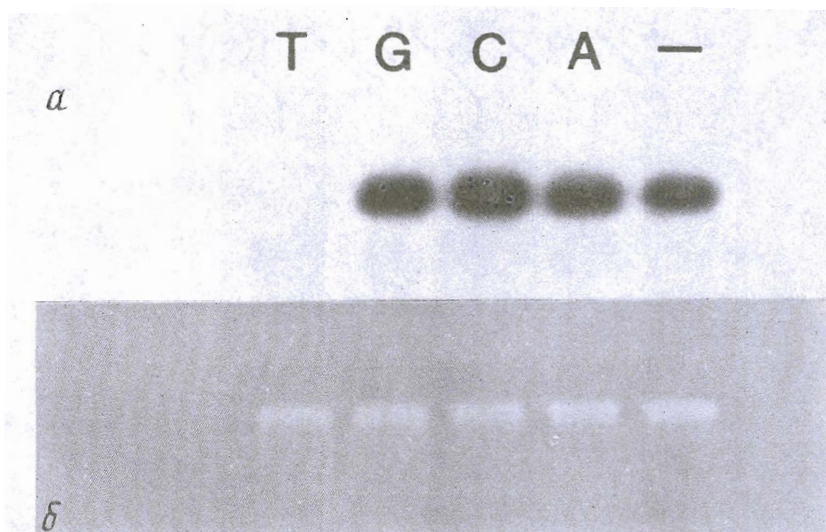


Рис. 1. Специфичность ингибирования включения $^{10^6}$ dUTP в ДНК в условиях ПЦР. Синтез ограничен одним циклом. К отдельным реакционным смесям объемом 50 мкл, включающим $5 \cdot 10^6$ Бк радиоактивно меченного трифосфата и смесь дезокси-нуклеозидтрифосфатов (концентрация каждого 15 мкМ; контрольный опыт отмечен прочерком), были добавлены dTTP, или dGTP, или dCTP, или dATP до 0,2 мМ концентрации (буквы, маркирующие колонки, соответствуют добавленным dNTP). Продукты ПЦР разделяли посредством гель-электрофореза и положение полос ДНК визуализовали с помощью радиоавтографий (а) и окрашиванием бромистым этидием (б)

достигало максимума при повышении концентрации последнего до 2–8 мкМ (рис. 2а). С повышением концентрации dTTP сначала наблюдалось увеличение количества синтезированной ДНК и понижение содержания в ней меченого нуклеотида (ср. рис. 2а и 2б), а затем (при дальнейшем увеличении концентрации dTTP — вплоть до 312 мкМ) не только подавлялось включение меченого субстрата, но и существенно уменьшался выход синтезированной ДНК.

Поскольку меченные изотопом йода ДНК, полученные в оптимальных условиях ПЦР, мы намеревались использовать в качестве гибридизационных зондов, была проведена оценка воздействия условий, типичных для денатурации двухцепочечных ДНК, на сохранение ковалентно связанного с ДНК радиоактивного йода. Было установлено, что при выдерживании ДНК при 100°C в течение 5 мин радиоактивный йод оставался связанным с нуклеиновой кислотой (потери не превышали 2%). Такой же результат наблюдался и при 5-мин экспозиции радиоiodированной ДНК в 10% растворе аммиака.

Экспериментальная часть

В работе использовались тиопропилсефароза 6В и меркурированный дезоксиуридинтрифосфат [8] (Pharmacia), ^{125}I йодид натрия (Amersham), катализатор иодирования Iodobeads (0,55 мкмоль хлорамина Т в каждом полистирольном шарике) фирмы Pierce Chemical.

Матрицей ПЦР служил ген тироксинсвязывающего глобулина человека (pGrTBG), включенный в вектор pGEM4Z (конструкция любезно предоставлена сотрудником Чикагского университета Оуэно Е. Ясссе-

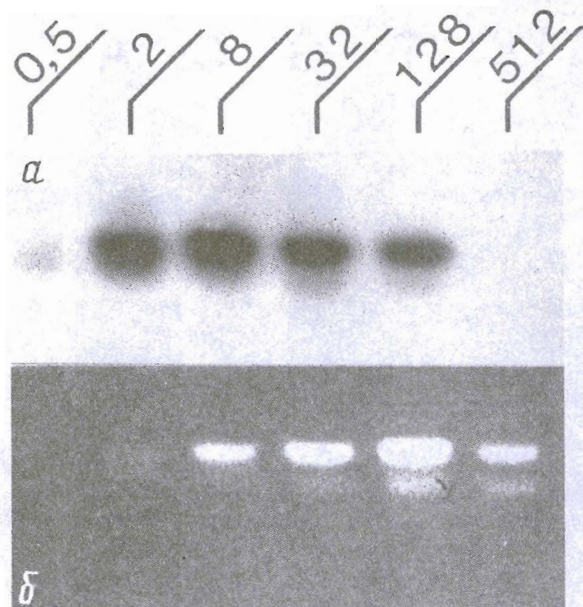


Рис. 2. Оптимизация включения ^{32}P -dUTP в условиях ПЦР. В отдельных реакционных смесях (содержание см. подпись под рис. 1, контрольный эксперимент) концентрацию dTTP доводили до 0,5, 2, 8, 32, 128 и 512 мкМ и проводили 35 циклов ПЦР. Результат электрофоретического разделения в 1% агарозном геле визуализовали радиоавтографией (а) или окрашиванием бромистым этидием (б). Цифры над колонками соответствуют указанным выше концентрациям dTTP

ном). Использованные олигонуклеотидные праймеры служили для амплификации участка этого гена размером 497 нуклеотидных пар (синтез праймеров осуществлен в Чикагском университете Полом Гарднером). *Taq*-Полимераза была приобретена у фирмы Beckman Instrument.

5-[^{125}I]иоддезоксигуанидинтрифосфат. Смесь, содержащую 50 мМ ацетат натрия (pH 5,0), 0,5 мМ меркуродезоксигуанидинтрифосфат, шарик Iodo-beads и 500 мкКи Na^{125}I в объеме 100 мкл, инкубировали при 40°С в течение 10 мин, затем добавляли 300 мкл воды и наносили на колонку (0,5×4 см) с тиопропилсефарозой 6В, предварительно активированной дитиотреентом (около 20 мкмоль восстановленных групп). При элюции водой (отсутствие ртутисодержащего нуклеотида контролировали по оптическому поглощению при 270 нм) получали смесь, содержащую Na^{125}I и ^{32}P -dUTP, которую далее разделяли хроматографией на колонке (0,5×2 см) с DEAE-целлюлозой при элюции бикарбонатом триэтиламония (градиент 0,02–1 М). Фракции, содержащие радиоактивный нуклеотид, объединяли и лиофилизовали, радиохимический выход – 60%.

ПЦР проводили в объеме 50 мкл. Реакционная смесь содержала (если не указано иначе) 2,5 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 30 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфаты, 50 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ трис-HCl (pH 8,3), 0,01% желатин, 0,3 мкг каждого праймера и 100–200 нг плазмидной ДНК. Температурный режим каждого цикла включал 1 мин – 94, 1,5 мин – 55 и 1 мин – 72°С, по завершении заданного числа циклов реакционную смесь выдерживали 5 мин при 72°С и разделяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в трис-EDTA-боратном буфере, содер-

жащем 0,089 М Трисм (трис-основание), 0,089 М H_3BO_3 и 2 мМ EDTA.

Денатурирующие тесты. Количество изотопа, оставшегося связанным с ДНК при 100°С в течение 5-минутной инкубации в воде или в 10% растворе аммиака, определено добавлением 0,5 мл раствора, содержащего 200 мкг бычьего сывороточного альбумина, с последующим осаждением трихлоруксусной кислотой и измерением радиоактивности осадка.

Авторы выражают признательность сотруднику Чикагского университета А. Кузнецову за полезные замечания по переводу статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Commerford S. L. // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 1993-1999.
2. Krisch R. E., Ley R. D. // Radiat. Res. 1974. V. 25. № 1. P. 21-30.
3. Gautschi J. R., Burkhalter M., Baumann E. A. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 518. № 1. P. 31-36.
4. Logan D. M., Whitmore G. F. // Photochem. and Photobiol. 1966. V. 5. № 1. P. 143-151.
5. Salki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf R., Higuchi R., Horn G. T., Mullin K. B., Erlich H. A. // Sci. 1988. V. 239. № 4839. P. 487-491.
6. Dale R. M. K., Ward D. C., Livingston D. C., Martin E. // Nucl. Acids Res. 1975. V. 2. № 16. P. 915-927.
7. Baranovska-Kortylewicz J., Kinsy B. H., Layne W. W., Kassis A. I. // Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A. Appl. Radiat. Isot. 1988. V. 39. № 4. P. 335-341.
8. Dale R. M., Martin E., Livingston D. C., Ward D. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 11. P. 2447-2457.

Поступила в редакцию
17.IV.1991

После доработки
10.III.1992

N. SCHERBERG, S. DZEKHTSER

PREPARATION OF ^{125}I -2'-DEOXYURIDINE TRIPHOSPHATE AND INCORPORATION OF THE LABELED NUCLEOTIDE INTO DNA BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

Thyroid Study Unit, University of Chicago Hospital Chicago, Illinois, USA

Radioiodine was substituted into deoxyuridine triphosphate by radioiodination of 5-mercuri-2'-deoxyuridine triphosphate. The purified ^{125}I -nucleotide was incorporated into DNA in reactions by the protocol of the polymerase chain reaction. The incorporation of the radioactive nucleotide required added thymidine triphosphate for the synthesis of full length molecules during the one minute elongation period. The iodine substituent in the DNA remained covalently bound during both heat and alkaline denaturation.