



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 9 * 1993

УДК 577.113.6:578.85/.86.08:578.113.7

© 1993 И. В. Лебедева, М. Г. Ивановская,
Т. И. Гуринович*, М. Б. Готтих, Я. А. Мелдрайс*, З. А. Ша-
барова

КОНСТРУИРОВАНИЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО БИОТИНСОДЕРЖАЩЕГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРОИДНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РАСТЕНИЙ

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва;
* Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латвии, Рига

Разработан метод выявления вириодных заболеваний растений — карликовости хризантем и веретеновидности клубней картофеля путём гибридизации вириодной РНК с биотинмеченым 26-звенным олигодезоксирибонуклеотидным зондом, последовательность оснований в котором комплементарна фрагменту вириодной РНК, идентичному для обоих вириодов. Отработан быстрый и эффективный химический метод введения биотиновой метки по концевой фосфатной группе олигонуклеотида. Подобраны условия дот-гибридизации зонда с РНК, выделенными специальным образом из сока больных растений. Выбран оптимальный вариант детекции образующегося гибрида с помощью конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза и установлен предел чувствительности детекции, составляющий 1 нг РНК. Предложенная схема конструирования диагностикума универсальна и проста, что позволяет использовать ее при создании широкого круга диагностикумов самого различного назначения. Описываемый вариант диагностикума легко может быть внедрен в практику для широкомасштабного и быстрого выявления вириодов в клеточных культурах растений.

Метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот в последние годы особенно широко используется для решения ряда важных прикладных задач, в первую очередь для диагностических исследований [1, 2].

Одним из ключевых моментов, определяющих возможности использования метода на практике, является способ детекции образующихся гибридов нуклеиновых кислот. Обычно для контроля за ходом гибридизации в используемый зонд вводят метку — радиоактивную или нерадиоактивную [1]. Радиоактивно меченные (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I) зонды позволяют проводить чувствительный и специфичный анализ, однако ряд их недостатков, таких, как недолговечность, небезопасность в работе, необходимость применения дорогостоящего оборудования для их детекции, сдерживает широкое внедрение метода в практику. Использование в гибридизационном анализе нерадиоактивных меток (флуоресцентных, люминесцентных, иммуногенных, ферментативных) существенно расширяет сферу прак-

Сокращения: ВВКК — вирус веретеновидности клубней картофеля, ВКХр — вирус карликовости хризантем.

тического использования метода. Так, нерадиоактивно меченные зонды применяются для создания различных диагностикумов (китов), используемых в молекулярной биологии, медицине, криминалистике, сельском хозяйстве и др. [1, 2].

Целью предпринятого нами исследования было создание универсального нерадиоактивного олигонуклеотидного диагностикума для выявления вироидных заболеваний картофеля и хризантем. Вироиды — это класс патогенов, состоящих из одной низкомолекулярной РНК, способной проникать в растение, реплицироваться там за счет биосинтетических механизмов растения-хозяина и вызывать определенную форму заболевания [3]. Вироиды можно диагностировать методом растений-индикаторов, электрофорезом в ПААГ или методом молекулярной гибридизации [4]. В настоящее время на практике широко применяются только первые два метода. Однако они довольно трудоемки и обладают сравнительно невысокой чувствительностью [4]. Более перспективным представляется использовать для идентификации вироидных заболеваний метод молекулярной гибридизации, который отличается высокой специфичностью, позволяет быстро получать результат анализа, превосходит вышеизложенные методы по чувствительности на один-два порядка и не требует выделения РНК из клеточного сока растений [5].

До сих пор при диагностировании вироидов методом молекулярной гибридизации в качестве зонда использовали либо меченую вироидную РНК той же видовой специфичности [5], либо ДНК-копию вироидной РНК [6]. Мы предлагаем для этой цели использовать синтетические олигонуклеотиды, так как олигонуклеотиды доступны в больших количествах благодаря развитию методов автоматического синтеза, легко модифицируются, что позволяет вводить в них различные метки. Этот метод кажется нам более перспективным еще и потому, что становится возможным создание универсального зонда для нескольких вироидов, имеющих идентичные участки первичной структуры.

Чтобы создать на базе метода молекулярной гибридизации эффективный диагностикум для практического применения, необходимо было решить следующие связанные между собой задачи: выбрать оптимальную первичную структуру зонда, наиболее подходящий способ нерадиоактивного мечения зонда, отработать схему анализа, соответствующую зонду и способу мечения. Схема анализа включает в себя подбор условий гибридизации полученного зонда с вироидными нуклеиновыми кислотами, подбор оптимальных условий детекции полученного гибрида и, наконец, отработку техники анализа, позволяющей обрабатывать сразу большое число образцов.

Выбор первичной структуры зонда и способа его нерадиоактивного мечения

Известно, что вироид веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) и вироид карликовости хризантем (ВКХр) представляют собой односпиральные ковалентно замкнутые РНК, состоящие из 359 и 354 нуклеотидов соответственно [4]. Наличие в обоих вироидах одинаковой нуклеотидной последовательности (фрагмент 255—280) позволило нам ранее [7] выявлять оба вироида с помощью одного ^{32}P -меченого олигонуклеотидного зонда $d(\text{AGCTTCAGTTGTTCCACCGGGTAGT})_p$ (I), структура которого комплементарна именно этой последовательности.

Стоящая перед нами задача — создание диагностикума для практического применения в сельском хозяйстве — определяет ряд требований к метке, вводимой в зонд: она должна быть такой, чтобы была возможность готовить заранее большое количество зондов для диагностических наборов, должна быть исключена необходимость использования сложной техники для детекции метки в полевых условиях и устранены жесткие требования к технике безопасности. Всем этим условиям удовлетворяет только нерадиоактивное мечение зонда.

Из множества известных на сегодняшний день нерадиоактивных меток мы выбрали биотин. Преимущества его заключаются в том, что он, будучи введенным в состав олигонуклеотидного зонда, минимально снижает термическую устойчивость гибрида и легко может быть обнаружен чувствительными и специфичными,

но в то же время достаточно простыми методами. Эти методы основаны на прочном взаимодействии биотина с белками авидином и стрептавидином (константы диссоциации соответственно 10^{-15} и 10^{-14} М [8]). После образования прочного нековалентного комплекса биотина с этими белками, предварительно помеченными нерадиоактивными (ферментативными, флуоресцентными, люминесцентными) маркерами, можно детектировать гибрид ДНК с биотинилированным зондом [1, 2].

Ковалентное присоединение биотина к олигонуклеотидам

Существуют различные способы введения биотиновой метки в нуклеиновые кислоты как с использованием ферментов, так и чисто химические. Для получения препаративных количеств нерадиоактивно меченых олигонуклеотидов обычно используют химические методы. Известны способы, позволяющие вводить биотин как по гетероциклическим основаниям олигонуклеотида [9], так и по концевым группам [10, 11]. Введение биотина по функциональным группам гетероциклических оснований нарушает их комплементационные взаимодействия, поэтому для синтеза нерадиоактивно меченых гибридизационных олигонуклеотидных зондов предпочтительно использовать методы, позволяющие ковалентно присоединять биотин по концевым группам олигонуклеотида. В качестве якорных используются либо концевые фосфатные группы [10], либо *цис*-гликольная группировка концевого рибозэна [11].

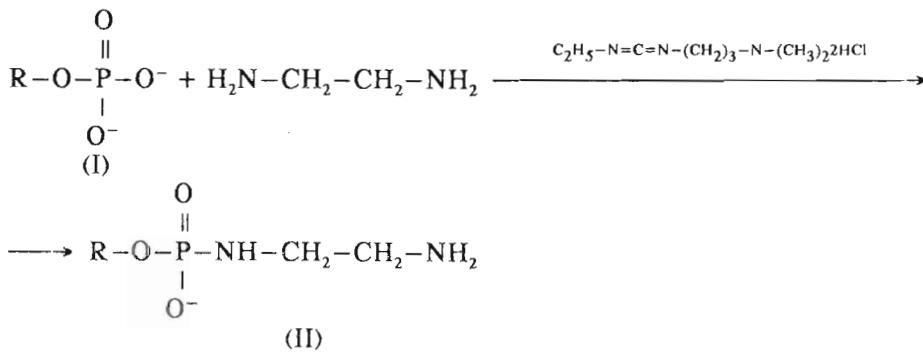
В нашей лаборатории ранее была предложена удобная и эффективная общая стратегия модификации олигонуклеотидов по концевой фосфатной группе, позволяющая вводить в состав готового синтетического олигонуклеотида различные ненуклеотидные группировки. Предложенная стратегия особенно удобна тем, что дает возможность модифицировать олигонуклеотиды в мягких условиях — в водной или водно-органической среде [12].

Используя этот подход, мы разработали эффективный метод биотинилирования олигонуклеотидов в две стадии. На первой стадии в олигонуклеотид (I), содержащий 3'-концевой фосфат, вводили алифатическую аминогруппу с помощью разработанного нами ранее метода прямой карбодиimidной конденсации незащищенных олигонуклеотидов с диаминами в водной среде [13]. На второй стадии введенную аминогруппу ацилировали активированным производным биотина.

При выборе диамина для получения производного мы учитывали, что для гибридизационных олигонуклеотидных зондов длиной более 20 звеньев расстояние между молекулой биотина и олигонуклеотидом не оказывает решающего влияния на устойчивость гибридизационного дуплекса [10]. Поэтому в наших экспериментах мы использовали только этилендиамин.

Реакция олигонуклеотида (I) с этилендиамином протекает с высокой эффективностью (схема 1):

Схема 1



R = (5') d(AGCTTCAGTTGTTCCACCGGGTAGT)-

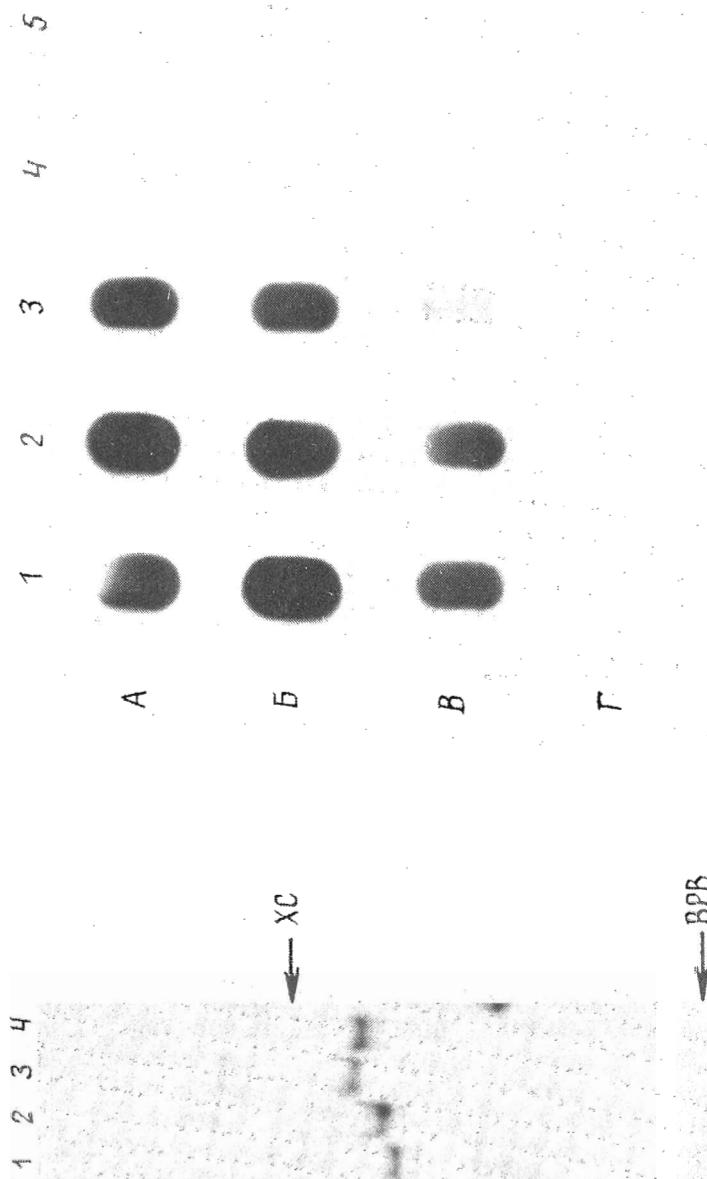


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Электрофорограмма в 12% ПЛАГ исходного 26-звенного олигонуклеотида (1) и реакционных смесей, образующихся при получении продукта его карбодимидной конденсации с этилендиамином (2), продукта ацилирования аминоэтиламида (II) имидазолидом биотина (3) и продукта ацилирования аминоэтамида (II) N-оксикусцинимидным эфиром биотина (4). ХС и ВРВ — положение маркерных красителей ксиленцианола и бромфенолового синего аминоэтамида (II).

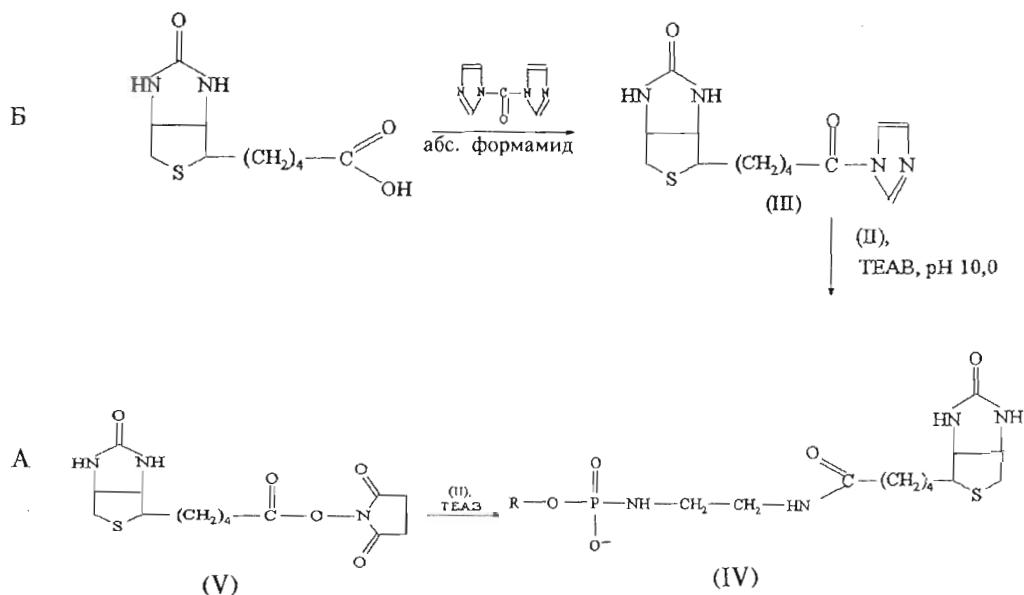
Рис. 2. Определение ВВКК и ВКХр методом гибридизации нуклеиновых кислот с использованием в качестве зонда биотинилированного олигодезоксирибонуклеотида и стрептавидина с последующей обработкой щелочной фосфатазой. А — очищенный ВВКК; Б — очищенный ВКХр (точки 1—5 соответствуют нанесению 2; 0,4; 0,08; 0,016; 0,0032 мкг РНК ВКХр или ВВКК); В и Г — растворима в 2 М LiCl фракция нуклеиновых кислот из хризантемы, инфицированной ВКХр, и из здоровой хризантемы соответственно (точки 1—6 соответствуют нанесению нуклеиновых кислот, выделенных из 1 г растительного материала (1) с 5-кратным разведением от точки к точке

Конденсацию проводили как описано в работе [13]. Избыток низкомолекулярных реагентов отделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-2, продукты реакции анализировали в 12% ПААГ. По данным электрофореза, соединение (II) образуется с количественным выходом (рис. 1).

Полученное аминопроизводное (II) мы ацилировали в мягких условиях активированным по карбоксильной группе производным биотина. Известно, что наиболее эффективные реагенты, способные ацилировать аминогруппу в водной или водно-органической среде,— имидазолиды и N-оксисукцинимидные эфиры карбоновых кислот [12, 14]. Чтобы выбрать оптимальный вариант введения биотина в зонд, мы обследовали в нашей работе оба производных биотина в качестве ацилирующих агентов.

Для получения имидазолида (III) биотин обрабатывали избытком N,N'-карбонилдимида в безводном формамиде по схеме 2. Полученный имидазолид (III) сразу вводили в реакцию с аминоэтиламидом (II).

Схема 2



Предварительное исследование показало, что имидазолид биотина — эффективный и достаточно устойчивый в водной среде ацилирующий агент, причем эффективность ацилирования им аминов сильно зависит от pH среды [15]. С одной стороны, это связано с тем, что в реакцию вступает только непротонированная аминогруппа, и с другой — с изменением pH среды изменяется реакционная способность ацилирующего агента. Нами было установлено, что наиболее эффективно ацилирование протекает при щелочных значениях pH реакционной смеси (9,5—10). Ацилирование проводили в смеси формамида с 1 М ТЕАВ, pH 10 (3 : 1 по объему). Следует отметить, что имидазолид биотина в этих условиях нерастворим, и ацилирование представляет собой гетерогенную реакцию. Мы отбирали пробы, обессоливали их на биогеле Р-2 и анализировали методом электрофореза в поликариламидном геле. С течением времени осадок растворяется,

и по данным электрофореза выяснилось, что это связано с протеканием необходимой реакции. Через 5–7 ч при комнатной температуре осадок имидазолида биотина полностью растворялся, после чего избыток низкомолекулярных соединений отделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-2 и продукты реакции анализировали электрофорезом в ПААГ. Конечный выход биотинилированного олигонуклеотида — количественный (рис. 1).

Альтернативный метод биотинилирования, позволяющий избежать работы в гетерогенной фазе,— применение в качестве ацилирующего агента N-оксисукцинимидного эфира биотина (V) (схема 2). Использование этого соединения для введения биотина в олигонуклеотид было описано, однако в предлагаемых ранее условиях проведения реакции выход биотинилированного производного не превышал 70% [10]. Мы изучали эту реакцию с целью подбора условий, позволяющих увеличить выход биотинилированного производного. В качестве реакционной среды использовали смесь диметилформамида с водным раствором триэтиламмонийбикарбоната. При проведении реакции варьировали концентрацию ацилирующего агента и pH буфера. Выход биотинилированного олигонуклеотида определяли после обессоливания методом электрофореза в ПААГ. Нами были подобраны следующие оптимальные условия проведения реакции: 10 мМ концентрация ацилирующего агента, 0,4 М TEAB-буфер, pH 10,0. Мы установили, что в этих условиях за 4–5 ч при комнатной температуре реакция протекает количественно (рис. 1).

Таким образом, нами разработаны методы биотинилирования олигонуклеотидов с использованием имидазолида и N-оксисукцинимидного эфира биотина в качестве ацилирующих агентов. Оба метода позволяют получить биотинилированный олигонуклеотид с количественным выходом (рис. 1), что исключает необходимость его выделения из реакционной смеси. Однако следует отметить, что метод с использованием N-оксисукцинимидного эфира биотина более прост экспериментально и не требует приготовления ацилирующего агента перед реакцией. В этом случае реакция протекает в растворе, что более удобно практически и позволяет уменьшить время, необходимое для ацилирования. В то же время имидазолидный вариант является хорошей альтернативой, когда активированный эфир по каким-либо причинам недоступен.

Гибридизация нуклеиновых кислот растений с биотинилированным олигодезоксирибонуклеотидом и нерадиоактивная детекция образовавшихся гибридов

Для выявления виридов картофеля и хризантем в образцах нуклеиновых кислот растений мы использовали метод дот-гибридизации на фильтре, поскольку к настоящему времени этот метод наиболее прост по инструментальному оформлению, позволяет подготавливать анализируемые образцы заранее, накапливать и хранить их (если это необходимо), а также проводить одновременно большое число анализов. Все эти особенности метода делают его пригодным для работы в полевых условиях. Поэтому в качестве основы для разработки сельскохозяйственного диагностикума мы выбрали именно метод дот-гибридизации.

Первый этап в решении этой задачи заключается в подготовке образца. Исследуемую суммарную фракцию нуклеиновых кислот, выделенную из листового материала картофеля и хризантем, а также чистые препараты ВВКК и ВКХР наносили на нитроцеллюлозный фильтр (выделение нуклеиновых кислот и подготовка препаратов подробно описаны в разделе «Экспериментальная часть»). Гибридизацию с биотинмеченным зондом, взятым в концентрации 1 мкмоль/см² фильтра, проводили в течение 20 ч при 37° С. Эти условия для гибридизации были отработаны нами ранее с использованием ³²P-меченого 26-звенного олигонуклеотида (I) [7]. После завершения гибридизации детекцию образовавшегося гибрида проводили двумя способами: либо фильтр постадийно обрабатывали стрептавидином, а затем биотинилированной щелочной фосфатазой, либо использовали заранее приготовленный конъюгат стрептавидин — щелочная фосфатаза.

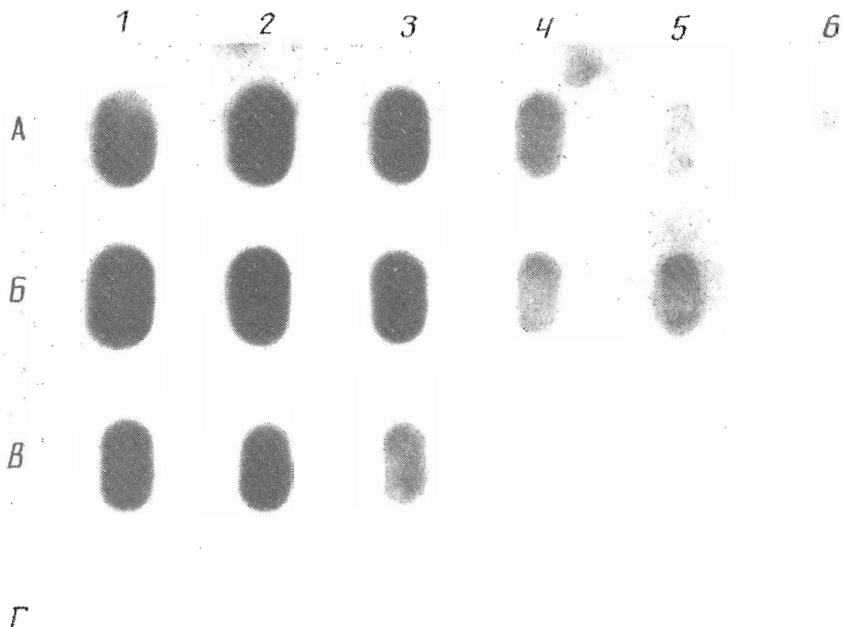


Рис. 3. Определение BBKK и BKXp методом гибридизации нуклеиновых кислот с использованием в качестве зонда биотинилированного олигодезоксирибонуклеотида и коньюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза. *A* — очищенный BBKK; *B* — очищенный BKXp (точки 1—6 соответствуют нанесению 2; 0,4; 0,08; 0,016; 0,0032; 0,00065 мкг РНК BKXp или BBKK); *V* и *Г* — растворимая в 2 М LiCl фракция нуклеиновых кислот соответственно из хризантемы, инфицированной BKXp, и из здоровой хризантемы (см. рис. 2 *B*, *Г*).

Перед детекцией гибрида отмытый фильтр блокировали в растворе бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифического связывания стрептавидина с фильтром и вызванного этим появления фонового окрашивания. После образования комплекса биотинилированного зонда с щелочной фосфатазой посредством биотин-стрептавидинового связывания фильтр окрашивали в растворе хромогенных субстратов этого фермента — нитро-голубого тетразолия и 4-бром-5-хлор-3-индолилфосфата, как описано в работе [16]. При нерадиоактивной гибридизации оказалось невозможным детектировать вироид непосредственно в клеточном соке растений, как было сделано в случае радиоактивно меченого зонда [7]. Клеточный сок, нанесенный на нитроцеллюлозный фильтр, имеет такую же окраску, как и продукты ферментативной реакции. Поэтому для проведения анализа необходимо наносить на фильтр уже выделенную из клеточного сока суммарную РНК.

Результаты гибридизации показаны на рис. 2, 3. Гибридизация с биотинилированным олигонуклеотидом происходит только в том случае, если в образце нуклеиновых кислот, нанесенном на фильтр, присутствует РНК BBKK или BKXp (рис. 2). Ранее мы показали, что чувствительность метода с использованием ^{32}P -меченого зонда составляет 1,3 нг вироида [7]. Из данных, представленных на рис. 2, 3, следует также, что нерадиоактивный метод гибридизации сравним по чувствительности определения вироидов с радиоактивным. Следует отметить, что два опробованных нами метода нерадиоактивной детекции различаются по чувствительности определения вироидной РНК: более чувствительным оказался метод прямой детекции с использованием коньюгата стрептавидин—щелочная

фосфатаза. Этим методом надежно можно определять до 3,2 нг ВВКК или ВКХр (рис. 3), тогда как для метода с постадийным использованием стрептавидина и биотинилированной щелочной фосфатазы чувствительность составляет 3,2—16 нг вироида (рис. 2, 3).

Итак, нами подобраны оптимальные условия выделения вироидных нуклеиновых кислот и подготовки образцов для проведения анализа. Отработана методика гибридизации на фильтре и выбран наиболее чувствительный способ проявления образующихся гибридов с использованием коньюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза, который позволяет определять 3,2 нг вироида.

Таким образом, в настоящей работе предложена методология конструирования нерадиоактивных диагностикумов для выявления вироидных заболеваний растений. Она включает в себя выбор олигонуклеотидной последовательности зонда на основании изучения первичной структуры РНК исследуемого объекта, выбор и введение нерадиоактивной метки в состав зонда, отработку условий гибридизации и проявления получающихся гибридов.

Разработан метод, позволяющий эффективно и селективно вводить биотиновую метку по концевым фосфатным группам олигонуклеотида в мягких условиях. Обследованы два типа ацилирующих производных биотина — имидазолид и N-оксисукцинимидный эфир биотина — и подобраны условия, позволяющие получать биотинмеченные зонды с количественным выходом.

Проведено сравнение методов нерадиоактивной детекции с использованием стрептавидина и биотинилированной щелочной фосфатазы, а также коньюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза. Данные, полученные в настоящей работе, подтверждают, что эти методы по чувствительности и специфичности сравнимы с радиоактивным методом детекции и позволяют определять 3,2—16 нг вироида.

В целом предложенная методология нерадиоактивной диагностики универсальна, может быть применена для обследования большого числа объектов. Простота, технологичность и легкость предложенной методологии позволяют легко внедрить ее в практику для широкомасштабного и быстрого выявления вироидов в клеточных культурах растений, что особенно важно при отборе посадочного материала.

Экспериментальная часть

В работе использованы дигидрохлорид этилендиамина, гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииамида, циклогексиламин, периодат натрия, N,N'-карбонилдиимидацол (Merck, ФРГ); d-биотин, АТР, акриламид, N, N'-метиленбисакриламид, щелочная фосфатаза (Serva, ФРГ), N-оксисукцинимидный эфир биотина, бычий сывороточный альбумин (фракция V), фиккол 400, поливинилпирролидон, стрептавидин (Sigma, США), 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат, нитроголубой тетразолий (Boehringer — Mannheim, ФРГ), аммоний надсернокислый и N,N,N',N'-тетраметилэтидендиамин (Reanal, Венгрия), остальные реагенты отечественного производства.

Ионообменную микроколоночную хроматографию проводили на колонках (2 × 62 мм) с полисилом СА в линейном градиенте калий-пирофосфатного буфера (0—0,12 М, pH 7,0) в 20% ацетонитриле на приборе «Милихром» отечественного производства, обращенно-фазовую ВЭЖХ — на колонках (4 × 250 мм) со смолой Диасорб 130 C₁₈ Т отечественного производства, гель-фильтрацию — на колонке (8 × 170 мм) с бисогелеем P-2 (200—400 меш, Bio-Rad, США). Гель-электрофорез продуктов химических реакций осуществляли в пластинах 12% денатурирующего ПААГ в 0,05 М трис-боратном буфере (pH 3,3), содержащем 1 mM EDTA. Продукты реакции детектировали по поглощению при длине волны 254 нм с использованием трансиллюминатора UVIS (Desaga, ФРГ).

Синтез олигодезоксирибонуклеотида. 27-Звенный олигонуклеотид с 3'-концевым рибозеяком d(ACCTTCAGTTGTTCCACCGGGTAGT)U (VI) синтезировали твердофазным амидофосфитным методом на автомате-синтезаторе

«Виктория-4М» [17] и выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. После удаления диметокситритильной защитной группировки олигонуклеотид дополнительно очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Получение 3'-fosфорилированного 26-звенного олигонуклеотида (I). Для окисления концевого рибозамина 10—100 нмоль олигонуклеотида (VI) растворяли в 50 мкл 0,1 М водного раствора периодаата натрия и выдерживали 10 ч при 20° С. Олигонуклеотид отделяли от солей на биогеле Р-2, упаривали, растворяли в 1 М водном растворе циклогексиламина и выдерживали 16 ч при 20° С. От избытка низкомолекулярных реагентов избавлялись гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (200—400 меш) [18]. Продукты реакции анализировали методом микрocolоночной ионообменной хроматографии в градиенте пироfosфата натрия. Выход олигонуклеотида (I) составил 95%.

Получение аминоэтиламида (II). К 50 мкл водного раствора 1—50 нмоль олигонуклеотида (I) добавляли 20 мг (150 мкмоль) солянокислого этилендиамина и 4,8 мг (25 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Реакционную смесь оставляли на 3 ч при 4° С, затем полученное производное (II) отделяли от низкомолекулярных реагентов гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (200—400 меш). После гель-фильтрации реакционную смесь анализировали электрофорезом в 12% ПААГ. Выход этилендиаминного производного (II) количественный.

Биотинилирование аминоэтиламида (II). Метод А. К 30 мкл водного раствора 1—50 нмоль этилендиаминного производного (II) добавляли раствор 2 мг (6 мкмоль) N-оксисукциниimidного эфира биотина (V) в 50 мкл абсолютного диметилформамида и 20 мкл 1 М TEAB, pH 10,0. Реакцию проводили 3—4 ч при 20° С.

Метод Б. К раствору 2,5 мг (10 мкмоль) d-биотина в 30 мкл безводного формамида добавляли порциями 4 мг (25 мкмоль) N,N'-карбонилдиimidазола. Смесь оставляли на 5—10 мин до прекращения выделения пузырьков углекислого газа, затем к ней добавляли раствор 1—50 нмоль этилендиаминного производного (II) в 70 мкл смеси 1 М TEAB (pH 10,0) и формамида (1 : 3 по объему). Реакционную смесь выдерживали 5—6 ч при 4° С.

В обоих случаях биотинилированный олигонуклеотид (IV) обессоливали гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (200—400 меш). Продукты реакции анализировали в 12% пенатурирующем ПААГ. Выход биотинилированного 26-звенного олигонуклеотида (IV) составил 95%.

Нуклеиновые кислоты картофеля и хризантемы выделяли и фракционировали согласно методу [7]. Очистку ВВКК и ВКХР осуществляли электрофоретически в 5% ПААГ в 25 mM три-*HCl*-буфере (pH 7,2), содержащем 25 mM ацетат натрия и 1 mM EDTA. На гель наносили 200 мкг растворимой в 2 mM LiCl фракции нуклеиновых кислот хризантемы или картофеля. Электрофорез проводили 3 ч при напряженности электрического поля 20 В/см. Гель окрашивали бромистым этидием в течение 15 мин. Зону, содержащую вироид, вырезали и проводили электроэлюсию вироида из геля. Очищенный вироид 2 раза переосаждали этанолом, растворяли в воде и хранили при —70° С.

Иммобилизацию нуклеиновых кислот растений на нитроцеллюлозных фильтрах выполняли по методике [16].

Гибридизация иммобилизованных на нитроцеллюлозных фильтрах нуклеиновых кислот растений с биотинилированным олигодезоксирибонуклеотидом. Прегибридизацию нитроцеллюлозного фильтра с иммобилизованными РНК проводили в течение 2 ч при 37° С в растворе, содержащем 4 × STE-буфер (1-кратный STE-буфер — 0,15 M NaCl, 0,03 M три-*HCl*, pH 8,0, 1 mM EDTA), 0,1% додецилсульфат натрия, 100 мкг/мл ДНК из тимуса теленка и 0,2-кратный раствор Денхардта (50-кратный раствор Денхардта — 1% бычьего сывороточного альбумина (фракция V), 1% фиколла-400, 1% поливинилпирролидона). Гибридизацию на фильтре осуществляли в течение 18—20 ч при 37° С в том же растворе, но в присутствии биотинилированного олигонуклеотида (IV) (0,0003

$\text{OE}_{260}/\text{cm}^2$). Фильтр отмывали 2 ч от несвязавшегося зонда в $6 \times \text{SSC}$ (1-кратный $\text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}, 0,015 \text{ M цитрат натрия, pH 7,2}$) при 37°C , несколько раз меняя буфер.

Получение конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза. 3 мкг щелочной фосфатазы (1000 ед./мг, Serva) растворяли в 100 мкл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,8. Добавляли 300 мкл раствора стрептавидина (10 мг/мл в фосфатном буфере при активности 14 ед./мг). Очистку смеси проводили на колонке с сефадексом G-25. Фракции контролировали с помощью реактива Бредфорда. Добавляли глутаровый альдегид до 1% концентрации и реакционную смесь инкубировали 3 ч при 20°C . Смесь дialisировали в течение ночи при 4°C против фосфатного буфера, pH 6,8. Полученный раствор конъюгата дialisом переводили в буфер, содержащий 0,05 М трис-HCl (pH 8,8), 0,5 М NaCl и 1 мМ MgCl₂ [18]. Активность конъюгата составила 650 ед./мг.

Получение биотинилированной щелочной фосфатазы. 3 мг щелочной фосфатазы (700 ед./мг, Serva) растворяли в 3 мл 0,1 М карбонатного буфера, pH 8,9. К полученному раствору добавляли при перемешивании 6 мкл N-оксисукцинимидного эфира биотина в DMF (50 мг/мл). Реакционную смесь оставляли на 3 ч при 20°C , после чего выделяли конъюгат на колонке с сефадексом G-25, элюируя его 0,05 М раствором трис-HCl, pH 8,0. Рабочая концентрация конъюгата 2 мкг/мл.

Детекция вироидной РНК с использованием конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза (прямой метод). После гибридизации фильтр отмывали 5 мин в TST-буфере (0,1 М трис-HCl (pH 7,8), 0,1 М NaCl, 0,05% тритон X-100). Влажный фильтр инкубировали 1 ч в растворе конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза (6,2 ед. акт./мл) при 20°C . Неспецифически связавшийся с фильтром конъюгат отмывали дважды по 15 мин в TST-буфере при покачивании и 1 раз в течение 10 мин в фосфатазном буфере (0,1 М трис-HCl (pH 9,5), 10 мМ MgCl₂). Для окрашивания фильтр инкубировали в фосфатазном буфере, содержащем субстраты щелочной фосфатазы: на 1 мл буфера 3,3 мкл раствора 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата в диметилформамиде (50 мг/мл) и 4,4 мкл нитроголубого тетразолия в 70% диметилформамиде (75 мг/мл) [16]. Время инкубации составляло 2—5 ч.

Детекция вироидной РНК с использованием стрептавидина и биотинилированной фосфатазы (непрямой метод). После гибридизации фильтр отмывали 5 мин в TST-буфере. Влажный фильтр инкубировали 20 мин в растворе стрептавидина (5 мкг/мл) в TST-буфере при 20°C . Фильтр отмывали 20 мин от несвязавшегося стрептавидина в TST-буфере, 2 раза меняя буфер. Далее инкубировали фильтры 30 мин в растворе биотинилированной фосфатазы в TST-буфере (2 мкг/мл) при 20°C , а затем еще 2 раза по 10 мин в TST-буфере и 1 раз 10 мин в фосфатазном буфере. Окрашивание проводили описаным выше способом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matthews J. A., Kriska L. J.//Anal. Biochem. 1988. V. 169. P. 1—25.
2. Бадашкеева А. Г., Кнорре Д. Г.//Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. Вып. 2. С. 309—324.
3. Шелудько Ю. М., Рейфман В. Г. Вироиды — новый класс патогенов. М.: Наука, 1978.
4. Методические указания по диагностике и идентификации вироидов веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) и карликовости хризантем (ВКХр).//Ред. Леонтьева Ю. А., Можаева К. А. М.: ВАСХНИЛ, 1988. С. 3—23.
5. McInnes J. L., Habil N., Symons R. H.//J. Virol. Methods. 1989. V. 23. P. 299—312.
6. Owens R. A., Diener T. O.//Science. 1981. V. 213. P. 670—672.
7. Мелдрайс Я. А., Друка А. Я., Лине И. Э., Ложа В. П., Ивановская М. Г., Романова Е. А., Лебедева И. В., Шабарова З. А.//Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. С. 816—821.
8. Wilchek M., Bayer E. A.//Analyt. Biochem. 1988. V. 171. P. 1—32.
9. Viscidi R. P., Connelly C. J., Yolken R. H.//J. Clin. Microbiol. 1986. V. 23. № 2. P. 311—317.
10. Shu B. C. F., Orgel L. E.//DNA. 1985. V. 4. № 4. P. 327—331.

11. Agraval S., Christodoulou C., Gait M. J.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
12. Shumyantseva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A.//Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 4. P. 903—916.
13. Ivanovskaya M. G., Gottikh M. B., Shabarova Z. A.//Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 5. P. 913—934.
14. Цилевич Т. Л., Краевский А. А., Готтих Б. П.//Успехи химии. 1972. Т. 41. № 10. С. 1766—1787.
15. Готтих М. Б. Модификация концевых фосфатных групп олигонуклеотидов в водной среде. Дис... канд. хим. наук. М., 1988. 179 с.
16. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C.//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 13. P. 4045—4049.
17. Грязнов С. М., Чернов И. П., Потапов В. К., Пурмаль А. А., Метелев В. Г., Елов А. А., Шабарова З. А.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1604—1611.
18. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 4. С. 500—510.

Поступила в редакцию
16.XI.1992

После доработки
25.V.1993

I. V. Lebedeva, M. G. Ivanovskaya, T. I. Gurinovich^{},
M. B. Gottikh, J. A. Meldrais^{*}, Z. A. Shabarova*

A GENERAL BIOTIN-CONTAINING OLIGONUCLEOTIDE DIAGNOSTICUM FOR PLANT VIROID DISEASES

*A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State
University, Moscow;*

** A. Kirhenstein Institute of Microbiology, Latvian Academy of Sciences, Riga*

A non-radioactive diagnosticum for plant viroid diseases has been designed, based on hybridization of a biotin-labeled 26-member oligonucleotide probe with the viroid RNA site identical for potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. The biotin label has been introduced into the synthetic oligonucleotide probe by the high-yield acylation of the oligonucleotide aminoalkylamide with the biotin imidazolide or N-hydroxysuccinimide ester. Hybridization techniques have been elaborated for nucleic acids isolated from plant sap. The hybrids obtained have been detected with streptavidin and biotinylated alkaline phosphatase or with the covalent conjugate of streptavidin and alkaline phosphatase, the sensitivity being as low as 1 ng. The methodology used can be applied for revealing viroids and for large scale and quick investigation of plant cell cultures.