



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4.083.3

В. И. Киселева, М. Ф. Турчинский, А. М. Поверенный*ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ К ДНК, МОДИФИЦИРОВАННОЙ
ТРАНС-ДИАМИНОДИХЛОРПЛАТИНОЙ, ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК*Научно-исследовательский институт медицинской радиологии АМН СССР,
г. Обнинск;***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

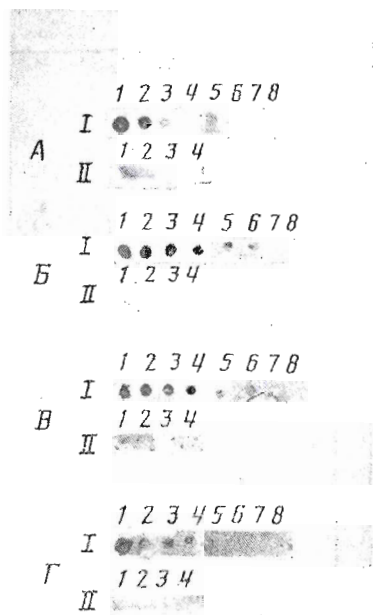
Для выявления специфических последовательностей нуклеиновых кислот с помощью гибридизации на мембранах используют нуклеотидные зонды, несущие либо радиоактивную, либо неизотопную метку, введенную ферментативным или химическим путем [1—3]. Применение радиоактивной метки позволяет достигать высокой чувствительности, однако, небезопасно; ферментативное включение биотинилированных нуклеотидов — дорогостоящая и громоздкая процедура. В связи с этим в последние годы все большее внимание уделяется методам введения гаптенов в нуклеотидные зонды с последующей идентификацией модифицированной ДНК с помощью специфических антител [4—6].

В настоящей работе в качестве агента для мечения гибридизационных зондов предложено использовать *транс*-диаминодихлорплатину (*транс*-DDP), а для визуализации гибридов — полученные и охарактеризованные нами ранее [7] высокоаффинные и высокоспецифичные антитела к *транс*-DDP-ДНК, а также конъюгаты антител к кроличьему иммуноглобулину и протеина А с пероксидазой.

Процедура введения метки (*транс*-DDP) в нуклеотидный зонд чрезвычайно проста и сводится к смешиванию расчетного количества ДНК и гаптена в 0,01 М NaClO₄ и последующей инкубации смеси в течение 48 ч при 28° С, т. е. время непосредственного участия экспериментатора в этой процедуре фактически составляет всего несколько минут. Предложенный способ позволяет модифицировать сколь угодно малые количества ДНК с образованием стабильного аддукта. Кроме того, существенным достоинством этого способа является возможность строгого контроля за степенью модификации методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием калибровочной кривой, полученной в нашей предыдущей работе [7].

В настоящей работе гибридизацию проводили в течение 16—18 ч при 42° С на нитроцеллюлозных мембранах в буферах, содержащих формамид и раствор Денхардта [8]. Мишенью служила ДНК плазмиды рАТ42, а гибридизационным зондом — эта же ДНК, модифицированная *транс*-DDP после температурной денатурации. Для оценки неспецифического взаимодействия на нитроцеллюлозные фильтры параллельно наносили ДНК из тимуса теленка.

На рисунке представлены результаты гибридизации ДНК плазмиды рАТ42, связанной с различными количествами гаптена, с соответствующей ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах. Очевидно, что чувствительность метода зависит от степени модификации зонда.



Гибридизация ДНК плазмиды рАТ42, модифицированной *транс*-диамминдихлорплатиной, с соответствующей ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных мембранах. Доля модифицированных в *транс*-DDP-ДНК оснований: 5 (А), 4 (В), 3 (В), 2% (Г). Проведена серия 5-кратных разведений для ДНК плазмиды рАТ42 (I) и ДНК тимуса теленка (II): количество ДНК, нанесенной на мембрану в пробах 1—8: 25; 5; 1 мг; 200; 40; 8; 1,6; 0,3 мг соответственно. Концентрация зондовой *транс*-DDP-ДНК в гибридном буфере 100 нг/мл. Инкубация с аффинными антителами к *транс*-DDP-ДНК (4,5 мкг/мл) — 1 ч при 20° С. Последовательная инкубация с антителами к кроличьему Ig, конъюгированному с пероксидазой (Sevak, Чехословакия; разведение 1/200) и конъюгатом протеин А — пероксидаза (Институт им. Л. Пастера, СССР, разведение 1/100) — по 1 ч при 20° С. Субстрат для проявления пятен — 0,025% диаминобензидин, 0,075% хлорнафтол, 0,08% H₂O₂ — 140 мМ NaCl, 10 мМ фосфат натрия рН 7,4

Оптимальной долей модифицированных оснований является 3—4%. В этом случае практически без неспецифического фона хорошо определяется 2 мг/мм² ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Syvanen A. C. // *Med. Biol.* 1986. V. 64. № 2. P. 313—324.
2. Agraval S., Christodoulou C., Gait M. // *Nucl. Acids. Res.* 1986. V. 14. № 15. P. 6227—6245.
3. Турчинский М. Ф., Айнбиндер Е. И., Свердлов Е. Д. // *Молекулярн. биология.* 1988. Т. 22. № 6. С. 1545—1552.
4. Pezzella M., Pezzella F., Gall C., Macchi B., Verani P., Sorice F., Baronie C. D. // *J. Med. Virology.* 1987. V. 22. P. 135—142.
5. Keller G. H., Cumming C. V., Huang D.-P., Manak M. M., Ting R. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 170. № 2. P. 441—450.
6. Lund V., Lindqvist B., Eggset G. // *Nucl. Acids. Res.* 1989. V. 17. № 2. P. 539—551.
7. Kiseleva V. I., Vrana J., Brabec V., Poverenny A. M. // *Gen. Physiol. Biophys.* In press.
8. Meinkoth J., Wahle G. // *Analyt. Biochem.* 1984. V. 138. № 2. P. 257—284.

Поступило в редакцию
25.XII.1989

V. I. KISELEVA, M. F. TURCHINSKY*, A. M. POVERENNY ANTI *TRANS*-DDP-DNA ANTIBODIES FOR DETECTION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES

*Research Institute of Medical Radiology, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Obninsk;*

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

DNA modified by *trans*-diamminedichloroplatinum (*trans*-DDP) is suggested as an effective probe for non-isotopic hybridisation. Highly specific anti *trans*-DDP-DNA antibodies and peroxidase-conjugated antibodies to antirabbit Ig and protein A system have been used for the hybridised visualisation. This method allows one to detect 2 µg/mm² DNA.