



УДК 577.113.4.083.3

© 1994 В. И. Киселева, М. Ф. Турчинский*,
Т. Б. Колесник*, А. М. Поверенный

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИЭТИЛЕНТРИАМИНХЛОРИДА ПЛАТИНЫ В ГИБРИДИЗАЦИОННОМ АНАЛИЗЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Медицинский радиологический научный центр РАМН, г. Обнинск;
*Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Диэтилентриаминхлорид платины предложен использовать в гибридационном анализе специфических нуклеотидных последовательностей для мечения ДНК-зонда, а высокоаффинные антитела к комплексу ДНК—Pt(dien) — для детекции ДНК: ДНК-гибридов. Процедура мечения чрезвычайно проста и включает только смешивание растворов реагентов и инкубацию их в течение 2 ч при 60° С. Чувствительности и специфичности метода достаточно, чтобы тестировать 8 фг ДНК в условиях точечной гибридизации.

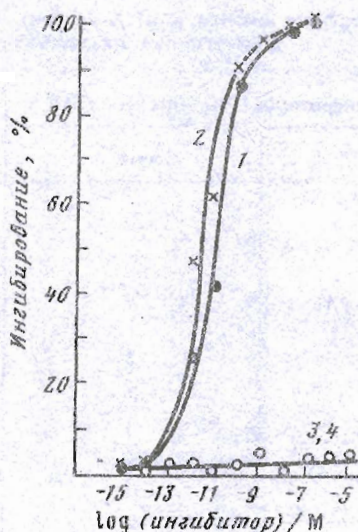
В предыдущих работах нами был предложен метод гибридационного анализа специфических нуклеотидных последовательностей с использованием в качестве метки для гибридационного зонда аддукта *trans*-DDP, а для визуализации полученных гибридов — аффинных антител к ДНК-*trans*-DDP [1—4]. Достоинством этого метода является чрезвычайная простота процедуры мечения зонда и высокая аффинность антител, определяющая высокую чувствительность системы иммуноферментной детекции. Метод позволяет определять $8 \cdot 10^{-13}$ г ДНК в Саузерн-блот-гибридизации.

В настоящей работе для мечения гибридационных зондов предложено использовать другой аминокислотный комплекс двухвалентной платины — [Pt(dien)Cl]Cl. Взаимодействие его с ДНК так же, как и в случае с другими аминокислотными комплексами платины — *cis*-DDP и *trans*-DDP, происходит легко, в мягких условиях (инкубация ДНК и Pt-комплексов в 0,01 М NaClO₄ в течение 48 ч при комнатной температуре в темноте приводит к количественному связыванию реагентов [5—7]), с образованием прочных координационных связей.

Антитела к модифицированной ДНК (ДНК-Pt(dien)) были получены принципиально по той же методике, что была описана нами ранее для антител к ДНК-*trans*-DDP [2, 4]. Иммуные сыворотки и выделенные из них аффинные антитела анализировали методом прямого и конкурентного ИФА на полистироловой

* Сокращения: BSA — бычий сывороточный альбумин, SDS — додецилсульфат Na, ПЭГ — полиэтиленгликоль, EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота, dien — диэтилентриамин, [Pt(dien)Cl]Cl — хлорид диэтилентриаминхлорид платины (II), ДНК-Pt(dien) — аддукт [Pt(dien)Cl]Cl с ДНК, *trans*-DDP — *транс*-диаминдихлорид платины, τ_a — молярное соотношение Pt/нуклеотид в реакционной смеси, τ_b — молярное соотношение Pt/нуклеотид в препарате ДНК-Pt(dien), ИФА — иммуноферментный анализ, IC₅₀ — концентрация ингибитора, вызывающая 50%-ное подавление связывания антител с антигеном, иммобилизованным на полистироловой планшете.

Рис. 1. Конкурентное ингибирование в ИФА связывания антител к ДНК-Pt(dien) с антигеном аддуктом ДНК-Pt(dien), γ_b 0,1 (1), им же после денатурации кипячением (2), нативной ДНК (3) и ДНК, денатурированной кипячением (4)



вых планшетах. В результате установлено, что в прямой реакции достаточно интенсивная цветная окраска развивается в течение 30 мин при использовании антисывороток в разведении 1/200 000 (данные не приводятся). Такой высокий титр косвенно свидетельствует о высокой аффинности антител к ДНК-Pt(dien). Об этом говорит также крутой наклон кривых ингибирования связывающей активности антител антигеном (рис. 1). Из результатов, представленных на рис. 1, следует, что антитела к ДНК-Pt(dien) высокоспецифичны, они не взаимодействуют с немодифицированными ДНК, ни с нативной, ни с денатурированной, взятыми в концентрации, в 10^6 раз превышающей концентрацию модифицированной ДНК. Из рис. 1 следует также, что ДНК-Pt(dien), денатурированная кипячением, узнается антителами лучше, чем неденатурированный аддукт. Очевидно, термическая обработка такой модифицированной ДНК не приводит к разрушению антигенной детерминанты, т. е. комплекс достаточно стабилен. А одной из причин несколько лучшего распознавания ее антителами после денатурации может являться увеличение доступности эпитопа. Следует отметить, что, по данным УФ-спектрометрии, модификация ДНК комплексом [Pt(dien)Cl]Cl вплоть до γ_b 0,1 практически не сказывается на кинетике ее термической денатурации — ренатурации, а также не влияет на гиперхромный эффект, вызываемый щелочной денатурацией [8].

Одной из основных особенностей комплекса [Pt(dien)Cl]Cl является то, что он образует с ДНК только монофункциональные соединения. Взаимодействие [Pt(dien)Cl]Cl с ДНК до значения γ_b не превышающего 0,1, происходит по N⁷ гуанина. Выше этого уровня связывание может происходить также по N⁷ аденина [6]. Платинирование пурина в N⁷-положение в отличие от алкилирования стабилизирует N-гликозидную связь и имидазольное кольцо и практически не вызывает изменения вторичной структуры ДНК, не нарушает стэкинг-взаимодействия между парами оснований [6—9].

Скорость образования монофункциональных аддуктов ДНК с Pt-комплексами гораздо выше, чем бифункциональных. Так, в случае с *trans*-DDP, которая образует как моно-, так и бизамещенные соединения, до 85% *trans*-DDP взаимодействует с ДНК одной своей валентностью в течение 1 ч инкубации [10] и затем происходит медленный переход к бифункциональным аддуктам, который завершается через 2 сут инкубации в 0,01 M NaClO₄ при 28° C [5]. А поскольку [Pt(dien)Cl]Cl образует с ДНК только монофункциональные аддукты, логично полагать, что время модификации ДНК [Pt(dien)Cl]Cl по строению с *trans*-DDP можно сократить, повысив температуру реакции. Образцы ДНК, полученные при

Условия модификации [Pt(dien) Cl] Cl ДНК		Условия последующей обработки ДНК-Pt(dien) *	$IC_{50} \cdot 10^{11}$, М	
t , °С	Время, ч			
37	48	—	1,1	
		А	4,3	
60	0,5	—	8,1	
		1	5,0	
		2	1,4	
		3	0,99	
		4	1,3	
		4	—	—
		16	—	1,1
37	48	Б	1,2	
60	2	Б	1,3	

* А — кипячение (100° С, 10 мин), Б — инкубация в гибридизационном буфере (65° С, 16—18 ч).

60° С в таких условиях в течение разных промежутков времени (0,5—4,0 ч), анализировали по тесту конкурентного ИФА. В качестве контроля служила ДНК-Pt(dien), модифицированная в течение 48 ч при 37° С (условия, в которых, как известно, происходит полное взаимодействие Pt-комплексов с ДНК [5—7]). Результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о том, что в этих условиях модификация практически завершается через 1,5—2,0 ч.

В таблице приведены также результаты ИФА-анализа ДНК-Pt(dien), преинкубированной в гибридизационном буфере в течение 16—18 ч. Очевидно, что такая обработка не влияет на способность модифицированной ДНК взаимодействовать с соответствующими антителами, т. е. комплекс ДНК—Pt(dien) сохраняет свою стабильность в условиях гибридизации.

Для оценки эффективности использования [Pt(dien) Cl] Cl в качестве метки для нуклеотидного зонда и выбора оптимального уровня модификации была проведена серия модельных экспериментов по точечной гибридизации ДНК фага λ , иммобилизованной на нитроцеллюлозных мембранах ВА-85, с ДНК с разной степенью модификации (r_a 0,03—0,20). Одновременно были испытаны и разные условия получения модифицированного зонда (см. «Эксперимент. часть»). В результате установлено, что увеличение степени модификации зонда до 10% (r_a 0,1) приводит к усилению гибридизационного сигнала (рис. 2). Дальнейшее повышение степени модификации до 20% не вызывает сколько-нибудь заметного изменения этого сигнала (данные не приводятся). При этом гибридизация и последующая иммуноферментная детекция гибридов происходят в равной степени эффективно при использовании зондов, модифицированных [Pt(dien) Cl] Cl как в течение 48 ч при 37° С, так и в течение 2 ч при 60° С. В том и другом случаях на доте легко определяется 10^{-14} г ДНК.

В качестве отрицательного контроля на мембранах иммобилизовали ДНК тимуса теленка. Из рис. 2 видно, что 10^{-8} г гетерологичной ДНК дают сигнал по интенсивности примерно такой же, как и 10^{-14} г гомологичной ДНК, что свидетельствует о высокой специфичности предлагаемого метода.

Предложенный метод гибридизационного анализа был апробирован в реальной системе для скрининга библиотеки кДНК, обогащенной фрагментами 19-й хромосомы человека. На рис. 3 представлены результаты гибридизации модифицированных [Pt(dien)Cl]Cl ДНК-зондов (размер зондов — 0,25—1,00 тыс.

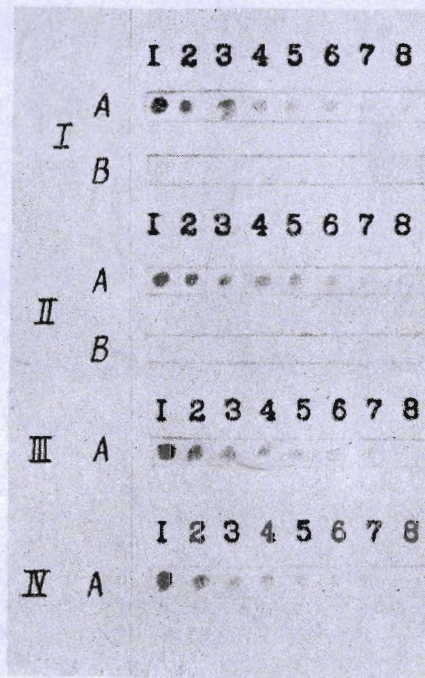


Рис. 2. Точечная гибридизация ДНК λ (А) и ДНК тимуса теленка (В), иммобилизованных на нитроцеллюлозных мембранах, с ДНК λ , модифицированной $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ в различных условиях. Количество иммобилизованной на мембране ДНК (А): 1 нг (1), 100 (2), 10 (3), 1 нг (4), 200 (5), 40 (6), 8 (7), 1,6 фг (8); Б: 100 (1), 10 (2), 1 нг (3). Условия модификации ДНК-зонда: 2 ч при 60°C , r_n 0,1 (I), 48 ч при 37°C , r_n 0,1 (II), 0,05 (III) и 0,03 (IV)

п. о.), полученных методом гибридизационного вычитания, с ДНК-мишенью, иммобилизованной на нитроцеллюлозной мембране. В качестве мишени были использованы два образца кДНК, один из которых (Т) содержал нуклеотидные последовательности 19-й хромосомы человека и хромосомы хомяка, а другой (D) — только хромосомы хомяка [11]. Все зонды, содержащие ДНК из гибридных клонов, должны давать и дают сигнал с (Т) и (D) (1,2,5 — рис. 3). Те зонды, которые обогащены последовательностями ДНК 19-й хромосомы человека, должны давать более интенсивный сигнал с (Т) (4 — рис. 3). Зонды, не содержащие ДНК из гибридных клонов, не дают сигнала вообще (3 — рис. 3). Такой подход позволяет анализировать библиотеки хромосом человека и выявлять клоны, содержащие специфическую ДНК хромосом. Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что чувствительности и специфичности предлагаемой системы гибридизационного анализа на основе ДНК—Pt(dien) достаточно для использования ее в этих целях.

Таким образом, в настоящей работе показана возможность использования еще одного аминокпроизводного Pt — $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ в качестве метки для гибридизационных зондов, а для детекции гибридов — соответствующих аффинных антител. Все достоинства, отмеченные нами ранее в случае применения для этих целей *trans*-DDP (чрезвычайная простота процедуры мечения зонда, не требующая очистки модифицированного зонда от непрореагировавшего препарата Pt, и стабильность метки [1—4]), присущи также $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$. Кроме того, предложенное аминокпроизводное Pt имеет ряд особенностей, предполагающих большую перспективность использования этого препарата в гибридизационном анализе, чем *trans*-DDP. Во-первых, высокая скорость модификации ДНК позволяет сократить процедуру мечения гибридизационного зонда до 1,5—2,0 ч. Во-вторых, модификация нуклеиновой кислоты $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ до степени, не превышающей 10%, практически не приводит к нарушению вторичной структуры и стабильности макромолекулы [5—8], что может иметь

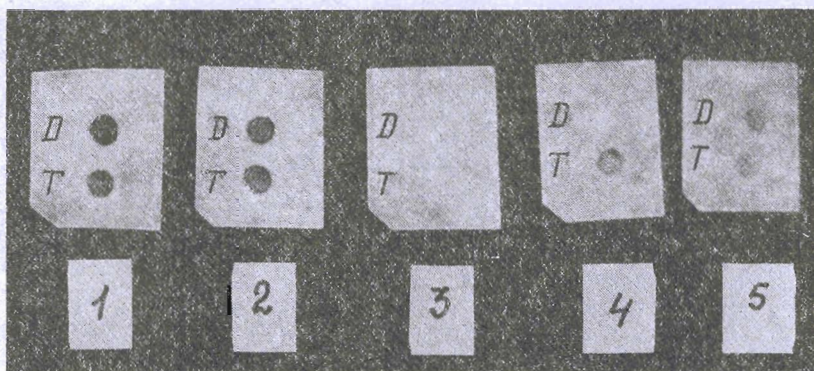


Рис. 3. Гибридизация ДНК-зондов 1—5 из библиотеки кДНК обогащенной фрагментами 19-й хромосомы человека, модифицированных [Pt(dien)Cl]Cl, с иммобилизованной на мембране кДНК гибридного клона GL12-42 китайского хомячка, содержащего фрагменты 19-й хромосомы человека (Т) или кДНК клона Ag17 китайского хомячка (D)

немаловажное значение для эффективности процесса гибридизации меченого зонда с ДНК-мишенью. И наконец, антитела к ДНК—Pt(dien) обладают более высокой аффинностью, следствием чего является на порядок более высокая чувствительность тест-системы с использованием этих антител (ср. [4]). В модельных экспериментах по точечной гибридизации ДНК фага λ предлагаемый метод позволяет тестировать 10^{-14} г ДНК при отсутствии неспецифического взаимодействия с более чем в 10^6 раз превышающими количествами гетерологичной ДНК. Показана пригодность метода для скрининга геномных библиотек. Кроме того, высокая чувствительность и специфичность метода позволяет предполагать возможность его использования для гибридизации *in situ* и для тестирования уникальных генов.

Экспериментальная часть

В работе использовали нитроцеллюлозные мембраны BA-85 (Schleicher und Schüll, Германия); ДНК тимуса телят, антитела к кроличьему Ig, конъюгированные с фосфатазой (Calbiochem, США); ПЭГ 6000, BSA, метилированный BSA, SDS, EDTA, формамид, нитротетразолиевый синий, 5-бром-4-хлориндолилфосфат (Serva, Германия); АН-сефарозу 4В, поливинилпирролидон, фикоколл-400, трис (Pharmacia, LKB, Швеция); твин-20 (Sigma, США). [Pt(dien)Cl]Cl любезно предоставлена доктором О. Враной (Институт биофизики, г. Брно, Чехия).

Иммунизацию кроликов ДНК, модифицированной [Pt(dien)Cl]Cl, и выделение аффинных антител к ДНК—Pt(dien) проводили по схеме, описанной нами ранее, путем многоточечных внутривоженных инъекций малыми дозами антигена через большие промежутки времени [2, 4]. Препарат ДНК—Pt(dien) для иммунизации готовили следующим образом: ДНК и $5 \cdot 10^{-4}$ М [Pt(dien)Cl]Cl смешивали в растворе 0,01 М NaClO₄ в соотношении Pt/нуклеотид 0,1 и инкубировали при 37° С в темноте в течение 48 ч. Антитела из иммунных сывороток выделяли на аффинной колонке (АН-сефароза с иммобилизованной ДНК—Pt(dien), г_б 0,1) путем последовательной элюции 2 М NaCl, 0,1 М глицин/ОН⁻ (рН 10,5), 0,1 М глицин/Н⁺ (рН 2,0). Характеристику антител проводили методом ИФА на полистироловых планшетах, предварительно активированных γ -облучением [2, 3].

ДНК-зонды из библиотек ДНК, обогащенной фрагментами 19-й хромосомы человека, были любезно предоставлены Г. Лаунер (Институт биоорганической

химии РАН, Москва). Клонированные в рTZ19R, эти зонды были наработаны методом полимеразной цепной реакции с прямого и обратного праймеров по стандартной методике [12] и осаждены этанолом с ацетатом аммония.

Модификация зондов. Водный раствор ДНК ($5 \cdot 10^{-4}$ М), свободной от белка и солей, линейризованной (в случае плазмид) или раздробленной ультразвуком до размеров 0,5—2,5 тыс п. о., денатурировали (100° С, 5 мин), охлаждали в ледяной бане (5 мин), добавляли Pt-комплекс до различных значений r_a (0,03, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2) и 0,1 М NaClO_4 до конечной концентрации 0,01 М и инкубировали 48 ч при 37° С или 2 ч при 60° С. Далее отбирали из реакционной смеси необходимое для гибридизации количество модифицированного зонда.

Для подбора времени модификации нуклеотидного зонда при 60° С ДНК и [Pt(dien)Cl]Cl в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М инкубировали в 0,01 М NaClO_4 (r_a 0,1). В разное время отбирали аликвоты, в которых реакцию останавливали добавлением NaCl до 0,5 М при 0° С. Реакционную смесь диализовали против 0,5 М NaCl при 4° С в течение ночи и анализировали модифицированную ДНК методом конкурентного ИФА.

Условия ДНК/ДНК-гибридизации, отмывки мембран, забивки их неспецифическим белком и последующей иммуоферментной детекции гибридов также описаны нами ранее [3, 4]. Рабочая концентрация первичных антител (к ДНК—Pt(dien)) составляла 0,1—0,5 мкг/мл, вторичные антитела (к кроличьему Ig), конъюгированные с фосфатазой, использовали в разведении 1/1000—1/2000. Развитие окраски с хромогеном наблюдалось в течение 1—16 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселева В. И., Турчинский М. Ф., Поверенный А. М. // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 991—992.
2. Киселева В. И., Врана О., Брабец В., Поверенный А. М. // Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 2. С. 503—507.
3. Киселева В. И., Турчинский М. Ф., Поверенный А. М. // Молекулярн. биология. 1991. Т. 25. № 2. С. 508—514.
4. Kiseleva V. I., Kolesnik T. B., Turchinsky M. F., Wagner L. L., Kovalenko V. A., Plaksin D. Ju., Konkalo D., Kuhrova V., Brabec V., Poverenny A. M. // Analyt. Biochem. 1992. V. 206. № 1. P. 43—49.
5. Kim S. D., Vrana O., Kleinwachter V., Katsumi N., Brabec V. // Anal. Lett. 1990. V. 23. № 7. P. 1505—1518.
6. Johnson N. P., Macquet J. P., Wiebers J. L., Monsarrat B. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 17. P. 5255—5269.
7. Macquet J. P., Butour J. L. // Biochimie. 1978. V. 60. № 11. P. 901—912.
8. Butour J.-L., Macquet J. P. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 653. № 3. P. 305—315.
9. Brabec V., Kleinwachter V., Butour J.-L., Johnson N. P. // Biophys. Chem. 1990. V. 35. № 2, 3. P. 129—141.
10. Eastman A., Barry A. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 12. P. 3303—3307.
11. Копанцев Е. П., Нестерова Т. Б., Бородин А. М., Заку С. М. // Генетика. 1993. В печати.
12. Lisitsyn N., Lisitsyn N., Wigler M. // Science. 1993. V. 259. № 5097. P. 946—951.

Поступила в редакцию
12.IV.1993

После доработки
2.VII.1993

V. I. Kiseleva, M. F. Turchinsky*, T. B. Kolesnik*,
A. M. Poverenny

**ANTI-DNA-[Pt(DIEN)Cl]Cl ANTIBODIES FOR DETECTION
OF SPECIFIC DNA SEQUENCES**

*Medical Radiological Scientific Centre, Russian Academy of Medical
Sciences, Obninsk;*

**M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

Monofunctional platinum compound [Pt(dien)Cl]Cl and high-affinity antibodies against DNA-[Pt(dien)Cl]Cl were suggested for non-radioactive hybridisation analysis of DNA. The simple labelling procedure was based on mixing the reagents followed by the incubation for 2 h at 60° C. The sensitivity and specificity of the technique were sufficient to detect 10 fg DNA in dot-hybridisation without cross-reaction with 10-fold excess of a heterological DNA. This technique permits genome libraries screening.