

Uso de sondas no radiactivas para la determinación del número de copias de genes y para el diagnóstico de enfermedades moleculares*

Use of non radioactive DNA probes to assess gene copy numbers and for the diagnosis of molecular diseases

GLORIA LEON, RODOLFO AMTHAUER, MARGARITA CONCHA,
ROSA IRIS MUÑOZ, INES VEGA, MARIA INES VERA,
JULIETA VILLANUEVA y MANUEL KRAUSKOPF

Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile,
Valdivia, Chile

Se sintetizó un análogo fotoactivable de biotina, el que se utilizó para marcar sondas de ácidos nucleicos. La marca se reveló con dos sistemas de detección avidina-peroxidasa y estreptavidina-fosfatasa alcalina, siendo esta última la que demostró una mayor sensibilidad. Los plásmidos pSS1.8 y pSP64/U1 fueron fotobiotinilados y utilizados en ensayos de hibridación en gota con DNA extraído de leucocitos humanos. Después de la incubación con estreptavidina y fosfatasa alcalina biotinilada, la actividad de la enzima se reveló con un sustrato soluble. Los resultados obtenidos demuestran diferencias cuantitativas consistentes con el número de copias para globina y U1snRNA humano. El plásmido pSS1.8 fotobiotinilado se utilizó para identificar fragmentos de restricción de DNA genómico alterados en un paciente afectado de anemia de células falciformes. El gen de la globina mutado se detectó por digestión del DNA del paciente con la endonucleasa de restricción Dde I, seguido de una hibridación "Southern" con la sonda marcada.

INTRODUCCION

Diversos métodos permiten la marcación no radiactiva de ácidos nucleicos. Hasta ahora, los más conocidos son los que utilizan biotina para marcar enzimática (Langer y col., 1981; Leary y col., 1983) o químicamente (Tchen y col., 1984; Chollet y Kawashima, 1985; Syvanen y col., 1986; Viscidi y col., 1986) fragmentos de DNA usados como sonda. La extraordinaria afinidad de biotina por avidina o por estreptavidina sustenta un sistema visual de detección del híbrido formado a través de un conjugado avidina-enzima o estreptavidina-enzima. La señal se identifica por la formación del producto de la reacción enzimática, que se revela como un cromógeno insolubilizado en la matriz donde ocurrió hibridación (Leary y col., 1983; Tchen y col., 1984).

El primer enfoque experimental para introducir biotina en ácidos nucleicos fue

desarrollado por Langer y col. (1981), quienes utilizaron biotina-11-dUTP en un ensayo estándar de "nick translation". Posteriormente, Forster y col., (1985) reportaron la síntesis química de fotobiotina, reactivo que permite incorporar la vitamina en el ácido nucleico a través de una reacción fotoquímica controlada.

El objetivo de este trabajo fue: 1) obtener sondas no radiactivas de ácidos nucleicos, utilizando esencialmente la técnica descrita por Forster y col. (1985) para la síntesis química de un análogo fotoactivable de biotina; 2) diseñar un sistema soluble de detección de la sonda biotinilada que permita determinar el número de copias de determinados genes; y 3) utilizar sondas fotobiotiniladas en ensayos de hibridación con fines diagnósticos.

MATERIALES Y METODOS

Síntesis del derivado fotoactivable de biotina: Se mezcló 22 mg de 4-fluoro-3-nitrofenilazida con 24 μ l de N-(3-aminopropil)-N metil-1,3-propano-

* Financiado por proyectos Fondecyt 0933/88 y S-86-29 de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile.

diamina. La reacción se realizó en medio éter etílico a temperatura ambiente durante 120 min. El compuesto de adición, de color marrón, claramente visible, se separó del exceso de reactivo que no reaccionó por extracción con acetato de etilo. En una segunda etapa, al compuesto de adición anterior se agregó 24 mg de N-hidroxisuccinimidobiotina (Pierce comercial) disuelta en una mezcla de piridina/agua en proporción 7:3 y se incubó por 2 h a 37°C. Debido a que la fotobiotina es una molécula muy poco soluble en solventes acuosos, se preparó finalmente a la forma de acetato. El límite de sensibilidad de la fotobiotina sintetizada se determinó sembrando en membranas de nitrocelulosa distintas cantidades de DNA marcado tanto con el reactivo sintetizado como con fotobiotina adquirida comercialmente (Sigma) y marcado con dUTP-biotina por "nick translation" (Langer y col., 1981). Luego de fijar los filtros durante 2 h a 80°C, la señal se reveló mediante el sistema de detección estreptavidina-fosfatasa alcalina (Chan y col., 1985) y avidina-peroxidasa (French y col., 1986).

Marcación de las sondas de ácidos nucleicos con fotobiotina: Se siguió esencialmente el procedimiento descrito por McInnes y col. (1987). En un capilar se colocó una mezcla en partes iguales de acetato de fotobiotina (1 ug/ul) y una solución acuosa del ácido nucleico (1 ug/ul). El capilar se irradió con una lámpara de luz Hanau, Hohensohn 100, de 400 Watts, colocada a 15 cm de altura, durante 30 min. El exceso de fotobiotina no incorporada se removió por extracciones sucesivas con n-butanol.

Preparación de DNA genómico de sangre total: El procedimiento de obtención de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica se realizó de acuerdo al método descrito por Garbutt y col., (1985).

Hibridación: Las condiciones de hibridación de DNA sembrado en gota en filtros de nitrocelulosa fueron esencialmente las descritas por Forster y col. (1985). Los transferidos de "Southern" fueron hibridados siguiendo el protocolo descrito por McInnes y col. (1987).

Detección colorimétrica de las membranas hibridadas con un sustrato soluble: Se siguió básicamente el método descrito por Seyfert (1985). Los filtros de nitrocelulosa, conteniendo en gota distintas cantidades de DNA genómico extraído de leucocitos humanos, fueron hibridados con las sondas pSS1.8 y con el plásmido recombinante pSP64/U1, fotobiotiniladas. El plásmido recombinante pSS1.8 fue gentilmente obsequiado por el Dr. J.T. Wilson y contiene un inserto de 1.8 kilobases del gen que codifica para β globina humana en el sitio Bam H I de pBR322. El plásmido pSP64/U1 contiene un fragmento de 206 pb del gen humano U1RNA, insertado en el sitio Bam H I del DNA de pSP64 (Schenborn y Mierendorf, 1985). Después de lavar los filtros hibridados con las sondas respectivas, se incubaron con estreptavidina y con fosfatasa alca-

lina biotinilada. Trozos del papel hibridado, cortados individualmente, fueron incubados con un sustrato soluble de la fosfatasa alcalina, el p-nitrofenilfosfato 6 mM en tampón glicina 0.1 M pH 10.4, durante 6 h a 37°C. La reacción se detuvo con NaOH 2M. El producto coloreado en solución se midió a 405 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tradicionalmente, los ácidos nucleicos utilizados como sondas para la detección de secuencias específicas y complementarias han sido marcados con isótopos radiactivos. Sin embargo, los problemas de estabilidad, seguridad biológica y detección de estas sondas han estimulado el interés por desarrollar sistemas alternativos de marcación, no radiactivos.

El logro de una modificación química estable de ácidos nucleicos útiles como sondas moleculares en experimentos de hibridación requiere la presencia de grupos funcionales altamente reactivos. El beneficio de la marcación no radiactiva de ácidos nucleicos depende, en gran parte, de la sensibilidad del método de detección de la sonda en cuestión.

El método utilizado en este trabajo para la preparación de un derivado estable, no radiactivo de biotina, elimina desventajas de otros procedimientos de marcación de ácidos nucleicos. La síntesis del derivado aprovecha la estructura de la molécula de vitamina, la que posee un grupo carboxilo a través del cual puede acoplarse fácilmente a otras moléculas, sin que se afecte su unión a avidina o a estreptavidina (Guesdon y col., 1979). Nuestro esquema de trabajo contempló la modificación de biotina con un grupo químicamente inerte pero fotoquímicamente lábil, una arilazida. Las arilazidas son estables en la oscuridad, y al ser irradiadas con luz de una longitud de onda adecuada, se convierten en un arilnitreno de una reactividad química muy alta (Bayles y Knowles, 1977; Staros, 1980). Como grupo fotoactivable utilizamos el 4-fluoro-3-nitrofenilazida, porque se puede acoplar fácilmente con las bases nitrogenadas del ácido nucleico a través de reacciones de "cross linking" y porque además puede ser fotoactivado con luz visible,

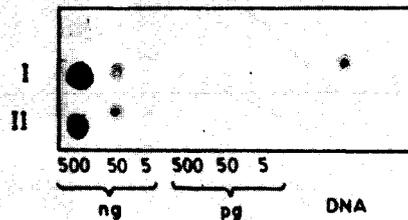
evitando de esta forma alterar la sonda que se desea marcar (Fleet y col., 1972).

El progreso de las dos etapas de la reacción de síntesis del derivado fotoactivable de biotina se evaluó por cromatografía en capa fina en sílica gel utilizando como solvente una mezcla de ácido acético/agua en proporción 1:9. El producto final, de color marrón claramente visible (muy poco soluble en solventes acuosos), se resuspendió en ácido acético 1 M y luego se liofilizó para remover el exceso de ácido. En estas condiciones, el acetato de fotobiotina es muy soluble en agua. Las características fisicoquímicas de la fotobiotina sintetizada resultaron ser semejantes a las descritas en la literatura (Forster y col., 1985). Por otra parte, la presencia de un brazo espaciador entre el grupo fotoactivable y la vitamina disminuye los impedimentos estéricos que pudieran producirse entre la sonda y la cadena complementaria tanto en la hibridación como en la reacción de detección posterior. Las distintas sondas fotobiotiniladas son mucho más estables que las radiactivas. En efecto, en la oscuridad pueden mantenerse por varios meses a -20°C sin pérdida apreciable de la marca. Además, el procedimiento es simple, rápido y no requiere de la infraestructura que necesita la detección de isótopos radiactivos.

El límite de sensibilidad de las sondas fotobiotiniladas se determinó sembrando en nitrocelulosa, por el sistema en gota, distintas cantidades de DNA marcado con fotobiotina sintetizada en el laboratorio, con fotobiotina comercial y con d-UTP-biotina. La señal se reveló utilizando dos sistemas de detección, estreptavidina-fosfatasa alcalina y avidina-peroxidasa. Aun cuando en los tres casos se obtiene una señal comparable hasta los 5 pg de DNA marcado con el primer sistema de detección, en la Fig. 1 B sólo se aprecia una señal débil a este nivel. No obstante, en forma repetitiva hemos observado el mismo grado de sensibilidad utilizando DNA de otras fuentes. No fue así con avidina-peroxidasa, procedimiento que ofreció siempre menor sensibilidad, pudiéndose detectar sólo hasta 5 ng de la muestra biotinilada. Gebeyehu y col. (1987), en un experimento semejan-

te utilizando DNA del fago lambda marcado con biotina por "nick translation", lograron detectar hasta 1 pg de DNA-biotina por el sistema estreptavidina-fosfatasa alcalina, sensibilidad comparable a los métodos que utilizan ³²P. Otros autores han informado que la detección de ácidos nucleicos fotobiotinilados en filtros de nitrocelulosa con el conjugado avidina-fosfatasa alcalina es comparable en sensibilidad a otros métodos no radiactivos (Saunders, 1989; Viscidi y col., 1986) y radiactivos (Forster y col., 1985).

A.- SISTEMA DE DETECCIÓN AVIDINA-PEROXIDASA



B.- SISTEMA DE DETECCIÓN ESTREPTAVIDINA-FOSFATASA ALCALINA

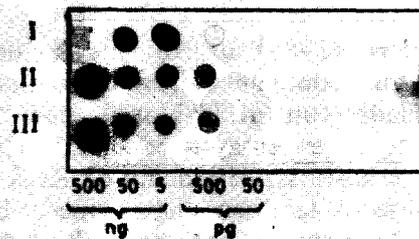


Fig. 1: Determinación del límite de sensibilidad de sondas fotobiotiniladas. A: Sistema de detección avidina-peroxidasa. I. DNA marcado con fotobiotina sintetizada en el laboratorio. II. DNA marcado con fotobiotina comercial. B: Sistema de detección estreptavidina-fosfatasa alcalina. I. DNA marcado con biotina por "nick translation". II. DNA marcado con fotobiotina sintetizada en el laboratorio. III. DNA marcado con fotobiotina comercial.

Los plásmidos pSS1.8 y pSP64/U1 se usaron como sondas fotobiotiniladas en experimentos de hibridación en gota con distintas cantidades de DNA extraído de leucocitos humanos. La reacción de hibridación se cuantificó revelando la actividad de la enzima con un sustrato soluble, cuyo producto se midió a 405 nm. En estas

condiciones se obtuvo una relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración de DNA hibridado con las dos sondas utilizadas (Fig. 2).

HIBRIDACION DE DNA HUMANO CON SONDAS BIOTINILADAS

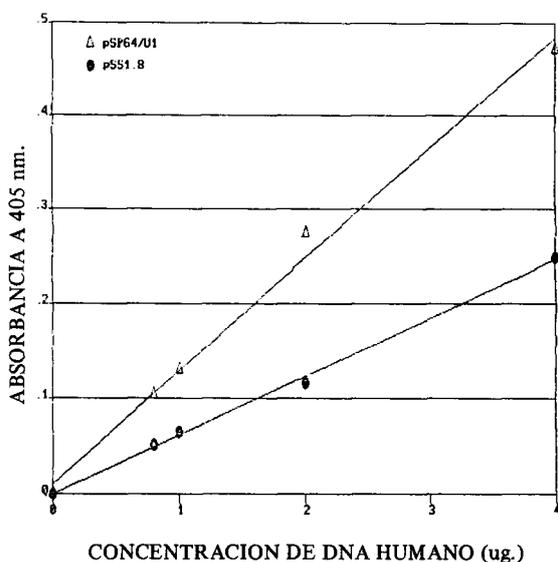
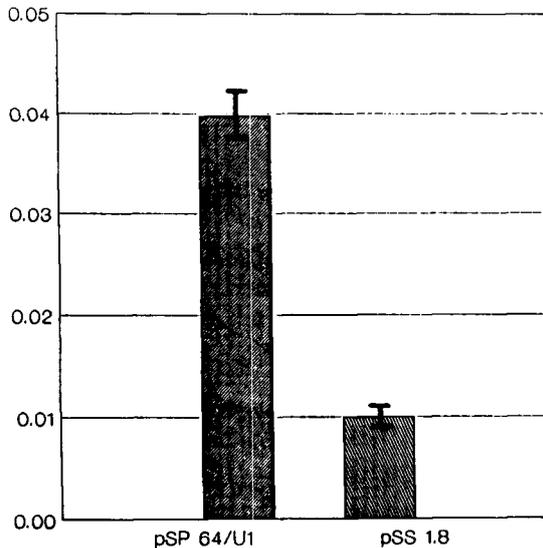


Fig. 2: Ensayo de hibridación de DNA de leucocitos humanos sembrado en gota y revelado con sustrato soluble como se describe en materiales y métodos. Se utilizaron las sondas fotobiotiniladas PSS1.8 y pSP64/U1.

Seyfert (1988) utilizó una sonda de DNA que contiene el gen de α -tubulina biotinilado con dUTP-biotina por "nick translation" en ensayos de hibridación en gota con distintas cantidades de RNA poli A⁺. Observó también una respuesta lineal ($r=0.992$) entre la cantidad de RNA hibridado y el aumento de la absorbancia del producto de la reacción enzimática en solución. La determinación del número de copias de genes es de particular importancia en Biología Molecular. A objeto de cuantificar el número de copias de determinados genes, expresamos nuestros resultados en función del número de copias para β globina y U1snRNA descritos en la literatura (Maniatis y col., 1980; Lund y Dahlberg, 1984). En la Fig. 3 la absorbancia a 405 nm está expresada en función de 1 μ g de DNA humano por kb de sonda biotinilada. Los resultados demuestran diferencias cuantitativas que pudieran ser consistentes con el número de copias de genes existentes

para globina y U1snRNA humano; no obstante habría que confirmarlo en forma más precisa con otras sondas de genes cuyo número de copias se conozca exactamente, para poder generalizar la utilidad de este método.

ABSORBANCIA A 405 nm.



SONDA FOTOBOTINILADA ESPECIFICA

Fig. 3: Análisis cuantitativo del número de copias de genes de β -globina y snRNA U1 detectados con las sondas fotobiotiniladas pSS1.8 y pSP64/U1 respectivamente. La absorbancia a 405 nm está expresada en función de 1 μ g de DNA humano por 1 kb de sonda fotobiotinilada.

Una de las mayores aplicaciones de las técnicas de hibridación molecular en medicina, se encuentra en el diagnóstico de enfermedades. El análisis del gen alterado constituye, además, una poderosa herramienta para el estudio de las bases moleculares responsables de múltiples patologías. A objeto de confirmar un caso de anemia falciforme, que presumiblemente afectaba a una paciente caucasiana, se utilizó la sonda pSS1.8 (Vega y col., 1990). Este plásmido fue marcado con fotobiotina sintetizada en el laboratorio y se hibridó a transferidos de "Southern" de DNA de leucocitos del paciente afectado, previamente digerido con la endonucleasa de restricción Dde I. La Fig. 4 demuestra que el método permite en forma inequívoca la identificación del genotipo B^S/B^S, generándose un solo fragmento de 376 pares de

bases, como consecuencia de la mutación que afecta al gen de β globina en un paciente homocigoto para esta enfermedad.

Los resultados de este trabajo confirman la facilidad que otorga el uso de sondas no radiactivas en el diagnóstico por hibridación molecular. Hemos constatado, además, que podría ser posible dosificar el número de copias génicas a través de un procedimiento simple y directo.

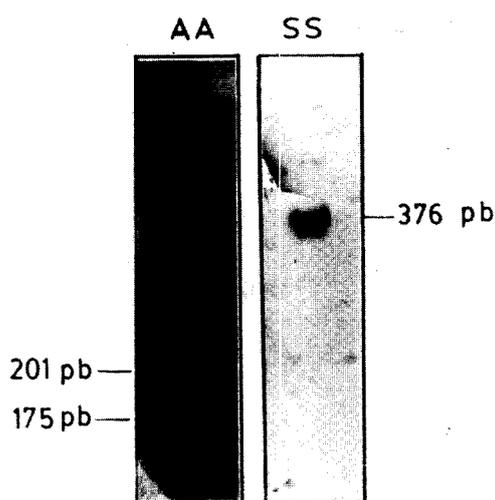


Fig. 4: Identificación de los fragmentos de restricción en transferidos de "Southern" de DNA cromosomal de un individuo normal y de una paciente afectada de anemia de células falciforme. La hibridación se realizó con la sonda pSS1.8 fotobiotinilada. La marca se reveló con fosfatasa alcalina. AA: individuo normal; SS: paciente.

BIBLIOGRAFIA

BAYLEY, H.; KNOWLES, J.R. (1977) Photoaffinity labelling. *Methods in Enzymol.*, 46: 69-114.
 CHAN, V.T.W.; FLEMING, K.A.; MCGEE, J.O.D. (1985) Detection of subpicogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization with biotinylated probes. *Nucleic Acid Res.*, 13: 8083-8091.
 CHOLLET, A.; KAWASHIMA, E.H. (1985) Biotin-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotides: chemical synthesis and uses as hybridization probes. *Nucleic Acid Res.*, 13: 1529-1541.
 FLEET, G.W.J.; KNOWLES, J.R.; PORTER, R.R. (1972) Labelling of a Specific Antibody against the Photo-Precursor of an Aryl Nitrene. *Biochem. J.*, 128: 499-508.
 FORSTER, A.C.; MCINNES, J.L.; SKINGLE, D.C.; SYMONS, R.H. (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of

DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acid Res.*, 13: 745-761.
 FRENCH, B.T.; MAUL, H.M.; MAUL, G.G. (1986) Screening cDNA expression libraries with monoclonal and polyclonal antibodies using an amplified Biotin-Avidin-Peroxidase technique. *Anal. Biochem.*, 156: 417-423.
 GARBUTT, G.J.; WILSON, J.T.; SCHUSTER, G.S.; LEARY, J.J.; WARD, D.C. (1985) Use of Biotinylated probes for detecting Sick Cell Anemia. *Clin. Chem.*, 31: 1203-1206.
 GEBEYEHU, G.; RAO, P.Y.; SOOCHAN, P.; SIMMS, D.A.; KLEVAN, L. (1987) Novel biotinylated nucleotide-analogs for labelling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acid Res.*, 15: 4513-4534.
 GUESDON, J.-L.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. (1979) The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1131-1139.
 LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; WARD, D.C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6633-6637.
 LEARY, J.J.; BRIGATI, D.J.; WARD, D.C. (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bioblots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4045-4049.
 LUND, E.; DAHLBERG, J.E. (1984) True genes for human U1 small nuclear RNA. Copy number, polymorphism, and methylation. *J. Biol. Chem.*, 259: 2013-2021.
 MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; LAUER, J.; LAWN, R.M. (1980) The Molecular Genetics of Human Hemoglobins. *Ann. Rev. Genet.*, 14: 145-178.
 MCINNES, J.L.; VISE, P.D.; HABIL, N.; SYMONS, R.H. (1987) Chemical biotinylation of nucleic acids with photobiotin and their use as hybridization probes. *Focus*, 9: 1-4.
 SAUNDERS, N.A. (1989) Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms for Epidemiological Tracing of Bacteria Using Nonradioactive Probes. *Focus*, 11: 47-49.
 SCHENBORN, E.T.; MIERENDORF, R.C.Jr. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acid Res.*, 13: 6223-6236.
 SEYFERT, H.M. (1985) The use of biotinylated genes probes for mRNA titration. *Focus* 7: 3-4.
 STAROS, J.V. (1980) Aryl azide photolabel in biochemistry. *Trends Biochem. Sci.*, 5: 320-322.
 SYVANEN, A.C.; TCHEN, P.; RANKI, M.; SODERLUND, H. (1986) Time-resolved fluorometry: a sensitive method to quantify DNA-hybrids. *Nucleic Acid Res.*, 14: 1017-1028.
 TCHEN, P.; FUCS, R.P.P.; SAGE, E.; LENG, M. (1984) Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3466-3470.
 VEGA, I.; LEON, G.; MUÑOZ, R.I.; ZAPATA, C.; KRAUSKOPF, M. (1990) Utilización de una sonda de DNA específica en la confirmación de anemia falciforme en una mujer caucásica. *Rev. Méd. Chile*, 118: 306-312.
 VISCIDI, R.P.; CONNELLY, C.J.; YOLKEN, R.H. (1986) Novel Chemical Methods for the Preparation of Nucleic Acids for Nonisotopic Hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 311-317.

