

EMPLEO DE LOS MARCADORES NO RADIATIVOS FOTOBLOTINA Y PEROXIDASA EN LA HIBRIDACIÓN DE ADN

Anabel Alvarez, Gilda Lemos, Nelvis Figueroa, Verena Muzio, Gerardo Guillén

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apdo. 6162, Ciudad de la Habana, CUBA.

Recibido en marzo de 1992. Aprobado en diciembre de 1992

Key words: Photobiotin, DNA hybridization, DNA labelling, chemiluminescence, non-radioactive labelling

SUMMARY

It is shown the non-radioactive labelling of nucleic acid probes with photobiotin and peroxidase and the usefulness of this method when compared with radioactive labeling in Dot-Blot and Southern-Blot hybridization.

RESUMEN

Se muestra el empleo de la fotobiotina y de la peroxidasa en el marcaje de sondas de ADN y las ventajas con respecto al marcaje con isótopos radiactivos para experimentos de hibridación por "Southern-Blot" y "Dot-Blot"

INTRODUCCION

Tradicionalmente la detección de ADN por técnicas de hibridación se basa en el marcaje de las sondas con isótopos radiactivos. Esta técnica es muy costosa y necesita de entrenamiento, equipamiento y condiciones especiales de trabajo que dificultan su amplia utilización en el diagnóstico clínico y la investigación.

El complejo avidina-biotina, debido a su gran afinidad ($K_d 10^{-15}$) y estabilidad, ha sido ampliamente utilizado, empleando para el marcaje nucleótidos biotinilados que se incorporan al ADN de forma similar a los nucleótidos marcados con isótopos radiactivos en reacciones de polimerización (Pitcher *et al.*, 1987; Hopp *et al.*, 1988; Niedobitek, *et al.*, 1989). De los sistemas que utilizan marcadores biotinilados que no necesitan reacciones de polimerización para su incorporación al ADN, el más difundido es el del compuesto denominado Fotobiotina, el cual se une covalentemente al ADN por acción de la luz (Foster *et al.*, 1985).

Más recientemente se ha generalizado el empleo de sustratos luminiscentes para sondas marcadas directamente con peroxidasa o fosfatasa alcalina. Estos métodos reportan una sensibilidad que llega hasta 0.2 pg de ADN, gran simplicidad técnica, posibilidad de conservar inalterable la sonda marcada durante varios meses y mayor rapidez en la obtención

del resultado al prescindir del largo período de exposición que se necesita cuando se emplean isótopos radiactivos.

El objetivo del presente trabajo es mostrar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sustituyendo el marcaje de sondas con isótopos radiactivos por sondas marcadas con Fotobiotina y Peroxidasa en diferentes técnicas de hibridación de ADN.

MATERIALES Y METODOS

Síntesis del acetato de fotobiotina

Se realizó según Foster y colaboradores (1985). El Acetato de Fotobiotina en concentraciones entre 1 g/ml y 100 g/ml en agua, se ha mantenido estable por más de 4 años a -20°C protegido de la luz, a pesar de repetidas congelaciones y descongelaciones.

Marcaje del ADN con Fotobiotina

Se realizó según el método de McInnes y colaboradores (1987).

1. El ADN debe estar libre de sales, solventes orgánicos, ARNt y proteínas, a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua.

2. Mezclar con igual volumen de fotobiotina a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. (Esto se realiza con luz tenue).

3. Colocar el tubo abierto en hielo e irradiar 20 min con una lámpara de 300-500 Watts con filamento de tungsteno, a 10 cm del tubo.

4. Añadir al tubo 50 μl de solución Tris 100 mM, pH 9.5, EDTA 1 mM, y completar con agua hasta 100 μl .

5. Extraer dos veces la fotobiotina no incorporada con 100 μl de 2-Butanol, quedando un volumen final de aproximadamente 35 μl .

6. Añadir 5 μl de Acetato de Sodio 3 M, pH 5.2 y 100 μl de Etanol absoluto.

7. Incubar 15 min a -20°C y centrifugar 15 min a 13000 rpm.

8. Lavar el precipitado con Etanol al 70% y secar en desecadora (si se marcan más de 10 g el precipitado se verá rojo).

9. Disolver a 50 ng/ μl , en agua y conservar a -20°C .

Preparación de la muestra e hibridación en Dot-Blot

1. Hidratar el filtro de nitrocelulosa (NC) 2 min en agua, sumergirlo 10 min en 6x SSC (1x SSC: NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M, pH 6.8) y colocarlo en el equipo de dot.
2. Desnaturalizar las muestras de ADN 5 min a 96°C y luego colocarlas en hielo durante 2 min o desnaturalizar con NaOH 0.1M y NaCl 1.5 M 10 min a temperatura ambiente.
3. Aplicar el ADN con vacío moderado, y luego añadir 100 µl de solución Tris-HCl 0.1 M, NaCl 1.5 M, pH 7.4.
4. Secar el filtro a temperatura ambiente.
5. Incubar el filtro a 80°C con vacío durante 2 h.
6. Prehibridar 1 h a 42°C en solución de prehibridación (50% de Formamida, 5x SSC, 5x solución de DENHARDT, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6.5, EDTA 5 mM, ARNt100 µg/ml).
7. Hibridar añadiendo la sonda desnaturalizada durante 5 min a 96°C y colocada 2 min en hielo, a una concentración de 50 ng/ml e incubar 16 h a 42°C en solución de hibridación (50% de Formamida, 5x SSC, 1x solución de DENHARDT, NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6.5, 5 mM EDTA, ARNt 100 µg/ml). Si se usan 500 ng/ml de sonda, el tiempo de hibridación se reduce a 6 h.
8. Lavar dos veces con 2x SSC, 0.1% de SDS a 50°C, 10 min.
9. Lavar dos veces con 0.2x SSC, 0.1% de SDS a 50°C, 10 min.
10. Lavar 1 vez con 2x SSC a temperatura ambiente durante 5 min.

Revelado de la señal

1. Bloquear el filtro con leche desgrasada al 5% a 42°C durante 20 min en la solución A (TBS 1X pH 7.5, 0.5% Tween 20).
2. Lavar 3 veces a temperatura ambiente con la solución B (TBS 1X pH 7.5, 0.1% Tween 20).
3. Añadir el conjugado Avidina-Fosfatasa Alcalina (AFA) (Sigma, USA) a 1 g/ml en la solución B e incubar, agitando 30 min a temperatura ambiente.
4. Lavar 3 veces con la solución B durante 10 min.
5. Lavar 2 veces con TBS 1x, pH 9.5 durante 5 min.
6. Añadir los sustratos NBT (Sigma, USA), a 0.33 mg/ml, y BCIP (Sigma, USA), a 0.17 mg/ml, en 5 ml de TBS 1x (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 50 mM), pH 9.5 e incubar a 37°C en la oscuridad durante 2 h.
7. Detener la reacción sumergiendo el filtro en TE 1x.

Southern-Blot

Se realizó según se describe por Sambrook y colaboradores (1989). En caso de fragmentos mayores de 10 Kb es posible tratar el gel después de la corrida con HCl 0.2 M durante 10 min para aumentar la eficiencia de la transferencia a la membrana de NC.

Marcaje de ADN con peroxidasa

Se empleó el kit comercial ECL Gen detection system (Amersham, Inglaterra), realizándose el marcaje y la detección según indicaciones del fabricante.

En lugar de las placas radiográficas ECL recomendadas por la firma, se emplearon placas Agfa Gevaert (Bélgica), Fuji (Japón) o Hyperfilm MP (Amersham, Inglaterra), con resultados similares.

RESULTADOS

Se prepararon patrones de pesos moleculares, marcando con fotobiotina los ADN previamente digeridos con enzimas de restricción (también es posible digerir el ADN después de biotinilarlo), y se calcularon las cantidades necesarias para detectar la señal de todas las bandas una vez transferidas. Los resultados obtenidos con 22 ng de ADN lambda HindIII, 12.6 ng de ADN lambda EcoRI, 1.5 ng de plasmidio pUC-18 BglII y 8.8 ng de plasmidio pBR322 AluI, se muestran en la figura 1. Debido a la poca cantidad de patrones de pesos moleculares marcados que se necesita, se mezclaron con patrones sin marcar para poder apreciar la señal fluorescente en el gel teñido con Bromuro de Etidio antes de la transferencia del ADN a la membrana de NC.

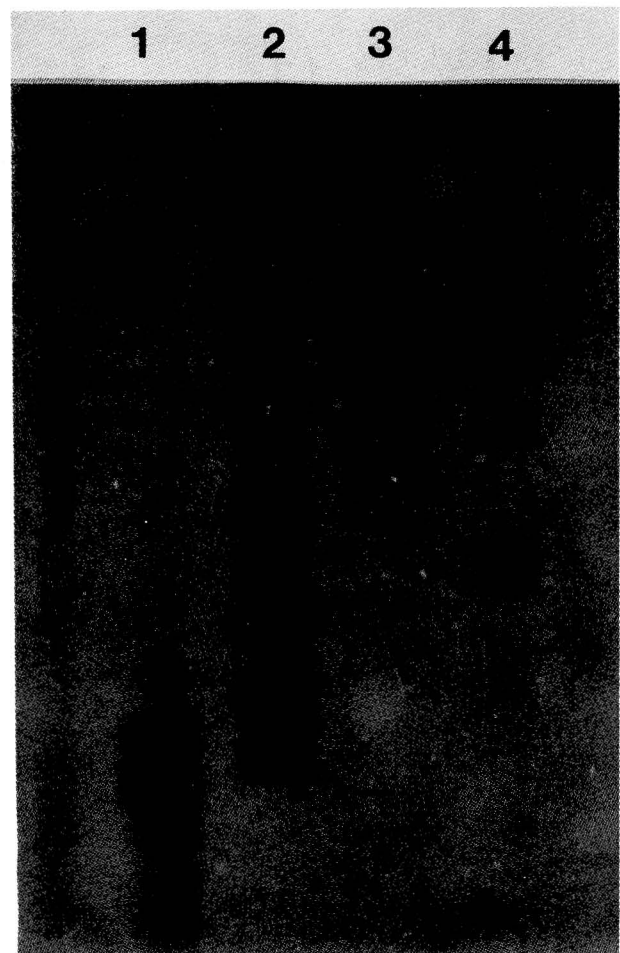


Fig. 1. Patrones de pesos moleculares biotinilados transferidos a NC. 1: Plasmidio pBR322 digerido AluI, 2: Plasmidio pUC19 digerido BglII, 3: ADN del fago lambda digerido EcoRI, 4: ADN del fago lambda digerido HindIII



Fig. 2 A. Detección por Southern-Blot del gen pm-6, de una sola copia, en el ADN cromosomal. Se aplicaron 10 g de ADN digerido con EcoRI y HindIII. 1: Patrones de Pesos Moleculares biotinilados (ADN del fago lambda digerido con HindIII), 2-6: ADN de *N. meningitidis*: 2: B:4:P1.15, 3: B(NT)121-85, 4: B(NT)210-86, 5: B:15:P1.16, 6: B:15:P1.15, 7: *N. lactamica*.

Las sondas biotiniladas se usaron con membranas de NC, ya que los substratos del conjugado AFA, utilizados en la detección de la señal, producen fondo en las membranas de nylon.

La sensibilidad de estos métodos de marcaje no-radiactivo es suficiente para detectar secuencias homólogas de una sola copia en el genoma de cepas de bacterias y levadura (figura 2).

Hibridando con una sonda biotinilada del virus del papiloma humano (VPH-18), se detectaron hasta 10 pg de ADN homólogo por "Southern-Blot" y entre 30 y 100 pg en "Dot-Blot" (figura 3A).

En el caso de sondas marcadas con peroxidasa, se puede volver a utilizar la membrana para otra sonda marcada con esta enzima. Basta con prehibridar 10 minutos a 55°C antes de volver a hibridar a 42°C. De esta forma se inactiva la peroxidasa y se elimina la posibilidad de señales de la primera hibridación.

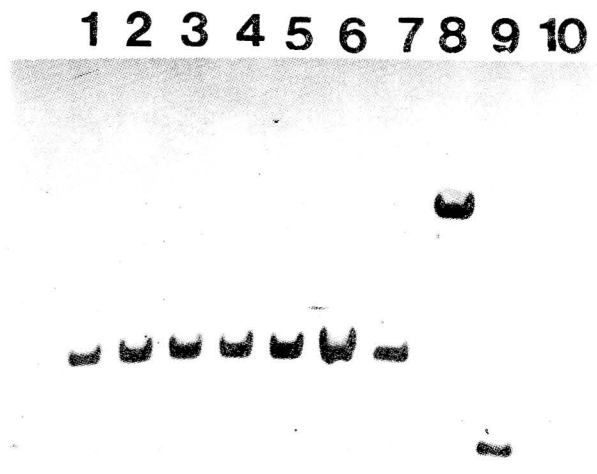


Fig. 2 B. Demostración de integración del gen S del virus de la Hepatitis B en la levadura *S. cerevisiae*. 1-7: 10 g del ADN genómico de 7 colonias transformantes digeridas con EcoRI. 8: Plasmidio utilizado en la transformación. 9: 1 ng del ADN usado como sonda. 10: Control negativo, 10 g de ADN genómico de la cepa hospedera. La sonda se marcó con peroxidasa. El film se expuso 3 min.

Al emplear sondas marcadas con peroxidasa es posible el uso de cualquier membrana de NC comercial en lugar de la ECL original o el uso de membrana de Hybond N+ (Amersham, Inglaterra), que al estar cargada positivamente, simplifica el proceso de fijación del ADN, bastando sólo 2 min de incubación en 0.2 N de NaOH. El uso de Hybond N+ permite además reducir el fondo inespecífico y disminuir el tiempo de prehibridación hasta 10 min.

En hibridaciones por "Dot-Blot" con la sonda de VPH-18 marcada con peroxidasa, se obtuvo una sensibilidad similar a la reportada para esta técnica (figura 3B).

DISCUSION

Con la utilización de los métodos no-radiactivos para el marcaje de sondas de ADN, se ha logrado una sensibilidad que permite sustituir a los isótopos radiactivos en la mayor parte de las hibridaciones que se realizan normalmente en los laboratorios de Biología Molecular.

La sensibilidad que se puede obtener con estos métodos depende de la calidad del conjugado

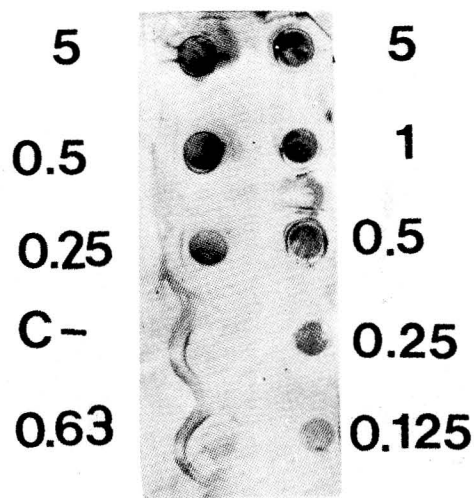


Fig. 3 A. "Dot-blot" demostrativo de la sensibilidad de los métodos de marcaje no radiactivo. A. Empleo de la sonda VPH-18 biotinilada para detectar el inserto en el plasmidio pBR322. Los números corresponden a las cantidades aplicadas de las muestras en ng. En el control negativo (C-) se aplicaron 5 ng del plasmidio pBR322.

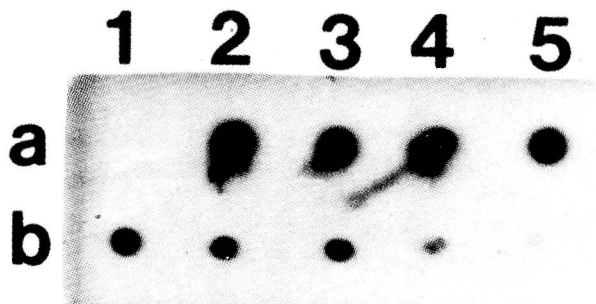


Fig. 3 B. Empleo de la sonda VPH-18 marcada con peroxidasa para detectar el inserto en el plasmidio pBR322. 1a: Control negativo (10 ng de pBR322). 2a-5b: Diluciones 1/2 del plasmidio pBRVPH18, desde 500 pg hasta 2 pg. El film se expuso 1 min.

enzimático y de los sustratos empleados, así como de la pureza del ADN usado como sonda, que va a determinar la eficiencia del marcaje

Empleando el conjugado peroxidasa-estreptavidina en sustitución del conjugado AFA, no se detectaron cantidades inferiores a 1 ng de ADN (resultado sin publicar).

Los métodos aquí mostrados no necesitan del empleo de enzimas para el marcaje de la sonda, lo cual constituye una ventaja, por su simplicidad y rapidez, sobre otros métodos de marcaje no-radioactivo reportados y comercializados en forma de kits por diferentes casas comerciales. En estos protocolos se han hecho modificaciones que simplifican y abaratan los costos del método sin afectar la sensibilidad.

Las sondas biotiniladas también pueden emplearse en hibridación de colonias (Kincaid y Nightingale, 1988; Michael y Flemming, 1988) y en hibridación *in situ* (Dunn *et al.*, 1986; Liesi *et al.*, 1986; Albertson *et al.*, 1988). En el caso de las hibridaciones *in situ*, hemos observado que la sonda debe tener menos de 400 pb, por lo que en caso de sondas mayores deben ser tratadas con DNAsa o digeridas con enzimas de restricción antes o después de realizar la fotobiotinilación (resultado sin publicar).

Los protocolos para hibridación *in situ* o de colonias empleados en nuestro laboratorio con los mismos procedimientos descritos aquí pueden ser enviados a solicitud.

REFERENCIAS

- ALBERTSON, D. G., R. FISHPOOL, P. SHERRINGTON, E. NACHEVA and C. MILSTEIN (1988). Sensitive and high resolution *in situ* hybridization to human chromosomes using biotin labelled probes: assignment of the human thymocyte + CD1 antigen genes to chromosome 1. *The EMBO Journal* 7: 2801-2805.
- DUNN, D. C., C. D. BLAIR, D. C. WARD and B. J. BEATY (1986). Detection of bovine herpesvirus-specific nucleic acids by *in situ* hybridization with biotinylated DNA probes. *Am. J. Vet. Res.* 47: 740-746.
- FOSTER A. C., J. L. MCINNES, D. C. SKINGLE and R. H. SYMONS (1985). Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *N.A.R.* 13: 745-761.
- HOPP H. E., L. GIAVEDONI, M. A. MANDEL, A. ARESE, B. ORMAN, F. B. ALMONACID, H. N. TORRENS and A. N. MENTABERRY (1988). Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. *Arch. Virol.* 103: 231-241.
- KINCAID R. L. and M. S. NIGHTINGALE (1988). A rapid non-radioactive procedure for plaque hybridization using biotinylated probes prepared by random primed labelling. *Biotechniques* 6: 42-46.
- LIESI P., J. P. JULIEN, P. VILJA, F. GROSVELD and L. RECHARDT (1986). Specific detection of neuronal cell bodies: *in situ* hybridization with a biotin-labelled neurofilament cDNA probe. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 34: 923-926.
- MCINNES J. L., P. D. VISE, N. HABIL and R. H. SYMONS (1987). Chemical biotinylation of nucleic acids with photobiotin and their use as hybridization probes. *Focus* 9: 1-4.
- MICHAEL J. H. and D. J. FLEMMING (1988). A simplified lysis method allowing the use of biotinylated probes in colony hybridizations. *Analytical Biochemistry* 168: 239-246.
- NIEDOBITEK, G., T. FINN, H. HERBST and H. STEIN (1989). *In situ* hybridization using biotinylated probes. An evaluation of different detection systems. *Path. Res. Pract.* 184: 343-348.
- PITCHER, D. G., R. J. OWEN, P. DYAL and B. BECK (1987). Synthesis of a biotinylated DNA probe to detect ribosomal RNA cistrons in *Providencia stuartii*. *FEMS Microbiology Letters* 48: 283-287.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press. U.S.A.