

SÍNTESIS DE UN NUEVO FOSFORAMIDITO NUCLEOSÍDICO BIOTINILADO PARA LA PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS MULTIBIOTINILADOS

✉ José Ángel Silva, Víctor Jiménez y Magalys Campos

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado postal 6162, Ciudad de La Habana, CP 10600, Cuba. Telf: (53-7) 21 8164; Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: victor.jimenez@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Here, we report the chemical synthesis of a biotinylated nucleoside (2'-deoxyadenosine) at C-8 position, using the 1,2-bis-(aminoethoxy)ethane as a polar spacer. This compound is compatible with automatic oligonucleotide synthesis by phosphoramidite method and allows the site-specific polybiotinylation of the oligonucleotides with a coupling efficiency higher than 98 %. We report the immunoenzymatic recognition of these oligonucleotides immobilized on membrane by the dot-blot technique. We detected 1.6 fmol of target DNA using this oligonucleotides as a probe in a membrane hybridization assay.

Key words: biotin, 2'-deoxyadenosine, phosphoramidite method, oligonucleotides

Biotecnología Aplicada 1998;15:154-158

RESUMEN

Se reporta la síntesis química de un nucleósido (2'-desoxiadenosina) biotinilado en la posición C-8 y con un espaciador de cadena polar [1,2-bis-(aminoetoxi) etano], para ser utilizado en la preparación de oligonucleótidos multibiotinilados mediante reacción en fase sólida. Este compuesto es compatible con la síntesis automática por el método del fosforamidito y permite la multibiotinilación sitio específica de los oligonucleótidos, con una eficiencia de acoplamiento superior al 98 %. Se muestra el reconocimiento de estos oligonucleótidos inmovilizados en membrana por la técnica de dot-blot y un ensayo de hibridación en membrana donde se utiliza como sonda un oligonucleótido biotinilado por esta técnica y en el que se detectan 1,6 fmol de ADN blanco inmovilizado.

Palabras claves: biotina, 2'-desoxiadenosina, método del fosforamidito, oligonucleótidos

Introducción

El marcaje y la detección de ácidos nucleicos es imprescindible en biología molecular. Las hibridaciones en membranas (southern, northern, dot, slot blots, y otros) e *in situ* son utilizadas rutinariamente en la mayoría de los laboratorios. Desde finales de la década pasada han cobrado un gran auge los métodos de marcaje no radiactivos los cuales son más seguros y económicos que los métodos radiactivos, y los grupos reporteros (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc.) son mucho más estables que los isótopos radiactivos (³²P, ³⁵S, ³H, entre otros) (1).

Entre los grupos reporteros más utilizados para oligonucleótidos está la biotina. Esta se puede introducir con relativa facilidad en los oligonucleótidos y presenta ciertas características que la hacen ideal para este tipo de aplicaciones, estas son: su gran afinidad por la avidina y la estreptavidina, la unión entre éstas y la biotina es lo suficientemente específica para garantizar la unión al blanco de interés. Ambas proteínas poseen cuatro sitios de unión por molécula; la molécula de biotina es pequeña (244.31 Da), por lo que usualmente no afecta las propiedades de las moléculas a las que se une (2, 3). Los oligonucleótidos biotinilados se utilizan además en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación en fase sólida, etc. (2-8).

La biotina se puede introducir químicamente en los oligonucleótidos por dos vías: a) por la incorporación de la marca en el extremo HO-5' (9-11) y b) por la incorporación, durante la síntesis en fase sólida del oligonucleótido, de nucleósidos modificados; aquí la marca puede introducirse directamente durante la síntesis o post-sintéticamente. Esta última variante permite la introducción de más de un residuo de biotina por molécula.

Existen reportes sobre el marcaje post-síntesis utilizando la posición C-5 de la 2'-desoxiuridina o la 4-NH₂ de la 2'-desoxicitidina (11, 12), pero este método requiere mucho tiempo y es muy trabajoso ya que hay que purificar dos veces el oligonucleótido, antes del acoplamiento del grupo reportero y después de éste.

El marcaje directo durante la síntesis del oligonucleótido también se ha reportado sobre los nucleósidos pirimidínicos anteriores (13, 14). Este método tiene la ventaja de que el oligonucleótido queda marcado al terminar la síntesis y por lo tanto únicamente se requiere de una sola purificación.

Singh *et al.* (15) realizaron el marcaje de la 2'-desoxiadenosina pero utilizando un espaciador n-alquílico, un marcador fluorescente (dansilo) y la

1. Mansfield ES, Worley JM, McKenzie SE, Surrey S, Rappaport E, Fortina P. Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods. *Molecular and Cellular Probes* 1995;9:145-156.

2. Wilchek M, Bayer EA. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* 1988;171: 1-32.

3. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* 1991;37:625-636.

4. Cocuzza AJ, Zagursky RJ. A simple preparation of 5'-biotinylated oligonucleotides and their use as primers in dideoxy-sequencing of DNA. *Nucleosides & Nucleotides* 1991;10:413-414.

5. Zecchini V, Caucheteux D, Grètry J, Lemaitre M, Dommès J. Detection of nucleic acids in the attomole range using polybiotinylated oligonucleotide probes. *Biotechniques* 1995;19:286-290.

6. Binder T, Berg T, Siegert W, Schmid CA. PCR-SSCP: Nonradioisotopic detection with biotinylated primers and streptavidin-alkaline phosphatase conjugate. *Biotechniques* 1995;18:780-781.

7. Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. Quantification of lane-to-lane loading of poly(A)RNA using a biotinylated oligo(dT) probe and chemiluminescent. *Biotechniques* 1995;19:712-715.

✉ Autor de correspondencia

síntesis del oligonucleótido tiene que realizarse por el método del fosfotriéster.

En el presente trabajo reportamos la síntesis de un nuevo fosforamidito nucleosídico (2'-desoxiadenosina) biotilado en la posición C-8, con un espaciador de cadena polar, el 1,2-bis-(2-aminoetoxi)etano, para ser utilizado en la preparación de oligonucleótidos multibiotilados mediante el método del fosforamidito. Según nuestro conocimiento no se ha reportado la síntesis de un derivado biotilado de la 2'-desoxiadenosina con similares características a este, ni existe comercialmente. Con el uso de la técnica de dot blot se demuestra la presencia del marcaje biotilado en los oligonucleótidos.

Materiales y Métodos

Cromatografía

La cromatografía de capa fina (CCF) se realizó sobre sílica gel 60 en placas de aluminio con indicador fluorescente F₂₅₄ (Merck). Los solventes utilizados fueron: solvente A: CH₂Cl₂/MeOH (9:1, v:v), solvente B: CH₂Cl₂/MeOH/TEA (8,8:1:0,2: v:v:v). Los compuestos se visualizaron con luz ultravioleta. Los compuestos con grupos aminos libres se detectaron por aspersión con ninhidrina 0,2 % en acetona y posterior calentamiento, con ella se detectó una coloración marrón. Los residuos de biotina se detectaron al observarse una coloración roja por aspersión con 4-(N,N-dimetilamino)-cinamaldehído 0,2 % en EtOH/H₂SO₄ (8:2, v:v) y los compuestos que tienen grupos dimetoxitritilo se visualizaron con HClO₄/EtOH (1:1, v:v), por observación de una coloración naranja. Para la cromatografía en columna se utilizó sílica gel 60 (Merck) y como fase móvil se utilizaron diferentes gradientes de CH₂Cl₂/MeOH.

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en un equipo modular con dos bombas (LKB), espectrofotómetro Knauer y columna de poliestireno de fase inversa (Hamilton PRP-1 250 x 4,1 mm).

Espectroscopía

Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro de doble sector (Jeol JMS-HX110HF) con bombardeo de átomos rápidos como fuente de ionización (cañón FABMS-FAB11). Se utilizó xenón ultrapuro como gas de bombardeo.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) se registraron en un equipo de 250 MHz (Brüker, modelo AC-250F). Se utilizó clorofórmio deuterado como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna.

Síntesis de 2-nitrofeniléster de biotina

Este compuesto se sintetizó por medio de una reacción de esterificación entre el 2-nitrofenol y la biotina según Pieleš *et al.* (14). Se obtuvieron 7 g para un

70 % de rendimiento. ¹H-RMN: δ 1,5-1,9(6H, m, 3CH₂), δ 2,7(2H, t, CH₂COOAr), δ 2,9(2H, d, CH₂S), δ 3,2(1H, c, CHS), δ 4,4-4,6(2H, m, CHNHCO), δ 5,4(1H, s, NH), δ 6,0(1H, s, NH), δ 7,2-8,2(4H, m, ArH). M/Z = 366.

Síntesis del Bis-(N,N-diisopropilamino)-β-cianoetilfosforamidito

La síntesis de este agente de fosfitilación se desarrolló según Nielsen *et al.* (16). Se obtuvieron 60 g para un 69 % de rendimiento. M/Z = 301.

Síntesis de 8-bromo-2'-desoxiadenosina. (I)

Al procedimiento original (17) se le adicionó un paso de purificación por recristalización del producto con metanol y tratamiento previo con carbón activado para eliminar impurezas coloreadas. Se partieron de 10 g de 2'-desoxiadenosina y se obtuvieron 8,33 g para un 83,3 % de rendimiento. M/Z = 330,2 (doble señal).

Síntesis de N⁶-Benzoil-8-bromo-5'-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenosina. (III)

La 8-bromo-2'-desoxiadenosina, (8 g, 24,2 mmol), se disolvió en piridina seca y se evaporó a sequedad; esta operación se repitió cuatro veces más. Se resuspendió en 100 mL de piridina y se le adicionaron 15,2 mL (121,0 mmol) de trimetilclorosilano (Fluka) gota a gota, con agitación y en baño de hielo-agua. Después de 30 min de agitación se añadieron de la misma forma 14,1 mL (121,0 mmol) de cloruro de benzoilo (Merck), una vez terminada la adición se retiró el enfriamiento y se continuó agitando durante 2 h. Se realizó CCF en solvente A y se observa una sola mancha asociada al frente del solvente. La reacción se detuvo con la adición de 53 mL de agua fría. Después de 15 min se procedió a realizar una hidrólisis con 53 mL de NH₄OH (15 M) (Merck); a los 30 min se realizó CCF en solvente A, y apareció una mancha de R_f = 0,53. La mezcla de reacción se concentró hasta la mitad de su volumen y se extrajo con éter dietílico (cinco veces). El producto comenzó a precipitar poco tiempo después de empezada la extracción con éter.

Este producto, N⁶-benzoil-8-bromo-2'-desoxiadenosina (II), se coevaporó de 3 a 4 veces con piridina seca. Se resuspendió en 90 mL de piridina y se le adicionaron 9,8 g (29 mmol) de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (Dalton). La reacción se detuvo con 100 mL de agua fría cuando por CCF en solvente A, se observó la desaparición de la mancha de R_f = 0,53 y la aparición de una de R_f = 0,78. Se extrajo con CH₂Cl₂ (cuatro veces). Se evaporó a sequedad y luego se coevaporó con tolueno (tres veces). El producto se purificó en columna de sílica gel utilizando como fase móvil un gradiente CH₂Cl₂/MeOH aumentando de 0 a 1 % la concentración de MeOH. Se obtuvieron 11 g (62 %). R_f = 0,78 en solvente A. M/Z = 737 (doble señal). ¹H-RMN: δ 1,3(1H, bs, OH), δ 2,4(2H, m, H-2'), δ 3,4(2H, m, H-5'), δ 3,6(1H, m, H-4'), δ 3,8(6H,

8. Szakacs JG, Livingston SK. mRNA in situ hybridization using biotinylated oligonucleotide probes: implications for the diagnostic laboratory. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1994;24:324-338.

9. Kumar P, Bhatia D, Garg BS, Gupta KC. An improved method for synthesis of biotin phosphoramidites for solid phase biotinylation of oligonucleotides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1994;4(14):1761-1766.

10. Pon RT. A long chain biotin phosphoramidite reagent for the automated synthesis of 5'-biotinylated oligonucleotides. *Tetrahedron Letters* 1991;32:1715-1718.

11. Eckstein F. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press Oxford, 1991.

12. Sprout BS, Lamond AI, Beijer B, Nemer P, Ryder U. Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetrabiotinylated derivatives: novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases. *Nucleic Acids Res* 1989;17(9):3373-3386.

13. Rogel A, Bazin H, Teoule R. Synthesis and use of labelled nucleoside phosphoramidite building blocks bearing a reporter group: biotiny, dinitrophenyl, pyrenyl and dansyl. *Nucleic Acids Res* 1989;17:7643-7651.

14. Pieleš U, Sprout BS, Lamm GM. A protected biotin containing deoxycytidine building block for solid phase synthesis of biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1990;18:4355-4360.

15. Singh D, Kumar V, Ganesh KN. Oligonucleotides, part 5+ synthesis and fluorescence studies of DNA oligomers d(AT)₅ containing adenines covalently linked at C-8 with dansyl fluorophore. *Nucleic Acids Res* 1990;18(11):3339-3345.

16. Nielsen J, Dahl O. Improved synthesis of (iPr₂N)₂POCH₂CH₂CN. *Nucleic Acids Res* 1987;15(8):3626.

17. Ikehara M, Kaneko M. Selective sulfonylation of 8-bromo-adenosine derivatives and an alternate synthesis of 8,2'- and 8,3'-cyclo-nucleosides. *Tetrahedron* 1970;26:4251-4259.

s, 2OCH₃), δ 4,2(1H, m, H-3'), δ 5,0(1H, m, H-1'), δ 6,5-8,0(18H, m, ArH), δ 8,6(1H, s, H-2).

Síntesis de N⁶-benzoil-8-(N-1,2-bis-(2-aminoetoxi)etil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenosina. (IV)

El compuesto III, 10 g (13,6 mmol), y 10 g (67,5 mmol) de 1,2-bis-(2-aminoetoxi)etano (Fluka) se pusieron a refluir en etanol absoluto. Una vez terminada la reacción se evaporó a sequedad y se procedió a purificar en columna de sílica gel utilizando un gradiente en el que se aumentó de 0 a 5 % la concentración de MeOH en CH₂Cl₂. El compuesto se obtuvo en forma de una espuma blanca, 6,4 g (59 %). R_f = 0,36 en solvente B. M/Z = 803,7. ¹H-RMN: δ 1,3(1H, bs, HO), δ 2,8(4H, m, CH₂-NH), δ 3,1(4H, m, H-3'), δ 3,5(4H, m, 2CH₂O), δ 3,8(6H, s, 2OCH₃), δ 4,2(1H, m, H-3'), δ 4,9(1H, m, H-1'), δ 6,5-8,0(18H, m, ArH), δ 8,5(1H, s, H-2).

Síntesis de N⁶-benzoil-8-(N-1,2-bis-(2-aminoetoxi)etil-N'-biotinil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenosina. (V)

Se hicieron reaccionar 6 g (7,5 mmol) del compuesto IV con 3,0 g (8,2 mmol) de 2-nitrofeniléster de biotina en DMF seca y 1 mL de TEA. Después de culminada la reacción se evaporó a sequedad y se purificó en columnas de sílica gel con un gradiente de MeOH en CH₂Cl₂ aumentando de 0 a 4 % la concentración de MeOH. Se obtuvieron 4,8 g (61,2 %) en forma de una espuma blanca. R_f = 0,41 en solvente B. M/Z = 1030,2. ¹H-RMN: δ 1,3-1,9(6H, m, 3CH₂), δ 2,5(2H, t, CH₂COOR), δ 2,9(2H, d, CH₂S), δ 3,1(4H, m, 2CH₂O), δ 3,5(4H, m, CH₂O), δ 3,7(6H, s, CH₃O), δ 4,1(1H, m, H-3'), δ 4,8(1H, m, H-1'), δ 6,5-8,0(18H, m, ArH), δ 8,4(1H, s, H-2).

Síntesis de N⁶-benzoil-8-(N-1,2-bis-(2-aminoetoxi)etil-N'-biotinil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxiadenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N'-diisopropilamino) fosforamido. (VI)

El compuesto V, 4,5 g (4,4 mmol), se coevaporó tres veces con THF anhidro. Se disolvió en THF anhidro y se le adicionaron 1,9 g (6,2 mmol) de bis-(N,N'-diisopropilamino)-β-cianoetilfosforamido y 12 l mL de una solución 0,4 M de tetrazol (Dalton) en CH₃CN anhidro. Al culminar la reacción se filtró y se evaporó a sequedad. Se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ al 5 %. Después de secar la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro se purificó el producto en columna de sílica gel utilizando un gradiente de MeOH en CH₂Cl₂ aumentando de 0 a 3 % la concentración de MeOH. El producto se obtuvo en forma de una espuma blanca, 3,2 g (59 %). R_f = 0,68 en solvente A. M/Z = 1 230. ¹H-RMN: δ 1,3(12H, d, 4CH₃), δ 1,4-1,9(6H, m, 3CH₂), δ 2,2(2H, t,

CH₂CN), δ 2,6(2H, t, CH₂COO), δ 2,8(2H, d, CH₂S), δ 3,1(4H, m, 2CH₂O), δ 3,5(6H, m, 3CH₂O), δ 3,8(6H, s, 2CH₃O), δ 4,2(1H, m, H-3'), δ 4,5(1H, m, H-1'), δ 6,5-8,0(18H, m, ArH), δ 8,6(1H, s, H-2).

Síntesis de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un equipo Gene Assembler Plus (Pharmacia) mediante reacciones en fase sólida y por medio del método del fosforamido. Para la adición el compuesto VI se disolvió en acetonitrilo seco a una concentración de 0,1 mol/L y se introdujo en una de las posiciones adicionales de la válvula 1 de la máquina sintetizadora, el tiempo de acoplamiento se aumentó a 6 min. La purificación se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia. La secuencia que se utilizó en los ensayos (Tabla 1) fue empleada anteriormente en la amplificación por PCR del gen de la TrxA (Thioredoxina) de *Escherichia coli* K12, su clonación y expresión bajo el control de promotores de bacteria (18).

Aplicación de las muestras en membrana mediante dot-blot

Los cuatro oligonucleótidos biotinilados descritos anteriormente (Tabla 1) así como el oligonucleótido sin marcar (control negativo) fueron diluidos en TE 1x (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6) en forma seriada (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg y 10 pg) en un volumen final de 100 μL. Estas muestras se calentaron a 70 °C durante 10 min. y puestas en baño de hielo-agua de forma inmediata.

Para el caso del ensayo de hibridación, el plasmidio pTx6, portador del gen de la TrxA de *E. coli* K12, blanco de nuestra sonda; fue alicuotado (50 ng, 5 ng, 500 pg, 250 pg, 50 pg y 5 pg) en TE 1x en un volumen final de 100 μL. Se aplicó 1 μg de control negativo, plasmidio pUC 19 (19), 20 veces más que nuestro ADN homólogo. Las muestras se calentaron a 100 °C por espacio de 10 min y luego colocadas inmediatamente en baño de hielo-agua.

Las muestras, tanto de los oligonucleótidos como del ADN plasmídico, se aplicaron a vacío con un equipo Manifold (Schleicher & Schuell). La transferencia se realizó según Mason y Williams (20). El soporte utilizado en ambos análisis por dot blot fue una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) y las muestras se fijaron con luz ultravioleta, 3 min a 312 nm.

18. Campos M, Estrada MP, Rubiera R, Hernández O, Leonart R, de la Fuente J et al. Bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* K12 Thioredoxin cloning and high expression. *Biocología Aplicada* 1990;7(3):313-319.

19. Yanish-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33(1):103-119.

20. Mason PJ, Williams JG. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, 1990, chapter 5, 119.

Tabla 1: Secuencias de los oligonucleótidos sintetizados.

S/B	5'-ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGAC-3'
A	5'-ATGAGCGATAAAATTATTCXCCTGACTGAC-3'
B	5'-ATGAGCGXTAAATTATTCACCTGXCTGAC-3'
C	5'-ATGXGCGATAAAATTATTCXCCTGACTGX-3'
D	5'-ATGXGCGATXAAATTATTCXCCTGACTGX-3'

S/B: oligonucleótido sin biotina y X: 2'-desoxiadenosina biotinilada.

Hibridación

La membrana con el ADN plasmídico inmovilizado se prehibridó durante 1 h a 60 °C en la solución de prehibridación [6X SSC, 0,2 % SDS, 10X Denhardt (21), 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado].

Esta membrana se sometió al proceso de hibridación por incubación, 2 h a 45 °C, en la solución de hibridación (6X SSC, 10X Denhardt, 100 µg/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado) y el oligonucleótido C (Tabla 1) como sonda a una concentración de 500 ng/mL (22). Ambos procesos se realizaron en bolsas de nylon herméticamente selladas. A continuación, la membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente en 6X SSC, 0,5 % SDS y luego se realizó otro lavado a 42 °C en 6X SSC, 0,1 % SDS.

Detección de las muestras inmovilizadas

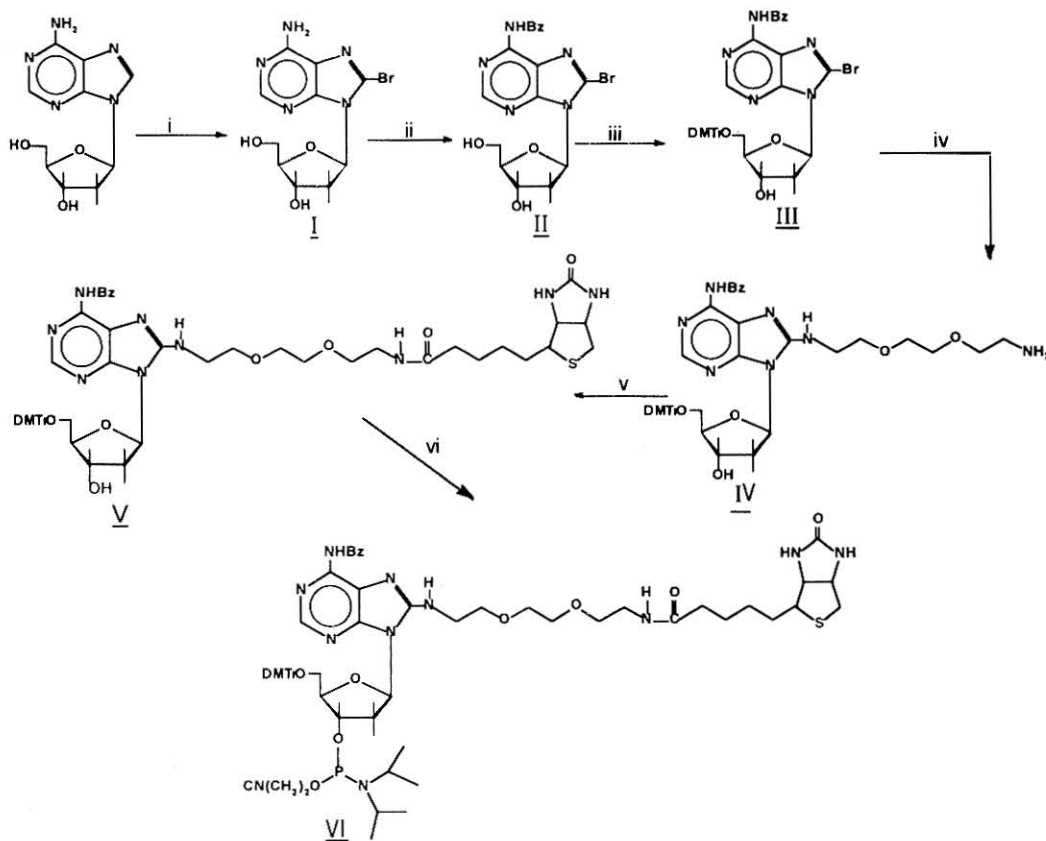
Las dos membranas, tanto la de los oligonucleótidos inmovilizados como la del ensayo de hibridación, se bloquearon 30 min en 5 % (m/v) de caseína, 0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5. A continuación se realizó otra incubación de 30 min con la solución

anterior, fresca, conteniendo 2 µL/mL del conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa (Amersham). Se lavó dos veces durante 15 min en 0,1 M ácido maleico, pH 7,4, 0,03 % Tween 20. La actividad de la peroxidasa se desarrolló en presencia de las soluciones de revelado del sistema ECL (Amersham).

Resultados y Discusión

La síntesis del monómero biotinilado se realizó siguiendo el esquema de la Figura 1. La reacción de bromación de la 2'-desoxiadenosina se realiza para activar la posición C-8 de la base nitrogenada y de esta forma acoplar, por esa posición, un espaciador y luego a éste, la biotina. Se utiliza esa posición porque no interviene en los enlaces por puente de hidrógeno entre la adenina y la timina cuando se forma la doble cadena y presenta cierta tolerancia estérica en la doble hélice (11).

Los pasos posteriores de protección del grupo amino de la base y la reacción de tritilación del grupo hidroxilo de la posición 5' se realizaron siguiendo los métodos tradicionales de protección de nucleósidos para la síntesis de oligonucleótidos (23).



21. Denhardt DJ, Dressler, Ray DS. The single stranded DNA phages. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1978.

22. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. Molecular cloning: a practical laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

23. Gait MJ. Oligonucleotide synthesis: a practical approach. IRL Press, Oxford, 1984.

Figura 1. Esquema de reacciones utilizado en la síntesis del compuesto VI. i: $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$; ii: trimetilclorosilano, cloruro de benzoilo, hidróxido de amonio; iii: cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo/piridina; iv: 1,2-bis-(aminoetoxi)etano/etanol; v: 2-nitrofeniléster de biotina/dimetilformamida y vi: bis-(N, N-dimetilamino)-β-cianoetilfosforamido, tetrazol.

El espaciador es necesario para facilitar el reconocimiento posterior de la biotina por la avidina o la estreptavidina. En este caso se utilizó el 1,2-bis-(aminoetoxi) etano, y no uno con una cadena alquímica, para aumentar la polaridad de la molécula en su conjunto y así lograr compatibilidad con la síntesis automática en fase sólida por el método del fosforamidito.

En la síntesis de los oligonucleótidos se utilizó un tiempo de acoplamiento de 6 min debido a que con ese tiempo se obtuvieron eficiencias de acoplamiento superiores al 98,0 %. Con tiempos menores (1,5; 3,0 y 5 min) la eficiencia de acoplamiento fue inferior a 97,5 %, y sucesivos incrementos en el tiempo de acoplamiento no conllevó a un incremento de la eficiencia. La purificación se realizó por HPLC. En la Figura 2 se observa la diferencia en los tiempos de retención de estos oligonucleótidos debido a las diferencias en el número de restos de biotina.

Es de destacar también que el compuesto VI es estable disuelto en acetonitrilo y en atmósfera de argón seco al menos durante tres semanas al igual que los fosforamiditos no biotinilados.

La Figura 3 muestra el resultado de inmovilizar los cuatro oligonucleótidos (Tabla 1) en membrana de nylon por dot-blot. Como se puede observar, la intensidad de la señal aumentó proporcionalmente con el número de biotinas debido a que aumenta el número de conjugados enzimáticos que se pueden unir a la molécula inmovilizada. Esto ocurre así hasta el oligonucleótido C, que presenta tres biotinas por molécula, del cual se detectaron 5 fmol (50 pg). Al seguir aumentando el número de biotinas por

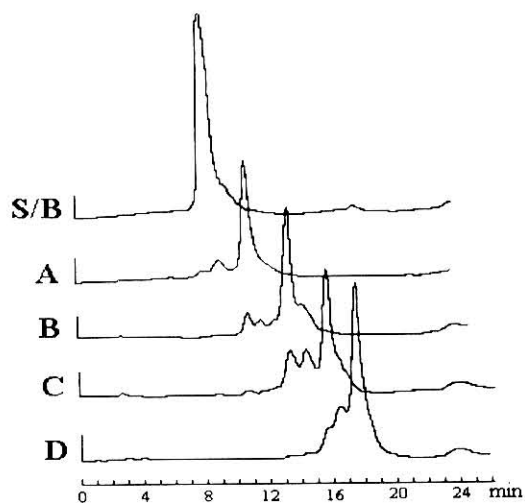


Figura 2. Cromatograma de los diferentes oligonucleótidos biotinilados sintetizados. S/B: sin biotina; A: oligonucleótido con una molécula de biotina; B: con dos; C: con tres y D: con cuatro. Se utilizó un gradiente en el cual se aumenta de 0 a 80 % el solvente B en 40 min, flujo: 1,00 mL/min; solvente A: acetato de amonio 0,2 M, metanol 13 %, pH 7,0; solvente B: metanol.

Recibido en septiembre 1997. Aprobado en noviembre de 1997.

molécula la señal disminuyó y esto se debe posiblemente a la presencia de efectos estéricos, que afectan la unión del conjugado enzimático e imposibilitan el reconocimiento de los sitios de unión. Este ensayo se repitió tres y se obtuvo obteniéndose en cada caso los mismos resultados.

El oligonucleótido con tres grupos de biotina fue también utilizado como sonda en la detección del plasmidio pTx6, portador del gen de la TrxA de *E. coli* K12 (Figura 4) con lo cual se pudo detectar 5 ng (1,6 fmol). Esto nos demuestra que el marcaje soporta todas las condiciones a las que se somete la sonda, y que los oligonucleótidos biotinilados por esta vía pueden ser utilizados como sondas ya que son capaces de reconocer secuencias complementarias. Se realizaron varios experimentos y se probaron empíricamente varias temperaturas de hibridación, por lo se encontró que las mejores condiciones de estringencia para este oligonucleótido, se obtienen a 45 °C y no alrededor de 65 °C como debía esperarse teóricamente por lo que el marcaje afecta la temperatura media de fusión (T_m). Este experimento se repitió cuatro veces y en cada caso los resultados fueron similares, de esta forma se demostró su reproducibilidad.

Conclusiones

Se sintetizó un nuevo fosforamidito nucleosídico biotinilado que es compatible con la síntesis automática de oligonucleótidos, su eficiencia de acoplamiento durante la síntesis es superior al 98 % y permite obtener oligonucleótidos multibiotinilados, los cuales reconocen sus secuencias complementarias y pueden ser detectados por métodos inmunoenzimáticos.

Agradecimientos

Agradecemos la ayuda brindada por la licenciada Mabel Alamino del Laboratorio de Antígenos Sintéticos de la Universidad de la Habana en el registro de los espectros de ^1H -RMN, a los integrantes del Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana y a la Dra. Lila Castellanos por la revisión crítica de este manuscrito.

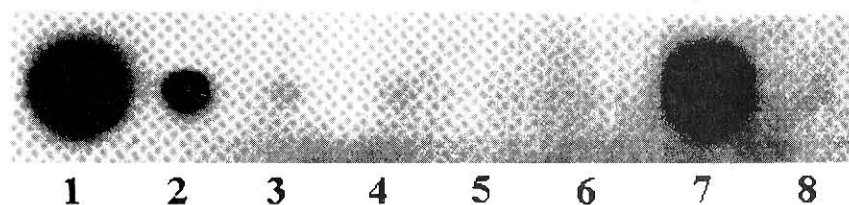


Figura 4. Ensayo de hibridación utilizando el oligonucleótido C como sonda. 1-6 corresponden a 50 ng, 5 ng, 500 pg, 250 pg, 50 pg y 5 pg de DNA blanco respectivamente. 7: oligonucleótido C y 8: control negativo (plasmidio pUC 19).

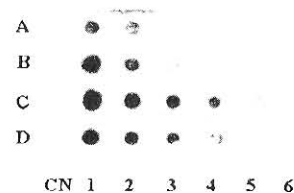


Figura 3. Oligonucleótidos biotinilados transferidos a membrana por "dot-blot". A-D corresponden a cada uno de los oligonucleótidos. CN: control negativo utilizado, que fue el mismo oligonucleótido sin marcar. 1-6 corresponden a 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 50 pg y 10 pg de oligonucleótido biotinilado, respectivamente.