

М. В. Личина, А. В. Шугалий

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЗОНДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОЛИ СЕРЕБРА.

### 2. ОКРАШИВАНИЕ МОНОМЕРА И ОДНОНИТЧАТОЙ ДНК

*Образование окрашенного металлокомплекса на основе аденина включает последовательные этапы модификации основания формальдегидом, присоединение этаноламина и удлинение боковой цепочки за счет нескольких метоксильных групп. Окраска формируется после добавления серебра, конечный разветвленный металлокомплекс обладает, кроме того, флуоресцентными свойствами. На однонитчатой ДНК наиболее быстро развивается фиолетовая окраска. Уровень модификации 10—15 %, не препятствующий образованию устойчивых дуплексов при молекулярной гибридизации, достигается при рН 8,2 за 15—20 мин.*

**Введение.** Полученный окрашенный металлокомплекс [1] включает олигомерные этаноламино-формальдегидные цепочки с брутто-формулой  $\text{NC}_5\text{H}_{13}\text{O}_4$ , образующие координационные связи с ионом серебра. Формирование окраски комплекса в растворе (от фиолетовой до оранжево-красной) определяется числом связанных с Ag элементарных цепочек, фиолетовой окраске соответствует одна координационная связь, оранжево-красной — от 4 до 6 подобных связей.

Образование олигомерной цепочки — основного компонента металлокомплекса — достаточно сложный процесс, по-видимому, двухпараметрический, зависящий от рН раствора и соотношения этаноламин : формальдегид. Присутствие в инкубационной среде дополнительных иницирующих центров, которыми являются свободные амино- и иминогруппы оснований ДНК, вносит неопределенность в момент инициации формирования этаноламино-формальдегидной цепочки, а также на стадии элонгации или разветвления уже образованных цепочек. Кроме того, конденсация формальдегида (в том числе, очевидно, и на доступных группах оснований) может проявляться и в виде димера [2], что способно откорректировать предложенный нами в [1] механизм образования цепи. Поэтому в общем контексте задачи выработки оптимального режима получения окрашенного ДНК-зонда мы специально изучили вопрос о взаимодействии компонентов металлокомплекса со свободными основаниями. Помимо этого, в работе представлены результаты модификации однонитчатой ДНК как в плане установления характеристик окрашивания в зависимости от различных условий инкубации, так и для выбора требуемого уровня модификации ДНК-зонда.

**Материалы и методы.** Хроматографию исходного и модифицированного аденина на пластинках «Silufol UV-254» осуществляли либо в цитратном буфере, 0,1 М Na, рН 7,5 (рис. 1, 2), либо в 0,03 М боратном буфере, рН 8,5 (рис. 4). Количество нанесенного материала составляло 1—2 мкг. При хроматографии на бумаге FN1 (Германия) также использовали 0,03 М боратный буфер. Для цветной окраски пятен бумажную хроматограмму после ее просушки пропитывали азотнокислым серебром, растворенным в том же буфере в концентрации 0,5 мг/мл.

Фотографическую регистрацию пластин на пленке «Микрат-изопан» со светофильтром ЗС-1 проводили в отраженном УФ-свете ультрамикроскопа УИ-1. Флюоресцирующие пятна на бумажной хроматограм-

© М. В. ЛИЧИНА, А. В. ШУГАЛИЙ, 1991

ме регистрировали так же, как и УФ-поглощающий материал на пластинках «Silufol».

Для проведения кинетики модификации однонитчатой ДНК коммерческий препарат ДНК селезенки крупного рогатого скота (Олайн), растворенный в 0,02 М Na-цитратном буфере и доведенный до концентрации 50—100 мкг/мл, предварительно прогревали до 95 °С и охлаждали во льду. Инкубационную смесь, содержащую азотнокислое серебро, этаноламин и формальдегид, приготавливали, как указано в работе [1]; рН смеси регулировали добавлением необходимого количества

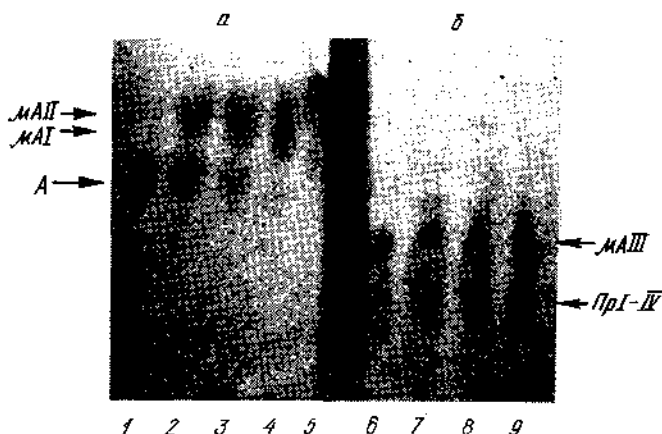


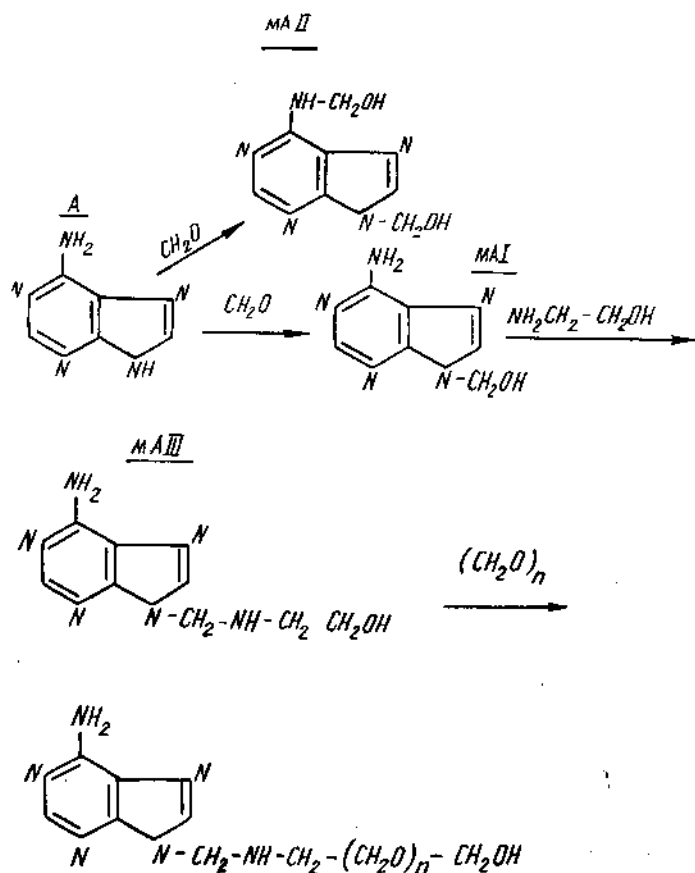
Рис. 1. Хроматография на пластинках «Silufol» продуктов модификации аденина: а — аденин с формальдегидом, А+ФА (1 — исходный А; 2 — А+ФА, время реакции 0,5 ч; 3 — 2 ч; 4 — 12 ч; 5 — 120 ч); б — полная реакционная смесь, включающая аденин, формальдегид и этаноламин, А+ФА+ЭА (6 — инкубация смеси в течение 2 ч; 7 — инкубация А+ФА в течение 2 ч, добавление ЭА и постинкубация 10 мин; 8 — то же, что 7, но постинкубация 0,5 ч; 9 — постинкубация 1,5 ч). Цифры внизу — нумерация полос, стрелками обозначены положения исходного аденина и продуктов реакции (см. схему в тексте)

10 %-й лимонной кислоты. После инкубации каждой порции однонитчатой ДНК в нужной реакционной смеси ее диализовали против соответствующего буфера со значением рН, отвечающим окраске данной фракции [1], для удаления так называемой растворной окраски, образуемой без участия ДНК. Окраску однонитчатой ДНК регистрировали на спектрофотометре «Spectord UV-VIS» при длине волны 410 нм.

**Результаты и обсуждение.** В инкубационной смеси без ДНК окрашенный металлокомплекс образуется за счет присоединения к иону серебра полностью сформированной цепочки из четырех молекул формальдегида и одной молекулы этаноламина [1]. Представленные на рис. 1 фотографии пластинок «Silufol» позволяют оценить, как формируется цепочка на свободных N-группах основания. При этом четко дискриминируются две возможности — постепенное удлинение цепи на основании или присоединение к нему уже сформированной метоксильной цепочки из четырех молекул формальдегида.

Мы использовали два варианта реакционной смеси — без этаноламина (рис. 1, а) и с ним (рис. 1, б). Присутствующий в смеси формальдегид сначала присоединяли к одному из двух возможных реакционных сайтов на аденине — иминогруппе [3]. В сроки инкубации 0,5 и 2 ч наблюдалось появление единственного продукта с большей, нежели у исходного аденина, хроматографической подвижностью (2-я и 3-я полосы на рис. 1, а). Он обозначен на рис. 1(а) и на схеме, как МАI (модифицированный AI). При этом доля исходного аденина прогрессивно снижается и к 12-му ч (4-я полоса) в реакционной смеси присутствует только МАI. В дальнейшем происходит реакция по NH<sub>2</sub>-группе аденина [4], и к МАI добавляется МАII — модифицированный аденин с двумя молекулами формальдегида, присоединенными к NH- и NH<sub>2</sub>-

группам. Через 120 ч в реакционной смеси имеется только МАII — конечный продукт реакции аденина с формальдегидом (5-я полоса).



В присутствии этаноламина (рис. 1, б) происходит его присоединение к модифицированному формальдегидом аденину с образованием МАIII (см. схему). Из сравнения полос 6 и 7 однозначно следует, что первым актом реакции в подобной трехкомпонентной смеси является формирование комплекса аденин — формальдегид и уже к этому модифицированному аденину достраивается этаноламин. Полоса 6 — это инкубация в течение 2 ч смеси аденин + формальдегид + этаноламин (А+ФА+ЭА), а полоса 7 — та же инкубация смеси А+ФА с добавлением ЭА и постинкубацией 10 мин. В обоих случаях получен один и тот же продукт МАIII с меньшей, нежели у МАI, подвижностью в использованном нами системе (0,1 М Na-цитратный буфер, рН 7,5).

Сразу же после образования МАIII начинается конденсация на его боковой цепочке молекул формальдегида. На полосах 7—9, отвечающих инкубации с ЭА в течение 0,15—1,5 ч, появляется гетерогенная полоса с минимальной подвижностью, очевидно, смесь Пр I—IV. Последовательное исчезновение в реакционной смеси МАIII и появление продуктов конденсации молекул формальдегида ясно прослеживается на хроматограмме рис. 2 для времен инкубации 7—48 ч. Сканограмма на рис. 3 отражает количественную сторону изменения доли МАIII и продуктов реакции I—IV. Увеличение времени инкубации сопровождается уменьшением МАIII и одновременным возрастанием количества продуктов I—IV, формирующих на рис. 2 полосу с минимальной подвижностью при временах инкубации 7—48 ч. Естественно, что в этом гетерогенном наборе могут присутствовать и продукты, полученные из МАII, т. е. с разветвлениями по обоим реакционным центрам — NH-

группе гетероцикла и экзоциклической  $\text{NH}_2$ -группе, хотя их доля для аденина может быть и невелика [5].

Подбором хроматографической системы мы добились разрешения суммарной полосы для Пр I—IV на ряд отдельных компонентов (рис. 4). Этим компонентам отвечают, как мы считаем, индивидуальные продукты с одношаговым увеличением длины боковой оксиметиленовой цепочки. Если учесть, что при нанесении на старт минимальных количеств препарата (0,2—0,5 мкг) в зоне с максимальной хроматографической подвижностью мы разрешали дуплет полос (очевидно,

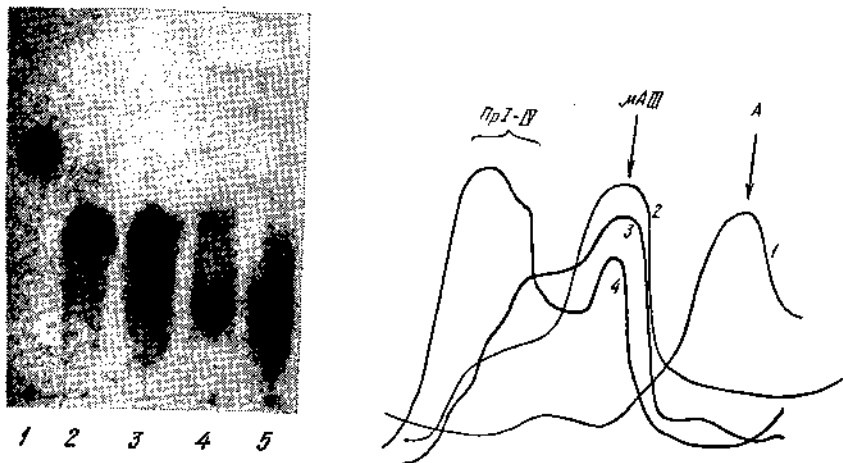


Рис. 2. Продукты модификации аденина в полной реакционной смеси А+ФА+ЭА: 1 — исходный А; 2 — инкубация в течение 1 ч; 3 — 7 ч; 4 — 18 ч; 5 — 48 ч

Рис. 3. Сканограмма хроматографической пластины, изображенной на рис. 2. Обозначения кривых соответствуют нумерации полос, стрелками указано положение продуктов

мАIII и Пр I, обозначен горизонтальной штриховой стрелкой), то на рис. 4 представлены, по-видимому, все классы получаемых в процессе реакции продуктов — от Пр I до Пр IV; они отмечены стрелками. С возрастанием времени инкубации до 42 ч основная доля продуктов возвращена Пр IV.

Окраска металлокомплекса появляется после добавления в реакционную смесь серебра. Для хроматографически «разогнанных» продуктов реакции аденина с формальдегидом и этаноламином единственным возможным способом окраски является обработка конечной хроматограммы раствором азотнокислого серебра, так как предварительно окрашенные продукты не хроматографируются и остаются на старте из-за повышенной адсорбции. Мы провели подобную обработку, при этом окрашивались только конечный продукт, Пр IV (вероятно, и возможные производные мАII), в минимальной степени — Пр III, а исходный аденин и мАIII оставались неокрашенными и детектировались только как темные поглощающие пятна при сквозном УФ-просвечивании бумажной хроматограммы. Отметим, что для данной системы (0,03 М боратный буфер, pH 8,5) происходит инверсия хроматографической подвижности на бумаге по сравнению с пластинкой «Silufol»: минимальной подвижностью обладает исходный аденин, далее мАIII и максимальной — разветвленные Пр III—IV. Их значения  $R_f$  в использованной нами системе составляют 0,32; 0,65; 0,80 и 0,87 соответственно.

При боковом освещении бумажной хроматограммы УФ-светом дополнительно зарегистрировано появление яркого флуоресцирующего пятна в той позиции, где локализован фиолетово окрашенный комплекс с максимальной хроматографической подвижностью, т. е. Пр IV со значением  $R_f=0,87$  (рис. 5, а). Существенной особенностью феномена свечения является то, что свойства флуоресценции Пр IV проявляются и

в отсутствие Ag, который необходим только для его окраски. На рис. 5 (б) схематически представлено флуоресцирующее пятно (сплошная стрелка), а также пятна, отмеченные штриховыми стрелками. Они детектируются как фиолетово окрашенный продукт (в месте флуоресценции) или УФ-поглощающий материал (остальные пятна) и соответствуют от старта мАИП, промежуточному Пр III и конечному Пр IV.

Приведенные данные хроматографии однозначно свидетельствуют о механизме образования металлокомплекса на основе аденина по

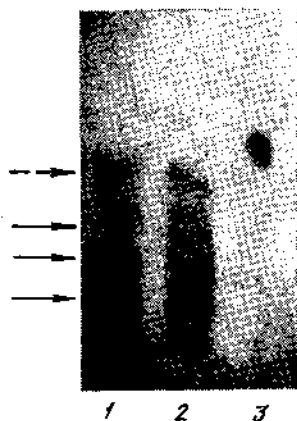
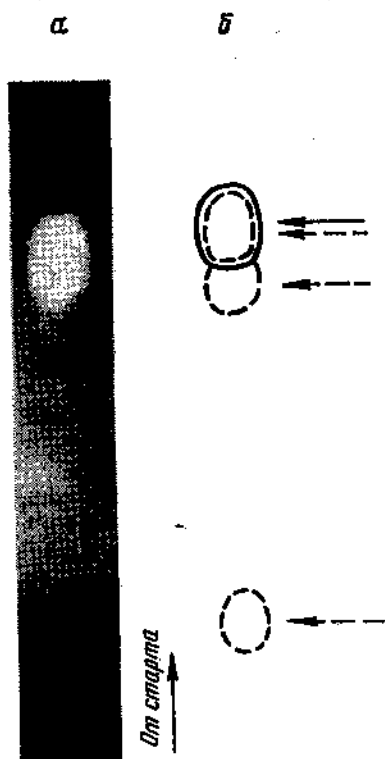


Рис. 4. Продукты модификации аденина при хроматографии пластинок «Silufol» в 0,03 М боратном буфере: 1 — инкубация в течение 20 ч; 2 — 42 ч; 3 — исходный А

Рис. 5. Флуоресцентная регистрация бумажной хроматограммы продуктов модификации аденина в полной реакционной смеси А+ФА+ЭА (а) и схематическое изображение хроматограммы (б). Температура реакции 15 °С, время инкубации 18 ч. Горизонтальными стрелками указаны положения флуоресцирующего пятна, а также набора УФ-поглощающих и окрашенных пятен (штриховые стрелки)



принципу «step-by-step». Флуоресцентные свойства проявляются только на полностью сформированной оксиметиленовой цепочке, окрашивание возникает после добавления Ag.

По сравнению с изученной ранее так называемой растворной окраской, т. е. получением металлокомплекса в растворе без ДНК [1], образование окрашенного ДНК-зонда является более медленным процессом. Это демонстрируют кривые на рис. 6. Здесь кривая 1 получена в инкубационной смеси без однострочной ДНК, остальные — с ДНК, причем каждая точка кривых 2—4 измерена после диализа, проводимого для удаления растворного окрашивания.

При pH 7,2, что соответствует, согласно обозначениям из [1], оранжево-желтой фракции 7, интенсивность растворной окраски достигает насыщения через ~5 ч (кривая 1), а для окрашенной ДНК — только через ~30 ч (кривая 2). Еще более медленная кинетика образования окрашенного комплекса на ДНК наблюдается, если проводить инкубацию при значениях pH, соответствующих красно-оранжевой окраске (рис. 6, кривая 3). Интенсивное окрашивание отмечается через 100—150 ч инкубации, что создает определенные неудобства при частых получениях ДНК-зонда. Кроме того, оранжевая окраска металлокомплекса — это достаточно разветвленная сеть этаноламино-формальдегидных цепочек (во всяком случае, число цепочек >3), и стерические препятствия при гибридизации объемного зонда являются серьезным негативным фактором.

Резким контрастом служит кинетика окрашивания ДНК, проведенная при pH 8,2 (рис. 2, кривая 4). Формирование фиолетовой окраски полностью завершается через 3—4 ч. При этом, однако, интенсивность фиолетового окрашивания оказалось значительно ниже, чем красно-оранжевого. При одинаковых концентрациях компонентов инкубационной смеси уровень насыщения интенсивности окраски, измеренный при 410 нм, равен 12,5—15 ед. оптической плотности для кривых 2 и 3, но лишь 2,5 — для кривой 4. Напомним, что эти оценки получены после

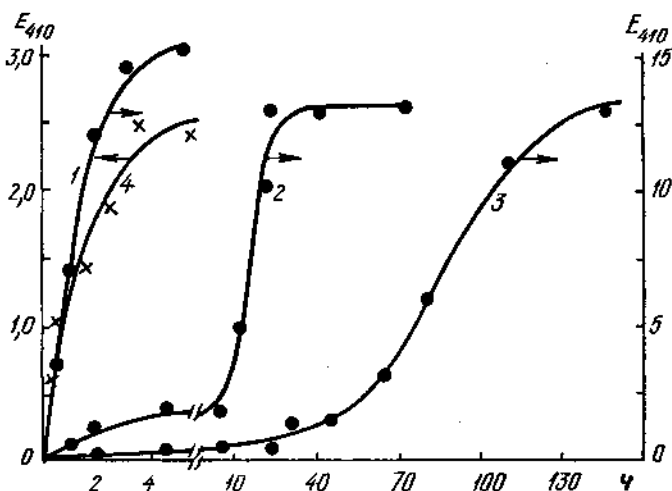


Рис. 6. Зависимость от времени интенсивности окраски в полной реакционной смеси, содержащей все компоненты, кроме ДНК (1), и с ДНК (2—4): 1, 2 — pH 7,2 (оранжево-желтая); 3 — pH 6,9 (красно-оранжевая); 4 — pH 8,2 (фиолетовая окраска). Температура инкубации 30 °С

интенсивного диализа препаратов окрашенного ДНК-зонда для безусловного удаления растворной окраски. Вопрос о том, в какой степени диализ снижает количество оксиметиленовых цепочек за счет возможной диссоциации молекул формальдегида, специально нами не исследовался.

Таким образом, формирование наиболее интенсивной красно-оранжевой окраски ДНК является достаточно медленным процессом, реакция завершается только после недельной инкубации. Существенный выигрыш во времени происходит при фиолетовом окрашивании ДНК, время инкубации снижается до нескольких часов, но налицо явный проигрыш в интенсивности окраски. Мы разработали прием (материалы будут представлены в следующей работе этой серии), который можно условно назвать «достраиванием» или разветвлением окрашенного комплекса, но не на ДНК-зонде, а уже в составе гибрида. Это позволит, по нашим оценкам, повысить чувствительность детектирования комплементарных последовательностей ДНК, как минимум, в 5—10 раз по сравнению с фиолетовым зондом.

Располагая набором кривых типа 1—4 (рис. 6), мы можем совершенно точно дозировать уровень модификации ДНК-зонда. Напомним, что присоединение окрашенной цепочки происходит по «формальдегидным» реакционным N-сайтам, т. е. аминок- и иминогруппам оснований, участвующих в последующем формировании дуплекса при гибридизации. Поэтому увеличение степени модификации, способствующее усилению интенсивности окраски, одновременно ухудшает условия формирования дуплекса за счет нейтрализации возможных сайтов комплементарного спаривания.

Экспериментально подобранный уровень модификации, который обеспечивает образование устойчивых гибридов, составляет 10—15%. Для фиолетового зонда (рис. 6, кривая 4) это отвечает времени инкубации однонитчатой ДНК 15—20 мин.

Предложенный в работе метод получения ДНК-зонда с окрашенным металлокомплексом достаточно прост и существенно выигрывает перед известными радужными зондами, требующими для формирования окраски конъюгаты щелочной фосфатазы с различными комбинациями нафтол-AS-фосфат/дiazониевой соли [6]. Неоспоримым преимуществом является флюоресценция нашего зонда, значительно расширяющая возможности его применения.

*М. В. Личина, О. В. Шугалий*

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЗОНДА С ВИКОРИСТАННЯМ СОЛІ СРІБЛА. 2. ЗАБАРВЛЕННЯ МОНОМЕРА І ОДНОНИТЧАСТОЇ ДНК

### Резюме

Утворення забарвленого металокомплексу на основі аденіна включає послідовні етапи модифікації основи формальдегідом, приєднання етаноламіна та видовження бічного ланцюжка за рахунок декількох метоксильних груп. Забарвлення формується після додавання срібла, кінцевому розгалуженому металокомплексу притаманні флюоресцентні властивості. На однитчастій ДНК найшвидше розвивається фіолетове забарвлення. Рівень модифікації 10—15 %, який не перешкоджає утворенню стійких дуплексів при молекулярній гібридизації, досягається за 15—20 хв. і рН 8,2.

*М. V. Lichina, A. V. Shugaliy*

## THE DNA PROBE CONSTRUCTION WITH USE THE SILVER SALT. 2. THE COLOURING OF THE MONOMER AND THE SINGLE-STRANDED DNA

### Summary

Some aspects of adenine modification as a one of DNA base during the preparing of coloured metal-complex is under investigation. After the N-metoxadenine formation as a result of formaldehyde reaction with the amino/imino groups of the base the lengthing of lateral chain is occurred at the expense of ethanolamine and some metoxy groups. The colour of modified adenine is developed after a silvre addition and the ultimate branched metal-complex possess in addition the fluorescent properties. The kind of clour is determined by pH of incubation media, the violet probe with a 10—15 % modification level is obtained in an alkaline solution in the course of 15—20 minutes.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Личина М. В., Шугалий А. В. Конструирование ДНК зонда с использованием соли серебра. I. Образование и характеристика олигомерных окрашенных цепей // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 2.—С. 38—44.
2. Чичибабин Л. Е. Основные начала органической химии.—М.: ГХИ, 1963.—Т. 1.—910 с.
3. Eyring E. J., Ofengang J. Reaction of formaldehyde with heterocyclic imino nitrogen of purine and pyrimidine nucleosides // Biochemistry.—1967.—6, N 8.—P. 2500—2506.
4. McGhee J. D., Von Hippel P. H. Formaldehyde as a probe DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases // Ibid.—1975.—14, N 6.—P. 1297—1303.
5. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д. и др. Органическая химия нуклеиновых кислот.—М.: Химия, 1970.—720 с.
6. Hoeltke H. J., Ettl I., Finken M. et al. Multiple nucleic acid labeling and rainbow detection // Anal. Biochem.—1992.—207, N 1.—P. 24—31.

Ин-т хим. физики в Черноголовке РАН

Получено 11.04.94