

Конструирование ДНК-зонда с использованием соли серебра. 3. Дозированная модификация двунищенного зонда и достраивание гибридов

А. В. Шугалий*, М. В. Личина

Институт химической физики в Черноголовке Российской академии наук
142432, Московская обл.

Рассмотрены варианты получения окрашенного зонда с использованием металлокомплекса, включающего этаноламино-формальдегидные цепочки, образующие координационные связи с ионом серебра. Модификацию проводили на полностью денатурированной ДНК, частично расплетенных с помощью формальдегида молекулах, а также дуплексах зонд — матрица за счет разветвления уже сформированной структуры олигомерных цепочек. С использованием последнего варианта окраски при степени модификации зонда $\approx 10\%$ достигнута чувствительность детектирования иммобилизованной на нитроцеллюлозных мембранах ДНК составила десятки пикограммов.

Введение. В предыдущих работах серии [1, 2] мы проанализировали возможный механизм формирования окраски ДНК за счет образования на amino/имино группах оснований этаноламино-формальдегидных цепочек $\text{NC}_5\text{H}_{13}\text{O}_4$. В зависимости от условий реакции цвет металлокомплексов менялся от фиолетового (единственная связанная с Ag элементарная цепочка) до оранжево-красного (4—6 цепочек) [1]. На однострочной ДНК фиолетовая окраска развивается достаточно быстро, однако наблюдается существенный проигрыш в интенсивности по сравнению с медленноформирующейся красно-оранжевой окраской комплекса [2].

Кроме выбора окраски и, следовательно, конкретных условий инкубации зонда, следует иметь в виду и такой немаловажный факт, как распределение модифицированных оснований вдоль зонда. При использовании денатурированной ДНК мы получаем, очевидно, случайное распределение «меченых» оснований. Присоединение окрашенной цепочки происходит по amino/имино группами, т. е. по тем сайтам оснований, которые участвуют в последующем образовании дуплекса при гибридизации. Подобное обстоятельство, естественно, несколько ухудшает как возможность образования «ядра» в процессе поиска комплементарных участков зонд — матрица, так и последующий процесс «зашнуровывания» цепи. Оценки дают различные значения снижения стабильности дуплексов при наличии в них модифицированных оснований, но в среднем это $0,7^\circ\text{C}$ на 1% модификации [3].

Указанные обстоятельства — негативные последствия случайного распределения вдоль зонда модифицированных оснований и недостаточная

*Correspondence address.

интенсивность окраски зонда при приемлемых временах инкубации — мы постарались преодолеть благодаря двум приемам. Первый состоит в дозированной модификации двунитчатого зонда в процессе его расплетания формальдегидом. В ходе реакции модифицируются легкоплавкие, наиболее доступные для расплетания участки при минимальной инициации новых центров расплетания, по крайней мере, за времена для получения 10—15 % модификации. Этим мы достигаем сгруппированность модифицированных оснований на ограниченных участках молекулы, а протяженные области зонда остаются нативными. Второй прием — это дополнительное окрашивание комплекса («дотраивание»), но не в ДНК-зонде, а уже в составе гибрида. Формирование оранжево-красной окраски на зонде, если проводить начальную реакцию в соответствующих условиях, происходит за десятки часов [2]. Кроме того, разветвленная структура металлокомплекса может явиться серьезным стерическим препятствием при комплементарном спаривании. Проведя дотраивание, во-первых, мы избегаем какого-либо разветвления цепочки на зонде до гибридизации, а во-вторых — повышаем интенсивность окраски.

Материалы и методы. Получение зонда. Расплетание ДНК формальдегидом. ДНК бактериофага λ была расплетена на 10 % с помощью 3,7 %-го формальдегида при 30 °С в течение 40—45 мин. К 0,028 мл 37 %-го формальдегида добавили 0,12 мл *MspI*-фрагментов ДНК фага λ (\approx 20 мкг) в 0,05 М боратном буфере, рН 8,5, и 0,131 мл 0,05 М боратного буфера. Оптическую плотность ДНК при расплетании регистрировали спектрометрически, после достижения необходимого расплетания препарат диализовали против 0,05 М боратного буфера для удаления свободного формальдегида.

Окрашивание частично расплетенной и однострочной ДНК. Исходная реакционная смесь содержала 5 мл 0,05 М боратного буфера, 0,513 мл этаноламина, 0,475 мл 10 %-й лимонной кислоты и 2,5 мг азотнокислого серебра. Этаноламин предварительно разбавляли в 10 раз 0,05 М боратным буфером. Затем к 2,47 мл этой смеси добавляли 0,28 мл частично расплетенной ДНК. Порция содержала 8—10 мкг препарата. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 3 ч, что приводило к желтой окраске раствора. После диализа против 0,002 М Na-ацетатного буфера, рН 7,48, цвет опытных образцов не изменялся. Для окрашивания однострочной ДНК к 2,47 мл исходной реакционной смеси (см. выше) добавляли 0,015 мл 30 %-го формальдегида (или 0,008 мл 37 %-го), однострочную ДНК в количестве 8—10 мкг и инкубировали при комнатной температуре для достижения нужной степени модификации. Диализ осуществляли так же, как для двунитчатого зонда. Однострочную форму ДНК фага λ получали нагреванием ее исходного дуплекса до 95 °С и быстрым охлаждением во льду.

Гибридизация гидролизата *MspI*/λ с окрашенным зондом. Нанесение гидролизата на нитроцеллюлозную мембрану. Гидролизат кипятили в течение 10 мин на водяной бане и охлаждали во льду. Затем на нитроцеллюлозную (НЦ) мембрану наносили по 1 мкл гидролизата разной концентрации для получения суммарных количеств ДНК в пятне (рис. 2). Высушенные мембраны с нанесенным гидролизатом запекали в течение 2 ч при 80 °С в вакуумной печи.

Предгибридизация. НЦ-мембраны с нанесенным гидролизатом *MspI*/λ вымачивали в 0,015 М растворе ацетата Na и помещали на дно плоскодонной стеклянной емкости. В нее наливали необходимое количество раствора для предгибридизации с таким расчетом, чтобы раствор полностью покрывал поверхность мембраны. Раствор содержал 9,0 мл 0,3 М ацетата Na, 1,0 мл 1 %-го фиккола, 0,1 мл фрагменти-

рованной денатурированной ДНК селезенки быка (коммерческий препарат) в концентрации 10 мг/мл. Предгибридизацию проводили при 35 °С в течение 5 ч.

Г и б р и д и з а ц и я. Окрашенный зонд денатурировали при 90 °С в течение 3 мин, затем 0,72 мл зонда в концентрации \approx 4 мкг/мл добавляли в раствор для предгибридизации и инкубировали 110 ч при 35 °С.

П р о м ы в к а НЦ-м е м б р а н. Мембраны промывали 0,1 М раствором цитрата Na (из расчета по 1 мл раствора на 1 см² мембраны) 4 раза по 10 мин при комнатной температуре и 2 раза по 1,5 ч при 30 °С.

Дополнительное окрашивание (дотраивание) зонда. Раствор для окрашивания содержал 0,02 М цитрат Na, 0,1 %-й формальдегид, 0,1 мг/мл азотнокислого серебра. Реакцию проводили при комнатной температуре, изменение окраски пятна в сторону красно-оранжевого цвета и увеличение интенсивности реакции происходило уже через 1—2 ч инкубации.

Рестрикция ДНК фага λ . Обработку ДНК эндонуклеазой *MspI* осуществляли по стандартной методике [4], реакционная смесь включала 10 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,4, 10 мМ MgCl₂, 6 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитол, 100 мг/мл альбумина. Соотношение фермент:ДНК составляло 5:1. Окрашенные пятна на мембранах фотографировали при дневном освещении на фотопленку «Микрат-изопан».

Результаты и обсуждение. Используя кинетическую кривую развития окраски на денатурированной ДНК (рис. 1, а), мы выбрали время инкубации для достижения 10 %-й модификации, составляющее 2,5 ч. Зондом служили, таким образом, окрашенные *MspI*-фрагменты ДНК фага λ . При гибридизации зонда с нанесенным на НЦ-мембрану гидролизатом *MspI*/ λ получена картина, представленная на рис. 2, а. Минимально детектируемое количество ДНК в пятне составило в данном случае 200 пг.

Для повышения чувствительности мы попытались получить меченый зонд, в котором модифицированные основания распределены не по всей длине молекулы, а по возможности сгруппированы на ограниченных участках. Наиболее простой путь — модификация частично деспирализованной ДНК при малых степенях денатурации. Участки локальной деспирализации, доступные для окраски, в этом случае довольно редки и, что наиболее важно, представляют собой дискретные кластеры. Это наглядно демонстрируют ставшие уже классическими электронно-микроскопические снимки частично деспирализованной фага ДНК λ при малых степенях расплетания [5, 6].

Поскольку фиксация подобных состояний при температурной денатурации — достаточно трудоемкий и многостадийный процесс [7], мы использо-

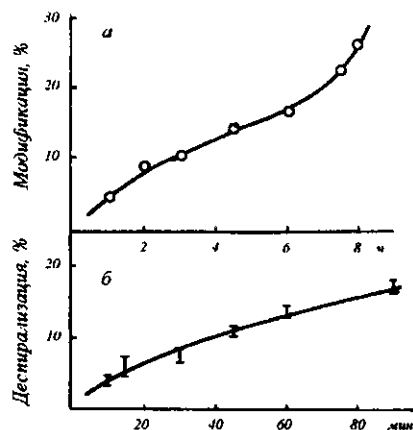


Рис. 1. Изменение во времени степени окраски денатурированной ДНК, выраженной в процентах ее модификации металлокомплексом (а), и деспирализация ДНК формальдегидом (б)

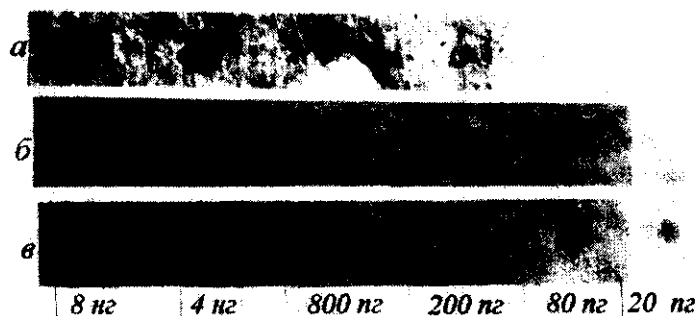


Рис. 2. Гибридизация *MspI*-фрагментов ДНК фага λ с гомологичным зондом, окрашенным в различных условиях: *а* — денатурированная ДНК, модифицированная на 10 %; *б* — нативная ДНК, расплетенная формальдегидом на 10 %; *в* — то же, что *б*, но с последующим докстраиванием окрашенного зонда в составе гибрида. Цифры около пятен отвечают количеству нанесенного на мембрану *MspI*-гидролизата ДНК λ .

вали расплетание ДНК формальдегидом. Кроме очевидного удобства получения частично деспирализованных молекул на разных стадиях расплетения, для реакции используется тот же реагент, что и при последующей окраске. Начальный участок кривой расплетания ДНК λ представлен на рис. 1, *б*, время для достижения 10 %-й деспирализации составило в наших экспериментальных условиях 40—45 мин. После этого препарат зонда диализовали, подвергали полной температурной денатурации и использовали в гибридизации, как описано в методике.

Полученная картина гибридизации представлена на рис. 2, *б*, достигнут ≈ 3 -кратный выигрыш в чувствительности по сравнению с вариантом окрашивания денатурированного зонда. Дальнейшее снижение предела детектирования мы получили, проведя дополнительное окрашивание уже образованного дуплекса зонд — матрица, иммобилизованного на мембране (см. методику). Отсутствие в реакционной смеси этаноламина предотвращает инициацию новых цепей на свободных амино/имино группах оснований, что приводит к неспецифическому окрашиванию всех доступных для реакции свободных (не вовлеченных в дуплекс) оснований. В наших условиях реакции мы достигаем только разветвления уже образованных цепей [1], при этом интенсивность окраски пятна на мембране заметно увеличивается уже через 1—2 ч инкубации.

Фотографии пятен для случая докстраивания приведены на рис. 2, *в*. Детектируется ≈ 20 пг материала в пятне, что на порядок величины меньше, чем при окраске денатурированного зонда (рис. 2, *а*) и сравнимо с чувствительностью других используемых в практике неизотопных методов, а в некоторых случаях и превосходит их [8, 9].

Лабильность координационных связей Ag — лиганд в металлокомплексе накладывает определенные ограничения на величину рН среды и температурный режим работы с зондом. Формирование окраски происходит при рН 7,4—8,8 [1]. В более кислой среде резко повышается скорость гидролиза полиформальдегидной цепочки [10], что смещает равновесие в реакции в сторону диссоциации цепочки на мономерные звенья. В щелочной среде (рН > 9) происходит восстановление серебра и его выпадение в осадок.

Нагревание вызывает разрыв координационных связей только после 10—15-мин кипячения, но при последующем охлаждении все связи (и, следовательно, окраска зонда) восстанавливаются. Окрашенный зонд не рекомендуется замораживать, сохранять следует при температуре холодильника ($\approx 5^\circ\text{C}$) — он не теряет своих характеристик цветности, по крайней мере, в течение нескольких месяцев.

Таким образом, зонд, содержащий кластеризованные участки модификации, которые затем «достраиваются» по предложенной методике, позволяет уверенно детектировать количества ДНК на мембране, составляющие десятки пикограммов. Доступность реагентов, устойчивость окраски, простота всех операций окрашивания и детектирования являются существенными преимуществами предложенной схемы получения окрашенного зонда, обладающего достаточной чувствительностью для контрастирования средние и редкоповторяющихся генных участков ДНК животного происхождения.

О. В. Шугалий, М. В. Личина

Конструирование ДНК-зонда с использованием соли серебра. 3. Дозовая модификация двухнитчатого зонда та добування гібридів

Резюме

Розглянуто варіанти отримання забарвленого зонда з використанням металокомплексу, який містить етаноламіно-формальдегідні ланцюжки, що утворюють координаційні зв'язки з іонами срібла. Модифікацію здійснювали на повністю денатурованій ДНК, частково розплетених за допомогою формальдегіду молекулах, а також дуплексах зонд — матриця за рахунок розгалуження уже сформованої структури олігомерних ланцюжків. Застосовуючи останній варіант забарвлення, при ступені денатурації $\approx 10\%$ досягнута чутливість детектування іммобілізованої на нітроцелюлозних мембранах ДНК склала десятки пікограмів.

A. V. Shugaliy, M. V. Lichina

DNA probe construction with the use of silver salt. 3. Dosed modification of two-stranded probe and additional colouring of hybrids

Summary

The different ways of the coloured probe preparation with the use of the metal complex comprising ethanolamine-formaldehyde chains forming coordination bonds with silver ions have been discussed. The denatured DNA, partially unwind with formaldehyde molecules, and the probe-template duplexes have been modified on the basis of the branching of oligomer chains already formed. The sensitivity of the detection of 10% -modified DNA immobilized on nitrocellulose filters has reached dozens of picograms.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Личина М. В., Шугалий А. В. Конструирование ДНК-зонда с использованием соли серебра. 1. Образование и характеристика олигомерных окрашенных цепей // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 2.— С. 38—44.
2. Личина М. В., Шугалий А. В. Конструирование ДНК-зонда с использованием соли серебра. 2. Окрашивание мономера и однонитчатой ДНК // Там же.—№ 5.—С. 98—106.
3. Прима В. И., Тарантул В. З., Шугалий А. В., Газарян К. Г. Реассоциация ДНК: физические и биологические аспекты // Укр. біохім. журн.—1974.—46, № 2.—С. 255—271.
4. Маншатиц Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
5. Inman R. B. Denaturation maps of the left and right sides of the lambda DNA molecule determined by electron microscopy // J. Mol. Biol.—1967.—28, N 1.—P. 103—116.
6. Inman R. B., Schnos M. Partial denaturation of thymine and 5-bromouracil-containing λ DNA in alkali // Ibid.—1970.—49, N 1.—P. 93—98.
7. Шугалий А. В., Маняков В. Ф., Герман А. В. Электронная микроскопия частично денатурированных молекул ДНК // Молекуляр. биология.—1972.—6, № 6.—С. 902—907.
8. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф. Меченные биотином олигонуклеотидные зонды в методике молекулярной гибридизации // Там же.—1989.—23, № 5.—С. 1221—1226.
9. Lee A. S. G., McGee J. O. D. The signal intensity on Southern blots developed by nonisotopic methods is linear with time and quantity of DNA // Nucl. Acids Res.—1989.—17, N 6.—P. 2364.
10. Чичибабин Л. Е. Основные начала органической химии.—М.: ГХИ, 1963.—Т. 1.—910 с.