

М. В. Личина, А. В. Шугалий

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЗОНДА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОЛИ СЕРЕБРА.  
1. ОБРАЗОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА  
ОЛИГОМЕРНЫХ ОКРАШЕННЫХ ЦЕПЕЙ**

*Инкубацией моноэтанолamina, формальдегида и нитрата серебра получен окрашенный металлокомплекс. Он включает олигомерные этаноламино-формальдегидные цепочки с брутто-формулой  $NC_2H_{13}O_4$ , образующие координационные связи с ионами металла. Число связанных с Ag элементарных цепочек определяет цвет комплекса — от фиолетового до оранжево-красного. В условиях длительной инкубации не исключен вариант формирования комплекса красной окраски с разветвленной сеткой из олигомерных цепочек.*

Наиболее часто применяемые ДНК-зонды содержат  $^{32}P$ -меченные нуклеотиды. Существует, однако, много проблем, связанных с радиоактивным мечением. Среди них стабильность зонда, безопасность использования, стоимость изотопов, необходимость специального оборудования. Альтернативные методы включают следующие подходы.

1. Мечение биотином и детектирование авидин/стрептавидинового конъюгата, приготовленного с ферментом, флуоресцентными группами или электронноплотными частицами. Биотин может быть введен в зонд как биотинированный нуклеотидтрифосфат ник-трансляцией, случайным праймированием [1] или с использованием фотоактивного аналога фотобиотина, который сшивается с ДНК при облучении [2].

2. Мечение другими гаптенами, такими как диоксигенин или сульфоновые группы, и детектирование конъюгатом фермент — антигаптеновые антитела [3].

3. Непосредственное сшивание детектируемого белка, например, пероксидазы хрена с ДНК-зондом с помощью комплекса фермент — полиэтиленимин или глutarальдегид [4]. Существенным недостатком этого метода является нестабильность полученного зонда при температурах выше 45 °C и влияние белка на гибридизацию ДНК — ДНК [5].

4. Получение флуоресцентно меченных ДНК-зондов, в частности, введением алифатических аминогрупп и присоединением к ним флуорохромоов дансихлорида или флуоресцеинизотиоцианата [6]. Наиболее высокая чувствительность с использованием этого подхода достигнута флуоресцентным мечением ДНК, содержащей тиофосфорные эфиры, за счет алкилирования монобромтиманом фосфатных мостиков в сахарофосфатном остове ДНК [7].

Ранее было предложено использовать нитрат серебра для пикограммового детектирования в геле белков и нуклеиновых кислот [8, 9]. Механизм появления окраски неясен, высказывались лишь отдельные предположения [9]. Впоследствии [10—13] появились варианты базового метода, в которых использовались иные реакционные смеси или модифицировались условия в зависимости от типа иммобилизующего геля. Мы, со своей стороны, для повышения чувствительности детектирования предложили непосредственное фотометрирование окрашенного полнакриламидного геля, опуская этап фотографирования [14]. При этом минимальное количество регистрируемых рестрикционных фрагментов ДНК животного происхождения составило 20—40 пг.

При всей методической простоте и достаточно высокой чувствительности существенным ограничением подхода, в частности, применительно к ДНК является то обстоятельство, что контрастированные молекулы иммобилизуются в геле в процессе фиксации и не могут быть перенесены на мембраны для дальнейших исследований.

Используя тот же агент — нитрат серебра, мы поставили цель разработать метод контрастирования ДНК-зонда для его последующего применения в молекулярной гибридизации. Суть контрастирования — образование комплекса ДНК с олигомерными цепями, взаимодействующими со свободными амино/имино группами оснований и имеющими интенсивную окраску. Из дальнейшего изложения будет ясна зависимость цвета комплекса от степени олигомеризации.

Для реализации поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- разработать условия олигомеризации цепей;
- определить характеристики образованного окрашенного комплекса;
- предложить оптимальный режим получения ДНК-зонда, т. е. молекул ДНК с фиксированным вкладом олигомерных окрашенных цепей;
- оценить стабильность модифицированных молекул;
- установить границы их использования в качестве молекулярного зонда.

Решению первых двух задач посвящено настоящее сообщение, последующих трех — дальнейшие публикации.

В реакционной смеси, содержащей компоненты для контрастирования ДНК — формальдегид, моноэтаноламин и нитрат серебра, развивается окраска раствора. При этом реакция, если судить по изменению цвета, является, по крайней мере, двухпараметрической — зависит от рН раствора и соотношения этаноламин : формальдегид. Для характеристики цвета, кроме визуального сравнения, мы использовали спектральные особенности каждой фракции (здесь и в дальнейшем под фракциями подразумевается реакционная смесь с фиксированным содержанием всех трех компонентов, которая инкубируется при данной температуре в течение заданного времени). Из достаточно диффузного спектра с помощью одного из светофильтров мы выделяли определенную спектральную полосу и уже в ней выявляли интенсивность поглощения фракции. В зависимости от светофильтра измеряли степень фиолетовой, зеленой, оранжевой или красной окраски фракции.

Для характеристики выбрано шесть фракций, имеющих рН 8,15 (1-ая фракция) и далее со смещением на 0,15 ед. рН в кислую область. Из рис. 1 видно, что фракции с различным значением рН ведут себя по-разному. У наиболее щелочной фракции 1 (рН 8,15, рис. 1, а) интенсивность окраски практически не изменяется со временем, причем во все сроки инкубации она фиолетовая. В то же время нарастание интенсивности окраски фракции 4 (рН 7,7, рис. 1, б) сопровождается изменением ее цвета от фиолетового в первые 1,5 и 4 ч инкубации до голубовато-фиолетового (7 ч) и, наконец, зеленого (24 ч). Соответственно первые три точки на кривой рис. 1, б, мы измеряли с фиолетовым светофильтром, последнюю — с зеленым. Фракция 5 (рН 7,55, рис. 1, в) с аналогичным изменением интенсивности имеет к 4-му ч инкубации зеленую окраску, далее — желто-оранжевую. Наконец, фракция 7 (рН 7,25, рис. 1, г) изменяет окраску от желтой (1,5 ч) до желто-оранжевой и оранжево-красной во все остальные сроки инкубации.

Представление об общем характере изменения суммарной интенсивности различных окрасок в зависимости от рН дает рис. 2. Кривая 1 получена со светофильтром СЗС-9, имеющим широкую полосу пропускания, которая включает практически все регистрируемые цвета ( $\Delta D = 6000 \text{ см}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 20 \text{ 500 см}^{-1}$ ). Для сравнения на кривой 2 представлен вклад индивидуального компонента (зеленая окраска).

Из анализа данных по изменению цвета фракций видно, что развитие окраски идет от фиолетовой к оранжево-красной, т. е. происходит

переход от коротковолновой в длинноволновую часть спектра. Этот переход осуществляется практически для всех фракций, имеющих  $pH < 8$ , и при длительной инкубации, например, в течение нескольких суток все фракции приобретают темно-оранжевый или красноватый оттенок.

Рис. 3 демонстрирует ассоциацию цвета фракции с материалом различной молекулярной массы. При центрифугировании в 2 М сахара-

розе фракции 5 после 24-ч инкубации мы наблюдали разделение полосы на зеленую и красно-оранжевую (а, кривые 2 и 2а), при этом материал красно-оранжевой полосы имел большую плотность, т. е. был более полимерным. Его положение при раскапывании совпадает с полосой, образованной фракцией 7, которая после инкубации в течение суток имела оранжево-красную окраску (а, кривая 3). При этом материал фракции 1 с фиолетовой окраской оставался практически у мениска (а, кривая 1), т. е. был наименее полимерным.

При регистрации с широкополосным фильтром СЗС-9 образованных после центрифугирования полос наблюдается смещение максимума полосы, вызванное различным вкладом того или иного цветового компонента (рис. 3, б). Для фиолетовой фракции максимум

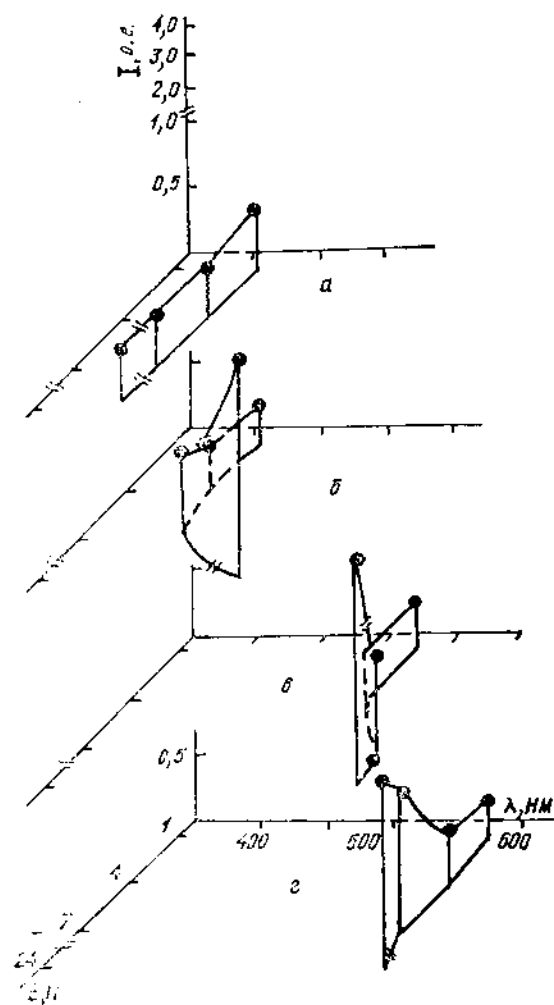


Рис. 1. Интенсивность окраски фракций ( $I$ , о. е.) как функция спектрального цвета ( $\lambda$ , нм) и времени инкубации ( $t$ , ч): а — фракция 1 ( $pH$  8,15); б — 4 ( $pH$  7,7); в — 5 (7,55); г — 7 (7,25)

смещается на  $\sim 10$  нм в фиолетовую область спектра, для оранжево-красной — на  $\sim 30$  нм в красную, что подтверждает изменение вклада каждого компонента в различных фракциях.

Для зеленого компонента мы оценили молекулярную массу, проведя гель-фильтрацию на сефадексе G-10 препарата фракции 5 после 7 ч инкубации. Использованным маркерам ализарину и динитрофенолу соответствуют на нашей колонке значения коэффициента доступности  $K_{av} = 4,2$  и  $7,2$  соответственно (см. [15]). Экстраполируя эти значения к  $K_{av} = 1,7$  для измеряемой фракции, мы получили величину молекулярной массы олигомера с зеленой окраской  $\sim 650$ .

Элементарный анализ фиолетового, зеленого и красного олигомеров, выделенных после лиофильной сушки растворов различной окраски, дал значения процентного вклада отдельных элементов, указанные в таблице. Поскольку для различных олигомеров эти значения мало варьируют, предполагаемая структура олигомера должна включать элементарную цепочку, повторенную  $n$  раз. Эта цепочка, как мы считаем, может иметь вид  $NH_2-CH_2-CH_2O-CH_2O-CH_2O-CH_2OH$ . Расчет

процентного вклада элементов подобной цепочки с двумя молекулами воды представлен в последнем столбце таблицы, вычисленные значения согласуются с экспериментом.

Если смесь этаноламина и формальдегида инкубировать без Ag, то олигомер окрашивается сразу же после добавления иона металла. Равновесному состоянию отвечает ситуация, когда при использованных нами соотношениях Ag : этаноламин = 1 : (20—200) все ионы металла имеют максимально возможное количество лигандов. Исходя из оцененной молекулярной массы зеленого олигомера ~ 650 комплекс с зеленой окраской включает три олигомерные цепочки. Добавление к зеленому комплексу дополнительного количества Ag должно немедленно приводить к перераспределению уже связанных лиган-

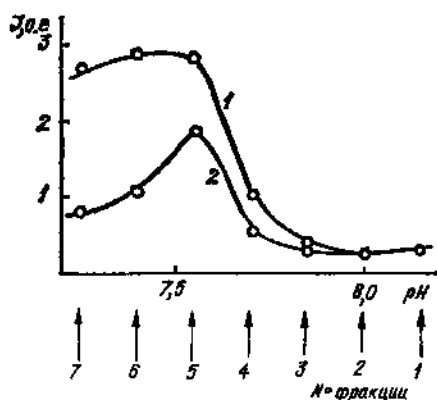
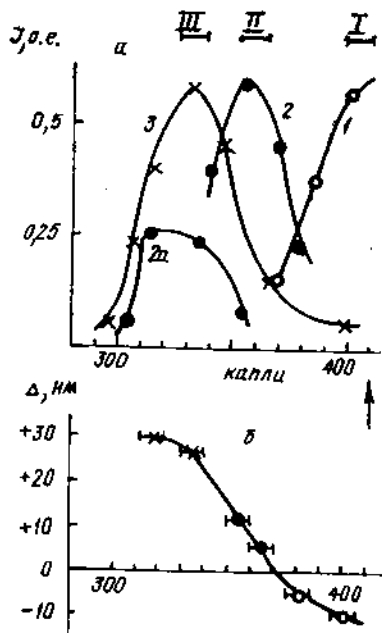


Рис. 2. Изменение интенсивности суммарной окраски различных фракций (1) и доли в ней зеленого компонента (2) после инкубации в течение 7 ч. Окраска фракций: 1, 2 — фиолетовая; 3, 4 — голубовато-фиолетовая; 5 — зеленая; 6 — желто-оранжевая; 7 — оранжево-красная

Рис. 3. Материал фракций 1 (1), 5 (2 и 2а), 7 (3) после центрифугирования в 2 М сахарозе — а. По оси ординат — интенсивность окраски, измеренная в полосе пропускания соответствующих фильтров. Римские цифры обозначают цвет полосы: I — фиолетовый; II — зеленый; III — оранжево-красный. Счет по каплям осуществляли со дна пробирки, каждая точка соответствует усредненной пробе из 10 капель. Стрелкой по оси абсцисс указан верх пробирки. Сдвиг максимума суммарной спектральной полосы при измерении фракций с широкополосным светофильтром СЗС-9 — б. Для регистрации взято по две пробы из фракций 1, 5 (зеленый компонент отвечает кривой 2) и 7. Знак минус по оси ординат означает сдвиг в фиолетовую область спектра, плюс — в красную



дов на свободные ионы металла и уменьшению их числа в координационном комплексе. При этом отмечается изменение цвета от зеленого к фиолетовому. С учетом данных о минимальной плавучей плотности фиолетового компонента (рис. 3, а, кривая 1) это означает, что комплекс с фиолетовой окраской содержит, по-видимому, минимальное количест-

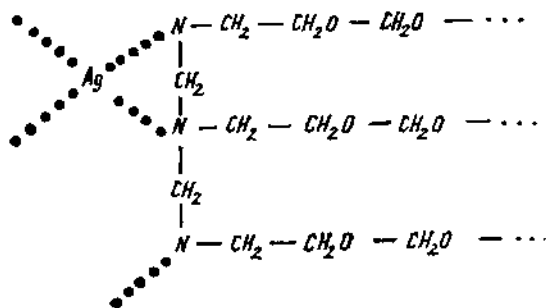
#### Содержание элементов в препаратах различно окрашенных фракций

Элемент, %	Фракция			NC <sub>2</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
	Фиолетовая	Зеленая	Оранжево-красная	
С	31,5±0,7	29,8±0,6	31,6±0,8	32
Н	8,0±0,1	7,7±0,1	7,9±0,2	9,1
Н	8,7±0,3	8,0±0,5	8,1±0,3	7,5
О	51,8±1	52±2	47,7±2,5	51
Остаток	—	2,5	4,8	—

во связанных с ионом металла элементарных цепочек. Напротив, комплекс с оранжево-красной окраской имеет максимальное количество лигандов ( $n=4-6$ ). Добавление к нему избытка Ag приводит, как мы наблюдали, к переходу цвета в ряду оранжево-красный  $\rightarrow$  зеленый, повторное добавление — зеленый  $\rightarrow$  фиолетовый.

Координационные связи в силу своей лабильности вносят дополнительную сложность в определение молекулярной массы комплексов. Так, при использовании метода гель-хроматографии на колонке со стирогелем методически необходимо провести лиофилизацию материала для последующего растворения лиофилизованного осадка в тетрагидрофуране. Оказалось, что лиофилизованные препараты, полученные из фракций фиолетового и зеленого цвета, при лиофилизации обесцветились. Они имели идентичную хроматографическую подвижность и элюировали в той зоне, которая отвечает выходу стандартных маркеров с молекулярной массой 100—200. Несмотря на приблизительность оценки можно утверждать, что в обоих случаях мы имеем дело с единственной номерной цепочкой  $NC_5H_{13}O_4$ , полученной при диссоциации комплекса с  $n=1$  (фиолетового) или  $n=3$  (зеленого).

Тем не менее, нельзя исключить и случая разветвления уже образованной элементарной цепочки  $NC_5H_{13}O_4$  по атомам N с образованием структур типа:



При этом каждый ион металла может образовывать координационную связь с двумя соседними атомами N с обеих сторон, что предполагает удвоенное содержание в комплексе показанной на схеме разветвленной цепи. Образование подобных структур ассоциировано, очевидно, только с красной (оранжево-красной) окраской комплекса. При попытке оценить молекулярную массу оранжево-красного комплекса мы столкнулись с ситуацией, когда при хроматографии на сефадексе G-200 с интервалом разрешения 5—200 кД наш препарат не проникал внутрь гранул геля и элюировал со свободным объемом. Это означает, что молекулярная масса подобного оранжево-красного комплекса по крайней мере превышает  $6 \cdot 10^5$ . При коротких сроках инкубации (несколько часов) заметна гетерогенность комплекса по молекулярной массе: в 2 M сахарозе (рис. 3, а, кривая 3), кроме основного пика, присутствует слабая оранжево-красная окраска практически по всему объему центрифужной пробирки.

При достаточно большом значении  $n$  разветвленная структура вряд ли может быть использована для контрастирования ДНК-зонда из-за стерических препятствий в условиях молекулярной гибридизации. Тем не менее, открывается возможность достраивания зонда в уже сформированном гибридном дуплексе для получения максимально интенсивной окраски комплекса. Подбором соответствующих условий инкубации мы осуществили достраивание исходно слабо-фиолетового зонда в составе дуплекса до интенсивной темно-оранжевой окраски (подробные результаты будут приведены во втором сообщении).

Таким образом, в качестве контрастирующей «метки» для окрашивания ДНК-зонда предлагается использовать этаноламино-формальдегидный комплекс. Он образуется после формирования элементарной цепочки с брутто-формулой  $NC_5H_{13}O_4$ , которая в качестве лиганда входит

в состав координационного комплекса серебра. Число лигандов в комплексе зависит от состава среды, времени инкубации и определяет цвет комплекса — от фиолетового до оранжево-красного. Реально, по-видимому, разветвление элементарной цепочки по атому N с образованием пространственной сетки.

**Реактивы и приборы.** В работе использовали следующие реактивы: моноэтаноламин (2-аминоэтанол), перегнанный при 107 °С под вакуумом 25 мм рт. ст., и формальдегид ДПО «Синтез»; азотнокислое серебро (Уральский з-д химреактивов); борная и лимонная кислоты (обе ос. ч.), натрий лимоннокислый 5,5 водный (Ленинградский з-д «Красный химик»); трис-(оксиметил)-аминометан, 3-кратно перекристаллизованный (НПО «Биохимреактив», Олайне); динитрофенол, ализарин (оба ч.), сахараза, дважды перекристаллизованная (Шостка); голубой декстран 2000 (м. м.  $2 \cdot 10^6$ ), сефадексы G-10 и G-200 фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Оптическую регистрацию проводили на спектрофотометре «Spectord UV-VIS» (ГДР) с широкополосным светофильтром СЗС-9, имеющим  $\lambda_{\max} = 20\,500\text{ см}^{-1}$  и полуширину полосы пропускания  $\Delta D = 6000\text{ см}^{-1}$ , а также с фильтрами зеленого ( $\lambda_{\max} = 19\,600\text{ см}^{-1}$ ,  $\Delta D = 3200\text{ см}^{-1}$ ), оранжевого ( $\lambda_{\max} = 17\,000\text{ см}^{-1}$ ,  $\Delta D = 1840\text{ см}^{-1}$ ) и красного цвета ( $\lambda_{\max} = 15\,900\text{ см}^{-1}$ ,  $\Delta D = 1900\text{ см}^{-1}$ ). Ультрацентрифугирование осуществляли на центрифуге К24Д (ГДР) в течение 24 ч в пробирках объемом 10 мл. Для гель-хроматографии использовали колонки стирогеля с размером пор 20, 50 и 100 нм. Хроматографию на сефадексе проводили по методике [15] с 0,02 М натрий-цитратным буфером в качестве элюирующего раствора.

**Оптимальный состав инкубационной смеси.** К 2 мл 0,05 М боратного буфера добавляли 1 мг азотнокислого серебра ( $5,8 \cdot 10^{-8}\text{ М}$ ), 0,0118 мл этаноламина ( $2 \cdot 10^{-4}\text{ М}$ ), 0,014 мл 30 %-го формальдегида ( $1,1 \cdot 10^{-4}\text{ М}$ ) и 0,5—0,15 мл 10 %-й лимонной кислоты в зависимости от требуемого значения pH раствора. Молярное соотношение Ag : этаноламин : формальдегид составляло в данном случае 1 : 34 : 19. Фракции указанного состава с различными значениями pH (6,87—9,25) инкубировали при 30 °С в течение 1—72 ч, через определенный промежуток времени отбирали аликвоты по 0,4 мл и проводили оптические измерения. Для центрифугирования отобранную аликвоту после инкубации в течение 24 ч наслаивали на 2 М сахаразу и после раскапывания содержимого пробирки осуществляли оптические измерения.

Для проведения элементарного анализа и гель-хроматографии на колонках со стирогелем измеряемые фракции лиофилизировали.

Авторы выражают благодарность И. П. Лаврентьеву за участие в обсуждении результатов и проф. И. Н. Тодорову — за ценные замечания, высказанные при подготовке статьи. Авторы также признательны А. С. Астаховой и А. И. Кузаеву за проведение элементарного анализа и гель-хроматографии на стирогеле.

*М. В. Личина, О. В. Шугалій*

## КОНСТРУЮВАННЯ ДНК-ЗОНДА З ВИКОРИСТАННЯМ СОЛІ СРІБЛА І УТВОРЕННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА ОЛІГОМЕРНИХ ЗАБАРВЛЕНИХ ЛАНЦЮГІВ

### Резюме

Інкубацією моноетаноламіна, формальдегіда і нітрату срібла отримано металокомплекс. Він містить олігомерні етаноламіно-формальдегідні ланцюжки з брутто-формулою  $\text{NC}_5\text{H}_{13}\text{O}_4$ , що утворюють координаційні зв'язки з іоном металу. Число пов'язаних в Ag елементарних ланцюжків обумовлює колір комплексу від фіолетового до оранжево-червоного. За умов тривалої інкубації не виключається варіант формування комплексу червоного забарвлення з розгалуженою сіткою з олігомерних ланцюжків.

THE DNA PROBE CONSTRUCTION WITH USE THE SILVER SALT.

1. THE FORMATION AND CHARACTERIZATION OF THE OLIGOMER COLOURED CHAINS

Summary

For DNA probe contrasting is proposed a coloured coordination complex of Ag. It consist of the oligomer ethanolamino-formaldehyde chains with brutto-formula  $NC_5H_{13}O_4$ , which are connected by coordination bonds with the metal ion. The numbers of ligand depend on the incubation media, the time of reaction and determine the complex colour—from violet to orange-red. It isn't excluded the branching of the single chain by atom N with the forming of the red coloured complex.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blotting // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 13.— P. 4045—4049.
2. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. S., Symons R. H. Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 3.— P. 745—761.
3. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Gustova L. I. et al. // Biochim. et biophys. acta.—1974.—340, N 1.— P. 153—165.
4. Renz M., Kurz C. A colorimetric method for DNA hybridization // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 8.— P. 3435—3444.
5. Al-Hakim A. H., Hull R. Studies towards the development of chemically synthesized non-radioactive biotinylated nucleic acid hybridization probes // Ibid.—1986.—14, N 24.— P. 9965—9976.
6. Фрумгарц Л. А., Киприянов С. М., Калачиков С. М. и др. Получение флуоресцентно меченной ДНК и использование ее в качестве зонда при молекулярной гибридизации // Биоорг. химия.—1986.—12, № 11.— С. 1508—1513.
7. Hodges R. R., Conway N. E., McLaughlin L. W. «Post-assay» covalent labeling of phosphorothioate-containing nucleic acids with multiple fluorescent markers // Biochemistry.—1989.—28, N 1.— P. 261—267.
8. Switzer R. C., III, Merril C. R., Shifrin S. // Anal. Biochem.—1979.—98, N 1.— P. 231—237.
9. Somerville L. L., Wang K. The ultrasensitive-silver «proteins» stain also detects nanograms of nucleic acids // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1981.—102, N 1.— P. 53—58.
10. Beidler J. L., Hilliard P. R., Rill R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver // Anal. Biochem.—1982.—126, N 2.— P. 374—380.
11. Merril C. R., Pratt M. E. A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes or thin layer plates // Ibid.—1986.—156, N 1.— P. 96—110.
12. Lomholt B., Frederiksen S. Detection of a few picograms of DNA on polyacrylamide gels by silver staining // Ibid.—1987.—164, N 1.— P. 146—149.
13. Datar R. H., Bhisey A. N. // Ind. J. Biochem. and Biophys.—1988.—25.— P. 373—375.
14. Личина М. В., Шугалий А. В., Тодоров И. Н. VI конф. по спектроскопии биополимеров.— Харьков, 1988.— С. 194—195.
15. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.— М.: Наука, 1985.— С. 109—167.

Ин-т хим. физики РАН, Черногловка

Получено 22.09.93