



УДК 577.113.4:577.336

**ПОЛУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННОЙ ДНК  
И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЕ В КАЧЕСТВЕ ЗОНДА  
ПРИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ****Фрунгарь Л. А., Битрянов С. М., Калачиков С. М.,  
Дударева Н. А., Дылышц Г. М., Карпова Г. Г.\*,  
Салганик Р. И.***Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Академии наук СССР,  
Новосибирск;**\* Новосибирский институт биорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР*

Разработан метод получения флуоресцентно меченой ДНК для визуализации комплементарных ей нуклеотидных последовательностей путем молекулярной гибридизации. Полинуклеотиды, алкилированные 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламином, модифицировали флуорохромами: дапсихлоридом или флуоресцеинизотиоцианатом. Сравнительное изучение модифицированных образцов РНК показало, что зондами при молекулярной гибридизации могут служить флуоресцентные производные полинуклеотидов, содержащие не более 4% модифицированных оснований. В условиях dot-гибридизации продемонстрирована принципиальная возможность использования флуоресцентных ДНК-зондов для детекции комплементарных последовательностей.

Методы молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот широко используют для локализации определенных нуклеотидных последовательностей в составе генома, а также для идентификации вирусов человека, животных и растений в диагностических целях. Для решения этих задач в качестве зондов применяют радиоактивно меченные ( $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ) полинуклеотиды, комплементарные детектируемым последовательностям. Однако необходимость в высокомеченых предшественниках, ферментах для их введения в полинуклеотиды, а также в специальных условиях и оборудовании для проведения таких работ ограничивает возможности применения этих методов, особенно в диагностических целях.

В связи с этим предпринимаются попытки создания методов визуализации определенных последовательностей нуклеотидов без использования радиоактивных меток. Описаны способы детекции гибридов нуклеиновых кислот с помощью антител, меченных флуорохромами [1, 2]. Разработан метод гибридизации молекул ДНК *in situ* с РНК, несущими флуоресцентную метку на 3'-конце [3], однако такая модификация неприменима к ДНК, что ограничивает приложения этого метода.

Возможность получения полидезоксирибонуклеотидов, комплементарных определенным последовательностям в геноме, путем клонирования, обратной транскрипции или химического синтеза делает ДНК-зонды значительно более перспективными как средство визуализации комплементарных им последовательностей, чем зонды на основе РНК.

В последние годы созданы колориметрический и хемилюминесцентный методы детекции гибридов с использованием ДНК-зондов, как непосредственно несущих ферментную метку [4], так и присоединяющих фермент после гибридизации через образование боптин-стрептавидинового комп-

Сокращения: МСВ — 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламин; Dns-хлорид — 1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид; Fl-ITC — флуоресцеинизотиоцианат; МСВ-РНК и МСВ-ДНК — РНК и ДНК, модифицированные МСВ; Dns-РНК и Fl-РНК — меченная дапсихлом и флуоресцеином РНК; Dns-ДНК и Fl-ДНК — аналогичные производные ДНК; SSC — 150 мМ NaCl, 15 мМ дитрат натрия; SDS — додецилсульфат натрия.

лекса [5]. Оба метода обладают высокой чувствительностью, но сложный многоэтапный процесс введения метки возможен лишь в хорошо оснащенных академических лабораториях.

Ранее мы предложили метод введения статистически распределенных вдоль цепи полинуклеотида алифатических аминогрупп с последующей модификацией флуорохромами [6, 7]. Для этого полирибонуклеотиды алкилировали 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламином, после чего модифицировали дансилхлоридом или флуоресцеинизотиоцианатом. На примере полиинозиновой кислоты со степенью модификации до 10% было показано, что присоединение дансильной группы не препятствует образованию совершенных комплексов с полицитидиловой кислотой [8].

В настоящей работе в результате сравнительного изучения флуоресценции образцов РНК, модифицированных флуоресцеинизотиоцианатом либо дансилхлоридом, мы определили выбор флуорохрома и границы, в которых имеет смысл модифицировать полинуклеотид для дальнейшего использования его в качестве зонда при молекулярной гибридизации.

Для характеристики флуоресцентных производных РНК были выбраны следующие параметры:

1) степень модификации РНК МСВ и флуорохромом (количество остатков МСВ и флуорохрома на 100 оснований в полинуклеотиде);

2) квантовый выход ( $\phi$ ) флуоресценции флуорохрома, присоединенного к полицуклеотиду; в данной работе флуорохромы характеризовали не абсолютным значением  $\phi$ , а величиной, пропорциональной ему:  $I/A_{\lambda_{ex}}$  — отношением интенсивности флуоресценции к поглощению образца при длине волны максимума возбуждения  $\lambda_{ex}$ ;

3) чувствительность зонда  $\epsilon_{\lambda_{ex}} \phi$  [9]; она пропорциональна количеству фотонов, которое излучает флуорохром после возбуждения, и является полезной при сравнении различных флуоресцентных зондов. При степенях модификации РНК примерно до 10% эта величина пропорциональна отношению  $I/A_{260}$ , где  $A_{260}$  — поглощение флуорохромированного полинуклеотида при 260 нм.

На рис. 1 приведено изменение чувствительности Dns- и Fl-производных РНК в зависимости от степени модификации. Видно, что чувствительность Dns-РНК даже при самой высокой степени модификации на порядок ниже, чем Fl-РНК. Для Fl-РНК предельные значения флуоресценции достигаются уже при степени модификации полинуклеотида, составляющей 4%. Кислотный гидролиз Fl-РНК, так же как и в случае гидролиза дансильных производных РНК, приводит к росту интенсивности флуоресценции [8], что говорит о концентриционном гашении на полимере, которое начинается уже при степенях модификации выше 1,5% (рис. 2).

Приведенные данные свидетельствуют о целесообразности использования в качестве зонда в опытах по молекулярной гибридизации флуоресцентных производных полинуклеотидов, модифицированных не более чем на 4%.

Флуоресцирующие производные ДНК получали путем их алкилирования МСВ, содержащим  $^{14}\text{C}$ -метку в бензильной части, и последующим введением флуоресцентной метки за счет ее ковалентного присоединения к аминогруппе МСВ.

Ранее Гриневой и соавт. [10, 11] изучалась модификация ДНК МСВ при pH 6 и было показано, что алкилированию подвергаются атомы N7 остатков гуанина, N1, N3 аденина, N3 цитозина. Алкилированные пурины легко элиминируются из ДНК в условиях модификации (примерно на 60%) [10]. В результате получают препараты модифицированной ДНК, содержащие в основном остатки реагента, ковалентно связанные с N1 аденина и N3 цитозина. Препараты ДНК, содержащие большое количество апуриновых звеньев, непригодны для получения флуоресцентных производных, так как последующая обработка их флуорохромом при pH 8,7–9,0 в течение 1–2 ч при 37°С может приводить к частичному расщеплению ДНК по апуриновым участкам [12]. При дальнейшей гибридизации с ДНК при 65°С в течение 12–15 ч должна происходить полная элиминация N7-алкилгуанинов и N3-алкиладенинов, не выщепившихся в услови-



Рис. 1

Рис. 1. Зависимость величины  $I/A_{260}$  для флуоресцентных Dns- (1) и Fl-производных РНК (2) от степени модификации

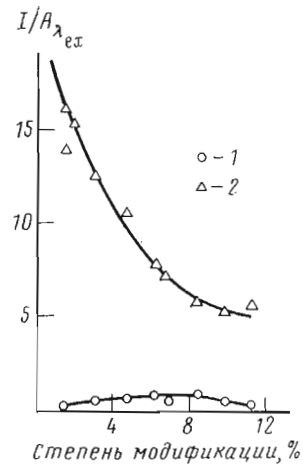


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость величины  $I/A_{\lambda_{ex}}$  для флуоресцентных Dns- (1) и Fl-производных РНК (2) от степени модификации.  $\lambda_{ex}$  для (1) равна 325, а для (2) — 492 нм

ях модификации [11]. Поэтому при проведении данной работы особое внимание было уделено подбору таких условий алкилирования ДНК, ее последующей обработки флуорохромами и гибридизации, при которых не наблюдалось бы столь значительной элиминации алкилпуринов.

Нам было оценено количество модифицированных оснований, остающихся в ДНК после алкилирования при разных значениях pH, флуорохромирования и инкубации в условиях гибридизации при разных температурах. Оказалось, что наименьшая (18%) элиминация алкилированных оснований из ДНК происходит, если алкилирование проводить при pH 7,5, а гибридизацию и отмывки — при pH 7,5 и температуре не выше 3,7° С с использованием формамида.

Применимость ДНК-зондов, несущих флуоресцепи, для обнаружения комплементарных нуклеотидных последовательностей была показана дот-гибридизацией. Мишенью служила немеченая денатурированная ДНК фага T7. После гибридизации с флуорохромированной с помощью Fl-ТС на 2,3% [ $^{32}P$ ]ДНК T7, отмывок и высушивания фильтры просматривали под УФ-светом и фотографировали.

При сравнении фотографии фильтров в УФ-свете и их автордиограммы (рис. 3) видно совпадение пятен флуоресценции и радиоактивности. При этом пятна флуоресценции имеют более четкую границу, что указывает на возможность более точной по сравнению с автордиографией локализации комплементарных полинуклеотидов при блот-гибридизации.

Концентрация [ $^{32}P$ ]ДНК, определенная по радиоактивности фильтров после отмывок и высушивания, в данном опыте составляла 4 нг/мм<sup>2</sup>. Это не является пределом чувствительности метода. Обнаружить меньшее количество ДНК возможно как за счет увеличения степени модификации зонда флуорохромом до 4%, так и за счет совершенствования техники визуализации зон флуоресценции подбором УФ-ламп и светофильтров.

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность введения статистически распределенной флуоресцентной метки в ДНК. Подобранные такие условия гибридизации и постгибридизационных отмывок, при которых элиминация модифицированных оснований не препятствует использованию флуорохромированной ДНК в качестве зонда в опытах по молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот.

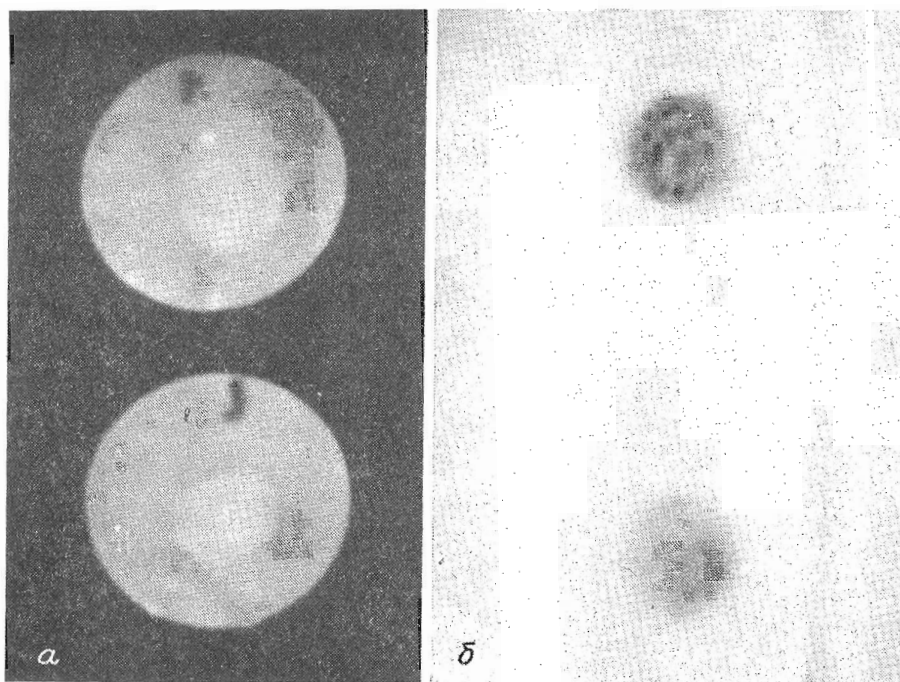


Рис. 3. Гибридизация FI-[ $^{32}\text{P}$ ]ДНК фага Т7 с гомологичной ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозных фильтрах: флуоресценция фильтров (а), их автораддиография (б)

### Экспериментальная часть

В работе использовали флуорохромы дансихлорид (Merck, ФРГ) и флуоресценцизотиоцианат (Fluka, Швейцария).

4-(N-Метиламино-N-2-хлорэтил)-[ $^{14}\text{C}$ ]бензиламин синтезировали по методике Богачева и соавт. [13].

Рибосомную РНК из личинок *Chironomus thummi* получали по описанному нами ранее способу [8].

Алкилирование рРНК МСВ, флуорохромирование и определение степени модификации проводили по методикам, описанным ранее [8]. Степень модификации флуоресценном определяли также по поглощению образцов модифицированной РНК при 485 нм. Молярный коэффициент поглощения присоединенного к РНК флуоресценна после исчерпывающего флуорохромирования МСВ-РНК с известной степенью модификации при рН 7,5 составлял  $20 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре MPF-4 Hitachi (Япония), возбуждая флуоресценцию Dns-РНК при 325, а FI-РНК — при 492 нм.

**Алкилирование ДНК.** Для модификации использовали ДНК печени крыс, выделенную по [14], и ДНК фага Т7, любезно предоставленную Е. Ф. Зайчиковым (ИМБХ СО АН СССР). ДНК предварительно денатурировали двукратным прогреванием по 10 мин при  $100^\circ\text{C}$  с последующим быстрым охлаждением во льду. Алкилирование ДНК [ $^{14}\text{C}$ ]МСВ с уд. акт.  $(1-6) \cdot 10^6 \text{ имп} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мкмоль}^{-1}$  проводили в 0,03 М натрий-ацетатном буфере, рН 6, при концентрации ДНК 0,7 мМ и МСВ 3,8 мМ. Алкилирование в буфере 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, проводили при концентрациях ДНК 0,5–0,8 мМ и МСВ 0,75–3,6 мМ. Реакционные смеси выдерживали 6 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Алкилированную ДНК четырежды переосаждали этанолом на холоде в присутствии 1 мМ EDTA и 2% ацетата натрия. Степень модификации определяли по содержанию радиоактивности в ДНК и выражали в молях остатков МСВ на 100 моль нуклеотидов.

**Присоединение флуорохромов к алкилированной ДНК** осуществляли так же, как при флуорохромировании РНК [8].

**Ник-трансляция ДНК фага Т7.** Активирование ДНК проводили в 0,05 М буфере трис-НСl, рН 7,5, содержащем 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , при концентрации ДНК 0,1 мг/мл и ДНКазы (КФ 3.1.21.1, Worthington, Англия)

0,5 нг/мл в течение 20 мин при 37°С. После этого реакционную смесь прогревали 10 мин при 77°С для инактивации ДНКазы. Ник-трансляцию вели, инкубируя активированную ДНК в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, с [<sup>32</sup>P]dATP (2 нМ, уд. акт. 1000 Ки·ммоль<sup>-1</sup>) и немечеными dCTP, dGTP и dTTP (каждый в концентрации 5 мкМ) при концентрации активированной ДНК 40 мкг/мл и ДНК-полимеразы I *E. coli* (КФ 2.7.7.7, получена А. Г. Ромащенко и сотр., ИЦиГ СО АН СССР) 120 ед. акт./мл 10 мин при 37°С. После ник-трансляции освобождали ДНК от белков фенольной экстракцией, после чего [<sup>32</sup>P]ДНК хроматографировали на сефадексе G-50.

Эффективность включения метки в ДНК от взятой в реакцию составляла 42%.

**Дот-гибридизация ДНК с Fl-ДНК.** Для определения возможности использования Fl-ДНК в качестве зонда при гибридизации применяли технику дот-гибридизации [15]. Мишенью служила немеченая денатурированная ДНК фага T7, которую наносили на середину нитроцеллюлозного фильтра HAWP 0,25 (Millipore, США) в концентрации 0,25 мкг/мм<sup>2</sup>; фиксацию ДНК проводили высушиванием фильтра в течение 1 ч в вакууме при 80°С. Фильтры с иммобилизованной таким образом ДНК перед гибридизацией помещали на 30 мин в 0,01 М трис-НСl (рН 7,5), 2×SSC при 37°С, затем переносили на 2 ч при той же температуре в раствор, содержащий 0,1 М трис-НСl (рН 7,5), 2×SSC, 2×раствор Denhardt [16], 0,05% SDS, 1 мМ EDTA и 20 мкг/мл озвученной и денатурированной ДНК печени крысы. Гибридизацию с [<sup>32</sup>P]ДНК фага T7 (33,3 мкг/мл), несущей 2,3% флуорохромированных остатков оснований, проводили 36 ч при 37°С в растворе, содержащем 50% формамид, 2×SSC, 0,05 М трис-НСl (рН 7,5), 1×раствор Denhardt, 0,025% SDS, 0,5 мМ EDTA, 10 мкг/мл ДНК печени крысы. После гибридизации фильтры отмывали дважды по 30 мин в 50% формамиде, содержащем 0,5×SSC и 0,4% SDS в термостатированном встряхивателе при 37°С и дважды по 10 мин в 2×SSC [4]. Высушенные фильтры просматривали под УФ-светом на ультрахемископе и фотографировали на пленку РФ-3 через светофильтр ЖЗС-6. Авторадиографию проводили в кассетах с рентгеновской пленкой РМ-1.

Авторы благодарны В. Г. Будкеру (НИИХ СО АН СССР) за ценные советы и постоянный интерес к работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rudkin G. T., Stollar B. D. Nature, 1977, v. 265, № 5593, p. 472-473.
2. Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 14, p. 4381-4385.
3. Bauman J. G. J., Wiegant J., Borst P., Duijn P. van. Exp. Cell Res., 1980, v. 128, № 2, p. 485-490.
4. Renz M., Kurz C. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 8, p. 3435-3444.
5. Matthews J. A., Batki A., Hynds C., Kricka L. J. Anal. Biochem., 1985, v. 151, № 1, p. 205-209.
6. Дымшиц Г. М., Румянцева Г. В., Фрумгарц Л. А., Салганик Р. И. В сб.: Успехи теоретической и прикладной генетики/Ред. Салганик Р. И. Новосибирск: ИЦиГ, 1982, с. 8-10.
7. Дымшиц Г. М., Фрумгарц Л. А. Тез. VIII Всесоюз. симпозиума «Структура и функции клеточного ядра». Цуцнио, 1984, с. 204-205.
8. Фрумгарц Л. А., Калачиков С. М., Дымшиц Г. М. Молекулярн. биология, 1985, т. 19, № 5, с. 1394-1399.
9. Кантор Ч., Шиммель П. В кн.: Биофизическая химия/Ред. Богданов А. А., Лазуркин Ю. С., Франк-Каменецкий М. Д. Т. 2. М.: Мир, 1984, с. 92-94.
10. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Мызина С. Д., Ноговицына Г. К. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1974, вып. 6, с. 125-135.
11. Гринева Н. И., Мызина С. Д. Молекулярн. биология, 1975, т. 9, № 4, с. 502-508.
12. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978, с. 373.
13. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1970, вып. 6, с. 110-116.
14. Дашкевич В. С., Дымшиц Г. М., Салганик Р. И., Уланов Б. П. Молекулярн. биология, 1972, т. 6, № 5, с. 689-695.

15. Kafatos F. C., Jones C. W., Efstratiadis A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 6, p. 1541—1552.
16. Denhardt D. T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 23, № 2, p. 641—646.

Поступила в редакцию  
7.III.1986

## PREPARATION OF FLUORESCENT-LABELED DNA AND ITS APPLICATION AS A PROBE FOR MOLECULAR HYBRIDIZATION

FRUMGARTS I. A., KIPRIYANOV S. M., KALACHIKOV S. M., DUDAREVA N. A.,  
DYMISHYTS G. M., KARPOVA G. G.\*, SALGANIK R. I.

*Institute of Cytology and Genetics and \* Novosibirsk Institute  
of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A method of the fluorescent-labeled DNA preparation for visualization of the complementary nucleotide sequences has been developed. Polynucleotide probes were alkylated randomly by 4-(N-methylamino-N-2-chloroethyl)-benzylamine followed by modification with such fluorochromes as dansyl chloride or fluoresceine isothiocyanate (FITC). It was found that the FITC but not dansyl-labeled polynucleotides could serve as efficient probes when about 4% of nitrogen bases were modified. The conditions minimizing the loss of the alkylated bases from DNA were determined. The procedure for hybridization with FITC-labeled DNA as a probe is described, concentration of DNA probe being about 4 ng/mm<sup>2</sup> of the nitrocellulose filter.