

Новий високочутливий флуоресцентний барвник *Barva NA* для візуалізації ДНК після денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу

О.О. Соловйов, Л.А. Лівшиць, В.Б. Ковальська,
М.Ю. Лосицький, Ю.Л. Сломінський¹, С.М. Ярмолук*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна*

*¹Інститут органічної хімії НАН України
вул. Мурманська, 5, Київ, 02660, Україна*

Резюме. Порівняно ефективності використання високочутливого барвника *Barva NA* (НСФ «Отава», Україна) та бромистого етидію для візуалізації продуктів ПЛР 20-го екзону гена ТРБМ після розділення мутантних варіантів методом денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE). Показано значно вищу чутливість *Barva NA* в порівнянні з бромідом етидію.

Ключові слова: DGGE, ген, мутації, муковісцидоз, візуалізація ДНК, *Barva NA*.

Вступ. Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) вважається одним з найефективніших сучасних методів детекції мутацій. Він був розроблений Фішером і Лерманом [1, 2] і ґрунтується на розділенні дволанцюгових фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в стандартному акриламідному гелі з лінійним градієнтом денатуруючих факторів — сечовини, формаміду або температури. Візуалізація ДНК у денатуруючих градієнтних гелях є досить важливою і відповідальною процедурою, оскільки цей метод здебільшого використовується з метою діагностики і потребує застосування високоспецифічних, а також безпечних для здоров'я і недорогих барвників. Найбільш ефективним вважається забарвлення гелів нітратом срібла, але ця методика є досить складною та до-

рогою, тому традиційно використовують досить ефективний і доступний барвник — бромистий етидій. Проте ця речовина є токсичною і проявляє мутагенну активність [3].

На сьогодні ціанінові барвники відомі як найбільш чутливі флуоресцентні зонди для визначення та візуалізації ДНК. Барвники цього класу не є токсичними та мутагенними [4, 5]. Серед них найбільш широко застосовується монометиновий ціанін SYBR Green I (Invitrogen Inc.) [<http://probes.invitrogen.com/>]. Нещодавно науковцями НСФ «Отава» було розроблено новий високочутливий ціаніновий барвник *Barva NA* для пост-електрофоретичної візуалізації ДНК. Чутливість визначення ДНК цим барвником значно перевищує аналогічну величину для бромистого етидію і дорівнює чутливості барвника SYBR Green. Важливо відзначити, що *Barva NA* не токсичний, для збудження його флуоресценції можна використовувати як шкідливе для здоров'я персоналу ультрафіолетове випромінювання (306 нм, 312 нм), так і нешкідливе збудження у

*Corresponding author.

Tel./fax: +38044-5222458

E-mail address: sergiy@yarmoluk.org.ua

видимій ділянці спектра (495 нм), його вартість для споживачів набагато нижча, ніж вартість SYBR Green [www.otavachemicals.com].

Метою нашої роботи було порівняння ефективності барвників *Barva NA* і бромиду етидію для візуалізації ДНК після денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу 20-го екзону гена ТРБМ.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень 20-го екзону гена ТРБМ методом DGGE були зразки периферичної крові хворих на муковісцидоз із різних регіонів України. Виділення та очищення ДНК із зразків проводилося за допомогою класичної методики шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою K із наступною фенольною екстракцією [6]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) послідовностей 20-го екзону гена ТРБМ проводили з використанням олігонуклеотидних праймерів, описаних раніше [7], в автоматичному режимі на термоциклері Perkin Elmer, Cetus у такому температурно-часовому режимі: ініціююча денатурація при 94 °C протягом 5 хвилин, 39 циклів (денатурація ДНК упродовж 1 хвилини при 94 °C, відпалювання праймерів протягом 1 хвилини при 55 °C та однохвилинна елонгація при 72 °C), фінальна елонгація при 72 °C упродовж 3 хвилин.

Робоча суміш об'ємом 25 мкл містила: Tris-HCl — 67 mM (pH 8,8 при 25 °C); (NH₄)₂SO₄ — 16,7 mM; ЕДТА — 6,7 мкМ; MgCl₂ — 2,5-4 mM; бичачий сироватковий альбумін — 170 мкг/мл; dNTP — 400 мкМ кожного типу; праймери — 4,5 pmol/ml; ДНК — 1 мкг; Taq-полімераза — 0,5 од. активності на пробу.

DGGE проводили за наступними параметрами: 7 %-вий поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10-60 % сечовини з формамідом, температура 55 °C, постійна напруга 240 В, тривалість — 5 годин.

Забарвлення гелів після DGGE проводили водним розчином бромиду етидію з концентрацією 5 μg/ml та барвником *Barva NA*. Для приготування останнього використовували трисацетатний буферний розчин, що містив 10 mM Tris-HCl, 1 mM ЕДТА, 1M оцтової кислоти, pH 8. У ньому розводили стоковий розчин барвника з концентрацією 5x10⁻⁶ M у 2000 разів.

Візуалізацію гелів після фарбування проводили з використанням УФ-трансліюмінато-

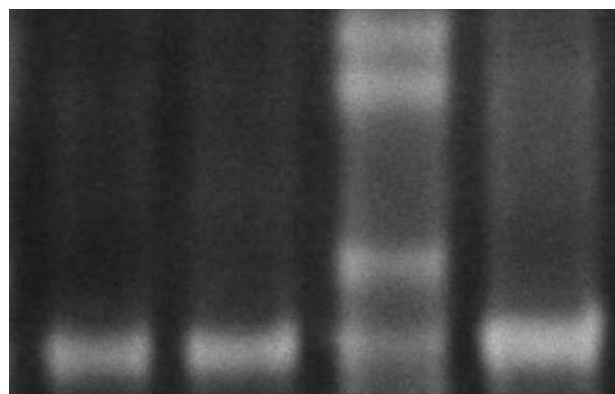


Рис. 1. DGGE-електрофореграма послідовностей 20-го екзону гена ТРБМ (7 %-вий поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10-60 %, температура 55 °C, напруга 230 В, тривалість — 5 годин): 1,2,4 — норма/норма; 3 — W1282X/норма.

ра ($\lambda=290$ нм) та приладу Dark Reader (Clare Chemical Research, США) ($\lambda=470$ нм).

Спектри флуоресценції та збудження флуоресценції *Barva NA* і бромистого етидію одержали за допомогою флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse (Varian Inc., Австралія). Розчини барвників у 0,05 M TRIS-HCl буфері (pH 8.0) досліджувалися у кварцевій кюветі (1x1 см).

Результати й обговорення. Для детекції мутантних варіантів 20-го екзону гена ТРБМ нами було розроблено діагностичну методику з використанням DGGE на основі методу Фанена і співробітників [7].

У разі наявності мутації у гетерозиготному стані в гелі спостерігалися чотири бенди (рис. 1): два — гомодуплексів і два — гетеродуплексів. З допомогою методу DGGE нами було досліджено зразки ДНК 25 пацієнтів. У результаті аналізу було виявлено трьох гетерозиготних носіїв мутації W1282X.

Ми також досліджували й порівнювали флуоресцентні властивості *Barva NA* та бромистого етидію у вільному стані та в присутності ДНК. На рис. 2 наведено спектри флуоресценції і збудження флуоресценції *Barva NA* (а) та бромистого етидію (б). Показано, що інтенсивність випромінювання *Barva NA* в присутності ДНК у 23 рази перевищує відповідну інтенсивність бромистого етидію. Слід зауважити, що рівень власної флуоресценції є ниж-

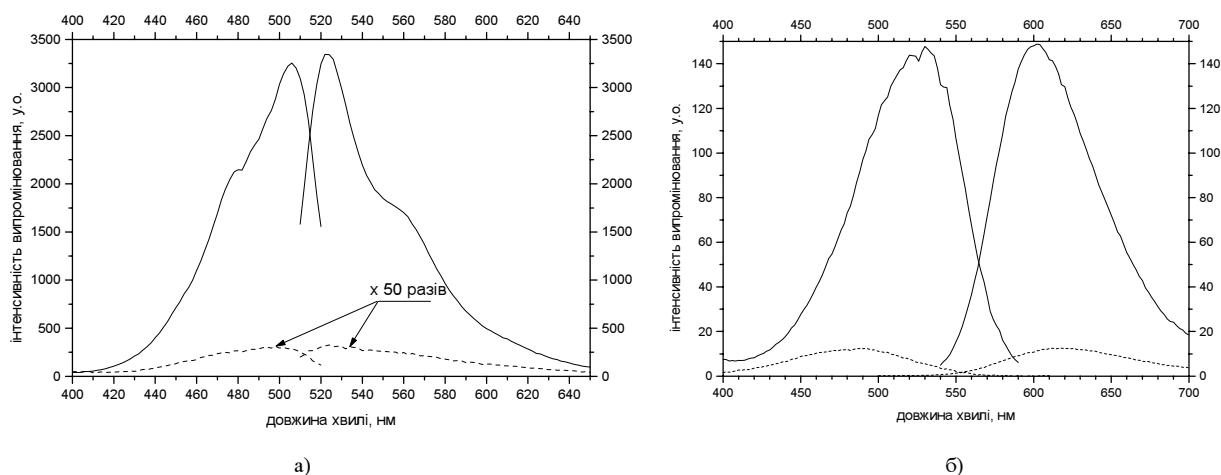


Рис. 2. а) Спектри флуоресценції (праворуч) та збудження флуоресценції (ліворуч) розчину барвника **Barva NA** в буфері (0,05 М TRIS-HCl, рН 8,0) (пунктир) та в присутності ДНК (суцільна лінія). Концентрація барвника 5×10^{-6} М, концентрація ДНК 6×10^{-5} М пар основ. Спектри поглинання розчину барвника в буфері збільшено в 50 разів. б) Спектри флуоресценції (праворуч) та збудження флуоресценції (ліворуч) розчину барвника бромистого етидію у воді (пунктир) та в присутності ДНК (суцільна лінія). Концентрація стокового барвника 10 мг/мл, концентрація ДНК 6×10^{-5} М пар основ.

чим для **Barva NA**, ніж для бромистого етидію, що також сприяє підвищенню чутливості детекції. Спектральні характеристики **Barva NA** — максимум поглинання, розташований біля 500 нм, та високий коефіцієнт молярної екстинкції — дають змогу ефективно використовувати джерела видимого випромінювання для збудження флуоресценції в постелектрофоретичній візуалізації ДНК.

Нами було проведено забарвлення продуктів ПЛР 20-го екзону гена ТРБМ після розділення алелів методом DGGE бромідом етидію та **Barva NA** з концентрацією 12,7 і 2,5 pmol/mkl відповідно. На рис. 3 та 4 подано фотографії пофарбованих гелів.

На гелях, забарвлених бромистим етидієм, не видно деяких зразків ДНК, а також не спостерігається гетеродуплексів у разі наявності

мутації, смуги розмиті, тому таку електрофореграму дуже важко аналізувати (рис. 3). На гелях, забарвлених **Barva NA**, чітко простежується розділення мутантних алелів із гетеродуплексами (рис. 4).

Висновки. Таким чином, за результатами дослідження мутантних варіантів 20-го екзону гена ТРБМ за допомогою методу DGGE встановлено, що використання барвника **Barva NA** для візуалізації електрофореграм як на УФ-трансліюмінаторі, так і на приладі Dark Reader є більш ефективним, ніж застосування бромиду етидію. До того ж **Barva NA** є безпечнішим барвником, а отже, більш перспективним для застосування в методах молекулярно-генетичної діагностики.

Надійшла до редакції 25.05.2006 р.



Рис. 3. DGGE-електрофореграма мутації W1282X 20-го екзону гена ТРБМ. Гель забарвлено бромідом етидію.

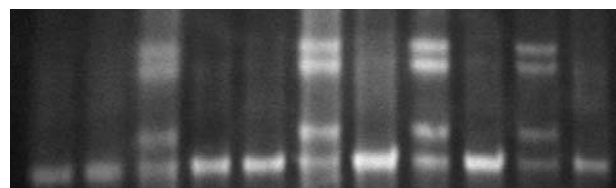


Рис. 4. DGGE-електрофореграма мутації W1282X 20-го екзону гена ТРБМ. Гель забарвлено **Barva NA**.

**New highly sensitive fluorescent dye *Barva NA* for DNA visualization
after the denaturing gradient gel electrophoresis**

O.O. Solovyov, L.A. Livshits, V.B. Kovalska, M.Yu. Losytskyy, Yu.L. Slominski¹, S.M. Yarmoluk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine

¹Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine
5 Murmans'ka str., Kyiv, 02094, Ukraine

Abstract. The comparison of the efficiency of cyanine dye *Barva NA* (Otava, Ukraine), the analogue of SYBR Green, and ethidium bromide for visualization of PCR products of exon 20 CFTR gene after mutant alleles separation using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed. The higher sensitivity of *Barva NA* was shown.

Key words: DGGE, gene, cystic fibrosis, mutations, *Barva NA*, ethidium bromide, DNA visualization.

Перелік літератури

1. Fischer S.G., Lerman L.S. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences // Proc. Natl. Acad. Sc. USA. — Vol. 77, No. 8. — P. 4420-4424, August 1980 Biochemistry.

2. Fischer S.G., Lerman L.S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — Vol. 80. — P. 1579-1583, March 1983 Biochemistry.

3. Singer V.L., Lawlor T.E., Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). — 1999. — Feb 2. — Vol. 439, No 1. — P. 37-47.

4. Мацелюх Б.П., Мацелюх Д.Я., Ковальська В.Б., Волкова К.Д., Криворотенко Д.В., Ярмолук С.М. Вивчення мутагенної активності флуоресцентних ДНК-чутливих монометинціанінових та карбоціанінових

барвників у тесті Реймса // Ukrainica Bioorganica Acta. — 2005. — Т. 3, № 2. — С. 22-26.

5. Нізамов Н.Н., Ісмаїлов З.Ф., Курталієв Е.Н., Нізамов Ш.Н., Хайдарова Ф.У., Ходжаєв Г., Кухаренко О.П., Баланда А.О., Ярмолук С.М. Вивчення токсичності ряду ціанінових барвників, що застосовуються для детекції нуклеїнових кислот та білків // Ukrainica Bioorganica Acta. — 2005. — Т. 3, № 2. — С. 35-38.

6. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. — 1988. — Vol. 239, No 8580. — P. 487-491.

7. Fanen P., Ghanem N., Vidaud M., Besmond C., Martin J., Costes B., Plassa F., Goossens M. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions // Genomics. — 1992. — Jul. 13 (3). — P. 770-776.