

УДК 547.785.5

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ К АНАЛИЗУ ДНК БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ: БРОМИД ЭТИДИЯ + ХЕХСТ-33258*

© 2005 г. В.С. Сибирцев

*Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева;
190005 Санкт-Петербург, Московский пр., 19; факс: +7 (812)327-9776,
электронная почта: vs1969r@mail.ru*

Поступила в редакцию 26.03.04
После доработки 24.06.04

Для системы из двух красителей, бромида этидия (ЕВ) и Хехста-33258 (Хт), изучено изменение в зависимости от присутствия различных количеств ДНК и состава среды спектров поглощения, люминесцентного возбуждения и эмиссии в ультрафиолетовой и видимой областях. Отмечено, что спектральные свойства рассматриваемой системы определяются взаимодействием входящих в ее состав красителей как с нуклеиновой кислотой (НК), так и друг с другом (в частности, при совместной сорбции ЕВ и Хт на ДНК между их молекулами может иметь место флуоресцентный резонансный перенос энергии). Таким образом, вследствие различного характера специфичности ЕВ и Хт по отношению к субстрату и условиям измерения, есть основания полагать, что совместное использование данных красителей сулит дополнительные эффекты (некоторые из которых также рассмотрены в настоящей статье), представляющие интерес в рамках структурно-функционального изучения НК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, флуорофоры, спектральные свойства, перенос энергии.

В настоящее время все большее распространение приобретают искусственно синтезируемые соединения, способные специфически связываться с определенными последовательностями нуклеотидов в геноме [1–6], и особенно те из них, которые способны при этом, например, резко изменять интенсивность своего свечения [7–12].

Все многообразие известных в настоящее время нуклеотид-связывающихся соединений по типу взаимодействия с субстратом подразделяется в основном на два больших класса: так называемые «внешне»-связывающиеся с НК соединения (присоединяющиеся к молекуле полинуклеотида «снаружи», не нарушая целостности структуры субстрата, и специфичные в основном к первичному и вторичному порядкам организации структуры НК [9, 13–16]) и интеркаляторы (которые встраиваются между элементарными парами оснований двойной спирали полинуклеотида и специфичны в основном ко вторичной структуре НК и степени их суперспирализации [7, 17–20]).

К настоящему времени известно и широко используется немало нуклеотид-связывающихся флуорофоров [7, 9, 16–18]. Однако задача те-

оретического обоснования путей конструирования новых соединений, более чувствительных и специфичных по отношению к субстрату, по-прежнему остается актуальной. Помимо прочего, она осложняется тем, что «сильное» избирательное связывание с субстратом, как правило, требует от лиганда одних структурных особенностей, а наличие пригодных для регистрации свойств — других.

Одним из путей разрешения этого противоречия могло бы быть конструирование «комплексных» соединений, одна из частей которых отвечала бы за связывание с субстратом, а другая — за наличие спектральных или иных, пригодных для регистрации свойств. Кроме того, если конструируемое «комплексное» соединение состоит из нескольких субъединиц, способных связываться с субстратом, то для него логично ожидать достаточно значительного увеличения (по сравнению с «мономерными» составляющими указанного соединения) как сродства к субстрату, так и специфичности по отношению к нему. Аналогично, если конструируемое «комплексное» соединение содержит несколько субъединиц, способных к примеру увеличивать свое свечение при сорбции на субстрате, то для него можно ожидать увеличения (по сравнению с вышеуказанными «мономерными» составляющими) чувствительности регистрации такого субстрата. Так, в частности, соединения (I) и (II) (схема 1), являющиеся «бис-

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Paper in Press, BM 04-081, 31.10.2004.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Paper in Press, BM 04-071, 01.08.2004.

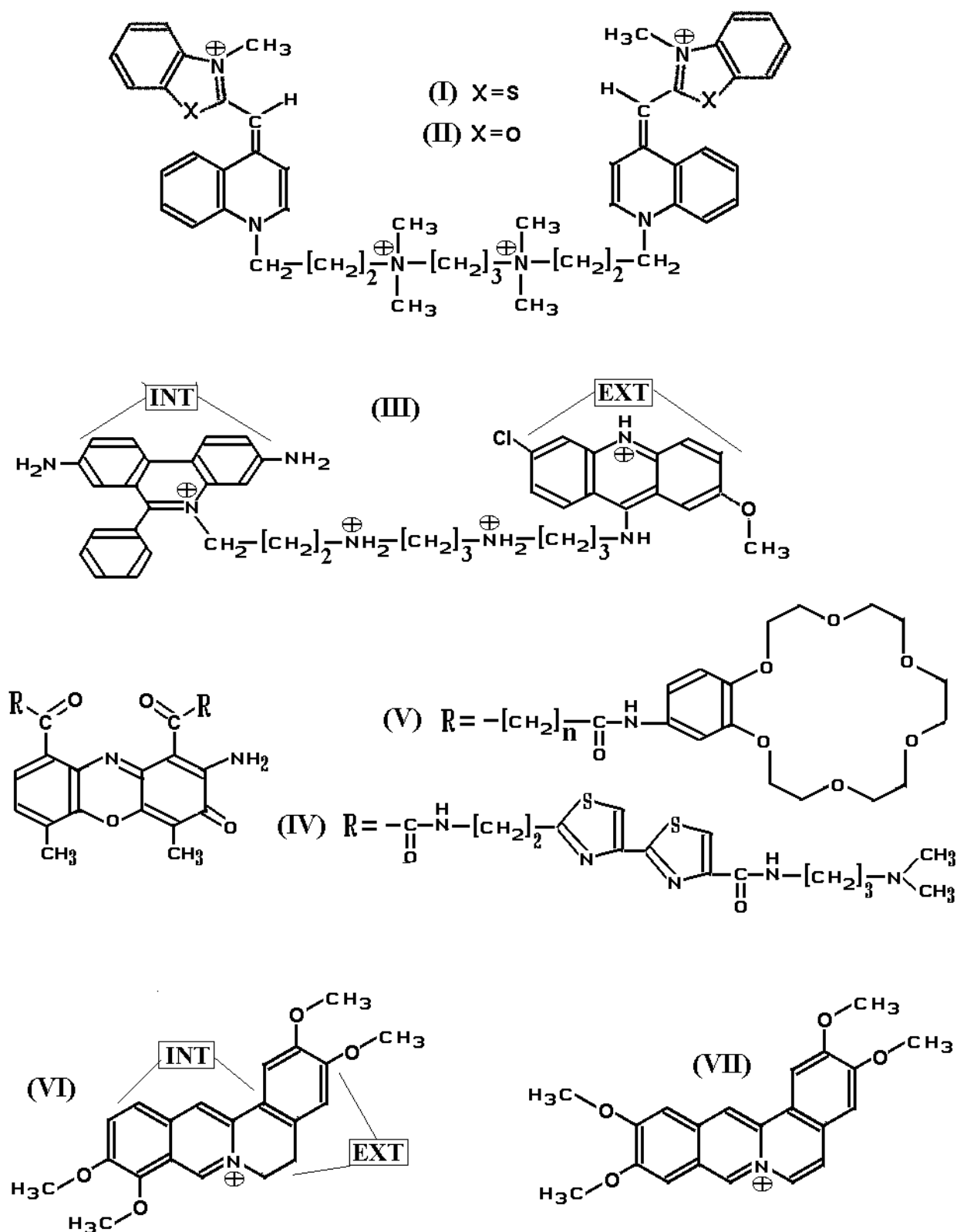


Схема 1. «ENT» и «EXT» обозначены интеркалирующие и «внешне»-связывающиеся с НК фрагменты молекул «гетерофункциональных» соединений

интеркаляторами» на полинуклеотид, демонстрируют сродство к НК и степень увеличения флуоресценции при взаимодействии с ней — значительно большие, чем у любого из известных в настоящее время «моно-интеркаляторов» [21, 22]. Однако при конструировании такого рода «комплексных» соединений результат далеко не всегда однозначно предсказуем.

Так, например:

- у соединения (III) (схема 1) и ему подобных [23, 24], являющихся по своей структуре «классическими бис-интеркаляторами», интеркаляция обоих «функциональных» (этидиевого и акридинового) фрагментов в полинуклеотид может иметь место лишь при длине цепи, соединяющей вышеупомянутые фрагменты, больше критической; в противном же случае, наблюдается интеркаляция в НК только одного (этидиевого) фрагмента, тогда как второй (акридиновый) связывается с полинуклеотидом «внешне»;

- соединение (IV) (схема 1) при $r < 0,07$ (здесь под r понимается количество связанного лиганда, приходящееся на единицу концентрации субстрата) взаимодействует с НК по типу интеркаляции исключительно за счет своих битазольных фрагментов, а при $r > 0,07$ связывается с полинуклеотидом неспецифически за счет феноксазинового «ядра», которое при иных условиях само проявляет свойства интеркалятора [25];

- соединения (V) (схема 1): при $n = 1$ (т.е. одной CH_2 -группе между феноксазиновым «ядром» и бензокраун-фрагментом молекулы) и $r < 0,1$ взаимодействуют с НК по типу интеркаляции за счет феноксазинового «ядра» своей молекулы; при $n = 0$ или 2 и $z > 0$ или при $n = 1$ и $r > 0,1$ — «внешне»-связываются с НК за счет своих бензокраун-фрагментов; а при $n > 2$ вообще взаимодействуют с НК крайне незначительно [26];

- соединение (VI) (схема 1) демонстрирует свойства как интеркалятора, так и «внешне»-связывающегося с НК соединения; в то время как его аналог (VII), дегидрированный по одному из ароматических циклов, взаимодействует с ДНК исключительно как интеркалятор [27].

Вследствие вышесказанного более перспективным представляется использование для анализа НК систем, включающих в себя несколько нуклеотид-специфических флуорофоров, не связанных между собой непосредственно (а лишь через субстрат), но имеющих согласованные комплексообразующие и спектральные свойства.

В качестве примера одной из таких систем можно предложить два таких широко используемых (по отдельности) флуоресцентных красителя, как:

2-[2-(4-гидроксифенил)бензимидазол-

-5(6)-ил]-5(6)-(4-метилпиперазин-1-ил)

бензимидазол (Хехст-33258) (Хт)

и

2,7-диамино-10-этил-9-фенил-

-фенантридиниумбромид

(бромид этидия) (ЕВ)

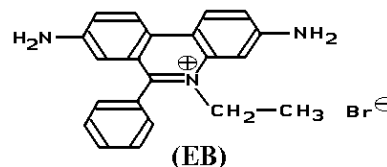
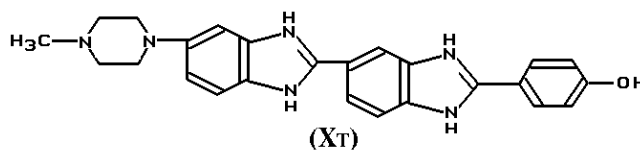


Схема 2

При этом, если ЕВ является интеркалятором, прослаивающимся между двумя парами оснований двойной спирали полинуклеотида с некоторым предпочтением к его GC-богатым участкам и имеющим в связанном с НК состоянии в видимой области спектра длины волн максимумов возбуждения флуоресценции и эмиссии: 520 и 605 нм соответственно [13, 28], то Хт, в свою очередь, является «внешне»-связывающимся с НК соединением, предпочтительно специфичным к участкам двойной спирали полинуклеотида, содержащим три последовательно расположенных АТ- и одну GC-пары оснований, и имеющим в связанном с ДНК состоянии в видимой области спектра длины волн максимумов возбуждения флуоресценции и эмиссии: 350 и 455 нм соответственно [7, 29]. Таким образом, при совместном использовании Хт и ЕВ для анализа НК можно существенно повысить информативность исследования, в частности, оценивая не только общее количество НК в пробе [7, 30], но и характер ее первичной и вторичной структуры [31], а также степень суперспирализации полинуклеотида [11, 32–34].

Кроме того, при совместной сорбции Хт и ЕВ на полинуклеотиде между их молекулами может происходить флуоресцентный резонансный безызлучательный перенос энергии. Это явление

имеет место, когда область длин волн флуоресцентной эмиссии одного из красителей (донора энергии — в нашем случае Хт) локализуется в области длин волн возбуждения флуоресценции другого красителя (акцептора энергии — в нашем случае ЕВ). В таком случае, когда первично возбужденная молекула (донор энергии) вступает в слабое (диполь-дипольное) взаимодействие с другой молекулой (акцептором энергии), находящейся на расстоянии от донорной молекулы меньшем длины волны излучения оной, возникает дополнительная вероятность перехода молекулы донора в электронно-колебательное состояние с меньшей энергией при одновременном переходе молекулы акцептора в состояние с большей энергией. При этом эффективность такого резонансного переноса энергии (E , определяемая как отношение числа квантов энергии, переданных от донора к акцептору, к общему числу квантов, испускаемых донором при переходе из возбужденного состояния в основное в тех же условиях в отсутствие акцептора) зависит от расстояния между хромофорными группами возбуждаемого донора и акцептора (f), как:

$$E = f_0^l / (f_0^l + f^l), \quad (1)$$

где f_0 — Форстеровский критический радиус (такое f , при котором вероятность перехода донора из возбужденного состояния в основное за счет переноса энергии к акцептору равна сумме вероятностей всех других процессов, приводящих к переходу донора из возбужденного состояния в основное в тех же условиях в отсутствие акцептора), а $l = 2, 4$ или 6 в зависимости от вида диполь-дипольного взаимодействия между молекулами донора и акцептора [35–37].

Следует отметить, что явление, когда при возбуждении флуоресценции донора светиться начинает не только он, но и акцептор, может наблюдаться и на расстояниях между их молекулами больших длины волны излучения донора. Однако механизм переноса энергии в этом случае иной (молекула акцептора реадсорбирует квант, уже испущенный донором) и зависимость E от f соответственно отличается от выражения (1). Также явление флуоресцентного резонансного безызлучательного переноса энергии может наблюдаться и между различными фрагментами одного «мультифункционального» соединения — что, например, и имеет место в случае красителя (III) (схема 1) [23, 24]. Кроме того, при рассмотрении систем из НК и нескольких специфичных в той или иной степени по отношению к ней лигандов следует учитывать возможность конкуренции между последними за места связывания на общем для них высокомо-

лекулярном субстрате, а также множество других нюансов, для более подробного рассмотрения которых лучше обратиться к специальной литературе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Измерения проводились при постоянных концентрациях красителей и различных концентрациях ДНК при температуре 20–25°. Спектры поглощения исследуемых растворов регистрировали на спектрофотометре фирмы «Beckman» (Австрия) model 35. Флуоресценцию проб анализировали на спектрофлуориметре фирмы «Hitachi» (Япония) model 850. При записи спектров флуоресценции щели монохроматоров возбуждения и эмиссии устанавливали по 3 нм, скорость сканирования — 120 нм/мин, время отклика — 2 с, усиление ФЭУ — нормальное. Для измерения использовали стандартные кюветы квадратного сечения с длиной оптического пути 1 см. Спектры флуоресценции корректировали в соответствии с руководством по эксплуатации к спектрофлуориметру с использованием счетчика квантов на основе стандартного спиртового раствора родамина В.

Вещества анализировали в буферных растворах следующего состава:

1) 0,01 М $NaCl$ + 0,01 М Na_2EDTA + 0,01 М Tris (pH 7,4);

2) 19 частей (по объему) буфера 1 + 1 часть лизирующей смеси (используемой для выделения из клеток интактной ядерной ДНК [38]), которая содержала: 2 М $NaCl$ + 0,1 М Na_2EDTA + 0,01 М Tris (pH 8,0) + 0,5% (по объему) Triton X-100.

Коммерческие красители Хт и ЕВ, а также Na_2EDTA (этилендиаминотетраацетат натрия), Tris (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол) и Triton X-100 (4-октил-[2,4,6,8,10-деканпентол]оксибензол) были получены от фирмы «Serva» (Германия). В качестве стандартного субстрата использовалась ДНК тимуса теленка фирмы «Serva» (58% АТ-пар; средняя молекулярная масса на один нуклеотид 326 Да, молярный коэффициент поглощения $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Для гомогенизации и уменьшения светорассеяния стандартную ДНК предварительно обрабатывали ультразвуком на аппарате УЗДН-2 (Россия) в течение 15 с при силе тока 0,3 А на резонансной частоте 22 кГц. Остальные реактивы использовались с маркой х.ч. Если не оговаривается особо, то упоминаемые в настоящей статье концентрации веществ — молярные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральное поведение ЕВ, взятого отдельно от Хт, в присутствии различных количеств ДНК в водном буфере 1 с низкой ионной силой показано на рис. 1. По своему характеру в целом оно было подобно ранее рассмотренному нами в аналогичных условиях для Хт отдельно от ЕВ [28]. Исключение составили другие значения длин волн максимумов возбуждения и флуоресцентной эмиссии, соотношений $\Delta A/\Delta C_{\text{ДНК}}$ и $\Delta I/\Delta C_{\text{ДНК}}$ (где A — оптическая плотность, I — интенсивность флуоресценции, $C_{\text{ДНК}}$ — концентрация ДНК в системе), а также соотношений интенсивностей пиков возбуждения и поглощения, локализованных в ультрафиолетовой (УФ; 200–300 нм) и видимой (ВД; 300–700 нм) областях спектра (см. таблицу).

Система «Хт + ЕВ» вела себя иначе. Так, если спектры ее поглощения в присутствии ДНК представляли собой сумму спектров Хт и ЕВ, взятых отдельно друг от друга в тех же условиях (что доказывало отсутствие заметного конкурентного связывания между данными красителями за места связывания на субстрате), то характер спектров флуоресценции рассматриваемой системы был существенно сложнее. В качестве примера, на рис. 2 показано изменение спектров флуоресценции системы «Хт + ЕВ» при соотношении молярных концентраций красителей $C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}} = 8$ в буфере 1 с низкой ионной силой в присутствии разных количеств ДНК тимуса теленка в диапазоне соотношений молярных концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ от 0 до 25 (соотношение $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{ЕВ}}$ при этом соответственно изменялось от 0 до примерно 3).

Из приведенного рисунка можно видеть, что в спектрах возбуждения рассматриваемой системы, регистрируемых при длине волны эмиссии 455 нм (соответствующей максимуму флуоресцентной эмиссии Хт, взятого отдельно от ЕВ, в присутствии ДНК; см. таблицу), как и в случае бинарной системы «Хт + ДНК» присутствуют только два пика с максимумами при длинах волн 280 и 350 нм, соответствующие переходу из основного состояния в возбужденное молекул Хт, связанных с ДНК. Однако сходным образом с вышеупомянутой бинарной системой «Хт + ДНК» эти пики в рассматриваемой нами тройной системе «Хт + ЕВ + ДНК» вели себя лишь до соотношения $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}} = 15$. При дальнейшем увеличении отношения $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ (а соответственно и $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{ЕВ}}$) интенсивность данных пиков начинала уже не возрастать, как ранее, а уменьшаться. Этот факт, по-видимому, явился следствием имевшего место в рассматриваемой тройной системе «Хт + ЕВ + ДНК» процесса флуоресцентного резонансного

безызлучательного переноса энергии от первично возбужденных молекул Хт (максимум при длине волны 353 нм) к молекулам ЕВ, связывающимся с ДНК на расстоянии от молекул Хт,

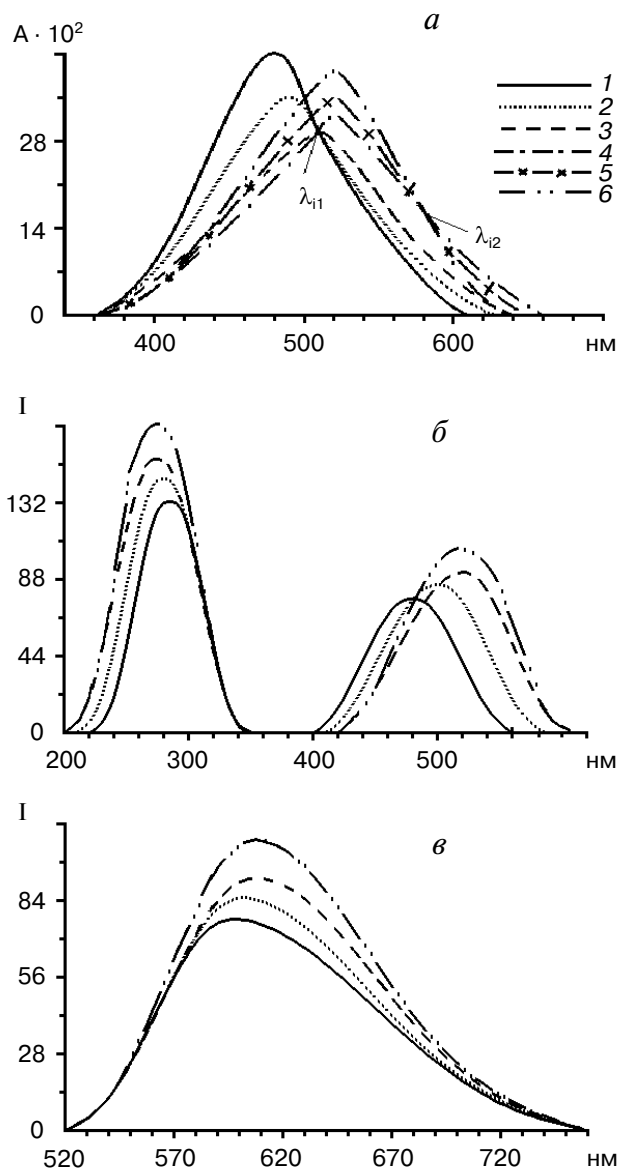


Рис. 1. Спектры поглощения (а), возбуждения (б) и эмиссии (в) ЕВ в присутствии различных количеств ДНК в буфере 1. Кривым 1–6 соответствуют отношения молярных концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{ЕВ}} = 0, 5, 10, 15, 20$ и 25 . λ_{11} и λ_{12} — обозначают изобестические точки. Запись спектров возбуждения проводили при длине волны, соответствующей максимуму эмиссии, а спектров эмиссии — при длине волны, соответствующей максимуму пика возбуждения ЕВ в видимой области при каждом конкретном соотношении $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{ЕВ}}$ в системе. Оптическая плотность (A ; рис. а) определялась для $C_{\text{ЕВ},1} = 8 \cdot 10^{-5}$ М; а интенсивность флуоресценции (I ; рис. б, в) для $C_{\text{ЕВ},2} = 8 \cdot 10^{-6}$ М

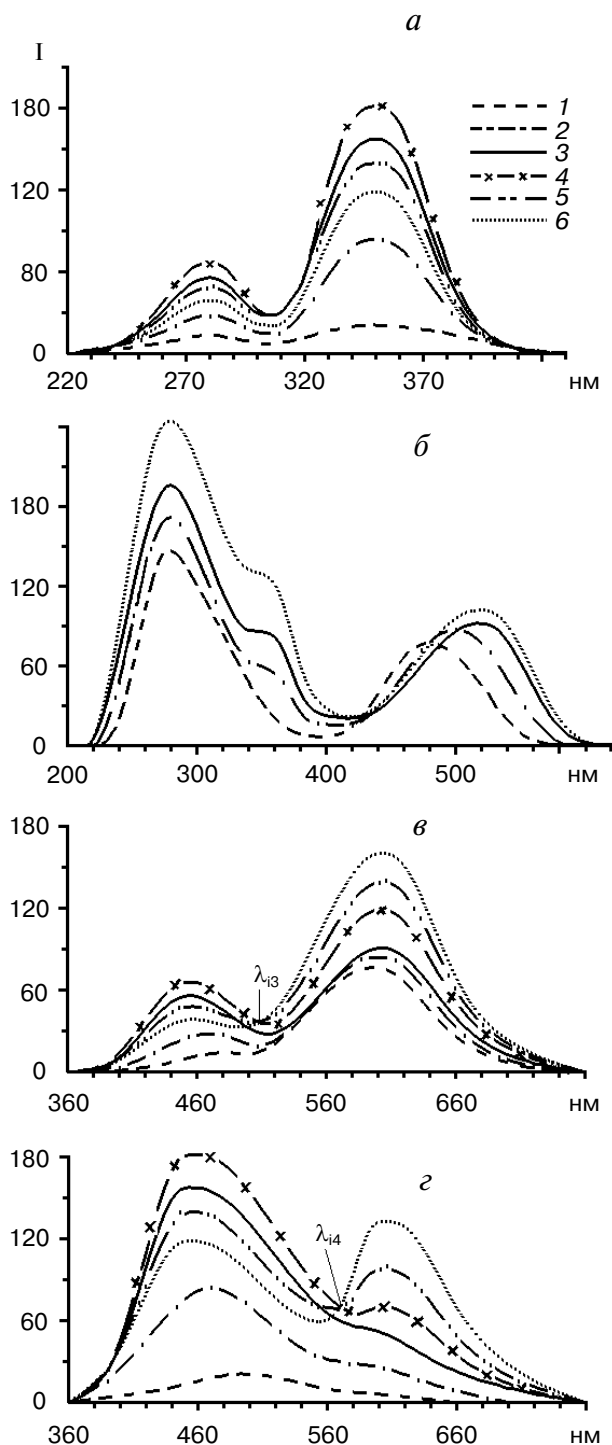


Рис. 2. Спектры флуоресценции системы «Хт + ЕВ» ($C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}} = 8$) в присутствии различных количеств ДНК в буфере 1, регистрируемые при фиксированных длинах волн эмиссии 455 (а) и 605 (б) и возбуждения 280 (в) и 350 (г) нм соответственно. Кривым 1–6 соответствуют отношения молярных концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}} = 0, 5, 10, 15, 20$ и 25. λ_{13} и λ_{14} — обозначают изобестические точки. $C_{\text{Хт}} = 1 \cdot 10^{-6}$ М

меньшем длины волны излучения последних (максимум при длине волны 455 нм), и способным возбуждаться в этой области длин волн (максимум при длине волны 520 нм; см. таблицу).

Другим следствием вышеупомянутого процесса было то, что в спектрах возбуждения флуоресценции системы «Хт + ЕВ + ДНК», регистрируемых при длине волны эмиссии 605 нм (соответствующей максимуму флуоресцентной эмиссии ЕВ, взятого отдельно от Хт, в присутствии ДНК), помимо двух пиков с максимумами в области длин волн 276–285 и 480–520 нм соответственно, как и в случае бинарной системы «ЕВ + ДНК», присутствовал дополнительный пик с максимумом при длине волны 350 нм.

В полном соответствии с данным фактом, в спектре флуоресцентной эмиссии рассматриваемой системы «Хт + ЕВ + ДНК» при возбуждении ее светом с длиной волны 350 нм (соответствующей максимуму поглощения Хт в ВД-области спектра) имел место не один, а два пика с максимумами при длинах волн 455 и 605 нм, из которых первый соответствовал переходу в основное состояние первично возбужденных молекул Хт, а второй — вторично возбужденных молекул ЕВ. При этом, если с увеличением соотношения концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ в системе пик с максимумом при длине волны 605 нм увеличивался на всем исследуемом диапазоне $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ (от 0 до 25), то пик с максимумом при длине волны 455 нм увеличивался лишь до соотношения $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}} = 15$, после чего начинал уменьшаться. В результате, в спектре флуоресцентной эмиссии рассматриваемой системы «Хт + ЕВ + ДНК», возбуждаемой светом с длиной волны 350 нм, в диапазоне соотношений $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ от 15 до 25 имела место изобестическая точка при длине волны 570 нм.

При возбуждении системы «Хт + ЕВ + ДНК» светом с длиной волны 280 нм (соответствующей УФ-максимумам поглощения при связывании с ДНК как Хт, так и ЕВ; см. таблицу) характер спектров флуоресцентной эмиссии в целом был подобен предыдущему случаю (когда система возбуждалась светом с длиной волны 350 нм; ср. рис. 2, в, г). Исключение составило то, что интенсивность пика с максимумом при длине волны 605 нм была значительно выше, чем у пика с максимумом при длине волны 455 нм. Кроме того, в диапазоне соотношений $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ от 15 до 25 изобестическая точка наблюдалась при длине волны 505, а не 570 нм, как в предыдущем случае. Объяснены данные факты могут быть тем, что флуоресценцию ЕВ в рассматриваемом случае определяло уже не только его вторичное возбуждение за счет соседних молекул Хт, но и собственное первичное УФ-возбуждение молекул ЕВ.

При возбуждении светом с длиной волны 520 нм (соответствующей максимуму поглощения ЕВ в ВД-области при связывании его с ДНК) рассматриваемая тройная система вела себя, как обычная бинарная «ЕВ + ДНК» (см. рис. 1, в).

В случае изменения соотношения $C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}}$, наличия в растворе дополнительных веществ, из-

Спектральные свойства исследованных красителей, взятых отдельно друг от друга, в буфере 1 в отсутствие и в присутствии ДНК

Характеристика	Краситель	
	(Хт)	(ЕВ)
$\lambda_{\text{AB,U}}$	267	285
$\lambda_{\text{AB,U}}^{\text{D}}$	282	276
$\lambda_{\text{AB,V}}$	345	480
$\lambda_{\text{AB,V}}^{\text{D}}$	353	520
$\lambda_{\text{ЕМ}}$	497	595
$\lambda_{\text{ЕМ}}^{\text{D}}$	455	605
$\lambda_{\text{I}}^{\text{I}}$	350	510
$\lambda_{\text{I}}^{\text{D}}$	383	580
$\varepsilon_{\text{V}} \cdot 10^{-3}$	27,3	5,6
$\varepsilon_{\text{U}}/\varepsilon_{\text{V}}$	0,3	1,4
$\mu_{\text{V}} \cdot 10^{-6}$	11,7	0,3
$\mu_{\text{U}}/\mu_{\text{V}}$	0,3	1,7
$\Phi_{\text{V}}^{\text{D}}/\Phi_{\text{V}}$	41,6	9,9
$\eta_{\text{V}}^{\text{I}} \cdot 10^{-5}$	49,0	4,8
$\eta_{\text{V}}^{\text{I0}} \cdot 10^{-5}$	40,7	2,9
$\eta_{\text{V}}^{\text{D}} \cdot 10^{-5}$	16,9	0,0

Примечание: λ_{AB} и $\lambda_{\text{ЕМ}}$ (нм) — длины волн максимумов поглощения (совпадали с максимумами в спектрах возбуждения) и флуоресцентной эмиссии красителей; λ_{I} (нм) — длины волн изобестических точек, имевших место в спектрах поглощения исследованных соединений при изменении соотношения концентраций ДНК/краситель; ε ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и μ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) — коэффициенты, отражающие максимальную величину оптической плотности и интенсивности флуоресценции красителя в указанном диапазоне длин волн при его концентрации в системе, равной 1 моль/л; Φ — квантовые выходы флуоресценции красителей (определялись, как описано в работе [39]); η ($\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) — коэффициенты, отражающие величину приращения интенсивности флуоресценции красителя при увеличении концентрации ДНК на 1 моль/л (определялись, как описано в работе [39]); индексы «U» и «V» соответствуют ультрафиолетовой ($\lambda = 200\text{--}300$ нм) и видимой ($\lambda = 300\text{--}700$ нм) областям спектров; индексами «I», «I0» и «D» отмечены величины, измерявшиеся при соотношениях молярных концентраций ДНК/краситель равных 1, 10 и 100 соответственно (остальные спектральные характеристики соединений изменялись в отсутствие ДНК).

бирательно влияющих на спектральные свойства одного из красителей, и т.п., характер спектров флуоресценции системы «Хт + ЕВ + ДНК» мог меняться весьма существенным образом. В качестве примера при этом можно сослаться на рис. 3, где приведены спектры флуоресценции Хт и «Хт + ЕВ» ($C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}} = 8$) в присутствии различных количеств ДНК в буфере 2, который, как уже было отмечено нами ранее [39], вследствие присутствия в нем неионного детергента Triton X-100 увеличивает квантовый выход флуоресценции Хт в ВД-области сходным с ДНК образом, в то время как на спектральные свойства ЕВ влияет в значительно меньшей степени. Из данного рисунка видно, что система «Хт + ЕВ + ДНК» в буфере 2, в отличие от ранее рассматриваемого буфера 1, в частности, демонстрировала монотонное уменьшение интенсивности пика флуоресцентной эмиссии с максимумом при длине волны 455 нм, регистрируемого при длине волны возбуждения 350 нм (соответствующей максимуму поглощения Хт в ВД-области при связывании его с ДНК), с увеличением концентрации ДНК на всем исследуемом диапазоне соотношений $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ (от 0 до 25).

Кроме того, следует отметить, что и в отсутствие ДНК в буфере 2 интенсивность вышеуказанного пика флуоресцентной эмиссии системы «Хт + ЕВ» была заметно меньше интенсивности аналогичного пика у Хт, взятого в той же концентрации, но отдельно от ЕВ. Это, очевидно, также явилось следствием процесса переноса энергии от Хт к ЕВ, протекающего в рассматриваемой системе; но уже не безызлучательного (могущего иметь место, как отмечалось ранее, лишь при связывании молекул Хт и ЕВ полинуклеотидом на расстоянии меньшем 450 нм друг от друга), а излучательного (осуществляемого на расстояниях между молекулами донора и акцептора больших длины волны излучения первого), при котором квант света сначала испускается молекулой Хт при переходе ее из возбужденного состояния в основное и лишь затем, поглощаясь при встрече с молекулой ЕВ, переводит ее в свою очередь из основного состояния в возбужденное.

Наиболее общий случай изменения интенсивностей пиков флуоресцентной эмиссии с максимумами при длинах волн 455 и 605 нм при возбуждении системы «Хт + ЕВ + ДНК» в присутствии ДНК светом с длиной волны 350 или 520 нм представлен на рис. 4.

В качестве практического примера одной из возможных схем анализа генетического материала с помощью рассматриваемой в настоящей работе системы «Хт + ЕВ» можно предложить следующее.

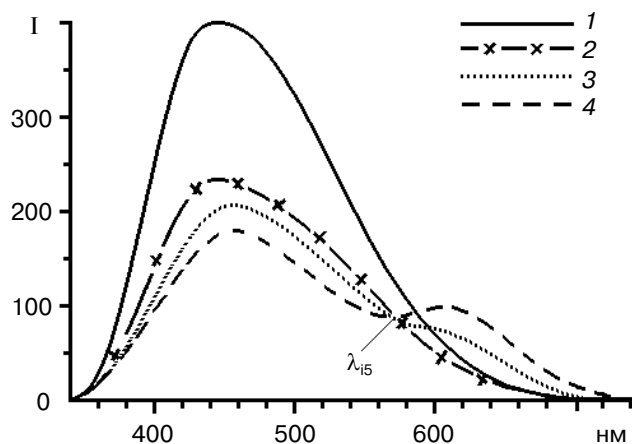


Рис. 3. Спектры флуоресценции Хт (кривая 1) и «Хт + ЕВ» ($C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}} = 8$; кривые 2–4) в присутствии различных количеств ДНК в буфере 2, регистрируемые при фиксированной длине волны возбуждения 350 нм. Кривыми 1 и 2 показаны спектры, снятые в отсутствие ДНК. Кривым 3 и 4 соответствуют отношения молярных концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}} = 10$ и 25. λ_{15} обозначена изобестическая точка. $C_{\text{Хт}} = 1 \cdot 10^{-6}$ М

1) Подготавливаем ДНК для анализа. Для этого к 0,1 мл пробы (в качестве которой может быть использована, например, цельная кровь) добавляем 1 мл лизирующей смеси (см. раздел «Методы исследования»); перемешиваем; выдерживаем 5 мин; после чего к 0,05 мл полученного раствора добавляем 1 мл буфера 1. В результате, получаем раствор A^* . Далее, для получения наиболее отчетливого сигнала устанавливаем щели монохроматоров возбуждения и эмиссии на спектрофлуориметре: 10 и 20 нм соответственно; после чего, измеряя интенсивность флуоресценции раствора A^* при длинах волн возбуждения (λ_{EX}) и эмиссии (λ_{EM}): 350 и 470 нм соответственно, определяем для пробы значение $I_{\text{Ф}}$.

2) Определяем концентрацию ДНК в пробе. Для этого, добавляя к 1,05 мл раствора A^* 0,05 мл стандартного раствора Хт в буфере 1 (приготовленного из расчета $C_{\text{Хт}} = 10$ мкг/мл), получаем раствор B^* , измеряя интенсивность флуоресценции которого при $\lambda_{\text{EX}} = 350$ нм и $\lambda_{\text{EM}} = 470$ нм, определяем для пробы значение $I_{\text{Х}}$. Далее, добавлением к 1,1 мл раствора B^* 0,02 мл раствора стандартной ДНК тимуса теленка в буфере 1 (приготовленного из расчета $C_{\text{ДНК}} = 60$ мкг/мл), получаем раствор B^* , измеряя интенсивность флуоресценции которого при тех же длинах волн, что и ранее, определяем значение $I_{\text{ДХ}}$. После чего вычисляем собственно:

$$C_{\text{ДХ}} = q \cdot C_{\text{СД}} \cdot (I_{\text{Х}} - I_{\text{Ф}}) / (I_{\text{ДХ}} - I_{\text{Х}}), \quad (2)$$

где $q = 246$ – разбавление ДНК в растворе B^* , по сравнению с отобранной цельной кровью; а $C_{\text{СД}} = 3,3 \cdot 10^{-6}$ М – концентрация стандартной ДНК тимуса теленка в растворе B^* .

3) Оцениваем степень суперспирализации ДНК в пробе. Для этого, выполняя те же действия, что описаны ранее в п. 2, но со стандартным раствором ЕВ, вместо Хт, в буфере 1 (приготовленном из расчета $C_{\text{ЕВ}} = 200$ мкг/мл), определяем величину $C_{\text{ДЕ}}$. После чего вычисляем коэффициент:

$$S = C_{\text{ДЕ}} / C_{\text{ДХ}}, \quad (3)$$

увеличение которого в соответствии с различным характером специфичности ЕВ и Хт по от-

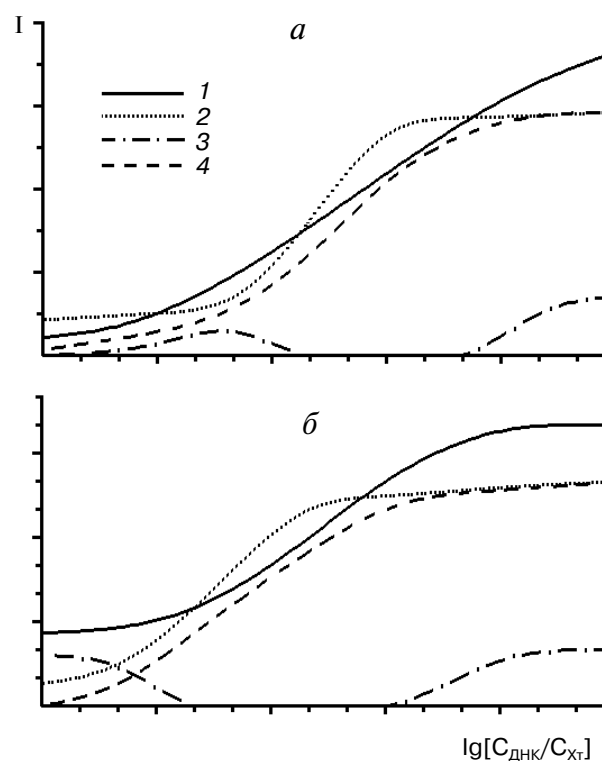


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции (I) от соотношения концентраций $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Хт}}$ (при $C_{\text{ЕВ}}/C_{\text{Хт}} = \text{const}$) в буферах 1 (а) и 2 (б). Условные обозначения: кривой 1 показано изменение I , регистрируемой при длинах волн возбуждения и эмиссии: 350 и 455 нм соответственно для Хт в отсутствие ЕВ; кривой 2 показано изменение I , регистрируемой при длинах волн возбуждения и эмиссии: 520 и 605 нм соответственно для ЕВ, независимо от присутствия Хт; кривой 3 показано изменение I , регистрируемой при длинах волн возбуждения и эмиссии: 350 и 455 нм соответственно для Хт в присутствии ЕВ; кривой 4 показано изменение I , регистрируемой при длинах волн возбуждения и эмиссии: 350 и 605 нм соответственно для ЕВ в присутствии Хт

ношению к полинуклеотиду (см. «Введение»), а также данными работ [11, 32–34], должно в определенной мере отражать уменьшение степени суперспирализации ДНК пробы.

4) Теломерной последовательностью называется фрагмент, многократно повторяющийся на концах молекул ДНК, входящих в состав генома многоклеточных живых организмов, и имеющий у позвоночных животных и человека вид: TTAGGG [40, 41]. При каждом клеточном делении таковые молекулы ДНК укорачиваются, вследствие неполной репликации, на определенное число вышеуказанных теломерных последовательностей. Таким образом, длина теломерного участка является максимальным ограничителем возраста живого организма, поскольку после полного редуцирования данных участков при дальнейших делениях клеток начинает происходить удаление уже собственно информативной части их генома. Кроме того, теломеры играют определенную структурную роль в расположении хромосом внутри ядра клетки и правильном их функционировании; т.е. укорочение теломер ведет к общему ухудшению состояния организма, а не просто работает как счетчик циклов клеточных делений [42, 43]. Вместе с тем в организме существует ряд клеток (половые, стволовые, лимфатической системы, кожи, тела матки, раковые [40]), у которых вследствие действия фермента — теломеразы, либо иных, альтернативных механизмов [44], происходит восстановление длины теломерных участков при каждом делении. Таким образом, изучение проблемы теломер может иметь важное значение как для выяснения общих механизмов старения многоклеточных организмов, так и для лечения онкологических заболеваний.

В соответствии с вышесказанным, для экспрессной (хотя, возможно, вследствие того и достаточно приблизительной) оценки длины теломерных участков ДНК пробы можно предложить следующее. Сначала насытить ДНК Хт. Затем добавить в систему ЕВ, который проявляет не только меньшую специфичность, но и меньшее сродство по отношению к субстрату, нежели Хт (что можно отметить на основании различных литературных источников [7, 13, 28, 29], а также было удостоверено нами на основании расчетов по модели *McGhee—vanHippel* [16, 45] для случая взаимодействия с ДНК ЕВ и Хт, взятых по отдельности), а потому способен занять на полинуклеотиде только несвязанные еще последним участки. После этого оценить эффективность флуоресцентного резонансного переноса энергии от Хт к ЕВ, каковая должна коррелировать с числом мест на ДНК, граничных между ее АТ- и GC-богатыми областями (где сорбированные на полинуклеотиде молекулы Хт и ЕВ расположены друг относительно

друга на расстоянии, меньшем f_0), из коих достаточно значительная часть, очевидно, должна приходиться на теломерные (TTAGGG)_n-участки.

В приложении к рассматриваемой выше схеме анализа ДНК это может выглядеть следующим образом. Измеряя интенсивность флуоресценции раствора B^* (см. п. 2) при $\lambda_{EX} = 350$ нм и $\lambda_{EM} = 605$ нм определяем значение $I_{ФХ}$. Затем, добавлением к 1,12 мл раствора B^* 0,02 мл стандартного раствора ЕВ в буфере 1, получаем раствор I^* , измеряя интенсивность флуоресценции которого при длинах волн $\lambda_{EX} = 350$ нм и $\lambda_{EM} = 605$ нм, определяем значение $I_{ХЕ}$. После этого величину коэффициента эффективности переноса энергии для пробы определяем по формуле:

$$K = (I_{ХЕ} - I_{ФХ}) / C_{ДХ}. \quad (4)$$

Уменьшение же величины данного коэффициента и должно, в соответствии с вышесказанным, отражать, в определенной мере, уменьшение длины теломерных участков в геноме человека и позвоночных животных.

Вышеописанная схема анализа ДНК была опробована нами на двух группах крыс по 20 особей в каждой; отобранных таким образом, что I группа включала в себя животных со средним возрастом 2 месяца и весом 140 гр, а II — животных со средним возрастом 1,5 года и весом 350 гр. В результате нами были, в частности, получены статистически достоверно (доверительная вероятность 99%) различающиеся величины усредненных по I и II группам параметров S и K, — чего и следовало ожидать, поскольку с возрастом (а различия в «скорости процессов старения» для крыс и человека составляют примерно 20 : 1) состояние генетического материала в клетках должно ухудшаться, в частности, за счет уменьшения степени суперспирализации ДНК, а также длины теломерных участков генома. Вышеприведенное, конечно, не может служить строгим доказательством того, что величина S действительно коррелирует со степенью суперспирализации полинуклеотида, а величина K — с длиной теломерных участков ДНК. Однако подобная задача и не ставилась нами в настоящей работе. Мы привели здесь схему определения параметров S и K лишь как один из возможных примеров применения системы «Хт + ЕВ» для анализа генетического материала.

В заключение автор хочет выразить благодарность С.Д.Иванову (зав. лаб. биотестирования токсических факторов окружающей среды Центрального научно-исследовательского рентгенорадиологического института) за ряд ценных мыслей, которые были использованы в настоящей работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Denison, L., Haigh, A., D'Cunha, G., and Martin, R.F. (1992) *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 69–81.
- Gazzard, B.G. (1989) *J. Antimicrob. Chemother.*, **23**, 67–75.
- Van Iperen, H.P., and van Henegouwen, G.M.J.B. (1997) *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **39**, 99–109.
- Baguley, B.C. (1982) *Molec. Cell. Biochem.*, **43**, 167–181.
- Osashi, M., and Oki, T. (1996) *Expert. Opin. Therp. Patents.*, **6**, 1285–1294.
- Bartulewicz, D., Markowska, A., Wolczynski, S., Dabrowska, M., and Rozanski, A. (2000) *Acta Biochim. Polonica*, **47**, 23–35.
- Morgan, A.R., Lee, J.S., Pulleyblank, D.E., Murray, N.L., and Evans, D.H. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **7**, 547–571.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Kapuscinski, J., Staiano-Coico, L., and Melamed, M.R. (1984) *Cytometry*, **5**, 355–363.
- Zimmer, C., and Wahnert, U. (1986) *Prog. Molec. Biol.*, **47**, 31–112.
- Campejohn, R.S., Macarthey, J.C., and Morris, R.W. (1989) *Cytometry*, **10**, 410–416.
- Иванов С.Д. (1992) *Пострадиационные реакции ДНК нуклеотидов лейкоцитов крови. Детектирование, закономерности, диагностическое и прогностическое значение*. Дис. ... докт.биол.наук, ЦНИРПИ, Ленинград, 306 с.
- Ivanov, S.D., Korytova, L.I., Yamshanov, V.A., Ilyn, N.V., and Sibirtsev, V.S. (1997) *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **16**, 183–188.
- Pjura, P.E., Grzeskowiuk, K., and Dickerson, R.E. (1987) *J. Mol. Biol.*, **197**, 257–271.
- Pelton, J.C., and Wemmer, D.E. (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1393–1399.
- Eriksson, S., Kim, S.K., Kubista, M., and Norden, B. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2987–2998.
- Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. (2001) *Биоорган. химия*, **27**, 64–73.
- Muller, W., and Grothers, D.M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 267–277.
- Muller, W., Bunemann, H., and Dattagupta, N. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **54**, 279–291.
- Miller, K.J., and Newlin, D.D. (1982) *Biopolymers*, **21**, 633–652.
- Tomosaka, H., Omata, S., Hasegawa, E., and Anzai, K. (1997) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1121–1125.
- Rye, H.S., Dabora, J.M., Quesada, M.A., Mathiens, R.A., and Glazer, A.N. (1993) *Analyt. Biochem.*, **208**, 144–150.
- Larsson, A., Carlsson, Ch., and Jonsson, M. (1995) *Biopolymers*, **36**, 153–167.
- Le Pecq, J.B., Le Bret, M., Barbet, J., and Roques, B.P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2915–2922.
- Gaugain, B., Barbet, J., Oberlin, R., Roques, B.P., and Le Pecq, J.B. (1978) *Biochemistry*, **17**, 5071–5088.
- Кривцова М.А., Морошкина Е.Б., Глибин Е.Н. (1995) *Молекуляр. биология*, **29**, 144–148.
- Морошкина Е.Б., Загоруйко Н.Е., Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г., Глибин Е.Н. (2002) *Молекуляр. биология*, **36**, 740–744.
- Pilch, D.S., Yu Ch., Makhey, D., La Voie, E.J., Srinivasan, A.R., Olson, W.K., Sauers, R.R., Breslauer, K.J., Geacintov, N.E., and Lin, L.F. (1997) *Biochemistry*, **36**, 12542–12553.
- Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. (1994) *Биоорган. химия*, **20**, 650–668.
- Борисова О.Ф., Шелкина А.К., Карапетян А.Т., Суровая А.Н. (1998) *Молекуляр. биология*, **32**, 855–862.
- Brunk, C.F., Jones, K.C., and James, T.W. (1979) *Anal. Biochem.*, **92**, 497–500.
- Mabuchi, T., and Nishikawa, S. (1990) *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7461–7462.
- Русинова Г.Г., Турдакова В.А., Мушкачева Г.С. (1991) *Мед. радиология*, **36**, 51–54.
- Иванов С.Д., Кованько Е.Г. (1994) *Цитология*, **36**, 736–737.
- Кованько Е.Г. (2000) *Флуоресцентная характеристика изменений структуры ДНК клеток кроветворной системы облученных крыс*. Дис. ... канд. биол. наук. СПб.: ЦНИРПИ, 166 с.
- Ермолаев В.Л., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б., Шахвердов Т.А. (1977) *Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения*. Ленинград: Наука, 311 с.
- Speiser, S. (1996) *Chem. Rev.*, **96**, 1953–1976.
- Lankiewicz, L., Malika, J., and Wicz, W. (1997) *Acta Biochimica Polonica*, **44**, 477–490.
- Cook, P.R. (1984) *EMBO J.*, **3**, 1837–1842.
- Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Иванов С.Д. (1997) *Биоорган. химия*, **23**, 969–978.
- Микер А.К., Коффи Д.С. (1997) *Биохимия*, **62**, 1547–1557.
- Куринова Е.В., Мейсон Д.М. (1997) *Биохимия*, **62**, 1453–1466.
- Скулачев В.П. (1997) *Биохимия*, **62**, 1394–1399.
- Блэкберн Е.Х. (1997) *Биохимия*, **62**, 1400–1406.
- Реддел Р.Р., Брайан Т.М., Мернейн Д.П. (1997) *Биохимия*, **62**, 1467–1476.
- McGhee, J.D., and van Hippel, P.H. (1974) *J. Mol. Biol.*, **86**, 469–489.

**STUDY OF APPLICABILITY OF THE BIFUNCTIONAL
SYSTEM «ETHIDIUM BROMIDE + HOECHST-33258»
FOR DNA ANALYSIS**

V. S. Sibirtsev

*D. I. Mendeleyev Russian Research Institute for Metrology,
Moscowskij pr. 19, 190005 St. Petersburg, Russia; fax: +7 (812)327-9776,
E-mail: vs1969r@mail.ru*

Received March 26, 2004

Revision received June 24, 2004

Changes in absorbance and fluorescence excitation and emission spectra in the ultraviolet and visible regions of the system containing ethidium bromide (EtBr) and Hoechst-33258 (Ht) were investigated depending on various DNA quantities and the composition of the medium. It is noted that spectral properties of this system are determined by interactions of EtBr and Ht both with nucleic acid and with one another (for example, joint sorption of EtBr and Ht on DNA may involve fluorescent resonance energy transfer between the dye molecules). Thus, different modes of EtBr and Ht specificity to substrate and assay conditions suggest that combined use of these dyes provides some additional effects that may be interesting in terms of structure-functional study of nucleic acid. Some of these effects are considered in this paper.

Key words: DNA, fluorescence dyes, spectral properties, energy transfer