

ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА

P19-86-590

М.М.Огиевецкая, М.Судник-Хрынкевич

ЭКСПРЕСС-МЕТОД  
ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК  
В КЛЕТКАХ

Направлено в журнал "Цитология"

1986

Содержание ДНК в биологических образцах является важным биохимическим параметром, по которому можно судить о фазе клеточного цикла, о процессах репликации ДНК, о плоидности клеток и т.д. Настоящая статья посвящена быстрому флуорометрическому методу количественного определения ДНК с помощью хехста 33258. Для количественного определения ДНК в клетках пользовались в основном спектрофотометрическими и колориметрическими методами. Однако при прецизионном определении содержания ДНК в клетках спектрофотометрическими и колориметрическими методами требуется предварительная экстракция ДНК из клеток, либо ее гидролиз, что занимает время и приводит к трудно учитываемым потерям ДНК /1/. Для регистрации флуоресценции уходит значительно меньше определяемого вещества, поэтому флуорометрические методы в этом отношении имеют преимущества.

Сама молекула ДНК не обладает способностью флуоресцировать в видимой области спектра, но при присоединении к ней флуорохрома может образоваться комплекс, способный иногда флуоресцировать в десятки раз более интенсивно, чем свободный флуорохром. К настоящему времени известно большое число флуорохромов, приобретающих интенсивную флуоресценцию при комплексобразовании с ДНК. К ним относятся антибиотики - митрамицин, оливомитцин, дистамицин, нетропсин и др. /2,3,4/, перкаляторы - акридиновый оранжевый, бромистый этидий, нодистый и др. /5,6,7,8/, 4,6-диамино-2-фенилиндола /9,10,11/, бисбензимидазолы /12,13,14,15,16/, окись тербия /17,18/ и др. По интенсивности флуоресценции и по специфичности взаимодействия с ДНК наиболее точно отличаются два флуорохрома - 4,6-диамино-2-фенилиндола и бисбензимидазол - хехст 33258. Большая специфичность взаимодействия этих флуорохромов обусловлена тем, что образование интенсивно флуоресцирующего комплекса с ДНК происходит за счет связывания с АТ-парами, при этом квантовый выход флуоресценции усиливается в случае аминофенилиндола в 20 раз, а в случае хехста 33258 в 40 - 60 раз. Следствием этого обстоятельства делает хехст 33258 наиболее перспективным флуорохромом для целей количественного определения ДНК в клетках.

Клеточная мембрана непроницаема для молекул хехста 33258, и без разрушения реакция флуорохрома с ДНК не происходит /13/. ДНК в клетках находится в комплексе с белками, что также препятствует взаимодействию флуорохрома с ДНК. Максимальное взаимодействие хехста с

ДНК возможно только при полной диссоциации ДНП. Для прецизионной оценки ДНК с помощью хехста 33258 важно соблюдение основных трех условий, а именно: проведение максимального лизиса клеток, полной диссоциации ДНП при сохранении вторичной структуры ДНК в интактном состоянии и ингибирование ДНК-азной активности.

В настоящей работе исследуются оптимальные условия лизирования клеток, диссоциации ДНП комплексов и солубилизации ДНК в клетках аспитной карциномы Эрлиха и E.coli K 12, при которых сохраняется интактной вторичная структура ДНК, и подбираются условия, при которых флуоресценция от неспецифического взаимодействия хехста с РНК становится пренебрежимо малой.

#### Материал, методы и приборы

Флуорохром хехст 33258 (Serva Feinbiochemica) растворяли в воде в концентрации  $10^{-4}$ М. Концентрацию хехста устанавливали по оптической плотности при 338 нм в соответствии с коэффициентом молярной экстинкции, равным 42 000 /14/. Перед использованием этот раствор разбавляли раствором 10 мМ NaCl в 10 раз.

ДНК из тимуса теленка (Sigma Chemical Company) растворяли в 10 мМ NaCl и 10 мМ трис-НС1 рН 7,0 в концентрации 500 мкг/мл. Точную концентрацию ДНК в растворе устанавливали по оптической плотности при 260 нм, исходя из коэффициента молярной экстинкции 6 650 (Михайлов и др., 1981).

t-РНК из дрожжей (предоставлен М.Я. Тимофеевой - Институт молекулярной биологии АН СССР) растворяли в 10 мМ NaCl и 10 мМ трис-НС1 рН 7,0 в концентрации 2 мг/мл.

Саркозил, ДИС- Na, трис, использованные в работе, были производства фирмы Serva Feinbiochemica.

Клетки аспитной карциномы Эрлиха линии Е1Д получали на седьмой день после перевивки мышам СВАхС57 black в лаборатории радиобиологии ВОНЦ СССР. Клетки E.coli K 12, выращенные в жидкой среде, собирали центрифугированием после 18 часов инкубирования при 37°C.

Метод определения ДНК в клетках с помощью дифениламинового реактива использовали в модификации Ричардса /19/.

Приборы. Оптическую плотность ДНК, РНК и хехста 33258 измеряли на спектрофотометре ZREKORD M-40 (ГДР). Флуорометрические измерения проводили на спектрофотометре ZREKOL 10 (ГДР), оборудованном ртутной лампой высокого давления Hg E/2 и флуоресцентной приставкой FK, при возбуждении монохроматическим светом 365 нм. Вырезание из флуоресцирующего потока света возбуждающей длины волны производили с помощью светофильтра ЖС4, пропускающего свет выше 400 нм и поглощающего ниже 390 нм. Интенсивность флуоресценции всех проб сравнивали с интенсив-

ностью стандарта Gv37-79= GGI7. Измерение интенсивности флуоресценции всех образцов производили путем сравнения с интенсивностью соответствующей контрольной пробы. Измерения проводили в кювете IxI см. Результаты. Разрушение клеточной мембраны возможно разными способами, например, ультразвуковой обработкой (УЗ), гомогенизацией, действием различных детергентов и т.д. О результатах лизиса в нашем случае можно судить по эффективности флуоресценции конечного продукта реакции. Для выбора способа лизиса мы воспользовались сведениями о механизме реакции хехста 33258 с ДНК. В ряде работ /12,14,15,20/ выяснено, что молекула хехста 33258 по размеру и форме напоминает ди- и трипептид, а также молекулы нетропсина и дистамицина. Подобие в структурах этих веществ навело Михайлова и др. /12/ на мысль о существовании сходного механизма взаимодействия. Предложенная модель взаимодействия хехста с ДНК подтверждена в других лабораториях /16/ и состоит в следующем. Три амидные группы молекулы хехста образуют мостик с N3 атомами адениновых остатков или с O2 атомами тиминовых остатков противоположной цепи двуспиральной молекулы ДНК. Для взаимодействия требуется от трех до пяти АТ-пар, при этом бисбензимидазольный остов молекулы хехста располагается в узкой бороздке двуспиральной цепи, образуя изгибы, изометричные В-форме ДНК.

Исходя из модели Михайлова и др. ясно, что эффективность флуоресценции образуемого комплекса будет зависеть от сохранности вторичной структуры ДНК и ее молекулярного веса. Это обстоятельство диктует соблюдение предосторожностей при разрушении клеточных мембран. Для определения ДНК флуорометрическими методами Бранк и др. /11/, а также Лабарка и Пейген /15/ применили УЗ. Однако эта обработка клеток несет в себе опасность образования разрывов молекулы ДНК, что может сказаться на изменении ее молекулярного веса и внести ошибку в количественную оценку ДНК. Даунс и Вилфрингер /22/ применили раствор  $\text{IN NH}_4\text{OH}$  в сочетании с 0,2% тритоном X100. В случае клеток асцитной карциномы и *E. coli* этот подход не дал хорошо воспроизводимых результатов. Применение ДДС- Na в качестве лизирующего агента оказалось непригодным по двум причинам - из-за высокой флуоресценции контрольных проб и образования хлопьевидного осадка, мешающего проведению измерений. Мы испытали несколько способов лизирования клеток и наилучшие результаты получили при применении растворов, содержащих 2% саркозила и 5 мМ цитрата Na.

Процедура лизирования клеток, диссоциации ДНК и сольubilизации ДНК сводилась к следующему. В пробирку отбирали 100 мкл суспензии клеток, добавляли 200 мкл лизирующего раствора (2% саркозила и 5 мМ цитрата Na). Пробирку закрывали парафильмом и ставили в термостат при 37°C

на 20 минут. По окончании лизиса в пробирку добавляли 1,7 мл буфера (0,5 М NaCl, 10 мМ EDTA, и 10 мМ трис-HCl pH 7,2). Для реакции с хехстом из полученного прозрачного раствора отбирали пробы по 100 и 200 мкл, добавляли 100 мкл хехста концентрации  $10^{-5}$ М и буфер (0,5 М NaCl, 10 мМ EDTA и 10 мМ трис-HCl pH 7,2) до 2 мл. Реакционную смесь ставили в термостат при 37°C на 30 минут, а затем при комнатной температуре на 10 минут, после чего измеряли интенсивность флуоресценции при возбуждении светом  $\lambda = 365$  нм с использованием ЖС4. Количество ДНК в клетках выражали в виде эквивалентов АТ-богатых участков эталонной ДНК путем сравнения интенсивностей флуоресценции лизатов и стандартной ДНК, используемой для калибровки. В качестве ДНК-сравнения мы использовали ДНК из тимуса теленка. Составление калибровочной кривой производили следующим образом. 50 мкл раствора ДНК концентрации 500 мкг/мл вносили в пробирку и добавляли 100 мкл лизирующего раствора (2% саркозил и 5 мМ цитрата Na). Одновременно готовили контрольный образец, в котором раствор ДНК был заменен на 10 мМ NaCl. После 20 минут при 37°C к смеси добавляли буфер до 2,5 мл. Затем кратные объемы растворов ДНК и контрольных проб разливали по пробиркам и добавляли 100 мкл  $10^{-5}$ М раствора хехста и буфера до конечного объема 2 мл. После 30 мин инкубирования при 37°C и 10 мин при комнатной температуре измеряли интенсивность флуоресценции образцов ДНК с учетом контрольного образца, содержащего соответствующее количество лизирующего раствора. На рисунке I представлена кривая зависимости усиления флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6}$ М раствора хехста 33258 от концентрации ДНК. На рисунке видно, что эта зависимость линейна. Калибровочная кривая составлена на основании 20 независимых измерений. Наклон кривой составляет 0,043 флуоресцентных единиц/нг ДНК, коэффициент вариации равен 0,997. Стандартные отклонения малы и указаны в таблице I.

Таблица I. Зависимость флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6}$ М хехста от концентрации ДНК из тимуса теленка в растворе 0,5 М NaCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl pH 7,2 и в разных концентрациях саркозила (20 независимых измерений)

ДНК нг/мл	Саркозил мкг/мл	Молярное отношение ДНК/хехст	Интенсивность флуоресценции
100	20	0,16	5,32 ± 0,40
250	40	0,40	10,63 ± 0,62
500	80	0,80	21,31 ± 0,73
1000	160	1,60	42,53 ± 0,88
1500	240	2,40	63,84 ± 1,50
2000	320	3,20	85,63 ± 3,50

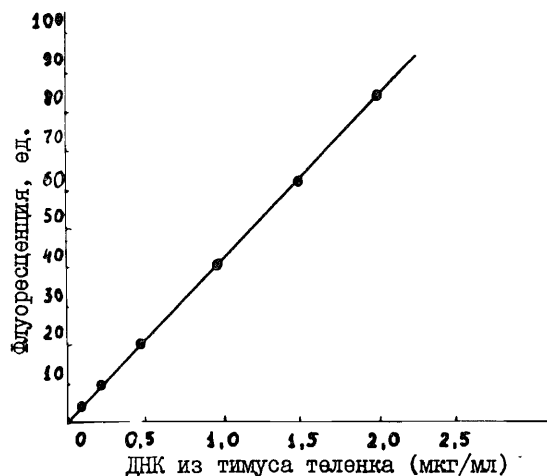


Рис. 1. Зависимость усиления флуоресценции хехста  $33258 \text{ } 0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  от концентрации ДНК из тимуса теленка в растворе  $0,5 \text{ M NaCl}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$ ,  $10 \text{ mM трис-HCl pH } 7,2$ . Кривая проведена на основании 20 независимых измерений. Наклон кривой составляет  $0,043$  флуоресцентных единиц/нг ДНК. Коэффициент вариации равен  $0,997$ . Стандартные отклонения малы (см. табл. I) и на рисунке не видны.

Чувствительность анализа, определяемая как  $2SD$  (табл. I), составляет  $20 \text{ нг ДНК в } 1 \text{ мл}$ . Интенсивности флуоресценции хехста с ДНК до обработки лизирующим раствором и после совпадают. Интенсивность флуоресценции комплексов стабильна, она практически не изменяется в течение более 20 часов при комнатной температуре. Линейный характер кривой зависимости флуоресценции хехста от концентрации ДНК проявляется в широком диапазоне молярных отношений ДНК/хехст. Мы установили, однако, что диапазон  $0,5 + 2,5$  является оптимальным. За пределами этого диапазона наклон кривой меняется, линейность нарушается и, следовательно, уменьшается точность определения содержания ДНК в образце. По этой причине мы рекомендуем при проведении реакции взаимодействия ДНК с хехстом брать из смеси лизированных клеток две пробы, различающиеся между собой по объему, например,  $100$  и  $200 \text{ мкл}$ .

Растворы саркозила, которые применяются в качестве лизирующего агента, не обладают собственной флуоресценцией в широком диапазоне концентраций. Однако саркозил способен усиливать флуоресценцию хехста. На рисунке 2 представлена зависимость интенсивности флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  хехста от концентрации саркозила: флуоресценция хехста в присутствии саркозила в концентрации  $300 \text{ мкг/мл}$  незначительна и не может мешать проведению флуорометрических измерений. При кон-

центрации выше  $300 \text{ мкг/мл}$  флуоресценция хехста резко возрастает и достигает насыщения при концентрации саркозила  $700-800 \text{ мкг/мл}$ . Следует обратить внимание на то, что усиление флуоресценции хехста в присутствии саркозила в концентрации выше  $500 \text{ мкг/мл}$  обнаруживает довольно большие флуктуации. Важно подчеркнуть, однако, что превышение содержания саркозила в измеряемой пробе выше  $200-300 \text{ мкг/мл}$  нежелательно, так как может внести ошибку при прецизионной оценке ДНК в образце.

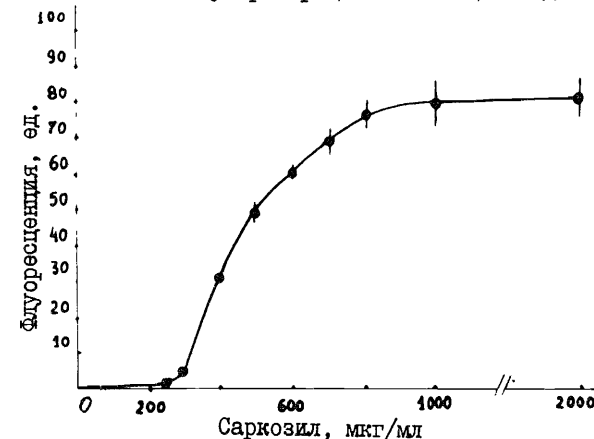


Рис. 2. Усиление флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  хехста 33258 в присутствии саркозила в растворе  $0,5 \text{ M NaCl}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$ ,  $10 \text{ mM трис-HCl pH } 7,2$ . Растворы саркозила указанных концентраций не обладают собственной флуоресценцией при возбуждении светом  $365 \text{ нм}$ .

При взаимодействии хехста 33258 с ДНК образуется два типа комплексов — прочный специфичный и слабый неспецифичный. Первый тип комплексов, образуемый за счет взаимодействия с АТ-богатыми участками ДНК, устойчив к высокой ионной силе вплоть до  $4 \text{ M NaCl}$ . Неспецифичные типы комплексов образуются за счет электростатического взаимодействия хехста с ГЦ-парами ДНК, однотяжевыми участками ДНК, а также с молекулами РНК [12]. Интенсивность флуоресценции неспецифичных комплексов значительно слабее, и она резко уменьшается при увеличении ионной силы раствора. В поиске оптимальных условий проведения реакции хехста с ДНК мы провели работу по изучению зависимости усиления флуоресценции хехста от концентрации РНК в растворах разной ионной силы. На рис. 3 представлена зависимость флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  раствора хехста от концентрации т-РНК из дрожжей, которая содержит до 30% двуспиральных участков [22], в растворах разной ионной силы. Из рисунка видно, что в растворе  $10 \text{ mM NaCl}$  усиление

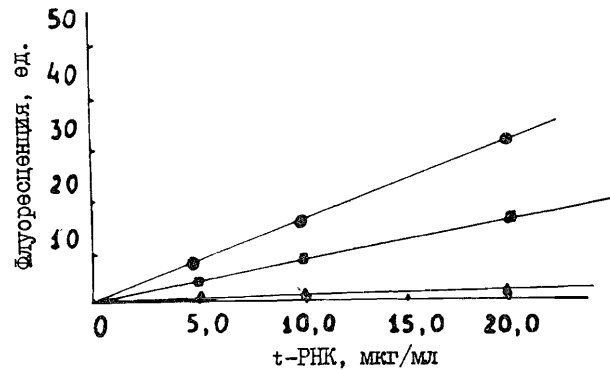


Рис. 3. Зависимость усиления флуоресценции  $0,5 \times 10^{-6}$  М хехста от концентрации t-РНК из дрожжей в растворах разной концентрации NaCl : 10 мМ ( ● ), 100 мМ ( ■ ), 500 и 1000 мМ ( ▲ ).

флуоресценции хехста составляет примерно 10% от флуоресценции такого же количества ДНК. При десятикратном увеличении ионной силы раствора флуоресценция резко падает и становится пренебрежимо малой при концентрации  $0,5$  М NaCl и выше.

**Обсуждение.** В настоящей статье описана простая и удобная процедура лизиса клеток, диссоциации ДНП и сольubilизации ДНК для использования в количественном флуорометрическом анализе ДНК в клетках с помощью хехста 33258. Процедура состоит в действии саркозила и цитрата натрия на клетки и в проведении реакции взаимодействия флуорохрома с ДНК в растворе высокой ионной силы. Эта процедура обеспечивает быстрый и хорошо воспроизводимый метод количественного определения ДНК в клетках. Высокая чувствительность метода позволяет определить содержание ДНК в малом объеме экспериментального материала — достаточно  $10^4$  клеток аспитной карциномы Эрлиха или  $10^7$  клеток *E. coli*. Усиление флуоресценции хехста 33258 линейно зависит от концентрации ДНК в растворе. Наклон кривой и ее линейный характер меняются при изменении отношения ДНК/хехст. Линейный характер кривой сохраняется в широком диапазоне молярных отношений ДНК/хехст, а именно  $0,5 \div 2,5$ . За пределами этого диапазона наклон кривой меняется, линейность нарушается и уменьшается точность анализа определения ДНК в клетках.

Во многих работах [12, 13, 14] показано, что взаимодействие хехста с ДНК приводит к образованию двух типов комплексов — специфического и неспецифического. Первый тип образуется за счет взаимодействия хехста

с АТ-богатыми участками ДНК, второй образуется за счет электростатического взаимодействия с ГЦ-парами НК, однотяжевыми участками ДНК и с РНК. Этот тип комплекса неустойчив к действию растворов высокой ионной силы. В растворе  $0,5$  М NaCl флуоресценция  $0,5 \times 10^{-6}$  М хехста в присутствии 20 мкг t-РНК практически не регистрируется на нашем приборе.

По предложенной Михайловым и др. [12] модели взаимодействие хехста с ДНК происходит по тем участкам ДНК молекулы, которые содержат не менее трех АТ-пар. Ввиду зависимости интенсивности флуоресценции образуемых комплексов от содержания АТ-богатых участков в ДНК важно помнить, что измеренное количество ДНК в клетках выражено в эквивалентах той ДНК, которая взята в качестве стандарта. Вместе с тем количество ДНК в клетках, определяемое двумя независимыми методами — с помощью хехста 33258 и дифениламинового реагента — совпадают.

Флуорометрический метод определения ДНК в клетках с помощью хехста 33258 перспективен. Он обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами по чувствительности, специфичности, простоте и скорости проведения анализа. Высокая ионная сила раствора, в котором проводится реакция хехста с ДНК, способствует диссоциации ДНП комплексов и предотвращает образование неспецифических комплексов с РНК. Описанная процедура лизиса клеток и сольubilизации ДНК с помощью саркозила и цитрата натрия удобна, так как образуемый лизат клеток прозрачен, совершенно свободен от хлопьев, что существенно при проведении флуорометрических измерений и для получения хорошо воспроизводимых результатов.

Авторам приятно выразить признательность М.Я. Тимофеевой, любезно предоставившей образец t-РНК, Н.Л. Шамаковой за обеспечение клетками аспитной карциномы Эрлиха и В.И. Корогодину за интерес к работе.

#### Литература

1. Огиевская М.М., Цитология, 1986, 27, 1182.
2. Заседателев А.С., Жузе А.Л., Циммер К., Греховский С.Л., Туманян В.Г., Гурский Г.В., Готтих Б.П., ДАН АН СССР, 1976, 231, 1006.
3. Crissman H.A., Oka M.S., Steinkamp J.A., J Histochem. Cytochem., 1976, 24, 64.
4. Steen H., Boye E., Skorstad K., Bloom B., Godal T., Mustafa S., Cytometry, 1982, 2, 249.
5. Борисова О.Ф., Сурова А.Н., Итоги науки и техники, Мол. биология, 1973, I, 141.
6. Le Pecq J., Paoletti C., Analit. Biochem., 1966, 17, 100.

7. Morgan A.R., Lee J.S., Pulleyblank D.E., Murray N.L., Evans D.H., Nucleic Acids Res., 1979, 7, 547.
8. Darzynkewicz Z., Traganos F., Kapuscinski J., Melamed M.R., Cytometry, 1985, 6, 195.
9. Williamson D.H., Fernell D.J., Methods in Cell Biol., 1975, 12, 335.
10. Kapuscinski J., Skoesylas D., Analyt. Biochem., 1977, 83, 252.
11. Brunk C.F., Jones K.C., James T.W., Analit. Biochem, 1979, 1979, 92, 497.
12. Михайлов М.В., Заседателев А.С., Крылов А.С., Гурский Г.В., Мол.биол., 1981, 15, 690.
13. Latt S.A. Wohlleb J.C., Chromosoma, 1975, 52, 297.
14. Latt S.A., Stetten G., Histochem, Cytochem., 1976, 24, 24.
15. Labarca C., Paigen K., Analyt. Biochem., 1980, 102, 344.
16. Harshman K.D., Dervan P.B., Nucleic Acids Res., 1985, 13, 4825.
17. Ringer D.P., Howell B.A., Kizer D.E., Analyt. Biochem, 1980, 103, 337.
18. Ringer D.P., Ethoredge J.L. Kizer D.E., J. Inorgan Biochem., 1985, 24, 137.
19. Richards G.M., Analyt. Biochem, 1974, 57, 369.
20. Martin R.S., Holmes N., Nature, 1983, 302, 452.
21. Downs T.R. Wilfinger W.W., Analyt. Biochem., 1983, 131, 538.
22. Борисова О.Ф., Кричевская А.А., Просвирина В.В., Самарина О.Н., Мол.биол., 1979, 13, 422.

Рукопись поступила в издательский отдел  
28 августа 1986 года.

Огиевецкая М.М., Судник-Хрынкевич М. P19-86-590  
Экспресс-метод флуорометрического определения  
ДНК в клетках

Описывается быстрый метод лизиса клеток и солюбилизации ДНК с помощью саркозила и цитрата натрия. Определение содержания ДНК производится непосредственно в лизатах в растворе 0,5 М NaCl, в котором флуоресценция комплексов хехста 33258 с РНК пренебрежимо мала. Линейный характер кривой зависимости флуоресценции хехста от концентрации ДНК/хехст проявляется в широком диапазоне молярных отношений ДНК/хехст (0,5÷2,5), за пределами которого точность определения ДНК уменьшается. Оптимальная область оценки содержания ДНК в клетках лежит в интервале 100÷2000 нг/мл.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИИИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод О.С.Виноградовой

Ogievetskaya M.M., Sudnik-Hrynkiwicz M. P19-86-590  
An Express Fluorometric DNA Quantification  
in Cells

A convenient express method for cell lysis and DNA solubilization in presence of sarcosyl and Na citrate is described. DNA quantification is performed in lysates directly by registration of fluorescence enhancement with bis-benzimidazole (Hoechst 33258) compound. In 0.5 M NaCl solution the Hoechst - tRNA fluorescence is shown to be negligible. An optimal molar relation DNA/Hoechst is in the 0.5-2.5 range. Beyond this range an accuracy of DNA quantification becomes poor. An optimal region of DNA cell quantification is 100-2000 ng/ml.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986