

ПОСТАНОВКА МЕТОДА ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК РАЗНОЙ ДЛИНЫ И АНАЛИЗА ИМПОРТА МЕЧЕНЫХ СУБСТРАТОВ В МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ

А.В. Панфилов¹, Ю.М. Константинов², М.В. Кулинченко²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия, panfilov.alexander@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, mk100171@yahoo.com

Аннотация. Мы применили два подхода получения флуоресцентно меченой ДНК как субстратов импорта в митохондрии: (1) введение флуоресцентного красителя в молекулы ДНК с помощью амплификации в ПЦР с использованием праймеров, содержащих Cy3; (2) включение в ДНК модифицированного мононуклеотида аминоксил-дУТФ в ходе ПЦР с последующим мечением АА-дУТФ активированным N-гидроксисукцимидным эфиром (Cy3-SE). Мы провели тестирование эффективности импорта в митохондрии, изолированные из *A. thaliana*, субстратов ДНК, меченых таким образом в ПЦР.

Ключевые слова: флуоресцентное мечение ДНК, полимеразная цепная реакция, модификация нуклеотидов, импорт ДНК в митохондрии растений

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1339-1343

Флуоресцентное мечение нуклеиновых кислот, дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) является основным методом биодетекции в ДНК/РНК-диагностике, молекулярно-генетических исследованиях, секвенировании, геномном анализе, флуоресцентной микроскопии [Bentley et al., 2008], применяется в протеомике, метаболомике, генной инженерии растений (трансгенез) [Ranasinghe et al., 2005]. Флуоресцентное мечение молекул ДНК/РНК, проводимое с использованием, в основном, цианиновых красителей с полиеновой структурой в транс-форме [Alexander et al., 2015], позволяют идентифицировать точечные мутации в генах, детектировать локальную модификацию и конформацию в биополимерах сложного строения. В молекулярно-генетических исследованиях существует необходимость в разработке методов быстрого анализа специфических последовательностей ДНК.

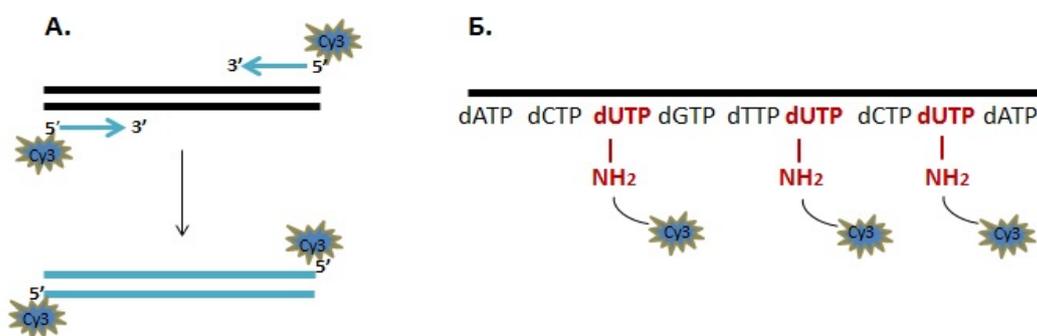


Рис. 1. Схема способов введения флуоресцентно меченых нуклеотидов в молекулы ДНК. А. Амплификация фрагментов ДНК в ПЦР с использованием флуоресцентно меченых праймеров; Б. Амплификация фрагментов ДНК в ПЦР с использованием аминоксил-дУТФ вместо/вместе с дТТФ и последующей инкубацией фрагментов ДНК с активизированным N-гидроксисукцимидным эфиром красителя, Cy3-SE.

Ранее при изучении процесса импорта ДНК в митохондрии использовали радиоактивно меченые [Koulintchenko et al., 2003] или «холодные» (немеченые) субстраты ДНК [Клименко и др., 2011]. Радиоактивно меченые субстраты получают амплификацией фрагмента ДНК в одном цикле ПЦР в присутствии [$\alpha^{32}\text{P}$] дЦТФ. После инкубации радиоактивно меченой ДНК с митохондриями и последующих обработок экстрагированную митохондриальную ДНК разделяют электрофоретически в агарозном геле и переносят на мембрану: анализ импорта ДНК с помощью радиоавтографии позволяет визуализировать полноразмерные молекулы импортированной ДНК, качественно и с высокой чувствительностью оценить влияние тех или иных эффекторов на импорт ДНК. Использование радиоактивной метки имеет, тем не менее, ряд очевидных недостатков. Анализ импорта немеченых субстратов ДНК проводят при помощи метода ПЦР в реальном времени. Такого рода анализ позволяет проводить количественную оценку влияния на процесс разных агентов и ингибиторов, изучать его кинетические характеристики, однако также имеет недостатки, связанные с тем, что в ходе анализа детектируются не полноразмерные молекулы ДНК, а лишь ее фрагменты.

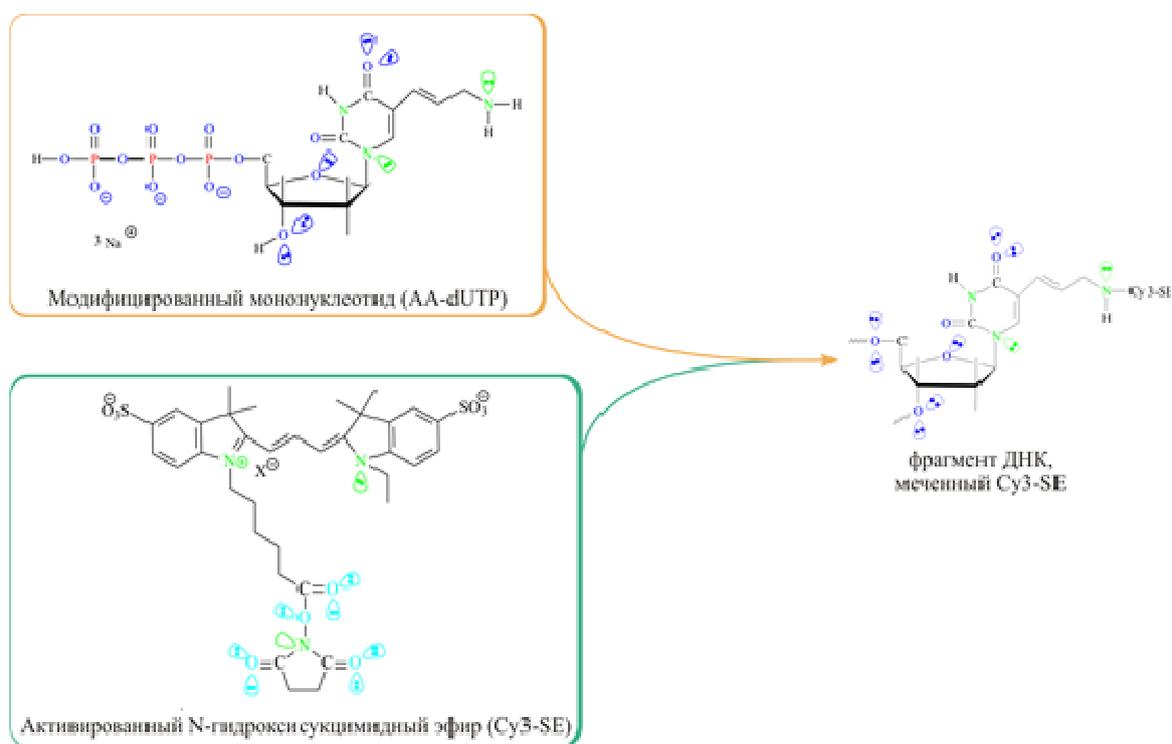


Рис. 2. Схема мечения ДНК фрагмента флуоресцентным красителем N-гидроксисукцинимидным эфиром Cy3-SE (NHS-ester).

Мы предположили, что введение в молекулы ДНК нерадиоактивной флуоресцентной метки позволит преодолеть недостатки, сохраняя при этом основные преимущества использования для импорта меченых субстратов ДНК, такие, как возможность тестирования после экстракции полноразмерных импортированных молекул, высокую чувствительность и специфичность, а также быстроту анализа. Ранее меченую таким образом ДНК использовали лишь в одной работе [Jackson et al., 2014] для характеристики импорта ДНК в изолированные митохондрии человека.

Для того чтобы ввести в состав молекулы ДНК флуоресцентный краситель, можно использовать амплификацию фрагментов ДНК с помощью праймеров, имеющих на 5'-концах Cy3 (цианин 3) (рис. 1А). Флуоресцентную метку можно ввести в ДНК

также посредством инкубации фрагментов ДНК, содержащих наряду с дТТФ аминоксил-дУТФ, с активированным эфиром красителя Су3 (рис. 1Б). Мы применили оба подхода получения флуоресцентно меченых субстратов импорта: для молекул ДНК с длиной 0,1- 3 т.п.н. была использована амплификация с флуоресцентно мечеными праймерами (рис. 1А), для молекул ДНК с длиной 7 – 9 т.п.н. способ модификации последовательности с последующей активацией флуоресцентным красителем (рис. 1Б). Во втором случае задача исследования заключалась в том, чтобы в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in vitro* встроить в двуниевую ДНК комплементарно дТТФ (дезокситимидин-5'-трифосфат) минорный компонент модифицированный мононуклеотид 5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксидурин-5'-трифосфат (аминоаллил-дУТФ), с последующим постсинтетическим мечением аминоксил-дУТФ (АА-дУТФ) в составе амплифицированных молекул ДНК активированным N-гидроксидуринимидным эфиром (Су3-SE) (рис. 2).

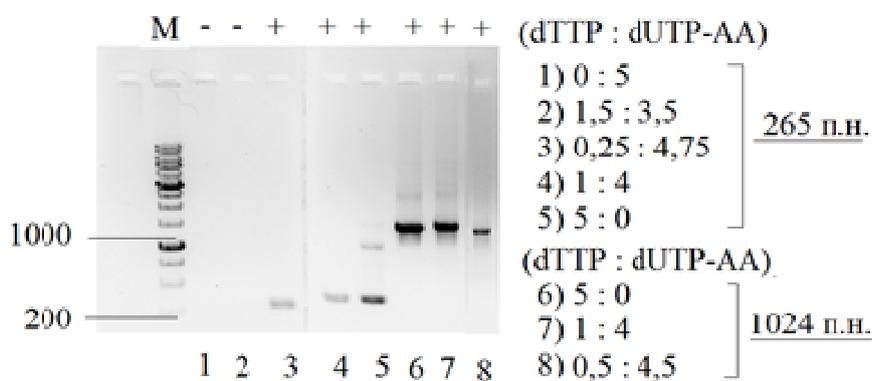


Рис. 3. Анализ зависимости эффективности амплификации ДНК размером 265 и 1024 п.н. от соотношения в реакционной смеси ПЦР мононуклеотидов дТТФ и АА-дУТФ. Представлен результат электрофоретического разделения в агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с использованием указанных на рисунке соотношений дТТФ и АА-дУТФ в мкл. М – маркер.

Для оптимизации встраивания аминоксил-дУТФ в молекулу ДНК и синтеза ДНК (необходимой для последующей реамплификации) были протестированы несколько условий: активность разных ферментов (Dream-Taq [Thermo Scientific] и Epcuslo [Евроген] полимеразы) и разные соотношения мононуклеотидов дТТФ:АА-дУТФ. Максимальное флуоресцентное свечение наблюдалось при $\lambda_{\text{max}} = 260$ нм для соотношений дТТФ:АА-дУТФ (1:4) с ферментом Dream-Taq полимеразой. На рис. 3 представлены данные синтеза фрагментов ДНК длиной 265 и 1024 п.н. с различными соотношениями дТТФ:АА-дУТФ. Следует отметить, что для обоих фрагментов ДНК с увеличением объема дТТФ синтезируется большее количество ДНК.

Далее постсинтетическое мечение аминоксил-дУТФ, включенных в состав нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК размером 265 п.н. и 1024 п.н., проводили в фосфатном буфере $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ при рН 8.4. Флуоресцентное мечение было отмечено для короткого фрагмента ДНК (265 п.н.) с тестируемыми соотношениями дТТФ:дУТФ-АА, а именно 1:4 и 0,5:4,5, однако его уровень был невысоким.

Сотрудниками лаборатории было проведено тестирование эффективности импорта в митохондрии, изолированные из растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), двух субстратов ДНК размером 109 п.н. и 852 п.н., полученных амплификацией в ПЦР с помощью праймеров, содержащих на 5'-конце

флуоресцирующую группу (Cy3) (рис. 1А). На рис. 4 представлены результаты анализа импорта флуоресцентно меченой ДНК данных фрагментов в митохондрии, изолированные из линии дикого типа (*Col-0*) и мутантной линии *tspo* (по гену *At2g47770*, кодирующему белок TSPO, от Tryptophan-rich Sensory Protein).

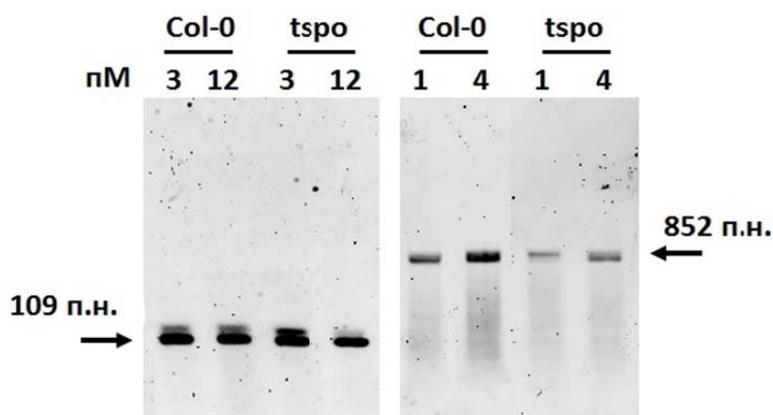


Рис. 4. Анализ импорта флуоресцентно меченой ДНК в митохондрии арабидопсиса (*A. thaliana*) линий дикого типа (*Col-0*) и мутанта (*tspo*). На рисунке представлены результаты электрофоретического разделения митохондриальных проб импорта фрагментов ДНК размером 109 п.н. и 852 п.н. Визуализация флуоресцентно меченых фрагментов проведена с помощью сканера GE Healthcare. Указано количество ДНК в пМ, взятое для инкубации с митохондриями.

Показано, что с увеличением количества флуоресцентно меченой ДНК в среде инкубации, от 3 до 12 пМ (0,2-0,85 мкг) для малых фрагментов или от 1 до 4 пМ (0,5-2 мкг) для средних фрагментов, эффективность импорта не менялась для фрагментов обоих размерных классов. Таким образом, в данной работе впервые была продемонстрирована возможность использования для анализа эффективности импорта ДНК в митохондрии растений флуоресцентно меченых субстратов.

Литература

- Клименко Е.С., Милейко В.А., Морозкин Е.С., Лактионов П.П., Лактионов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28 (3). – С. 199–205.
- Bentley et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // Nature. – 2008. – P. 53–59.
- Gorka A.P., Nani R.R., Schnermann M.J. Cyanine polyene reactivity: scope and biomedical applications // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2015. – P. 1–3.
- Jackson C.B., Zbinden C., Gallati S., Schaller A. Heterologous expression from the human D-Loop in organello // Mitochondrion. – 2014. – V. 17. – P.67–75.
- Koulintchenko M., Konstantinov Y., Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex // EMBO J. – 2003. – V. 22 (6). – P. 1245–1254.
- Ranasinghe R.T., Brown T. Fluorescence based strategies for genetic analysis // Chem. Commun. – 2005. – P. 5487–5502.

DEVELOPING OF METHOD OF FLUORESCENT LABELING OF DNA FRAGMENTS WITH DIFFERENT LENGTHS AND ANALYSIS OF LABELED SUBSTRATES IMPORT IN THE MITOCHONDRIA OF PLANTS

A.V. Panfilov¹, Yu.M. Konstantinov^{1,2}, M.V. Koulintchenko²

¹Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *panfilov.alexander@mail.ru*

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, *mk100171@yahoo.com*

Abstract. We applied two approaches to obtain the fluorescent labeled DNA as substrates for mitochondria import: (1) introduction of the fluorescent dye in DNA molecules using PCR amplification with primers containing Cy3; (2) incorporation in DNA of modified mononucleotide aminoallyl-dUTP during PCR, followed by postsynthetic labeling of the AA-dUTP by activated N-hydroxysuccinimide ester (Cy3-SE). We tested the efficiency of import into mitochondria isolated from *A. thaliana* of DNA substrates labeled thus in PCR.

Keywords: *fluorescent labeling of DNA, polymerase chain reaction, modification of nucleotides, DNA import in plant mitochondria*