



УДК 543.544:542.952.6:547.413.5

## КОМПОЗИЦИОННЫЙ ПОИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИЙ КРЕМНЕЗЕМНЫЙ СОРБЕНТ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

© 2003 г. Д. В. Капустин<sup>##</sup>, Е. Ю. Ягудаева\*, Л. Л. Завада\*, Л. С. Жигис\*, В. П. Зубов\*,  
Е. М. Ярошевская\*\*, Л. Плюбнер\*\*, Р.-М. Лайзер\*\*, Г. Брем\*\*

\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*NEХТес GmbH, Хеммельратер Вег 201, Леверкузен, Германия

Поступила в редакцию 10.06.2002 г. Принята к печати 11.07.2002 г.

Композиционный полианилинсодержащий сорбент получен путем осадительной полимеризации анилина в присутствии частиц макропористого носителя. Выявлено, что подобная модификация обеспечивает однородное покрытие внутренней поверхности пор носителя полимерным слоем толщиной порядка 70 Å. Установлено, что полученный материал при сохранении пористости исходного носителя селективен при разделении нуклеиновых кислот и белков. Показана эффективность использования полианилинсодержащих сорбентов как при препаративном выделении ДНК из бактериальных лизатов, так и в аналитических целях, в частности, при обнаружении фрагментации ДНК в результате апоптоза, вызванного УФ-облучением лизатов клеток карциномы толстой кишки. Показано, что по своим структурным характеристикам и сорбционным свойствам полученный сорбент близок полифторбутадиенсодержащему сорбенту.

*Ключевые слова:* выделение ДНК, композиционные сорбенты, фрагментация ДНК.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области генной инженерии, диагностики, клонирования, а также обработки и хранения генетической информации невозможны без использования чистых концентрированных препаратов нуклеиновых кислот. Это стимулирует поиск эффективных нетрудоёмких методов выделения и очистки нуклеиновых кислот из различных источников.

При биосепарации нуклеиновых кислот применяются как традиционные, но трудоёмкие и не всегда эффективные методы с применением фенол-хлороформной экстракции, так и хроматографические методы, основанные на использовании коммерческих сорбентов (например, наборы Qiagen, Hoffman la Roche, Agilent Technologies и др.), в определенной мере удовлетворяющие существующим потребностям. Выделение нуклеиновых кислот с помощью таких сорбентов включает сорбцию нуклеиновых кислот на поверхности носителя, отмывку от нежелательных примесей и десорбцию нуклеиновых кислот подходящим элюентом. Многостадийность процесса определяет потери целевого продукта и снижение его выхода. Кроме того, не всегда удается достичь

высокой степени очистки препарата от низкомолекулярных примесей.

Для упрощения процесса получения очищенных препаратов ДНК более перспективным, на наш взгляд, могло бы быть использование сорбентов, удерживающих белки и другие примеси, но в то же время пропускающие ДНК в "исключенном объеме". Как было показано, такими свойствами обладают перфторполимеры [1], которые оказались селективными при разделении смесей биополимеров. Перфторполимеры исключительно хемостойки, но не отличаются механической жесткостью. Для реализации одностадийной процедуры выделения нуклеиновых кислот были предложены композиционные сорбенты на основе кремнезема, поверхность которого модифицирована фторсодержащими полимерами (политетрафторэтиленом [2], сополимерами трифторстирола с метилдвинилсиланом [3], полифторбутадиеном [4] и др.). С их помощью достигнута высокая эффективность при одностадийном выделении плазмидной и геномной ДНК из бактерий, ДНК из клеток крови человека, РНК [4]. Устойчивость к механическим воздействиям и высокая сорбционная емкость фторполимерсодержащих сорбентов позволили выделять очищенные препараты ДНК как при реализации традиционных колоночных схем хроматографии, так и при использовании картриджей, содержащих всего 60 мг сорбента, а также

Сокращения: ПИАНИ-МПС – полианилинсодержащий кремнеземный сорбент; ПФБД-МПС – полифторбутадиенсодержащий кремнеземный сорбент.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00; факс: (095) 335-10-11; эл. почта: kapustin@mail.ibch.ru).

Таблица 1. Структурные характеристики ПАНИ- и ПФБД-содержащих композиционных сорбентов

Сорбент	Характеристики		
	объем пор, см <sup>3</sup> /г	диаметр пор, нм	$\Delta D^*$ , нм
ПАНИ-МПС	0.970	35	7.0
ПФБД-МПС	0.982	34	7.5

\* Вычислено как  $(D_0 - D_m)/2$ , где  $D_0 = 49$  нм – эффективное значение диаметра пор немодифицированного МПС,  $D_m$  – эффективное значение диаметра пор модифицированного МПС.

при сорбции примесей в перемешиваемом объеме (“batch-процесс”) [4].

Применение фторполимерсодержащих сорбентов ограничено технологической сложностью получения описанных материалов, поэтому разработка менее трудоемких способов получения сорбентов для одностадийного выделения нуклеиновых кислот является актуальной задачей. С этой целью был предпринят поиск полимерных модификаторов, обладающих сходными с перфторполимерами сорбционными свойствами и в то же время способных формировать тонкие сплошные пленки на поверхности носителя. К числу таких соединений относятся, в частности, анилина, образующие в процессе осадительной полимеризации нерастворимые тонкие пленки как на органических [5], так и на неорганических поверхностях [6].

Известно, что полианилин, вследствие наличия гетероатомов азота и системы полисопряжения в макромолекуле, наряду с высокой хемостойкостью, обладает сорбционными свойствами, позволяющими использовать полианилинсодержащие материалы при разделении ряда низкомолекулярных соединений [7]. Можно полагать, что сорбенты на основе полианилина могут быть эффективны при разделении белков и нуклеиновых кислот.

В настоящей работе мы показали возможность использования осадительной полимеризации анилина при получении бездефектных композиционных сорбентов на основе объемно-пористых кремнеземов. Были исследованы сорбционные свойства таких материалов при выделении и очистке нуклеиновых кислот. Проведен сравнительный анализ образцов ДНК, полученных с использованием ПАНИ- и ПФБД-содержащих картриджей, картриджей фирмы Qiagen, а также по стандартной методике (фенол-хлороформная экстракция). Эффективность применения полианилинсодержащего сорбента была показана на примере препаративного выделения ДНК из бактериальных лизатов, а также на примере использования полученного сорбента в аналитических целях при изучении апоптоза клеток карциномы толстой

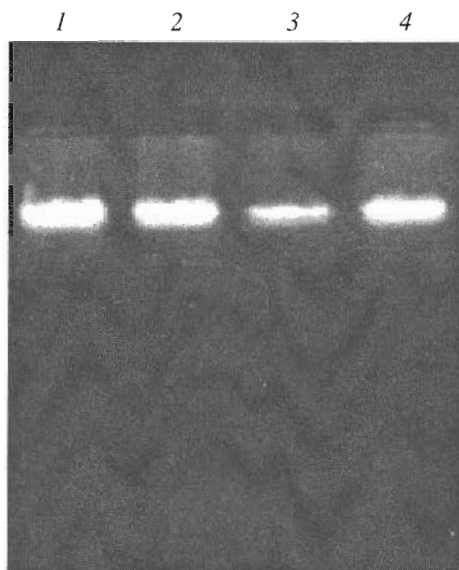
кишки, сопровождающегося изменениями в структуре выделяемой ДНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

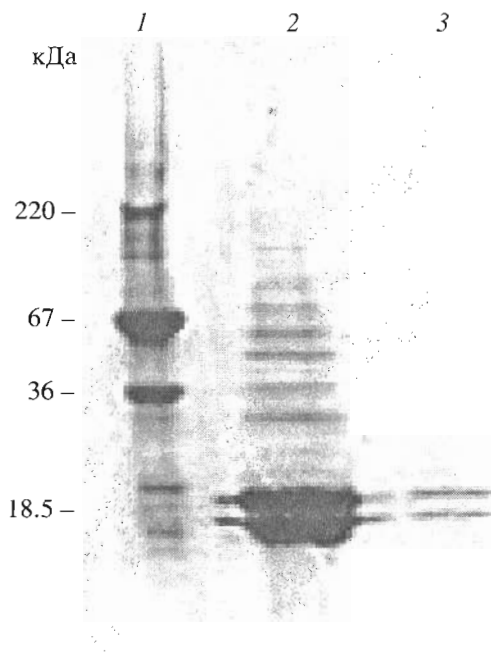
С целью получения бездефектных полианилинсодержащих сорбентов на основе объемно-пористых кремнеземов было исследовано влияние условий проведения осадительной полимеризации анилина в присутствии частиц объемно-пористого носителя на скорость образования и распределение полианилиновой пленки на поверхности носителя. Было показано, что для получения сплошного полимерного покрытия как на внешней поверхности частиц носителя, так и на внутренней поверхности пор, оптимально соотношение мономер–кислота–окислитель, равное 1 : 3 : 1, что соответствует соотношению реагентов, при котором получают бездефектный полианилин в отсутствие носителя [8]. Для получения сорбента с равномерно распределенным по поверхности носителя полианилиновым слоем необходимо вакуумировать носитель перед контактом с раствором, содержащим реагенты, строго соблюдать соотношение количеств носителя и реагентов, а также соблюдать порядок введения компонентов реакционной смеси в реактор (см. “Эксперимент. часть”).

Морфологию поверхности сорбентов изучали методом ртутной порометрии. Сравнение порограмм образцов полианилинсодержащего сорбента с порограммами образцов полифторбутадиеносодержащего сорбента, полученного нами ранее [4], показало (табл. 1), что в обоих случаях в значительной степени сохраняется пористость исходного носителя, а толщина полимерного покрытия составляет около 70 Å.

Таким образом, показана возможность получения в мягких условиях полианилинсодержащего сорбента на основе объемно-пористых носителей с оптимальной морфологией полимерного покрытия. Эти данные, в частности, указывают на то, что при проведении осадительной полимеризации анилина в присутствии частиц объемно-



**Рис. 1.** Результаты электрофореза ДНК из *E. coli* в 1% агарозном геле: 1 – лизат *E. coli*; 2 – образец ДНК, полученный при использовании ПАНИ-МПС-содержащего картриджа; 3 – образец ДНК, полученный при выделении на картридже фирмы Qiagen; 4 – образец ДНК, полученный при использовании ПФБД-МПС-содержащего картриджа.



**Рис. 2.** Результаты белкового электрофореза в ПААГ образцов лизата *E. coli* до (2) и после пропускания через картридж (3), содержащий ПАНИ-МПС; 1 – стандартная смесь белков.

пористого кремнезема, тонкий полианилиновый слой образуется не только на внешней поверхности частиц носителя, но и на внутренней поверхности пор.

Упакованные полученным полианилинсодержащим сорбентом картриджи использовали для препаративного выделения ДНК из лизатов бактериальных клеток *E. coli* (JM 109). Лизаты представляют собой сложные смеси ДНК, продуктов расщепления РНК, белков, пептидов, полисахаридов, липидов, поверхностно-активных веществ, а также низкомолекулярных соединений. Было показано, что при пропускании лизатов через слой сорбента нуклеиновые кислоты не удерживаются сорбентом, в то время как белковые примеси и значительная часть низкомолекулярных веществ сорбируются. Таким образом, полианилинсодержащий сорбент проявляет сорбционные свойства, сходные со свойствами перфторполимерсодержащих материалов, что позволяет проводить эффективную одностадийную очистку ДНК, используя модифицированные полианилином носители. Значительная сорбционная емкость (определяемая наличием развитой поверхности носителя) обеспечивает возможность применения картриджей, содержащих всего 60 мг сорбента. Выход ДНК и степень ее очистки в образцах, полученных при одностадийном выделении ДНК с применением полианилинсодержащего сорбента, сравнивали с показателями для образцов ДНК, полученных как при использовании полифторбутадиеносодержа-

щего сорбента, так и с выделенными по многостадийной методике, разработанной фирмой Qiagen (рис. 1, 2)

Бактериальные лизаты в равных объемах вносили в картриджи с сорбентами, модифицированными соответственно полианилином и полифторбутадиеном. Картриджи центрифугировали и получали депротенинированные растворы ДНК. Параллельно ДНК выделяли по альтернативной схеме на картриджах фирмы Qiagen. Из собранных элюатов отбирались равные аликвоты для проведения электрофореза. Представлены результаты электрофореза полученных ДНК-содержащих образцов в 1% агарозном (рис. 1) и в полиакриламидном гелях (рис. 2). Из рис. 1 видно, что относительное содержание ДНК в препарате, полученном после очистки на картридже с полианилинсодержащим сорбентом (рис. 1, дорожка 2), незначительно отличается от содержания ДНК в исходном лизате (рис. 1, дорожка 1) и не ниже содержания ДНК в контрольных образцах, полученных при использовании полифторбутадиеносодержащего сорбента (рис. 1, дорожка 4), а также при использовании картриджа фирмы Qiagen (рис. 1, дорожка 3). Вместе с тем, в результате однократного пропускания лизата через картридж с полианилинсодержащим сорбентом белки эффективно удерживаются, что следует из сравнения содержания белков на электрофореграмме (рис. 2) в исходном лизате (рис. 2, дорожка 2) и в полученном препарате ДНК (рис. 2, дорожка 3).

**Таблица 2.** Содержание белка в элюатах, полученных при выделении ДНК из *E. coli* с использованием картриджей, упакованных ПАНИ-МПС

Образец (0.06 мл)	Содержание белка в пробе по Бредфорд, мкг/мл	Суммарное количество белка в пробе, мкг	Содержание белка в пробе, %
Исходный лизат	302	18.12	100
Элюат	42.2 ± 6	2.5 ± 0.4	14 ± 2

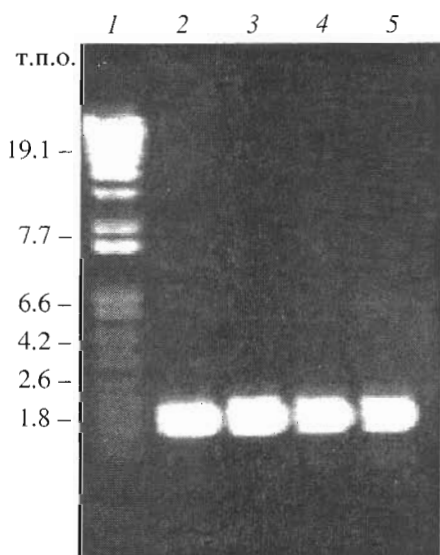
Анализ полученных элюатов по методу Бредфорд показал, что на картридже сорбируется не менее 85% суммарного количества белка исходного лизата (табл. 2).

Высокая степень очистки ДНК подтверждается возможностью непосредственного использования полученного препарата ДНК в ПЦР-анализе, поскольку ПЦР (полимеразная цепная реакция), проводимая в присутствии бактериальной геномной ДНК, легко ингибируется даже при незначительном содержании различных примесей. Продукты амплификации в результате проведения ПЦР бактериальной ДНК, полученной после выделения на картриджах с полианилин- и полифторбутандиенсодержащими сорбентами, хорошо видны на электрофореграмме (рис. 3, дорожки 2–5).

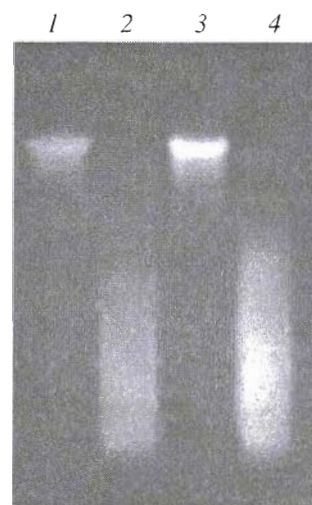
Таким образом, при одностадийной процедуре препаративного выделения ДНК из сложных смесей (лизатов) полианилинсодержащий сорбент не уступает по эффективности полифторбутандиенсодержащему сорбенту. Применение полученного полианилинсодержащего сорбента значительно экономит время по сравнению с обычно применяемыми многостадийными процедурами

выделения ДНК при отсутствии заметных потерь ДНК в процессе выделения.

Положительные результаты, полученные при препаративном выделении ДНК из бактериальных лизатов, дают основание предположить, что спектр практических задач с использованием полианилинсодержащего сорбента может быть расширен. В данной работе мы приводим пример использования полианилинсодержащих картриджей в аналитических целях для быстрого детектирования фрагментации ДНК. Как известно, многие биологические процессы в клетке сопровождаются апоптозом. При апоптозе происходит фрагментация ДНК. На рис. 4 показана электрофореграмма с результатами электрофореза в 1% агарозном геле образцов ДНК, полученных при выделении на полианилинсодержащем сорбенте из лизатов клеток карциномы толстой кишки Colon Carcinoma HT 29 (рис. 4, дорожка 3) и тех же клеток после воздействия УФ-излучения (рис. 4, дорожка 4). В качестве контроля были использованы образцы ДНК, полученные в результате проведения фенол-хлороформной экстракции (рис. 4, дорожки 1, 2). Показано, что содержание



**Рис. 3.** Электрофорез в 1% агарозном геле продуктов ПЦР с образцами ДНК, полученными при использовании ПАНИ-МПС-содержащего картриджа (дорожки 2, 3) и ПФБД-МПС-содержащего картриджа (дорожки 4, 5), 1 – маркер ДНК.



**Рис. 4.** Электрофорез в 1% агарозном геле ДНК, выделенной на ПАНИ-МПС-содержащем картридже (дорожки 3, 4) и методом фенол-хлороформной экстракции (дорожки 1, 2) до (дорожки 1, 3) и после апоптоза (дорожки 2, 4).



ДНК при использовании сорбента (рис. 4, дорожки 3, 4) оказывается выше, чем при проведении фенол-хлороформной экстракции (рис. 4, дорожки 1, 2). При этом в образцах ДНК, выделенных из облученных клеток, на электрофореграмме наблюдается "хвост", свидетельствующий о фрагментации ДНК, сопровождающей апоптоз клеток (рис. 4, дорожки 2, 4). Полученные результаты подтверждают, что полианилинсодержащие сорбенты могут быть с успехом использованы для быстрого обнаружения структурных изменений в нуклеиновых кислотах.

Таким образом, использование полианилина в качестве полимерного модификатора позволяет значительно упростить процесс получения композиционных полимерсодержащих сорбентов с оптимальной морфологией поверхности по сравнению с методами получения фторполимерсодержащих сорбентов. Полианилинсодержащие сорбенты эффективны при одностадийном препаративном выделении очищенных концентрированных препаратов ДНК из различных источников. При этом на процедуру выделения ДНК (с момента получения лизата) затрачивается, в среднем, всего 3–5 мин. Показано, что картриджи, упакованные полианилинсодержащим сорбентом, также могут с успехом применяться в аналитических целях при исследовании процессов, протекающих с изменением структуры нуклеиновых кислот.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Синтез полианилин-МПС (ПАНИ-МПС).

Макропористое стекло марки RGB-500-Trisorop (средний диаметр пор 40 нм, размер частиц 100–200 мкм) получено от Schuller GmbH, Германия (далее – МПС). МПС предварительно вакуумировали в специальном реакторе, в который затем вводили раствор реагентов, интенсивно впитывающийся в поры частиц носителя. К 20 г МПС добавляли 3.6 мл анилина, растворенного в 50 мл 2 М HCl, непосредственно перед вводом в реактор смешанного с 30 мл водного раствора, содержащего 8.4 г  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакцию останавливали, добавляя 100 мл 1 М  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Полученную смесь инкубировали 17 ч, затем промывали сорбент водой, метанолом, ацетонитрилом и ацетоном. Сорбент высушивали в вакууме до постоянного веса. Морфологию сорбента изучали методом ртутной порометрии на ртутном порометре Pore Sizer 9300 (Micromeritics, США).

**Выделение ДНК.** Лизаты клеток получали из 1 мл ночной культуры *E. coli* (с концентрацией  $1.6 \times 10^6$  клеток/мл), используя готовые буферные растворы (содержащие детергенты и протеиназу К) и при условиях, разработанных и любезно предоставленных NExtTec GmbH, Германия. 200 мкл полученного клеточного лизата в Трис-

EDTA-буфере, pH 7.5, вводили в картриджи (7 мм × 25 мм), содержащие по 60 мг тестируемого сорбента (ПАНИ-МПС, ПФБД-МПС, [4]), или в картридж фирмы Qiagen. Картриджи центрифугировали при 2000 об/мин в течение 1 мин. Полученные элюаты (в среднем, по 150 мкл) затем анализировали.

Аналогичным способом из клеточной суспензии с концентрацией  $1.4 \times 10^6$  клеток/мл приготавливали лизаты клеток карциномы толстой кишки Colon Carcinoma HT-29, полученных из American Type Culture Collection HTB-38.

Кроме того, клетки карциномы толстой кишки лизировали стандартным щелочным методом, затем инкубировали при 37°C 2 ч с протеиназой К (20 мг/мл) и выделяли ДНК экстракцией фенол-хлороформной смесью с последующим осаждением в течение ночи при –20°C в присутствии этанола. Полученный осадок ДНК ресуспендировали в 150 мкл Трис-EDTA-буфера, pH 7.5.

Содержание белка в образцах определяли спектрофотометрически по методике Бредфорд с использованием Кумасси бриллиантового синего G-250 [9].

**Электрофорез.** Аликвоты полученных растворов (20 мкл) наносили на пластину 1% агарозного геля, содержащего бромид этидия (0.5 мкг/мл) и проводили электрофорез в течение 1 ч (90 В) также в присутствии бромида этидия (0.5 мкг/мл). Образцы визуализировали в УФ-свете.

**Электрофорез в ПААГ** (аликвоты по 20 мкл) проводили по методике, описанной Лэммли [10], используя 4–30% градиентный гель в присутствии додецилсульфата натрия. Гель окрашивали 0.125% Кумасси бриллиантовым синим G-250. В качестве маркеров использовали стандартные наборы смесей белков NMW фирмы Pharmacia.

**ПЦР** проводили с использованием видоспецифичных к *E. coli* праймеров в условиях, отработанных NExtTec GmbH (NExtTec PCR kit). Полученные ампликоны визуализировали в УФ-свете после электрофореза в 1% агарозном геле.

**Апоптоз** вызывали, подвергая клетки (концентрация  $1.4 \times 10^6$  клеток/мл) воздействию УФ-излучения мощностью 30 Вт/см<sup>2</sup> в течение 2 мин. ДНК для последующего анализа выделяли с использованием картриджей, упакованных полианилинсодержащим сорбентом и методом фенол-хлороформной экстракции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hjerten S. // Chromatog. Rev. 1967. V. 9. P. 122.
2. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. // Adv. Polymer Science. 1992. V. 104. P. 135–175.
3. Kataev A.D., Saburov V.V., Reznikova O.A., Kapustin D.V., Zubov V.P. // J. Chromatogr. A. 1994. V. 660. P. 131–136.
4. Капустин Д.В., Сабуров В.В., Завада Л.Л., Евстратов А.В., Барсамян Г.Б., Зубов В.П. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 770–777.

5. Wu S., Zeng F., Shen J. // *Polymer Int.* 1998. V. 47. P. 335–339.
6. Nicolau Y.F., Ermolieff A. // *Synthetic Metals.* 1995. V. 71. P. 2073–2074.
7. Schneider B. G01N 27/26, B01D 15/08, 17/06. 1989.
8. Кобрянский В.М., Арнаутов С.А., Мотякин М.В. // *Рос. журн. ВМС. Серия А.* 1995. Т. 37. С. 35–38.
9. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 142–146.
10. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

## A Composite Polyaniline-Containing Silica Sorbent for DNA Isolation

D. V. Kapustin<sup>#</sup>, E. Yu. Yagudaeva\*, L. L. Zavada\*, L. S. Zhigis\*, V. P. Zubov\*,  
E. M. Yaroshevskaya\*\*, L. Plobner\*\*, R.-M. Leiser\*\*, and G. Brem\*\*

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 336-0600, fax: +7 (095) 335-10-11, e-mail: kapustin@mail.ibch.ru

\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10,  
GSP Moscow, 117997 Russia

\*\* NExtTec GmbH, Hemmelrather Weg 201, Leverkusen, Germany

A composite sorbent based on porous glass beads modified with thin polyaniline coating was prepared by precipitating aniline polymerization in the presence of carrier particles. It was shown that the modification ensures the uniform coating of the inner surface of the carrier pores with the polymer layer ~70 Å thick. It was shown that the resulting material retains the initial porosity of the carrier and is selective in the separation of nucleic acids and proteins. The polyaniline-coated sorbents were shown to be efficient for both the preparative DNA isolation from bacterial lysates and for analytical purposes, in particular, for studying DNA fragmentation during apoptosis proceeding under UV irradiation of cell lysates of colon carcinoma. The morphological and chromatographic characteristics of the new sorbent were demonstrated to be similar to those of the polyfluorobutadiene sorbent. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* composite sorbents, DNA fragmentation, DNA isolation