

OBSERVAREA LA MICROSCOPUL ELECTRONIC A ADN-ului MARCAT SELECTIV – SPRE SECVENȚIEREA ADN LA MICROSCOPUL ELECTRONIC

Alexandre Loukanov, Dept.
*Geoecologie, Universitatea de Minerit
și Geologie “Sf. Ivan Rilski”, Sofia
1700, BULGARIA*

ABSTRACT: Scopul acestei investigații este studiul posibilității de a utiliza microscopul electronic cu transmisie pentru identificarea unui anumit tip de baze cu conținut de azot în ADN-ul monocatenar. Marcarea selectivă se încercă prin aplicarea unui marcator, care este atașat la ADN printr-o legătură de hidrogen a perechilor de baze. Acest marcator conține un element greu (de exemplu platina sau altele) care are o densitate ridicată și este observabil la microscopul electronic. În lucrarea de față facem o demonstrație cu un nucleozid artificial în stare metalică chelatică pe post de marcator pentru atașarea complementară la oligonucleotide cu scopul de a distinge structura sa de nivel înalt. Această abordare permite detectarea analizei specific a secvenței ADN și reprezintă o cale promițătoare către diagnosticul molecular.

CUVINTE CHEIE: Nucleozid artificial în stare metalică chelatică, perechi de baze metal-asistate

1. INTRODUCERE

Secvențierea ADN prin microscopia electronică cu transmisie este acceptată ca o tehnologie de secvențiere uni-moleculară de a treia generație, ce folosește microscopul electronic cu transmisie (TEM) pentru vizualizarea de baze azotate individuale. Pentru a fi detectate acestea trebuie etichetate cu atomi grei, ce sunt apoi transpuși în imagini la TEM datorită contrastului mai mare în comparație cu fundalul peliculei de carbon care îi înconjoară. În urma marcării diferențiate a bazelor ADN cu nucleozid artificial în stare metalică chelatică, este posibilă atât vizualizarea cât și distingerea între bazele individuale atașate la coloana vertebrală de zahăr-fosfat. Studiile teoretice și experimentale indică faptul că la

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF SELECTIVELY LABELED DNA – TOWARD EM DNA SEQUENCING

Alexandre Loukanov, Dept. of Eng.
*geoecology, University of Mining and
Geology “St. Ivan Rilski”, Sofia 1700,
BULGARIA*

ABSTRACT: The goal of this investigation is to study the possibility of using transmission electron microscope for identification of specific type of nitrogen-containing bases in single stranded DNA. The selective labeling is attempted by applying a marker, which is attached to DNA by base pairing hydrogen bond. This marker contains heavy element (for example platinum or others) that is high-dense and observable by electron microscope. In the present paper, we demonstrate an artificial nucleoside with metal chelating site as marker for complementary attachment to oligonucleotide with purpose to discern its high-order structure. This approach allows the detection of specific DNA sequence analysis and it is promising way for molecular diagnostic.

KEY WORDS: Artificial nucleoside with metal chelating site, metal-assisted base pairs

1. INTRODUCTION

The transmission electron microscopy DNA sequencing is accepted as a third-generation, single-molecule sequencing technology that uses transmission electron microscope (TEM) for visualization of individual nitrogen bases. To be detected they must be labeled with heavy atoms, which are then imaged in TEM due to their higher contrast in comparison with the surrounding carbon film background. Upon differential labeling of the DNA bases with artificial nucleoside with heavy metal chelating site, it is possible to both visualize and distinguish between the individual bases attached to the sugar-phosphate backbone. Theoretical and experimental studies indicate that in the high-

microscopul electronic de înaltă rezoluție e posibilă obținerea de imagini ale unui singur atom greu așezat pe un substrat subțire de carbon (Crewe *et al.*, 1970). Prin urmare, microscopia electronică împreună cu etichetarea diferențială a atomilor grei de ADN ar putea fi utilizate în crearea de imagine directă a ADN-ului, pentru a-i determina secvența (Xu și Fujita, 2009).

Scopul acestei investigații este de a studia posibilitatea folosirii microscopului electronic cu transmisie pentru identificarea unor nucleobaze specifice marcate în ADN-ul monocatenar (ss ADN). Această metodă este demonstrată prin colorarea selectivă a citozinei în lanțul de oligonucleotide monocatenar întins. Marcarea selectivă este realizată prin aplicarea unui marcator, care este un derivat artificial al guaninei și este atașat complementar la citozină în ss ADN prin împerecherea bazelor de tip Watson-Crick. Marcatorul conține starea de chelare a platinii (Tasaka *et al.*, 2001) care îl face observabil la microscopul electronic. Acest cation de platină este legat de N7 de bază purinică și nu duce la schimbări majore în geometria împerecherii bazelor. Totuși stabilitatea împerecherii bazelor poate fi mărită prin polarizarea bazelor purinice de către cation și prin atracția electrostatică de distanță dintre cationul hidratat și alte nucleobaze. Stabilitatea împerecherii bazelor guanină-citozină Watson-Crick este îmbunătățită de către mecanismul de polarizare în timp ce stabilitatea împerecherii bazelor adenină-timină Watson-Crick este îmbunătățită de către efectele electrostatice (Sponer *et al.*, 2000).

2. SECȚIUNE EXPERIMENTALĂ

2.1. Dispersarea ss ADN în rețeaua de carbon.

Conținutul soluției: pH ~ 8 (gipurile de fosfați ale ADN sunt încărcate), tampon TE (10nM Triss + 0.1 mM EDTA), formamidă (pentru asistarea dezintegrării ss-ADN), 2,5mg/l ss ADN din timus de vițel (Sigma D

resolution electron microscope it is possible to obtain pictures of a single heavy atom resting on a thin carbon substrate (Crewe *et al.*, 1970). Therefore, electron microscopy in conjunction with differential heavy atom DNA labeling could be used directly image the DNA in order to determine its sequence (Xu and Fujita, 2009).

The goal of this investigation is to study the possibility of using transmission electron microscope for identification of specific labeled nucleobases in single-stranded DNA (ss DNA). This method is demonstrated by selectively staining of cytosine in stretched single-stranded oligonucleotide chain. The selectively labeling is achieved by applying a marker, which is artificial derivative of guanine and it is attached complementary to cytosine in ss DNA via Watson-Crick base pairing. The marker contains platinum chelating site (Tasaka *et al.*, 2001) that make it observable by electron microscope. This platinum cation is bind to N7 of purine base and it does not lead to any major changes in the geometry of the base pairing. However, the stability of the base pairing can be increased by polarization of the purine base by the cation and by long-range electrostatic attraction between the hydrated cation and the other nucleobase. The stability of guanine-cytosine Watson-Crick base pairing is enhanced by the polarization mechanism while the stability of the adenine-thymine Watson-Crick base pair is enhanced by the electrostatic effects (Sponer *et al.*, 2000).

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Spreading of ss DNA on the carbon grid.

Solution contents: pH ~ 8 (the phosphate groups of DNA are charged), TE buffer (10 nM Triss + 0.1 mM EDTA), formamide (to assist unfolding of ss-DNA), 2.5 mg/l ss DNA from calf thymus (Sigma D 8899) in 0.25 TE

8899) în 0,25 TE + 50 formamidă (FA).
 Dispersarea: soluția ADN este amestecată cu surfactant cationic bromură de cetil trimetil amoniu (CTAB): $C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3Br^-$ (concentrație miceliară critică = 1×10^{-3} M).
 Mixtura a fost injectată într-o picătură de apă și formamidă (cu raportul volumului 1:1).
 Stratul de suprafață este atins cu un strat de carbon cu descărcare luminiscentă pe rețeaua microscopului electronic, așa cum este indicat în Fig. 1.

+ 50% formamide (FA). Spreading: DNA solution is mixed with cationic surfactant cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB): $C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3Br^-$ (critical micellar concentration = 1×10^{-3} M). The mixture was injected into a drop of water and formamide (with volume ratio 1:1). The surface layer is touched with a glow-discharged carbon layer on the electron microscopic (EM) grid as it is shown on Fig. 1.

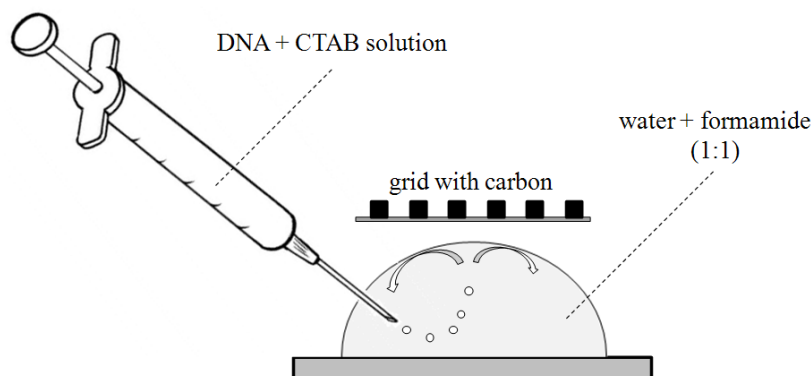


Figura 1. Injectarea de ADN monocatenar în soluție de apă amestecată cu formamidă.

Figure 1. Injection of single stranded DNA in mixed water & formamide solution.

Datorită diferenței de densitate, soluția injectată se ridică la suprafață. Are loc o dispersare rapidă, deoarece soluția injectată are o tensiune mai scăzută (efectul Marangoni în prezența surfactantului). Acest proces este ilustrat în Fig. 2.

Due to density difference the injected solution goes up to the surface. Fast spreading occurs because the injected solution has lower tension (Marangoni effect in the presence of surfactant). This process is shown on Fig. 2.



Figura 2. ADN monocatenar rapid în dispersie datorită efectului Marangoni în prezența surfactantului CTAB.

Figure 2. Fast single stranded DNA spreading due to the Marangoni effect of the presence CTAB surfactant.

Când stratul de suprafață este transferat în rețea, bazele ADN sunt lăsate libere pentru împerecherea cu marcatorul, așa cum este ilustrat în Fig. 3.

When surface layer is transferred to the grid, DNA bases are left free for pairing with a marker as it is shown on Fig. 3.



Figura 3. Orientarea surfactantului și moleculei ADN din rețeaua de carbon.

Figure 3. Orientation of the surfactant and DNA molecule on the carbon grid.

2.2. Condițiile optime de adsorbție și alungire a ADN. Protocolul de marcare.

Se amestecă ADN monocatenar (2,5 mg/l) în 0,25 TE + 50 % formamidă (1:1) cu 2×10^{-5} CTAB și injectat într-o picătură de apă + formamidă (1:1). Suprafața este atinsă cu o rețea EM acoperită de o peliculă de carbon proaspăt descărcată cu luminescență (și după ce s-a așteptat 2 min), apoi excesul de soluție se estompează. După ce ss-ADN a fost depozitat pe pelicula de carbon, s-a aplicat soluția de marcator Pt (dăruit de Dr. Tasaka) în apă sau metanol: se pune o picătură pe epruvetă timp de 4 minute, apoi se șterge și se spală în apă timp de un minut. Marcatorul se dizolvă în apă. Toate epruvetele au fost observate cu microscopul electronic cu transmisie JEOL JEM 1200 EX la o tensiune accelerată de 100 kV.

2.2. Best conditions for adsorption and stretching of DNA. Labeling protocol.

Single stranded DNA (2.5 mg/l) in 0.25 TE + 50 % formamide is mixed (1:1) with 2×10^{-5} CTAB, and injected in a drop of water + formamide (1:1). The surface is touched with an EM grid covered by freshly glow-discharged carbon film (and waited 2 min), then the excess solution is blotted. After ss-DNA has been deposited on the carbon film, it was applied solution of Pt-marker (gift from Dr. Tasaka) in water or methanol: a drop is put on the specimen for 4 min, then was blot and washed for 1 min on water. The marker is dissolved in water. All sample were observed by transmission electron microscope JEOL JEM 1200 EX at 100 kV accelerated voltage.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚIE

3.1. Adsorbția și alungirea ss-DNA.

Forma ADN-ului adsorbit este deosebit de sensibilă datorită condițiilor experimentale. La concentrația surfactantului de peste 2×10^{-5}

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Adsorption and stretching of ss-DNA.

The shape of adsorbed DNA is strongly sensitive from the experimental conditions. At surfactant concentration above 2×10^{-5} M CTAB DNA exists in globular state. Toroidal

M ADN-ul există în stare globulară. Teoretic s-a prezis o formă toroidală. În Fig. 4 se ilustrează imagini văzute la TEM ale moleculelor ADN în stare globulară.

shape has been predicted theoretically. On Fig. 4 are shown TEM photos of DNA molecules in globular state.

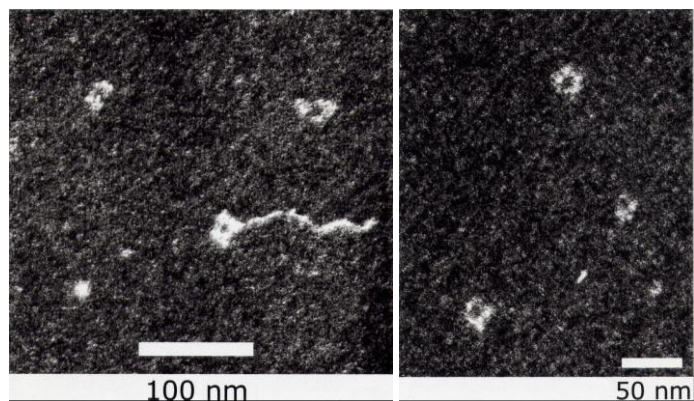


Figura 4. Observarea la microscopul electronic a moleculelor de ADN în stare globulară. Concentrația surfactantului = 5×10^{-5} M. Efectul hidrofobic (agregarea cozilor surfactantului) poate aduce ADN în stare globulară. Modul de camp întunecat este realizat cu ajutorul devierii fasciculului. Marcarea este cu 2 % $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Scara de măsurare 100 nm (microfotografia din stânga) and 50 nm (microfotografia din dreapta).

Figure 4. Electron microscopic observation of DNA molecules in globular state. Surfactant concentration = 5×10^{-5} M. The hydrophobic effect (aggregation of surfactant tails) may bring DNA to globular state. Dark-field mode is realized by beam tilt. Staining with 2 % $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Scale bar = 100 nm (for left) and 50 nm (for right microphotograph).

Atunci când ADN este încălzit și dispersat la 70 °C, se poate observa starea de spiral ([CTAB = 10^{-4} M]). În Fig. 5 sunt ilustrate imagini la TEM ale moleculelor ss ADN în stare de spiral. Acest proces trebuie evitat în faza de marcarea, deoarece ar putea împiedica secvențele microscopului electronic (EM).

When DNA is heated and spread at 70 °C, it is possible to observe entangled coil state ([CTAB = 10^{-4} M]). On Fig. 5 are shown TEM photos of ss DNA molecules in coil state. This process must be avoided in the labeling step, because it could prevent the electron microscopic (EM) sequences.

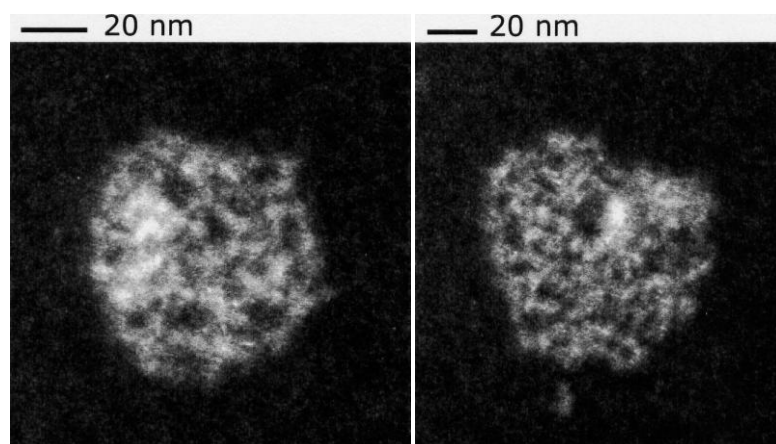


Figura 5. Micrografia TEM a molecule de ADN monocatenar în stare de spirală. Pe epruvetă a fost aplicat 2 % acetat de uranil. Scara bar = 20 nm. Dacă după încălzirea la 70 °C ss-ADN se răcește repede cu gheață, metoda de dispersare poate fi

Figure 5. TEM micrographs of single stranded DNA molecule in coil state. The sample was stained with 2 % uranyl acetate. Scale bar = 20 nm.

If after heating at 70 °C the ss-DNA is quickly cooled

utilizată pentru a obține o bună alungire a bucăților de ADN (CTAB = 5×10^{-5} M). În Fig. 6 se ilustrează bucăți de ADN alungite prin această metodă. Acest tip de ADN este potrivit pentru secvențierea la EM.

down by ice, the spreading method can be used to achieve good stretching of DNA pieces (CTAB = 5×10^{-5} M). On Fig. 6 are shown stretched DNA pieces by this method. Such DNA is appropriate for sequencing in EM.

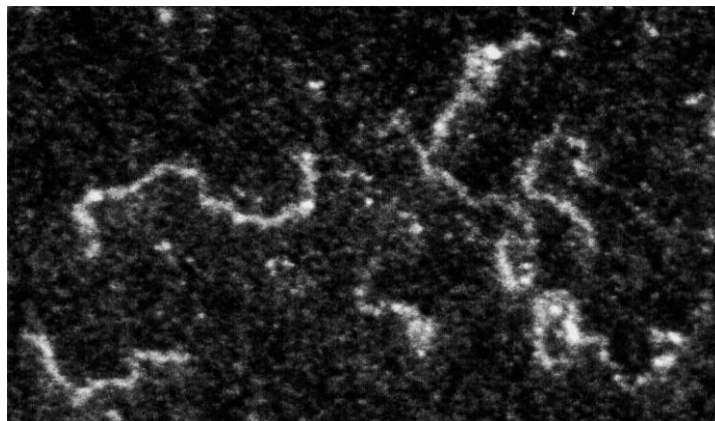


Figura 6. Imagini cu TEM ale bucăților de ADN alungit. Pe epruvetă a fost aplicat 2% acetat de uranil.

Figure 6. TEM photos of stretched DNA pieces. The sample is stained with 2 % uranyl acetate.

În Fig. 7 se demonstrează izoterma de legătură a sistemului ADN-CTAB. Regiunea întunecată reprezintă regiunea de coexistență, observată la microscopul cu fluorescență.

On Fig. 7 it is demonstrates the binding isotherm of DNA-CTAB system. The shaded region corresponds to the coexistence region, observed with fluorescent microscope.

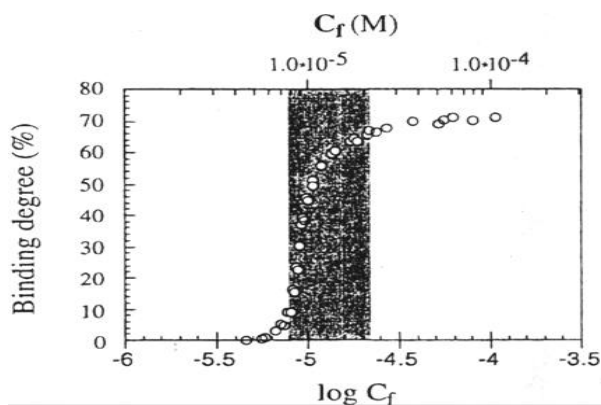


Figura 7. Izoterma de legătură a sistemului ADN-CTAB în tamponul TE la 20 °C.

Figure 7. Binding isotherm of DNA-CTAB system in TE buffer at 20 °C.

Concentrația de surfactant ar trebui să fie îndeajuns de scăzută pentru a evita starea globulară a ADN, dar îndeajuns de ridicată pentru a lega ADN și a-l trage la suprafață în timpul dispersiei. Acest experiment a obținut rezultate bune în absorbția și alungirea ss-ADN (vezi Fig. 8).

The surfactant concentration should be low enough to avoid the globular state of DNA, but still high enough to bind to DNA and drag it to the surface during spreading. In this experiment it was reached good result in the adsorption and the stretching of ss-DNA (see Fig. 8).

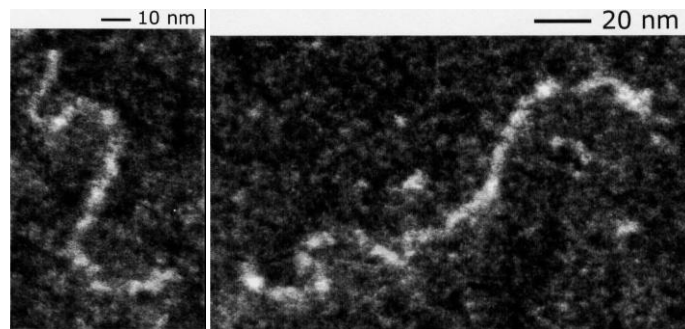


Figura 8. Imagini la TEM a molecule de ADN alungit. Scara de măsurare 10 nm (microfotografia din stânga) and 20 nm (microfotografia din dreapta).

Figure 8. TEM photos of stretched DNA molecule. Scale bar = 10 nm (left) and 20 nm (right) micrograph.

3.2. *Marcarea selectivă a ss DNA cu un marcator ce conține un element greu.*

3.2. *Selectively labeling of ss DNA with a marker contains heavy element.*

După aplicarea condițiilor de mai sus, ADN este capabil să marcheze prin nucleozide artificiale, având platina ca metal participant la formarea stării de chelare. Cationul Pt(II) coordonat asigură suficient contrast în EM (așa cum este indicat prin pătratul din microfotografia din Fig. 9)

After applying the above conditions DNA is able to label by artificial nucleoside with platinum as metal participating in the formation of chelating site. The coordinated Pt(II) cation ensures sufficient contrast in EM (as it is shown with the enclosed square on micrograph Fig. 9c.)

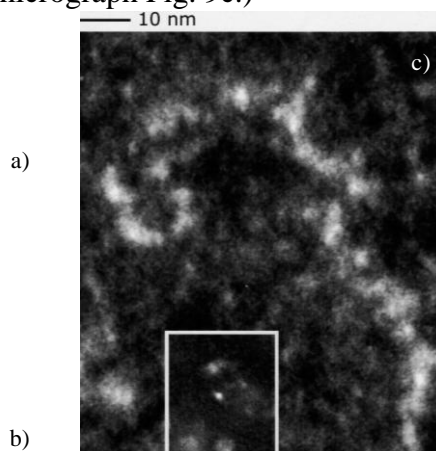


Figura 9. (a) Sinteza derivaților guaninei, (b) legăturile de hydrogen tip Watson-Crick ale percloratului de guanină 9-butyl-7-Pt- (diethylentriamină) cu o bază de citozină din coloana vertebrală de zahăr-fosfat a ADN și (c) imaginea TEM a moleculei marcate ss-ADN. Pătratul delimitează punctul ce corespunde unui atom de Pt. Scara de măsurare = 10 nm.

Figure 9. (a) Synthesis of Guanine derivatives, (b) Watson-Crick hydrogen bonding of 9-butyl-7-Pt-(diethylenetriamine) guanine perchlorate with a cytosine base from sugar-phosphate backbone of DNA and (c) TEM photo of labeled ss-DNA molecule. With the square is enclosed a spot corresponded to one Pt-atom. Scale bar = 10 nm.

În Fig. 9a se ilustrează sinteza derivaților guaninei (Tanaka et al., 1999). Guanina poate perechi de baze complementare tip Watson-Crick cu baza citozinei din lanțul ADN (Fig. 9b). ADN-ul marcat rezultat se poate observa și analiza cu succes la TEM (Fig. 9c).

Experimentele dependente de concentrație de schimbare a ^1H NMR în $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ au dus la descoperirea că coordonarea Pt(II) cu guanina-N7 a îmbunătățit stabilitatea perechii de baze tip of Watson-Crick cu citozina. Este posibil să se distingă atomi singulari cu ajutorul EM (vezi Fig 9c). Când marcatorul Pt este dizolvat în CH_3OH , rezultatul este practice același: se pot discerne marcatori individuali pe ADN.

4. CONCLUZIE

TEM produce imagini de înaltă rezoluție ale ADN care este marcat specific cu nucleozid artificial cu platină în stare de chelare (percloratului de guanină 9-butyl-7-Pt-(diethylentriamină)). Acest marcator este capabil să se atașeze complementar la citozină prin împerecherea bazelor tip Watson-Crick în ADNul monocatenar. Punctele luminoase de pe micrograful electronic, corespunzătoare ADNului marcat, pot fi analizate cu ajutorul software computerizat. Metoda are potențial pentru aplicarea în secvențierea ADNului în cantități mari disponibil în comerț.

5. MULȚUMIRI

Autorul mulțumește Prof. Kuniaki Nagayama (Catedra de fiziologie nanostructurată, Institutul Okazaki de Bioștiință Integrativă) pentru permisiunea de a utilize microscopul electronic cu transmisie și Dr. Motoyuki Tasaka (Catedra de Chimie, Universitatea din Tokyo) pentru sinteza percloratului de guanină 9-butyl-7-Pt-(diethylentriamină). Această lucrare a fost parțial sprijinită de o bursă JSPS (Societatea Japoneză de Promovare a Științei).

On Fig. 9a is shown the synthesis of Guanine derivatives (Tanaka et al., 1999). The guanine can make complementary Watson-Crick base pair with the cytosine base in the DNA strand (Fig. 9b). The resulted labeled DNA might be observed and analyzed successful in TEM (Fig. 9c).

Concentration-depending ^1H NMR shift experiments in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ reveal that Pt(II) coordination to guanine-N7 enhanced the stability of Watson-Crick base pair with cytosine. It is possible to distinguish single atoms by EM (see Fig 9c). When Pt-marker is dissolved in CH_3OH , the result is essentially the same: individual markers on the DNA can be discerned.

4. CONCLUSION

TEM produces high-resolution images of DNA which is specifically labeled with artificial nucleoside with platinum chelating site (9-butyl-7-Pt-(diethylentriamin) guanine perchlorate). This marker is able to attach complementary by Watson-Crick base pairing to cytosine in single-stranded DNA. Bright spots on the electron micrograph, corresponding to the labeled DNA bases might be analyzed by computer software. The method has potential application for high-throughput commercially available DNA sequencing.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The author is thankful to Prof. Kuniaki Nagayama (Division of Nano-structured physiology, Okazaki Institute for Integrative Bioscience) for his kind permission to use the transmission electron microscope and Dr. Motoyuki Tasaka (Department of Chemistry, Tokyo University) for the synthesis of 9-butyl-7-Pt-(diethylentriamin) guanine perchlorate. This work was partially supported by a JSPS grant (Japanese Society for Promotion of Science).

Bibliografie

- Crewe, A. V., Wall, J. and Langmore, J. (1970) Visibility of single atoms, *Science*, Vol. **168**, 1338-1340.
- Tanaka, K., Cao, H., Tasaka, M., Shionoya, M. Artificial DNAs with metal-assisted base pairs, *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 42(1), 111-112, 1999.
- Tasaka, M., Tanaka, K., Shiro, M. and Shionoya, M. (2006), A palladium-mediated DNA base pair of a β -C-nucleoside possessing a 2-aminophenol as the nucleobase, *Supramolecular Chemistry* **13** (6), 671-675.
- Sponer, J., Sabat, M., Gorb, L., Leszczynski, J., Lippert, B. and Hozba, P. (2000) The effect of metal binding to the N7 site of purine nucleotides on their structure, energy, and involvement in base pairing, *J. Phys. Chem. B* **104** (31), 7535-7544.
- Xu, M. and Fujita, D. (2009) Perspectives and challenges of emerging single-molecule DNA sequencing technologies, *Small* **5** (23), 2638-2649.

REFERENCES

- Crewe, A. V., Wall, J. and Langmore, J. (1970) Visibility of single atoms, *Science*, Vol. **168**, 1338-1340.
- Tanaka, K., Cao, H., Tasaka, M., Shionoya, M. Artificial DNAs with metal-assisted base pairs, *Nucleic Acids Symposium Series*, Vol. 42(1), 111-112, 1999.
- Tasaka, M., Tanaka, K., Shiro, M. and Shionoya, M. (2006), A palladium-mediated DNA base pair of a β -C-nucleoside possessing a 2-aminophenol as the nucleobase, *Supramolecular Chemistry* **13** (6), 671-675.
- Sponer, J., Sabat, M., Gorb, L., Leszczynski, J., Lippert, B. and Hozba, P. (2000) The effect of metal binding to the N7 site of purine nucleotides on their structure, energy, and involvement in base pairing, *J. Phys. Chem. B* **104** (31), 7535-7544.
- Xu, M. and Fujita, D. (2009) Perspectives and challenges of emerging single-molecule DNA sequencing technologies, *Small* **5** (23), 2638-2649.