

БЕЗПЕЧНІ МЕТОДИ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ПІСЛЯ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Н.М. РОШКА, Л.С. ЯЗЛОВИЦЬКА, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: n.roshka@chnu.edu.ua

У статті розглянуто сучасні підходи до візуалізації нуклеїнових кислот після гель-електрофорезу з акцентом на безпечні для здоров'я та довкілля барвники. Традиційно для детекції ДНК використовували інтеркалюючі флуоресцентні барвники, зокрема бромід етидію (EtBr), який, попри високу ефективність, характеризується значною токсичністю, мутагенною активністю та екологічною небезпекою. У статті детально проаналізовано механізми шкідливої дії EtBr на клітини та надано рекомендації з безпечної роботи з цією сполукою, включаючи утилізацію та заходи індивідуального захисту.

Також, аналізуються доступні на ринку альтернативні сучасні барвники, як-от SYBR Green I/II, GelRed™, GelGreen™, Midori Green та інші, які часто демонструють вищу чутливість та можуть застосовуватись без використання жорсткого ультрафіолетового опромінення. Крім того, такі сполуки не пошкоджують нуклеїнові кислоти та не пригнічують ензиматичні реакції, що важливо для успішності подальших експериментальних маніпуляцій, таких як ПЛР, клонування чи сиквенування. Проведено порівняльну характеристику комерційних барвників з оцінкою їх переваг, недоліків, спектральних властивостей та вартості. Попри вищу закупівельну ціну, затрати на утилізацію та ризики для персоналу при використанні сучасних барвників нижчі, ніж при роботі з EtBr. Перехід на безпечні альтернативи сприяє підвищенню ефективності, чутливості й безпеки лабораторної практики в молекулярній біології і відповідає сучасним екологічним стандартам.

Ключові слова: бромід етидію, гель-електрофорез, ідентифікація нуклеїнових кислот, охорона праці та безпека лабораторії, флуоресцентні барвники

Основна частина. Останнє десятиліття відзначилось значним технічним прогресом у галузі молекулярної генетики. Проте, традиційні методи фракціонування нуклеїнових кислот (НК: ДНК, РНК) з використанням електрофорезу в агарозному гелі продовжують залишатись важливим інструментом лабораторної роботи (Maniatis et al., 1982; Panchuk & Volkov, 2007). Останнім етапом таких експериментів є візуалізація НК після закінчення електрофорезу. Для цього застосовуються різноманітні барвники, які специфічно взаємодіють з молекулами НК.

Для візуалізації НК широко застосовують флуоресцентні барвники, які здатні до інтеркаляції між сусідніми парами нуклеотидних основ у подвійній спіралі ДНК або РНК. Ключовим при цьому є наявність у молекулі барвника плоскої поліциклічної ароматичної структури. До переліку таких інтеркалюючих барвників належить низка речовин, зокрема пропідію йодид (propidium iodide, PI), акридиновий оранжевий (acridine orange) та найпопулярніший серед них етидію бромід, який досі широко використовується у лабораторіях. У живій клітині взаємодія із інтеркалюючими барвниками призводить до

значних структурних змін у молекулах НК, які можуть надалі блокувати процеси реплікації та транскрипції, а також порушувати роботу топоізомераз (Yoshikawa et al., 1980; Nafisi et al., 2007).

Бромід етидію (EtBr, ethidium bromide – 3,8-діаміно-5-етил-6-фенілфенантридинію бромід) – один із найдавніших і найпоширеніших інтеркалюючих барвників для детекції НК після гель-електрофорезу, особливо ДНК (Olmsted, et al., 1977; Maniatis et al., 1982; Lai & Her, 1992; Vardevanyan et al., 2003; Panchuk & Volkov, 2007). За кімнатної температури він має максимум поглинання світла за довжини хвилі 210 та 285 нм, а максимальна емісія флуоресценції відбувається за 605 нм (оранжево-червоний колір). У лабораторній практиці для візуалізації НК у гелі після електрофорезу використовують транслюмінатори, які випромінюють світло відповідною довжини хвилі. Найважливішою особливістю EtBr, яка робить його досі популярним фарбником, є значне посилення флуоресценції при зв'язуванні з нуклеїновими кислотами. Однак, незважаючи на його популярність, використання EtBr має низку серйозних недоліків, зокрема небезпечні наслідки для організму людини.

Основна небезпека у застосуванні EtBr для фарбування нуклеїнових кислот пов'язана з його здатністю викликати зміни в конформації ДНК, пригнічувати синтез мітохондріальних білків і спричиняти інші клітинні порушення, особливо за умов високих концентрацій (McNerney R., 2002; Amirjavid & Mohammadi, 2014; Del Giudice & Wolf, 2021). EtBr викликає деформацію спіралі вільних мінікілець ДНК, гальмує ініціацію реплікації, а сукупний ефект цих змін призводить до втрати ДНК та загибелі клітини (Fogg et al., 2021). Окрім того, він є подразником для слизових оболонок очей, верхніх дихальних шляхів і шкіри, токсичний при проковтуванні, контакті зі шкірою та особливо небезпечний при вдиханні, що може призводити навіть до летальних наслідків.

Через високу стабільність EtBr у довкіллі та його здатність розкладатися на мутагенні продукти зростають екотоксикологічні ризики щодо широкого застосування цієї сполуки. Ефективне управління з поводженням та утилізацією EtBr є критично важливим для мінімізації його негативного впливу на довкілля та живі організми (Parkash Singh et al., 2024). Зокрема, належне поводження в лабораторії повинно включати в себе наступні рекомендації:

1. Забезпечення лабораторії витяжною системою;
2. Обов'язковий захист рук: використання виключно нітрилових та/або неопренових рукавичок, оскільки латексні рукавички не забезпечують достатнього захисту;
3. Захист тіла: уникання контакту з відкритими ділянками шкіри. Для цього рекомендується носіння лабораторного халату з довгими рукавами;
4. Заборона вживати їжу, пити воду, наносити косметичні засоби на шкіру в лабораторії, де працюють з EtBr;
5. Проведення тренінгів персоналу щодо поводження з EtBr та спеціальна підготовка на випадок розливу розчину;
6. Обов'язкова деkontамінація робочих поверхонь та належна утилізація використаних розчинів EtBr, яка має передбачати (а) хімічну дезактивацію (обробка перманганатом калію або гіпохлоритом натрію), (б) адсорбцію на активованому вугіллі, (в) утилізацію забруднених твердих відходів (гелей, одноразових витратних матеріалів, посуду).

Слід зазначити, що при використанні EtBr для ефективного збудження флуоресценції необхідно використовувати короткохвильовий ультрафіолет, що є додатковим фактором ризику

для персоналу. Крім того, це є недоліком для лабораторій, які оснащені лише транслюмінаторами з довжиною хвилі 306 або 312 нм (Tuma et al., 1999).

З огляду на низку небажаних наслідків, ризиків та практичних незручностей, пов'язаних з лабораторним використанням EtBr, постало питання пошуку безпечних альтернатив. Це призвело до розробки **нових флуоресцентних барвників**, які мають значно ширші діапазони збудження, що робить їх сумісними як із короткохвильовим ультрафіолетовим випромінюванням, так і з видимим синім світлом. Крім того, сучасні барвники мають вищий квантовий вихід флуоресценції і демонструють значне посилення флуоресценції при зв'язуванні з НК. Це дозволяє досягати високої чутливості навіть при менш потужному або спектрально менш оптимальному освітленні. Проте, поряд з очевидними перевагами над використанням EtBr, альтернативні флуоресцентні барвники не позбавлені власних недоліків (таблиця 1).

Нові барвники для детекції НК розроблені з акцентом на підвищену безпеку, що зазвичай досягається за рахунок модифікацій молекулярної структури, які перешкоджають їхньому проникненню крізь клітинні мембрани, тим самим мінімізуючи мутагенний ризик. Окрім значно нижчої токсичності, багато з цих нових сполук демонструють вищу чутливість, дозволяючи детектувати менші кількості ДНК та РНК, а також забезпечують краще співвідношення сигналу до шуму, що призводить до отримання чіткіших та яскравіших смуг на гелі.

Серед найпопулярніших та найефективніших заміन EtBr виділяють дві основні групи барвників. Перша — це **мономерні ціанінові барвники**, яскравим представником яких є родина SYBR. Наприклад, SYBR Green I, зв'язуючись переважно з дволанцюговою ДНК, демонструє значно вищий квантовий вихід флуоресценції порівняно з EtBr, що забезпечує його виняткову чутливість (Alarana et al., 2023).

Другу групу складають **димерні ціанінові барвники**, такі як GelRed™, GelGreen™ та TOTO-1/YOYO-1. Зокрема GelRed™ та GelGreen™ мають більшу молекулярну масу і розроблені таким чином, щоб бути нездатними проникати в живі клітини, що підтверджено стандартними тестами на мутагенність (тест Еймса). GelRed™ має спектральні характеристики, подібні до EtBr (збудження та емісія у червоній області), що дозволяє використовувати його зі стандартними УФ-

трансліномінаторами. Натомість GelGreen™ флуоресцює у зеленій частині спектру і може бути збуджений як ультрафіолетом, так і безпечнішим синім світлом, що додатково захищає ДНК від ушкоджень, спричинених

жорстким УФ-випромінюванням, і є перевагою для подальших маніпуляцій, таких як виділення фрагментів для клонування (Kulyk et al., 2022; Medina et al., 2024).

Таблиця 1.

Перелік доступних комерційних барвників

Table 1.

List of available commercial dyes

Назва	Постачальник	Переваги	Недоліки	Посилання
EZ-Vision® In-Gel Solution	AMRESCO	безпечніший для середовища, візуалізація без відмивання гелю	висока вартість, нижча інтенсивність сигналу	http://www.bio-protech.com.tw/upload/20170905102818.pdf
SafeView™	Applied Biological Materials Inc.	працює з УФ та синім світлом	вимагає калібрування	https://www.abmgood.com/Safe-DNA-Stains.html
Apex Safe DNA Gel Stain	APExBIO	працює з УФ та синім світлом, висока стабільність у розчинах, висока чутливість	висока вартість, може вимагати перевірки сумісності з трансліномінатором	https://www.apexbt.com/safe-dna-gel-stain.html
GelRed®	Biotium	працює з УФ-світлом, висока чутливість	висока вартість	https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/
GelGreen®	Biotium	ефективно працює з синім та зеленим світлом, висока чутливість	висока вартість	https://biotium.com/product/gelgreen-nucleic-acid-gel-stain/
EvaGreen®	Biotium	висока чутливість та стабільність, використання як для кількісної ПЛР, так і для детекції ДНК у гелях	висока вартість, слабка взаємодія з РНК, іноді вимагає калібрування	https://biotium.com/technology/pcr-dna-amplification/evagreen-dye-for-qpcr/
SYBR® Gold	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific	дуже висока чутливість, працює з УФ та синім світлом, зручний для РНК та ДНК	висока вартість, відносно погана стабільність	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S11494
SYBR® Green I/II	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific	Green I - переважно для ДНК; Green II - оптимізований і для РНК; підходять і для флуоресцентної хроматографії	при тривалому зберіганні	https://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Green_I https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7564
SYBR® Safe	Invitrogen / Thermo Fisher Scientific	Висока чутливість, сумісний із синім світлом (470 нм), менш мутагенний / токсичний	висока вартість гірша взаємодія з РНК	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S33102 https://en.wikipedia.org/wiki/SYBR_Safe
PicoGreen	Molecular Probes (нині частина	висока чутливість, дозволяє селективно детектувати ДНК у	висока вартість, не працює з	https://www.aatbio.com/resources/application-notes/picogreen

	Thermo Fisher Scientific)	присутності РНК	РНК та одноланцюговою ДНК	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P7589
TOTO-1/YOYO-1	Molecular Probes (нині частина Thermo Fisher Scientific)	флуоресценція в зеленому діапазоні, висока чутливість	TOTO-1 може впливати на структуру ДНК	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T3600
Midori Green	NIPPON Genetics	працює з УФ та синім світлом, еквівалент SYBR® Safe, але дешевший, висока чутливість	інколи вимагає оптимізації експозиції	https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/nucleic-acid-stains/midori-green-advance/
Diamond™ Nucleic Acid Dye	Promega	висока чутливість, додається після електрофорезу, сильний флуоресцентний сигнал	висока вартість	https://worldwide.promega.com/products/biochemicals-and-labware/biochemical-buffers-and-reagents/diamond-nucleic-acid-dye/?catNum=H1181
Метиленовий синій (Methylene Blue)	-	працює у видимому світлі, що усуває потребу у використанні УФ, зв'язується з РНК та ДНК	низька чутливість порівняно з іншими барвниками	https://www.ibisci.com/products/met_hylene-blue

Важливим практичним аспектом при роботі з сучасними барвниками є їхній вплив на цілісність нуклеїнових кислот та сумісність із подальшими ензиматичними реакціями. Жорстке ультрафіолетове випромінювання (254-312 нм), необхідне для ефективної візуалізації з використанням EtBr, спричиняє утворення тимінових димерів та одно- і дволанцюгових розривів у ДНК. Ці пошкодження можуть суттєво знизити ефективність таких ензиматичних реакцій, як ПЛР, лігування, секвенування та клонування. На противагу цьому, багато альтернативних барвників (наприклад, GelGreen™, SYBR® Safe) оптимізовані для збудження синім світлом видимого спектру (~470 нм), яке не пошкоджує нуклеїнові кислоти. Це дозволяє безпечно ізолювати фрагменти ДНК з гелю для подальшого використання, зберігаючи їхню структурну цілісність, що є критично важливим для успіху експериментів. Крім того, більшість сучасних барвників не впливають на активність полімераз, лігаз чи рестриктаз, тому їх можна додавати безпосередньо в агарозний гель перед заливкою (метод прекастингу), що спрощує протокол і заощаджує час порівняно з необхідністю пост-електрофоретичного фарбування та відмивання, що часто є обов'язковим при використанні EtBr (Maniatis et al., 1982).

Окрім переваг у безпеці та ефективності, існують також **економічні та інструментальні переваги** у застосуванні альтернативних

барвники. Хоча початкова закупівельна ціна сучасних альтернативних барвників значно вища, ніж у EtBr, повна розрахункова вартість у використанні часто виявляється нижчою. Це пов'язано з відсутністю значних витрат на спеціалізовану утилізацію контамінованих гелів, буферів та інших матеріалів як небезпечних хімічних відходів, що є обов'язковою вимогою при роботі з EtBr. Зниження ризиків для здоров'я персоналу також є важливим економічним фактором у довгостроковій перспективі.

Інструментально, перехід на використання альтернативних барвників вимагає наявності транслюмінатора з джерелом синього світла та відповідними світлофільтрами, однак такі системи стають все більш поширеними та доступними. Водночас, ринок пропонує широкий спектр барвників з різними спектральними властивостями, як-от Diamond™ Nucleic Acid Dye або Midori Green (табл. 1), що дає лабораторіям гнучкість у виборі оптимального реагенту залежно від наявного обладнання та специфічних завдань дослідження, остаточно закріплюючи позиції безпечних барвників як нової норми в молекулярній біології. Тож повноцінний перехід до використання сучасних альтернативних барвників для детекції НК не лише підвищує безпеку лабораторної роботи, але й покращує якість та чутливість експериментальних результатів.

На загал, незважаючи на високу ефективність в якості барвника, використання популярного й доступного EtBr супроводжується значними

ризиками для організму людини та навколишнього середовища. Критично важливою є суворі відповідність міжнародним стандартам безпеки, використання засобів індивідуального захисту, систематична дезактивація забруднених матеріалів та належна утилізація всіх лабораторних відходів, які містять EtBr. Перехід на безпечніші альтернативи є найоптимальнішим рішенням для

забезпечення зниження ризиків в межах сучасних молекулярно-генетичних досліджень.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що дослідження проводили за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.

Список літератури / References:

- Alaranta, J. M., Truong, K. N., Matus, M. F., Malola, S. A., Rissanen, K. T., Shroff, S. S., ... & Lahtinen, T. M. (2023). Optimizing the SYBR green related cyanine dye structure to aim for brighter nucleic acid visualization. *Dyes and Pigments*, 208, 110844ac. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110844>
- Alexeeff, G.V., Kilgore, W.W., & Li, M. (1990). Ethylene dibromide: toxicology and risk assessment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 112, 49-122. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3342-8_2
- Amirijavid, S., & Mohammadi, M. (2014). Toxicity of the ethidium bromide on germination of wheat, alfalfa and tomato. *Inter. Invention J. Agri. Soil Sci*, 2(5), 69-74.
- Del Giudice, L., Wolf, K., Schwemmier, W., & Schenk, H. E. A. (1980). Evidence for a joint control of nuclear and mitochondrial DNA synthesis in the petite negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Endocytobiology: Endosymbiosis and Cell Biology*, 1, 779-790.
- Fogg, J. M., Judge, A., Stricker, E., Chan, H. L., & Zechiedrich, E. L. (2021). Supercoiling and looping promote DNA base accessibility and coordination among distant sites. *Biophysical Journal*, 120(3), 221a-222a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.11.1484>
- Gupta, R.S., & Goldstein, S. (1982). Human fibroblast strains showing increased sensitivity or resistance to ethidium bromide. *Mutation research*, 105 3, 183-8. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90009-4)
- Kulyk, O. G., Kolosova, O. S., Svoiakov, R. P., Kobzev, D. V., Hovor, I. V., Kraievska, I. M., ... & Tatarets, A. L. (2022). Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization and application in real-time PCR. *Dyes and Pigments*, 200, 110148. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110148>
- Kuypers, N. J., James, K. T., Enzmann, G. U., Magnuson, D. S., & Whittemore, S. R. (2013). Functional consequences of ethidium bromide demyelination of the mouse ventral spinal cord. *Experimental neurology*, 247, 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.02.014>
- Lai, J. S., & Herr, W. (1992). Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), 6958-6962. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.6958>
- McNerney, R. (2002) Mutagens in the medical laboratory: what can be done? *Africa health*, 25. (1) 14-15
- Medina, O. A., Oviedo, F. R., González, Y. N., & Obregón, R. R. (2024). GelRed dye for staining nucleic acids in agarose gel was used in the molecular biology laboratory. *Revista Torreón Universitario*, 13(38), 145-150. <https://doi.org/10.5377/rtu.v13i38.19325>
- Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F., & Tajmir-Riahi, H. A. (2007). Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 827(1-3), 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.004>
- Olmsted III, J., & Kearns, D. R. (1977). Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*, 16(16), 3647-3654.
- Panchuk, I.I. & Volkov, R.A. (2007). *A practical course in molecular genetics*. [Praktykum z molekuliarnoi henetyky.. Chernivtsi: Ruta. 120 p. [in Ukrainian]
- Parkash, S., Parminder, K. N., Akanksha (2024). A review on toxicity and degradation of ethidium bromide (EtBr). *Environment and Ecology*, 42 (2B), 851-854. <https://doi.org/10.60151/envec/KWJT3358>
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Singh, S., & Singh, A. N. (2018). Ethidium bromide: Is a stain turning into a pollutant? A synthesis on its status, waste management, monitoring challenges and ecological risks to the environment. *Int. J. Res. Anal. Rev*, 4, 226-233.
- Tuma, R. S., Beaudet, M. P., Jin, X., Jones, L. J., Cheung, C. Y., Yue, S., & Singer, V. L. (1999). Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Analytical biochemistry*, 268(2), 278-288. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3067>
- Usifo, O. R., & Obi, F. O. (2024). Dose-dependent reduction of rat colon antioxidant enzyme activities and increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by ethidium bromide. *Scientia Africana*, 23(2), 42-47. <https://doi.org/10.4314/sa.v23i2.4>
- Vardevanyan, P. O., Antonyan, A. P., Parsadanyan, M. A., Davtyan, H. G., & Karapetyan, A. T. (2003). The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single-and double-stranded structures. *Exp Mol Med*, 35(6), 527-533. <https://doi.org/10.1038/emm.2003.68>
- Yoshikawa, H., Ogasawara, N., & Seiki, M. (1980). Initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis*: IV. The effect of an intercalating dye, ethidium bromide. *Molec. Gen. Genet.*, 179, 265-272.

SAFE METHODS FOR VISUALIZATION OF NUCLEIC ACIDS AFTER GEL ELECTROPHORESIS

N.M. Roshka, L.S. Yazlovyska, R.A. Volkov

*Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: n.roshka@chnu.edu.ua*

The article discusses modern approaches to the visualization of nucleic acids after gel electrophoresis, with an emphasis on dyes that are safe for human health and the environment. Traditionally, intercalating fluorescent dyes, particularly ethidium bromide (EtBr), have been used for DNA detection. Despite its high efficiency, EtBr is characterized by significant toxicity, mutagenic activity, and environmental hazards. The article provides a detailed analysis of the harmful effects of EtBr on cells and offers recommendations for the safe handling of this compound, including disposal and personal protective measures.

The study also analyzes modern alternative dyes available on the market, such as SYBR Green I/II, GelRed™, GelGreen™, Midori Green, and others, which often demonstrate higher sensitivity and can be used without intense ultraviolet irradiation. Moreover, such compounds do not damage nucleic acids or inhibit enzymatic reactions, which is important for the success of further experimental procedures such as PCR, cloning, or sequencing. A comparative characterization of commercial dyes is provided, including an assessment of their advantages, disadvantages, spectral properties, and cost. Despite a higher purchase price, disposal costs and personnel risks are lower when using modern dyes compared to EtBr. The transition to safer alternatives enhances the efficiency, sensitivity, and safety of laboratory practice in molecular biology and aligns with modern environmental standards.

Keywords: detection of nucleic acids, ethidium bromide, fluorescent dyes, gel electrophoresis, labor protection and laboratory safety

Отримано редколегією 03.06.2025 р.

ORCID ID

Надія Рошка <https://orcid.org/0000-0003-2602-920X>

Людмила Язловицька <https://orcid.org/0000-0001-9296-1201>

Роман Волков <https://orcid.org/0000-0003-0673-2598>