

УДК 577.088

© 1992 г. А. Г. МАЛЫГИН, Н. И. ДОРОХИНА, И. Н. ГАНЦЕРОВА

МЕХАНИЗМ ПРОЯВЛЕНИЯ БЕЛКОВ СЕРЕБРОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Ключевые слова: проявление, белок, окраска, серебро, полиакриламидный гель.

Изучены механизмы проникновения в гель ионов серебра и осаждения на белке металлического серебра. Выявлены существенные параметры, влияющие на окраску белков серебром в полиакриламидном геле. Разработана упрощенная методика проявления гелей с использованием растворимого комплекса метиламин – серебро. Выведено и проанализировано кинетическое уравнение скорости осаждения металлического серебра в геле как в условиях ограничения скоростью диффузии компонентов реакции в геле, так и при отсутствии этого ограничения.

Проявление белков в полиакриламидном геле серебром имеет чувствительность, сравнимую с чувствительностью методов, использующих радиоактивную метку. Преимущество проявления серебром перед радиоактивными методами состоит в возможности работать непосредственно с природными смесями белков. Кроме того, некоторые из предложенных методик позволяют получать для разных белков различные цветовые оттенки. Последнее представляется весьма полезным для идентификации белков.

Однако преимущества окраски серебром в значительной степени обесцениваются недостаточной хорошей воспроизводимостью метода. На эту трудность обычно указывают авторы, систематически использующие метод окраски серебром в своих исследованиях. Очевидно, что сложности, встречающиеся в этом методе, обусловлены слабой изученностью механизма окраски серебром и, следовательно, неясностью в отношении параметров, определяющих воспроизводимость процесса избирательного осаждения металлического серебра на белках в геле. Используемые в настоящее время методики окраски серебром сводятся в основном к двум следующим схемам.

Первая схема [9, 11, 14, 15] предполагает стадии пропитки геля растворимым в щелочи аммиачным комплексом серебра, споласкивания водой и проявления в разбавленном растворе формальдегида и лимонной кислоты.

Вторая схема [7, 8, 12, 13] предусматривает насыщение геля раствором AgNO_3 , последующую обработку раствором сильной щелочи (0,75 н. NaOH) с формальдегидом и проявление остатками формальдегида в последующих сменах щелочного раствора.

Варианты этих двух схем у разных авторов отличаются лишь предобработкой гелей перед насыщением их соединениями серебра, числом промывок, концентрациями используемых растворов и временами обработки.

Цель настоящей работы состоит в том, чтобы на основании анализа обеих схем, используя литературные данные и собственные наблюдения, выяснить механизм окраски белков серебром и разработать простой метод окраски, свободный от недостатков ранее предложенных методов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Акриламид («Serva» (ФРГ), 10675); бисакриламид («Serva», 29195); трис («Serva», 37180); глицин («Bio-Rad», (США), 161-0718); DS-Na («Bio-Rad», 161-0302); ТЕМЕД («Reanal», Венгрия); персульфат аммония («Serva», 13375); этанол ректификат; едкий натр (х.ч.); раствор аммиака в воде 25% (х.ч.); раствор метиламина в воде (ч.), очищенный перегонкой (конечная концентрация 9 М); азотнокислое серебро (ч.д.а); раствор формальдегида в воде 37% («Merck», (ФРГ), 4003); лимонная кислота (х.ч.); сыворотка крови кролика 75 мг белка в 1 мл. Во всех опытах использовали дистиллированную деионизованную воду.

Приготовление образцов полиакриламидного геля (ПААГ) для окрашивания серебром. Гелеобразующий раствор с концентрацией акриламида 11,7%, бисакриламида 0,30%, DS-Na 0,1%, триса 0,025 М, глицина 0,192 М, ТЕМЕД 0,2%, персульфата аммония 0,005% полимеризовали между двумя горизонтальными стеклами с зазором 1,5 мм. Для формирования требуемой концентрации белка в геле перед добавлением персульфата аммония в гелеобразующий раствор вносилось необходимое количество сыворотки. После полимеризации из пластинок гелей вырезали образцы размерами 7×13 мм, которые использовали в последующих опытах.

Методика проявления образцов. Проявление осуществляли по первой схеме. Образцы отмывали в течение ночи или дольше в 50%-ном растворе этанола, затем обрабатывали аммиачным раствором AgNO_3 , содержащим NaOH, или раствором AgNO_3 с метиламином в присутствии или в отсутствие NaOH, промывали водой и проявляли раствором с низкими концентрациями лимонной кислоты и формальдегида. После проявления образцы фиксировали в растворе, содержащем 50% спирта, 1% глицерина и 1% уксусной кислоты. Для того чтобы обеспечить одинаковые условия обработки и эффективное перемешивание растворов, проявление осуществляли следующим образом. Три образца геля (два из которых содержали белок различной концентрации, а третий без белка служил контролем) помещали в пробирки с внутренним диаметром 8 мм и длиной 120 мм с отверстием в дне. Образцы в пробирках разделялись кольцами из силиконового шланга, которые плотно прилегали к стенкам пробирки и препятствовали падению образцов на дно. Пробирки с образцами вставлялись в отверстия пластинки, которая соединялась с эксцентриком на валу двигателя так, чтобы при работе последнего могла совершать вертикальные возвратно-поступательные движения, увлекая за собой пробирки. После этого пробирки с образцами опускали в установленные в штативе пробирки с внутренним диаметром 13–14 мм и длиной 100 мм, заполненные необходимыми для обработки образцов растворами. Объемы растворов в пробирках составляли 5,5 мл, т. е. в 12 раз превышали суммарный объем образцов. Обработку образцов проводили при непрерывном перемешивании растворов, осуществляемом вертикальными движениями пробирок с образцами.

Измерение концентрации Ag^+ в милливольтх и pH проводили соответственно поноселективным на Ag^+ и стеклянным электродами против каломельного электрода сравнения, соединенного с измеряемой ячейкой солевым мостиком, содержащим 0,2 М раствор NaNO_3 . Для перевода милливольт в логарифм молярной концентрации Ag^+ строили калибровочную кривую.

Методика проявления с метиламином. Методика рассчитана на проявление 150×150×1,5 мм пластинок ПААГ с концентрацией акриламида 11,7% и бисакриламида 0,30%. Все растворы имели постоянную температуру 20–21° и объем 400 мл. Пластины геля выдерживали в 50%-ном этаноле в течение ночи или дольше и затем инкубировали в свежеприготовленном растворе 3 мМ AgNO_3 и 24 мМ метиламина в течение 1 ч. После этого пластину геля промывали в воде в течение 20 мин и проявляли раствором 12 мМ формальдегида и 0,34 мМ лимонной кислоты в течение 20–30 мин. После проявления гель фиксировали в описанном в предыдущем разделе растворе. В фиксирующем растворе гель мог храниться несколько дней. На стадиях насыщения серебром, промывки, проявления и в первые 10 мин стадии фиксации гель непрерывно встряхивали. Все стадии обработки проводили в условиях относительного затемнения.

Инициация восстановления серебра частицами коллоидного серебра в пробирке. В 0,5 мл 0,1%-ного раствора альбумина добавляли 20 мкл 1 М AgNO_3 и 0,1 мл 0,2 М NaOH. Одновременно готовили контрольный раствор без альбумина. Растворы инкубировали при 35° в течение 20 мин. Затем в обе пробирки добавляли по 5 мкл 9 М метиламина. При этом в контрольной пробирке смесь обесцвечивается, в то время как в пробирке с белком приобретает оранжево-красный цвет раствора коллоидного серебра. Если 8 мкл этого раствора добавить к 0,4 мл раствора, содержащего 43 мМ формальдегида, 0,5 мМ лимонной кислоты и 20 мМ AgNO_3 , то можно наблюдать довольно быстрое развитие окраски, вызванное ростом микрочастиц коллоидного серебра. В случае той же процедуры с контрольным раствором процесс появления и развития окраски растягивается на существенно более длительное время.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уже при первом рассмотрении становится очевидным, что процесс осаждения серебра на белке в ПААГ это весьма сложная химическая реакция со следующими характерными особенностями.

1. Реакция преимущественно инициируется белками.
2. Реакция гетерогенна, так как протекает на поверхности микро-частиц металлического серебра.
3. Скорость реакции зависит от скорости диффузии лимитирующего компонента в геле.

Этими особенностями определяются такие характеристики реакции, как неравновесность и нелинейность. Кроме того, наличие диффузионного процесса делает реакцию весьма чувствительной к изменению таких параметров, как температура, толщина и плотность геля, концентрация сшивающего агента в геле (отношение акриламид/бисакриламид) и даже отношение объема геля и используемых при его обработке растворов.

Механизм проявления по первой схеме. Очевидно, что главной характеристикой процесса окраски серебром является интенсивность потемнения пятен белка на конечной стадии проявления гелей. Поэтому изучение механизма проявления серебром было логично начать с этой конечной стадии. Для этого было изучено влияние концентрации компонентов проявляющего раствора, используемого при окраске по первой схеме, на интенсивность потемнения гелей, содержащих и не содержащих белок.

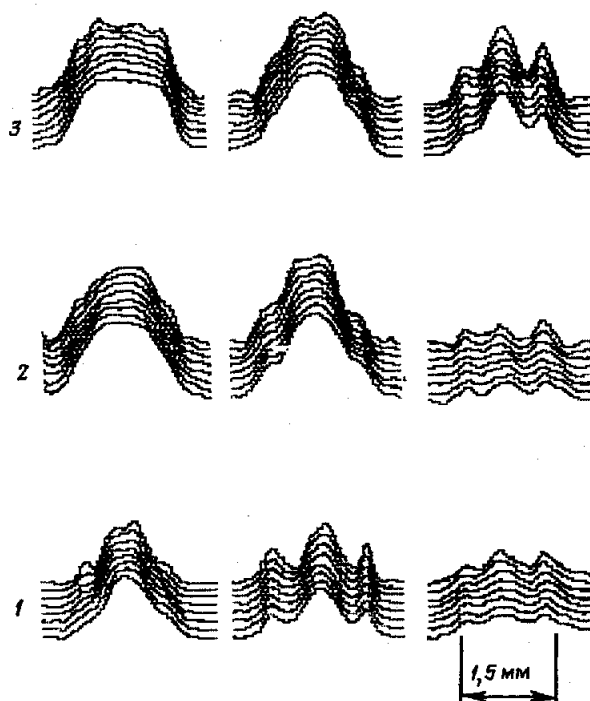
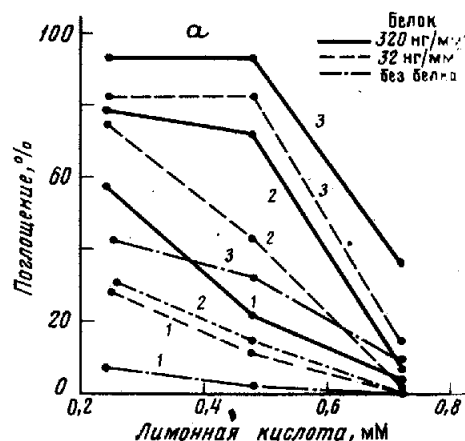
Условия эксперимента приведены на рис. 1. Как следует из рис. 1, а, увеличение концентрации лимонной кислоты приводит к ослаблению интенсивности окраски, а увеличение концентрации формальдегида, напротив, — к ее увеличению. При этом наблюдаемые изменения связаны не только с изменениями оптической плотности, но также и с изменением толщины прокрашиваемого слоя внутри гелей (рис. 1, б).

Этот эффект может быть объяснен тем, что проникновение проявляющего раствора в гель сопровождается двумя противоположно направленными реакциями: растворением образованных на предыдущих стадиях затравочных частиц коллоидного серебра в кислой среде и их роста за счет восстановления ионов серебра формальдегидом. При этом на начальном этапе, когда кислотность проникающего раствора велика, в поверхностных слоях геля преобладает процесс растворения микрочастиц серебра. Однако, по мере диффузии щелочного раствора из геля и кислого проявляющего раствора в гель, рН среды в геле и во внешнем омывающем растворе уравниваются (см. ниже рис. 4). В результате во внутренних слоях геля, где значение рН не опускается ниже равновесного, преобладает процесс роста микрочастиц серебра. Это полностью объясняет уменьшение толщины и оптической плотности окрашенного слоя в геле вплоть до полного его исчезновения при увеличении концентрации лимонной кислоты и уменьшении концентрации формальдегида в исходном проявляющем растворе, и, наоборот, увеличение оптической плотности и толщины окрашенного слоя, вплоть до часто наблюдаемого выхода реакции осаждения серебра на поверхность геля и во внешний омывающий раствор при уменьшении концентрации лимонной кислоты и увеличении концентрации формальдегида. В частности, выпадение серебра на поверхности геля при исключении лимонной кислоты из проявляющего раствора отмечено в работе [4].

Другой причиной осаждения серебра на поверхности геля может быть локальное защелачивание омывающего раствора вблизи поверхности геля при недостаточно интенсивном перемешивании диффундирующей из геля щелочи в объеме кислого проявляющего раствора.

Поскольку ингибирование проявления избытком лимонной кислоты

Рис. 1. Влияние концентраций лимонной кислоты и формальдегида на интенсивность проявления белка в гелях серебра. Образцы инкубировали 1 ч в растворе: 23,5 мМ AgNO₃, 50 мМ NH₃, 9,3 мМ NaOH, затем промывали 10 мин в воде и проявляли 20 мин в разбавленном растворе формальдегида и лимонной кислоты; а – концентрация формальдегида в проявляющем растворе: 1 – 6,2 мМ, 2 – 12,4 мМ, 3 – 18,6 мМ (а, б); б – результаты сканирования поперечного среза проявленных образцов с концентрацией белка 320 нг/мм². В центре – пик оптической плотности коллоидного серебра, по бокам – пики краевого эффекта. Номера рядов по вертикали соответствуют номерам, обозначающим концентрацию формальдегида на графике. Последовательность колонок по горизонтали соответствует последовательности значений концентрации лимонной кислоты на графике



6

тормозится увеличением концентрации формальдегида, то для стабильности процесса окрашивания весьма важно поддерживать постоянство отношения концентраций лимонной кислоты и формальдегида в проявляющем растворе.

Из приведенных объяснений также следует, что процесс проявления зависит от соотношения абсолютных количеств кислоты в проявляющем растворе и остатков щелочи в геле, т. е. не только от их концентрации, но и от объемов проявляющего раствора и геля. Это значит, что процесс проявления можно регулировать также на его начальных стадиях изменением содержания общей щелочности в растворах комплексов серебра

с аммиаком или органическими аминами. Подтверждением этому может служить тот факт, что использование в опытах, представленных на рис. 1 (состав проявляющего раствора: 0,24 мМ лимонная кислота и 6,2 мМ формальдегид), аммиачного раствора серебра двукратной концентрации приводило к осаждению серебра на поверхности геля и, наоборот, двукратное разбавление раствора полностью подавляло процесс осаждения серебра. С этим наблюдением согласуются данные статьи [10], где авторы отмечают, что изменение концентрации NH_3 и NaOH по границе, разделяющей области растворения и образования осадка Ag_2O , при малой концентрации NaOH не приводит к окраске белков в гелях, при средних — обеспечивает удовлетворительную окраску, а при больших — сопровождается выпадением серебра на поверхности геля.

Противоположное действие на осаждение серебра в геле добавок NaOH на начальной стадии и лимонной кислоты на конечной стадии видно из графиков рис. 2, а. Так же как и в случае лимонной кислоты и формальдегида (рис. 2, б), увеличение концентрации лимонной кислоты приводит к уменьшению толщины окрашенного серебром слоя белка в геле, а увеличение концентрации NaOH вызывает противоположный эффект, вплоть до выхода реакции осаждения серебра на границу фаз гель — раствор. В результате можно сделать общий вывод, что для воспроизводимости методики проявления гелей наряду с сохранением отношения концентраций лимонной кислоты и формальдегида в проявляющем растворе очень важно поддерживать постоянным отношение концентрации общей щелочи в аминном растворе серебра и абсолютного содержания кислоты в проявляющем растворе.

Однако воздействие увеличения концентрации аммиака в аммиачном растворе серебра на процесс проявления неоднозначно. Мы нашли, что избыток аммиака может тормозить осаждение металлического серебра в геле, а трехкратное увеличение концентрации аммиака по отношению к содержанию его в комплексе $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ полностью подавляет процесс проявления. В случае использования избытка метиламина подавления процесса проявления не наблюдается. Факт различного действия высоких концентраций аммиака и метиламина на процесс проявления может быть объяснен на основании анализа различий в кривых титрования раствора AgNO_3 аммиаком и метиламином (см. рис. 3) и выражения для константы нестойкости их комплекса с серебром:

$$K_n = [\text{Ag}^+][\text{A}]^n / [\text{Ag}(\text{A})_n^+], \quad (1)$$

где K_n — константа нестойкости, а A — аммиак или метиламин.

Чтобы интерпретировать кривые титрования при помощи формулы (1), обозначим начальную концентрацию ионов серебра в растворе $[\text{Ag}^+]_0$, а отношение начальной концентрации аммиака или метиламина к $[\text{Ag}^+]_0$ буквой n . Тогда при малой величине K_n и $n > 2$ можно принять $[\text{Ag}(\text{A})_n^+] \approx [\text{Ag}^+]_0$, а выражение (1) можно записать:

$$K_n = \frac{[\text{Ag}^+](n-2)[\text{Ag}^+]_0^2}{[\text{Ag}^+]_0}.$$

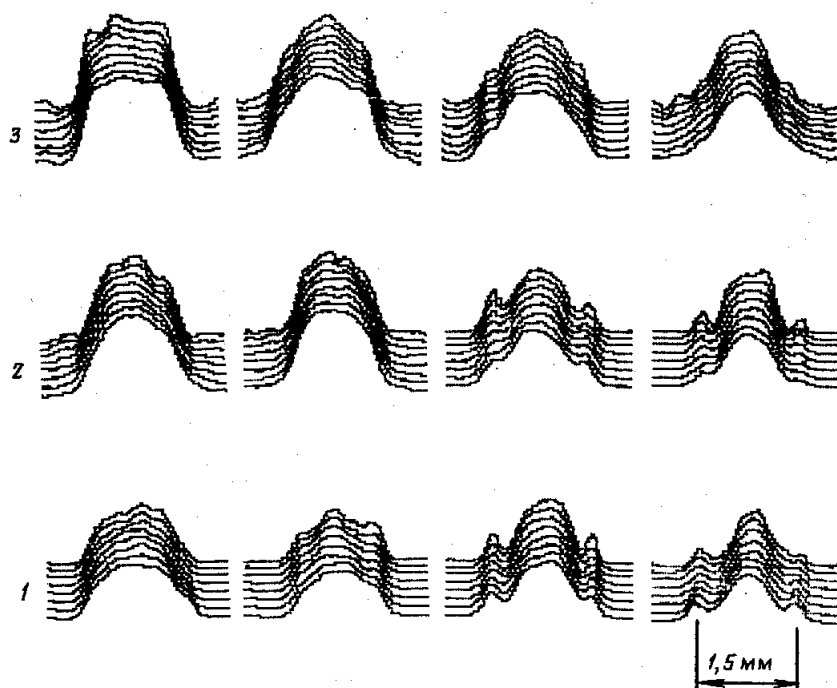
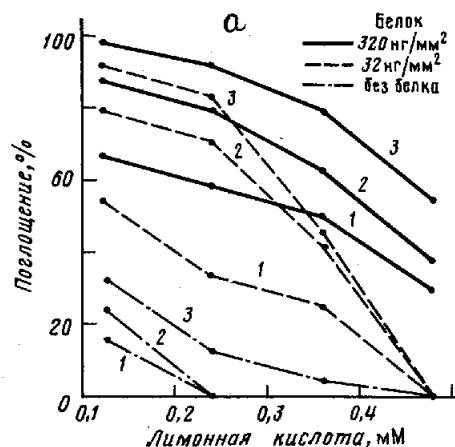
Отсюда концентрация свободных ионов серебра, описываемая правой ветвью кривых титрования, будет выражаться следующим уравнением:

$$[\text{Ag}^+] = \frac{K_n}{(n-2)^2[\text{Ag}^+]_0}. \quad (2)$$

Логарифмируя формулу (2), получим выражение:

$$\lg [\text{Ag}^+] = \lg K_n - 2 \lg (n-2) - \lg [\text{Ag}^+]_0. \quad (3)$$

Рис. 2. Влияние концентраций лимонной кислоты и NaOH на интенсивность проявления белка в гелях серебром. Образцы инкубировали 1 ч в растворах: 3,0 мМ AgNO_3 , 12 мМ CH_3NH_2 , с разной концентрацией NaOH, затем промывали 20 мин в воде и проявляли 30 мин в растворе с различной концентрацией лимонной кислоты в присутствии 12,4 мМ формальдегида. а – концентрация NaOH в растворе комплекса метиламина с серебром: 1 – без NaOH, 2 – 1,2 мМ, 3 – 2,4 мМ (а, б); б – результаты сканирования поперечного среза проявленных образцов с концентрацией белка 320 нг/мм². В центре – пик оптической плотности коллоидного серебра, по бокам – пики краевого эффекта. Номера рядов по вертикали соответствуют номерам, обозначающим концентрацию NaOH на графике. Последовательность колонок по горизонтали соответствует последовательности значений концентрации лимонной кислоты на графике



6

Из формулы (2) видно, что при неизменной начальной концентрации ионов серебра концентрация свободных ионов серебра в растворе будет уменьшаться в обратной квадратичной зависимости от величины $n-2$. При этом, как следует из рис. 3, правая часть кривой титрования аммиаком опускается заметно ниже, чем соответствующая часть кривой титрования метиламином. Различие $\lg[\text{Ag}^+]$ в правых ветвях кривых достигает значения 0,7, что соответствует примерно 5-кратному различию в концентрациях Ag^+ . Очевидно, что низкие концентрации Ag^+ на пологом участке кривой титрования аммиаком препятствуют осаждению серебра

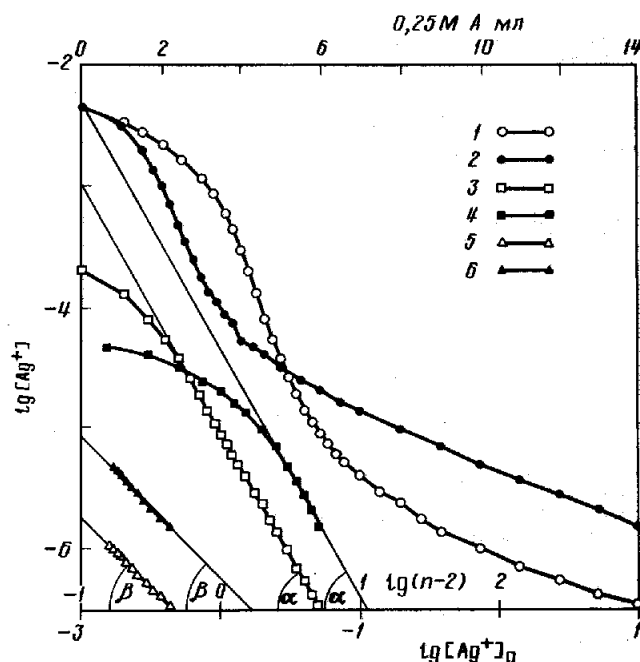


Рис. 3. Кривые титрования 100 мл 5 мМ AgNO_3 0,25 М растворами А (NH_3 (1) и CH_3NH_2 (2)). $\lg [\text{Ag}^+]$ как функция $\lg (n-2)$ для правых ветвей кривых титрования растворами NH_3 (3) ($\lg K_n = -7,35$; $\lg \alpha = 2$) и CH_3NH_2 (4) ($\lg K_n = -6,6$; $\lg \alpha = 2$), построенная в соответствии с выражением (3). $\lg [\text{Ag}^+]$ как функция $\lg [\text{Ag}^+]_0$, полученная в результате разбавления растворов AgNO_3 после титрования растворами NH_3 (5) ($\lg K_n = -7,4$; $\lg \beta = 1$) и CH_3NH_2 (6). ($\lg K_n = -6,7$; $\lg \beta = 1$) при сохранении неизменным значения n . Константы нестойкости для аммиачного комплекса серебра и комплекса серебра с метиламином найдены двумя независимыми способами на основании данных из соответствующих графиков по формуле $\lg K_n = \lg [\text{Ag}^+] + 2\lg (n-2) + \lg [\text{Ag}^+]_0$, полученной преобразованием выражения (3)

в геле. В то же время на крутых участках, где концентрация Ag^+ достаточно велика для успешного протекания этого процесса, окраска серебром не будет достаточно воспроизводимой из-за сильной зависимости концентрации Ag^+ от случайных колебаний концентраций аммиака, вызванных, например, его летучестью. В этом смысле комплекс метиламина с серебром имеет существенные преимущества, поскольку сохраняет свои проявляющие свойства на пологом участке кривой титрования.

Более высокой концентрацией свободных Ag^+ в растворе следует объяснить и наблюдавшееся Маршаллом и Латнером [5] более глубокое проявление белков при использовании комплекса серебра с метиламином по сравнению с аммиачным комплексом и комплексами с другими органическими аминами.

Различие концентраций Ag^+ на пологом участке кривых титрования аммиаком и метиламином обусловлено существенно большей прочностью аммиачного комплекса серебра по сравнению с комплексом серебра с метиламином. Логарифмы констант нестойкости этих комплексов могут быть вычислены в соответствии с выражением (3), исходя из прямых участков зависимостей $\lg [\text{Ag}^+]$ от $\lg (n-2)$ при неизменных значениях $[\text{Ag}^+]_0$, полученных из кривых титрования, и зависимостей $\lg [\text{Ag}^+]$ от $\lg [\text{Ag}^+]_0$ при неизменных значениях n , полученных в результате разбавления комплекса (см. рис. 3). Найденные таким образом значения $\lg K_n$ для аммиачного комплекса составляют $-7,35$ и $-7,4$, а для комплекса с метиламином $-6,6$ и $-6,7$. Для $\lg K_n$ аммиачного комплекса в

литературе [1] приводятся три значения: $-7,7$ при 0° , $7,2$ при 25° и $6,2$ при 52° . Если учесть, что экспериментальные данные были получены нами при 17° , значения вычисленных из них констант закономерно укладываются в приводимый ряд. Из рассмотрения этого ряда также вытекает, что K_n аммиачного комплекса серебра сильно зависит от температуры, так что, например, изменения температуры от 17 до 52° вызывают изменение K_n в 10 раз и соответственно изменение концентрации Ag^+ в растворе при избытке аммиака также в 10 раз. Отсюда следует, с одной стороны, что изменением температурных условий можно перекрыть различие в концентрациях Ag^+ в растворах аммиачного комплекса серебра и комплекса с метиламином на пологом участке кривых титрования, а с другой — что для получения воспроизводимых результатов необходимо тщательно контролировать стабильность температурных условий проявления.

На кривой титрования аммиаком точка перегиба соответствует строению аммиачного комплекса серебра, содержащего две молекулы аммиака на один атом серебра. В то же время на кривой титрования метиламином точка перегиба, скорее соответствует эквимолярному отношению метиламина и серебра, что на первый взгляд свидетельствует о включении лишь одной молекулы метиламина в комплекс. Однако это отличие в положении точки перегиба при титровании метиламином объясняется другой причиной. Особенностью метиламина являются его более выраженные щелочные свойства ($\text{p}K_a$ 10,6) по сравнению с аммиаком ($\text{p}K_a$ 9,25). Это приводит к тому, что при титровании метиламином образованию $\text{Ag}(\text{CH}_3\text{NH}_2)_2^+$ предшествует образование AgOH , о чем свидетельствует выпадение мощного осадка Ag_2O . На кривой титрования это проявляется в том, что точка перегиба соответствует эквимолярному количеству титруемых ионов серебра. Напротив, в случае титрования аммиаком стадия образования AgOH на кривой не просматривается, а точка эквивалентности соответствует образованию непосредственно комплекса $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2$. Доказательством того, что, несмотря на различие в протекании реакций, в обоих случаях в конечном счете образуется двойной комплекс с серебром, является параллельность начальных участков зависимостей $\lg [\text{Ag}^+]$ от $\lg (n-2)$ на рис. 3 и равенство тангенса угла их наклона α двум. Последнее, согласно выражению (3), указывает на присутствие в комплексе двух молекул аммиака или метиламина. Контролем может служить параллельность прямых, отражающих изменение $\lg [\text{Ag}^+]$ при разбавлении комплексов, и равенство тангенса угла их наклона β единице, что также следует из уравнения (3).

Более выраженные щелочные свойства метиламина позволяют использовать комплекс метиламина с серебром для проявления щелочных и нейтральных белков в геле без добавления NaOH . Исключение дополнительного компонента упрощает процедуру проявления и увеличивает воспроизводимость процесса.

При проявлении по первой схеме начальную стадию обработки гелей и стадию обработки раствором лимонной кислоты и формальдегида разделяют споласкиванием гелей в дистиллированной воде. При этом споласкивание рекомендуют проводить как можно быстрее (реально процедура занимает от 30 с до 1 мин). Мы нашли, что равновесие как в отношении $[\text{Ag}^+]$, так и pH между водой и гелем устанавливается за 5–8 мин инкубации (см. рис. 4). Следовательно, небольшие ошибки в определении времени споласкивания в течение первых 2–3 мин должны приводить к значительным отклонениям в концентрациях растворов в гелях.

Рекомендации сокращать время споласкивания до минимального вызваны, вероятно, стремлением предотвратить потери содержащегося в

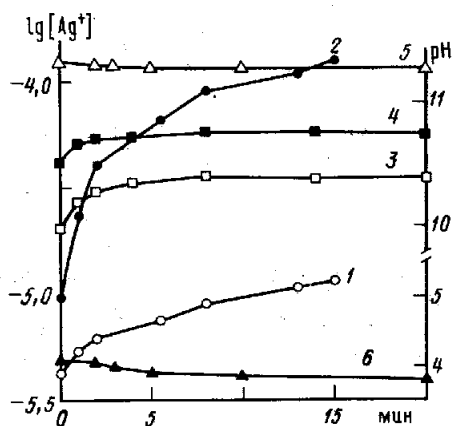


Рис. 4. Кинетика установления равновесных pH и концентрации Ag^+ между гелем и растворами на разных стадиях проявления серебра. Кривые с треугольными метками (5, 6) относятся к стадии обработки гелей раствором комплекса серебра с метиламином, с квадратными (3, 4) — к стадии промывки гелей водой, с кружками (1, 2) — к стадии проявления раствором формальдегида с лимонной кислотой. Метки значений $\lg(\text{Ag}^+)$ затемнены. Метки значений pH не затемнены. Условия обработки приведены в разделе «Методика проявления с метиламином»

гелях серебра. Действительно, общие потери серебра неизбежны. Однако, как показывает опыт (см. рис. 4), при равновесных промывках гелей, прошедших первую стадию обработки, концентрация свободных Ag^+ в растворе не только не уменьшается, но, наоборот, значительно возрастает. Этот на первый взгляд парадоксальный факт непосредственно следует из уравнения (2), согласно которому уменьшение начальной концентрации ионов серебра при сохранении значения n постоянным (т. е. при разбавлении раствора), концентрация свободных Ag^+ будет увеличиваться обратно пропорционально этому уменьшению. Особенно наглядно факт увеличения концентрации Ag^+ при разбавлении аминных комплексов серебра демонстрируется на экспериментальных зависимостях $\lg[\text{Ag}^+]$ от $\lg[\text{Ag}^+]_0$ (см. рис. 3). В полном соответствии с уравнением (3) эти зависимости как для аммиачного комплекса серебра, так и для комплекса с метиламином описываются прямыми с отрицательным тангенсом угла наклона β . Исходя из этих фактов можно сделать вывод, что увеличение времени споласкивания геля до установления равновесия между раствором и гелем не только стабилизирует процесс проявления, но и интенсифицирует его за счет увеличения концентрации свободных Ag^+ в растворе. Последнее наглядно подтверждается в опытах по увеличению продолжительности стадии промывки.

Следует также отметить, что для сохранения отношения между содержанием щелочи в геле и кислоты в растворе на стадии проявления соотношение объема геля и объема воды на стадии промывки должно сохраняться строго постоянным.

Механизм проявления по второй схеме. Проявление по второй схеме очень напоминает реакцию синтеза медицинского препарата колларгола [2], который получают выдерживанием раствора белка и AgNO_3 в присутствии NaOH . В результате образуется растворимое коллоидное серебро, которое в зависимости от условий приготовления имеет различные оттенки — от желтого и оранжевого до глубокого синего. Аналогичным образом, по-видимому, на белке в геле образуются частички коллоидного серебра, которые затем в процессе восстановления Ag^+ формальдегидом подрастают до размеров, способных интенсивно поглощать свет.

Однако остается неясным, как этот процесс в условиях щелочной среды удерживается внутри геля, не выходя на границу раздела фаз гель — раствор. Безусловно, этому способствует градиент концентраций Ag^+ между гелем и щелочным раствором, который поддерживается благодаря осаждению Ag_2O в геле сразу после его контакта с раствором NaOH . Образующийся осадок бывает заметен в первые минуты обработки геля. Однако, на наш взгляд, этого недостаточно. Решение, скорее,

следует искать в гидролизе амидной группы полиакриламида при его обработке раствором NaOH. Этот гидролиз легко наблюдать по появлению характерного запаха аммиака или интенсивному окрашиванию реактива Несслера при добавлении небольших количеств щелочи к кусочкам ПААГ. Образование аммиака при обработке гелей щелочью позволяет интерпретировать процессы, протекающие при окраске белков серебром по второй схеме, следующим образом. Выделяющийся аммиак в результате образования комплекса $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ растворяет выпавший в геле осадок Ag_2O . Если раствор NaOH содержит формальдегид, то последний усиливает образование затравочных микрочастиц серебра в геле. Замена раствора NaOH раствором соды должна резко замедлять гидролиз ПААГ в результате понижения pH среды и тем самым предотвращать подавление образования частиц серебра избытком аммиака. При этом восстанавливаемое формальдегидом серебро продолжает осаждаться на предобразованных ранее затравках. Процесс подращивания инициированных белком в присутствии NaOH частиц коллоидного серебра легко моделируется в пробирке (см. раздел «Методы исследования»).

Дополнительным подтверждением такого механизма проявления служит факт уменьшения толщины слоя восстановленного серебра в геле, вплоть до полного подавления проявления, при увеличении времени экспозиции геля в 0,75 н. NaOH [13]. Это может быть объяснено избыточным выделением аммиака. Нетрудно видеть, что наблюдаемый эффект имеет ту же природу, что и описанный выше эффект уменьшения слоя серебра при увеличении концентрации кислоты в проявляющем растворе. Отличие состоит лишь в том, что растворяющим фактором в данном случае служит не кислота, а аммиак, который образует с серебром прочный комплекс. Растворимость мелкодисперсного серебра в аммиаке была описана еще в прошлом веке [3].

Недостатком окраски серебром по второй схеме является образование в геле интенсивного желтого фона, который, по-видимому, связан с появлением большого количества карбоксильных групп при гидролизе ПААГ щелочью. Это подтверждается усилением желтого фона при добавлении в гель перед полимеризацией акриловой кислоты.

Кинетическое уравнение осаждения Ag на белках. Кинетика осаждения серебра на белках может быть описана, исходя из следующих соображений. Мы принимаем, что скорость накопления металлического серебра dM/dt в единичном участке геля пропорциональна концентрации свободных ионов серебра, концентрации восстановителя, а также суммарной поверхности микрочастиц серебра в этом участке:

$$dM/dt = k[\text{Ag}^+]rS,$$

где M — концентрация металлического серебра в геле, t — время, k — константа скорости, зависящая от температуры, $[\text{Ag}^+]$ — концентрация ионов серебра, r — концентрация восстановителя, S — суммарная поверхность микрочастиц серебра.

Допуская, что в процессе роста линейные размеры микрочастиц изменяются пропорционально, для их суммарной поверхности можем записать:

$$S = gNm^{2/3},$$

где g — константа, зависящая от плотности серебра и формы частиц; N — количество микрочастиц в единичном участке геля, m — средняя масса одной микрочастицы. Учитывая, что $m = M/N$, находим

$$S = gN^{1/3}M^{2/3}$$

и

$$dM/dt = kgr[\text{Ag}^+]N^{1/3}M^{2/3} \quad (4)$$

Очевидно, что скорость диффузии ионов серебра к месту реакции в пластине геля можно выразить следующим уравнением:

$$d[Ag^+]/dt = k_d([Ag^+]_p - [Ag^+]), \quad (5)$$

где k_d — коэффициент, зависящий от толщины и плотности геля, концентрации сшивающего агента, температуры и др., $[Ag^+]_p$ — концентрация ионов серебра в растворе, омывающем пластину геля.

Исходя из того, что при избытке восстановителя в стационарных условиях скорость диффузии ионов серебра равна скорости его осаждения, запишем

$$dM/dt = d[Ag^+]/dt. \quad (6)$$

Решая уравнения (4)–(6) как систему относительно M и t при начальных условиях $t=0$, $M=0$, находим:

$$M = \frac{k_d kgr [Ag^+]_p N^{1/3} t}{kgr N^{1/3} + 3k_d/M^{2/3}}. \quad (7)$$

Анализируя эту формулу, находим выражения для двух предельных случаев.

Первый соответствует ситуации

$$kgr N^{1/3} \ll 3k_d/M^{2/3},$$

т. е. низким концентрациям белка в геле или начальному этапу реакции, когда количество осажденного серебра мало и величина k_d не лимитирует подвод Ag^+ к растущим микрочастицам. Пренебрегая членом $kgr N^{1/3}$ в формуле (7), получаем:

$$M = (1/3 kgr [Ag^+]_p t)^3 N. \quad (8)$$

Кубическая зависимость количества осаждаемого серебра от константы скорости k , концентрации восстановителя r , концентрации серебра $[Ag^+]$ и времени t объясняет высокую чувствительность реакции соответственно к изменению температуры, предобработкам гелей альдегидами [9, 15] и изменению концентрации восстановителя [11], к понижению концентрации свободных Ag^+ в результате повышения концентрации аммиака в исходном растворе и большой лаг-период (до 15 мин и больше), предшествующий появлению визуально наблюдаемой окраски белков серебром. В то же время линейная зависимость количества осаждаемого серебра от числа затравочных частиц коллоидного серебра N отражает установленную рядом авторов [4, 6, 7] линейную зависимость оптической плотности окрашенных серебром белковых пятен от концентрации в них белка.

Второй случай соответствует ситуации

$$kgr N^{1/3} \gg 3k_d/M^{2/3},$$

т. е. высокой концентрации белка в геле, или конечному этапу реакции, когда количество осаждаемого серебра велико и величина k_d лимитирует подвод Ag^+ к растущим микрочастицам. Пренебрегая членом $3k_d/M^{2/3}$ в формуле (7), получим:

$$M = k_d [Ag^+]_p t. \quad (9)$$

Таким образом, осаждение в геле серебра на конечных этапах реакции приобретает линейную зависимость от k_d , концентрации Ag^+ в растворе и времени и не зависит от N . Это значит, что на тех участках геля, где значение N и величина микрочастиц серебра велики, скорость их роста ограничивается скоростью диффузии Ag^+ к микрочастицам. Это в полной мере объясняет тот факт, что при больших концентрациях белка линейная зависимость количества осажденного серебра от концентрации белка переходит

в плато [4, 6]. При этом участки геля с высоким значением N снижают концентрацию Ag^+ в прилежащих участках с минимальным значением N , замедляя тем самым рост микрочастиц в них в соответствии с формулой (8). Следствием этого является эффект контрастирования пятен белка при проявлении серебром.

Особенно наглядно эффект контрастирования проявляется в образовании небольших светлых пятен на затемненном фоне в плоских гелях. Эти пятна образуются за счет присутствия в их центральной части пылинки, осаждающих на своей поверхности много металлического серебра. Это приводит к резкому понижению концентрации Ag^+ вокруг пылинки и как следствие — к замедлению роста микрочастиц в зоне пятна.

В том случае, когда микрочастицы по всей площади геля достигают достаточного больших размеров, формула (9) описывает образование в геле равномерного фона, который при своем развитии приводит к полному затемнению ранее проявившихся пятен белка. Ввиду того что k_d зависит от толщины и плотности геля, от концентрации сшивающего агента и температуры, интенсивность окрашивания пятен белка и образование фона также зависят от этих параметров. В частности, уменьшение интенсивности окрашивания белков при увеличении плотности в градиентном геле было отмечено Геварой с сотр. [4]. Увеличением плотности геля и, следовательно, уменьшением k_d , может быть объяснено обнаруженное Раем [15] замедление скорости окрашивания белков и образования фона при добавлении к проявляющему раствору этилового спирта, обработка которым, как известно, приводит к сокращению линейных размеров геля. На существенное увеличение интенсивности окраски фона и пятен при незначительном повышении температуры проявляющего раствора указывает Сэмонс [13].

Исходная формула (7) выведена для случая избытка восстановителя. Однако нетрудно показать, что если лимитирующим компонентом будет восстановитель, то эта формула изменится незначительно: лишь в знаменателе r окажется замещенным на $[Ag^+]_p$. В результате предельная формула (8) не претерпит изменений, а в другой предельной формуле (9) $[Ag^+]_p$ окажется замещенным на r , т. е. почти все из рассмотренных выше закономерностей сохраняют свою силу.

Тот факт, что при выводе формулы (7) не учитывалось изменение концентрации Ag^+ в геле в результате диффузии серебра в раствор и закисления геля, по-видимому, не имеет существенного значения. Действительно, как следует из рис. 4, равновесное значение $lg [Ag^+]$ в результате диффузии не только не опускается ниже своего исходного уровня на поверхности геля, определяемого уровнем значения $lg [Ag^+]$ после промывки водой, но даже превосходит его. И поэтому, несмотря на уменьшение поступления Ag^+ для реакции из буферных соединений в виде гидроокиси или комплексов с аминами, увеличение концентрации свободного Ag^+ в результате разрушения этого комплекса в кислой среде в значительной степени компенсирует потерю.

В заключение следует обратить внимание на два дополнительных фактора, которые могут оказывать влияние на воспроизводимость окраски серебром.

Мы заметили, что продолжительное выдерживание геля в 50%-ном этаноле (до двух недель и более) увеличивает контрастность окраски. Сходный эффект получается, если отмывать гели в течение суток в нагретом 50%-ном этаноле. Наблюдаемые изменения могут предположительно иметь две причины, которые отмечаются также в литературе: отмывание с белков додецилсульфата натрия [4, 10] и модификация белков имеющимися в спирте примесями альдегида [15].

Другой замеченный нами, а также известный из литературы фактор, который может оказывать значительное влияние на воспроизводимость

проявления серебром, это освещенность [6]. Поэтому для воспроизводимости проявления необходимо контролировать стабильность освещенности рабочего места.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аналитическая химия элементов. Серебро. М.: Наука, 1975. 263 с.
2. Мелентьева Г. А. Фармацевтическая химия. М.: Медицина, 1968. 769 с.
3. Менделеев Д. И. Основы химии. М.: ГНТИХИ, 1946. С. 644.
4. Guevara J. Jr., Johnston D. A., Martin B. A. // Electrophoresis. 1982. V. 3. P. 197-205.
5. Marshall T., Latner A. L. // Electrophoresis. 1981. V. 2. P. 228-235.
6. Merril C. R., Goldman D., Van Keuren M. L. // Electrophoresis. 1982. V. 3. P. 17-23.
7. Merril C. R., Goldman D. // Detection of Polypeptides in Two-Dimensional Gels Using Silver Staining: Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins/Eds Celis J. E., Bravo R. N. Y.; L.: Acad. Press, 1984. P. 93-109.
8. Nielson B. L., Brown L. R. // Analyt. Biochem. 1984. V. 141. P. 311-315.
9. Oakley B. R., Kirsh D. R., Morris N. R. // Anal. Biochem. 1980. V. 105. P. 361-363.
10. Ohsawa K., Ebata N. // Analyt. Biochem. 1983. V. 135. P. 409-415.
11. Poehling H.-M., Neuhoff V. // Electrophoresis. 1981. V. 2. P. 141-147.
12. Sammons D. W., Adams D., Nishizawa E. E. // Electrophoresis. 1981. V. 2. P. 135-141.
13. Sammons D. W. // Applicability of Color Silver Stain (GELCODE System) to Protein Mapping with Two-Dimensional Gel Electrophoresis: Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins/Eds Celis J. E., Bravo R. N. Y.; L.: Acad. Press, 1984. P. 111-126.
14. Switzer R. C. III, Merril C. R., Shifrin S. // Analyt. Biochem. 1979. V. 98. P. 231-237.
15. Wray W. // Analyt. Biochem. 1981. V. 118. P. 197-203.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию
04.04.91

A. G. MALYGIN, N. I. DOROKHINA, I. N. GANTSEVA

THE MECHANISM OF PROTEIN DETECTION WITH SILVER IN POLYACRYLAMIDE GEL

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Key words: detection, protein, staining, silver, polyacrylamide gel.

The mechanisms whereby silver ions penetrate into the gel and metallic silver precipitates on the protein have been studied. The parameters critical for silver staining for the proteins in polyacrylamide gel have been established. A simple procedure for the development of gels with the use of a soluble methylamine-silver complex has been designed. Analysis of kinetic equations for the rate of metallic silver precipitation in the gel both under conditions of limitation of the reaction component diffusion rate and in the absence of this limitation has been carried out.