

УДК 577.088

УГЛЕКИСЛЫЙ ГАЗ ВОЗДУХА ПОДАВЛЯЕТ ПРОЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ СЕРЕБРОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

© 2002 г. А. Г. Малыгин, Д. О. Султанова

Представлено академиком А.С. Стириным 18.04.2002 г.

Поступило 24.04.2002 г.

Окраска коллоидами металлического серебра широко используется для проявления белковых зон, получаемых электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ). В связи с тем, что электрофорез белков в ПААГ является центральным методом нового направления в биологии – протеомики, метод проявления белков серебром благодаря высокой чувствительности становится особенно актуальным. Однако в известных модификациях этот метод имеет существенный недостаток – он плохо воспроизводим. Это связано с тем, что процесс, инициирующий осаждение металлического серебра белками, до сих пор недостаточно изучен, чтобы контролировать все существенные для его протекания параметры [1]. В то же время воспроизводимость проявления белков является обязательным условием для однозначной количественной оценки их концентраций при изучении физиологических и метаболических процессов. В связи с этим нами был предпринят целенаправленный поиск неконтролируемых параметров, влияющих на процесс проявления серебром.

Обычно методики проявления белков в ПААГ серебром включают процедуры пропитки гелей раствором комплекса серебра с амином в присутствии едкого натра и проявления раствором, содержащим низкие концентрации формальдегида и лимонной кислоты. В большинстве методик проявления серебром используется комплекс серебра с аммиаком $[Ag(NH_3)_2]^+$ [2–4].

Чтобы сравнить воспроизводимость результатов проявления одинаковых полосок гелей, процесс проявления мы проводили параллельно в четырех стеклянных кюветах: в двух кюветах осуществляли опыт с измененными условиями проявления, а две другие служили контролем. Полоски гелей размером $150 \times 9 \times 1.5$ мм получали разрезанием пластины ПААГ, в которой предварительно был осуществлен электрофорез белков

20 мкл сыворотки крови человека по всей ширине пластины в соответствии со стандартной методикой Лемли [5] (в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия при концентрации ПААГ в пластине 10%). Перед разрезанием на полоски пластину фиксировали в течение суток в 50%-ном этаноле.

Первоначально одной из причин плохой воспроизводимости проявления серебром предполагалась летучесть аммиака, затрудняющая контроль концентрации комплекса $[Ag(NH_3)_2]^+$ в растворе. Поэтому аммиак был заменен на его нелетучий аналог – этаноламин. Эта замена, хотя и не привела к улучшению метода, однако заведомо исключила одну из возможных причин плохой воспроизводимости процесса. После промывки полосок геля в течение 30 мин в бидистиллированной воде процедура проявления включала: 1) стадию пропитки геля в течение часа раствором 3 мМ $AgNO_3$, 24 мМ этаноламина, 2.4 мМ NaOH; 2) стадию отмычки бидистиллированной водой – 20 мин; 3) стадию проявления раствором 72 мМ формальдегида и 0.17 мМ лимонной кислоты – около 10 мин. Объем растворов на всех стадиях составлял 25 мл.

При исследовании воздействия света на проявление нами неожиданно было обнаружено, что уменьшение контакта с воздухом растворов в результате экранирования кювет от света приводит к увеличению интенсивности окраски гелей после проявления по сравнению с кюветами, свободно контактирующими с окружающим воздухом. Опыт был многократно повторен при изоляции кювет от окружающего воздуха посредством стеклянных пластин, и полученный ранее результат повторялся со 100% воспроизводимостью (рис. 1).

Чтобы выяснить, на какой из трех стадий методики контакт с воздухом приводит к ослаблению интенсивности окраски гелей, были поставлены опыты, в которых кюветы экспонировались открытыми только на изучаемой стадии проявления, в то время как на других стадиях они закрывались стеклянными пластинами. При этом

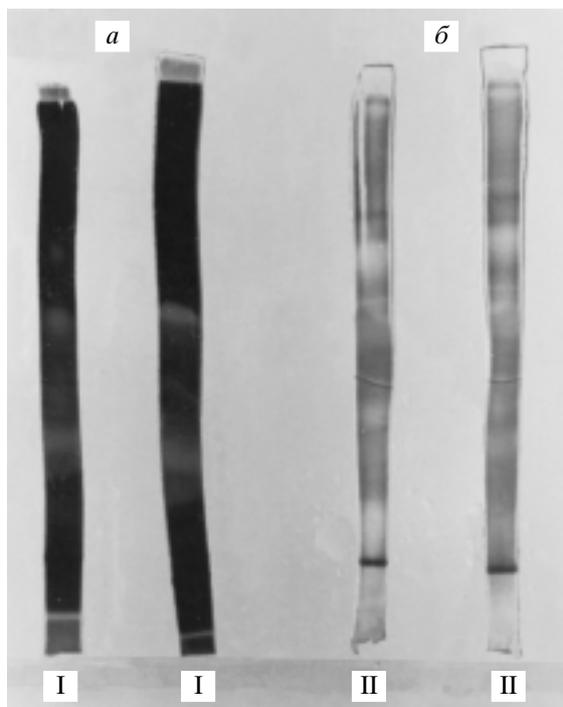


Рис. 1. Результаты проявления белков сыворотки крови в полосках ПААГ с использованием комплекса серебра с этаноламином: в кюветах, прикрытых стеклянными пластинами (а); в открытых кюветах (б).

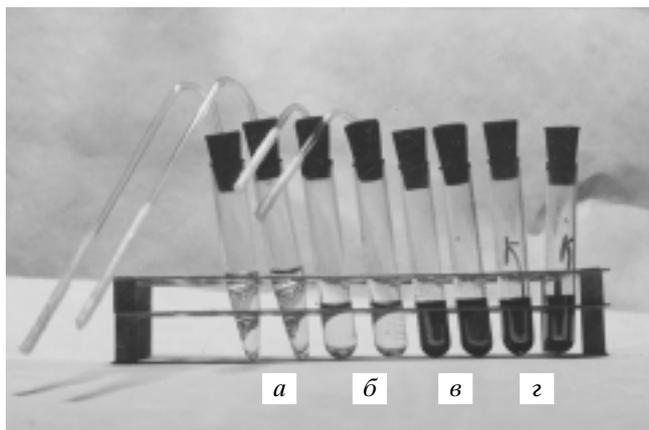


Рис. 2. Образование зеркального слоя на внутренней поверхности стеклянных пробирок из 0.1 М раствора комплекса серебра с этаноламином через сутки инкубации при комнатной температуре: подавление осаждения серебра в результате диффузии CO_2 в пробирки из капилляров объемом 120 мкл (а) и 60 мкл (б); осаждение серебра в пробирках, заполненных кислородом, очищенным от CO_2 (в); осаждение серебра в контрольных пробирках, заполненных атмосферным воздухом (г).

контрольные кюветы на всех стадиях оставались закрытыми. В результате удалось установить, что наиболее чувствительной к подавлению осаждения серебра в гелях в результате контакта

с воздухом была первая стадия – насыщение гелей комплексом серебра с этаноламином. Чувствительность второй стадии – промывание водой – выражалась лишь в некоторой задержке проявления на последней стадии, при выравнивании окраски в конце проявления. Контакт с воздухом на третьей стадии – проявление раствором формальдегида и лимонной кислоты – никак не сказывался ни на ходе проявления, ни на конечном результате. Аналогичные опыты были также проведены при использовании аммиака вместо этаноламина. Ввиду более высокой константы связывания с серебром аммиак в пропитывающем растворе использовался в более низкой концентрации, чем этаноламин – 9 мкМ. При проявлении с аммиаком наблюдались те же эффекты, что и с этаноламином.

На основании полученных результатов было сделано предположение, что контакт с воздухом на первой стадии препятствует образованию невидимых центров инициации осаждения серебра, а на второй стадии уменьшает их размеры, замедляя тем самым процесс проявления на последней стадии.

Необходимо было выяснить, какой из двух активных компонентов воздуха – кислород или углекислый газ – приводит к подавлению образования центров инициации на первой стадии методики проявления. Для этого воспользовались обнаруженным нами эффектом подавления воздухом образования серебряного зеркала на стенках стеклянных пробирок, содержащих по 1 мл 0.1 М раствора комплекса ионов серебра с этаноламином. Эффект наблюдался в открытых пробирках и отсутствовал в пробирках, закрытых парафином. На стенках последних выпадал плотный слой металлического серебра через сутки инкубации при комнатной температуре. Очевидно, что наблюдаемый эффект был аналогичен подавлению осаждения серебра в гелях и отличался лишь тем, что центры инициации возникали на стеклянных стенках, а восстановителем служил не формальдегид, а сам этаноламин.

Тот факт, что мембрана из парафила не втягивалась в пробирку в процессе инкубации раствора комплекса серебра с этаноламином, свидетельствовал в пользу участия в реакции углекислого газа (содержание в атмосфере 0.03%), а не кислорода (содержание в атмосфере 21%).

Чтобы подтвердить этот вывод и оценить количество углекислого газа, необходимое для подавления образования серебряного зеркала, в две пробирки вводили по 120 мкл углекислого газа (рис. 2а), а в другие две – по 60 мкл (рис. 2б) при помощи капилляров, заполненных углекислым газом. Капилляры были закрыты парафином с внешнего конца и вставлены другим концом в резиновые пробки. Еще две пробирки с раствором

заполнялись очищенным от углекислого газа при помощи гидроксида калия кислородом (рис. 2в). И, наконец, две заполненные воздухом пробирки служили контролем (рис. 2г). В первом случае наблюдалось полное подавление образования серебряного зеркала на стенках пробирок; во втором на стенках отмечался едва заметный налет серебра (на рисунке не виден). Причем при пересчете оказалось, что количество мкмоль углекислого газа, диффундировавшего из капилляра в пробирку во втором случае (60 мкл), в 40 раз меньше количества мкмоль комплекса серебра с этаноламином и в 27 раз больше количества мкмоль углекислого газа, содержавшегося в воздухе в объеме пробирки. Столь большое молярное отношение между комплексом серебра с этаноламином и углекислым газом, способным подавить осаждение серебра на стенках пробирок, подтверждает вывод о том, что углекислый газ подавляет не процесс осаждения серебра, а препятствует образованию центров инициации, необходимых для его осаждения. С другой стороны, признаков подавления образования серебряного зеркала в пробирках с кислородом не наблюдалось.

Чтобы выяснить, не участвует ли углекислый газ в подавлении образования центров инициации в виде карбонат-иона, в пробирки с 1 мл 0.1 М раствора комплекса серебра с этаноламином вносили 60, 120 и 240 мкл 0.5 М гидрокарбоната натрия. Оказалось, что только в случае добавления 240 мкл гидрокарбоната натрия наблюдалось подавление осаждения серебра на стенках пробирок. Это количество гидрокарбоната в 1.2 раза превышало эквимольное количество по отношению к комплексу серебра с этаноламином. При аналогичных концентрациях карбонат натрия не препятствовал образованию серебряного зеркала на стенках пробирок. Полученные ре-

зультаты свидетельствуют о том, что углекислый газ подавляет реакцию образования центров инициации в виде CO_2 , а не в виде карбонат-иона. Это согласуется с теми известными из литературы данными, что карбонат натрия успешно используется вместо щелочей в некоторых методиках проявления белков в ПААГ серебром [6, 7], а примеси карбоната калия существенно не влияют на результаты в технологии производства зеркал [8].

Как известно, концентрация CO_2 в результате жизнедеятельности человека в закрытом помещении может изменяться на два порядка (от 0.03 до 3%). Учитывая этот факт, а также зависимость эффекта подавления центров инициации осаждения серебра от концентрации углекислого газа, можно сделать вывод, что колебания концентрации углекислого газа в воздухе являются главным неконтролируемым параметром, влияющим на воспроизводимость проявления белков серебром в ПААГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малыгин А.Г., Дорохина Н.И., Ганцера И.Н. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 517–530.
2. Oakley B., Kirsh D.R., Morris D. // *Analyt. Biochem.* 1980. V. 105. P. 361–363.
3. Poehling H.-M., Neuhoff V. // *Electrophoresis.* 1981. V. 2. P. 141–147.
4. Wray W. // *Analyt. Biochem.* 1981. V. 118. P. 197–203.
5. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
6. Merril C.R., Goldman D., Van Keuren M. // *Electrophoresis.* 1982. V. 3. P. 17–23.
7. Sammons D.W., Adams L.D., Nishizawa E.E. // *Electrophoresis.* 1981. V. 2. P. 135–141.
8. Винокуров В.М. Химические методы серебрения зеркал. М., 1950. 120 с.