



УДК 577.088

ДИОКСИД УГЛЕРОДА ВОЗДУХА ПОДАВЛЯЕТ ИНИЦИИРУЕМОЕ БЕЛКАМИ ОБРАЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ И В РАСТВОРЕ

© 2008 г. А. Г. Малыгин[#], В. Д. Пономарева*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33*

Поступила в редакцию 24.07.2007 г. Принята к печати 01.04.2008 г.

Показано, что проявление белков в полиакриламидном геле серебром подавляется при свободном контакте с воздухом раствора комплекса ионов серебра с аммиаком, используемого на первой стадии проявления. В опытах по восстановлению ионов серебра этаноламином из комплекса с этаноламином, а также в опытах по восстановлению ионов серебра формальдегидом из комплекса с аммиаком доказано, что инициируемое белками образование наночастиц серебра тормозится содержащимся в воздухе диоксидом углерода. Обсуждается вопрос о форме участия диоксида углерода в этом процессе. Установлено, что даже дыхание экспериментатора может вызывать колебания концентрации диоксида углерода, достаточные для отрицательного влияния на воспроизводимость методик окрашивания серебром. Сделан вывод, что для устойчивых результатов проявления белков серебром в полиакриламидном геле следует поддерживать низкую концентрацию диоксида углерода в воздухе над проявляющими растворами.

Ключевые слова: серебро, проявление, коллоиды, белки, полиакриламидный гель, диоксид углерода, наночастицы.

ВВЕДЕНИЕ

Заемствованные из гистохимии методики окраски биологических препаратов серебром широко используются для проявления белковых зон, получаемых методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). В связи с тем, что электрофорез белков в ПААГ является центральным методом протеомных исследований [1], использование методик проявления белков серебром становится особенно актуальным. Преимущество проявления серебром состоит в его высокой чувствительности, сравнимой с чувствительностью методик, использующих радиоактивную метку. Однако проявление серебром имеет один существенный недостаток. Оно не всегда воспроизводимо, что заметно сдерживает его применение.

Нестабильность результатов проявления серебром связана с тем, что не выявлены все существенные параметры, влияющие на реакцию образования наночастиц серебра, которые необходимо контролировать для устойчивого протекания процесса [2]. В то же время воспроизводимость проявления белков является обязательным условием для однозначной оценки их количества при детальном изучении физиологических и метаболических процессов. В методиках проявления белков серебром обычно используют комплексное соединение ионов серебра с аммиаком ($[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$) [3–5]. Для

того чтобы исключить колебания концентрации аммиака в системе (связанные с его летучестью) в качестве возможной причины недостаточной воспроизводимости результатов, в предыдущем исследовании [6] аммиак в комплексе $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ был заменен нами на этаноламин. Дополнительным следствием этой замены было то, что этаноламин выступал не только в роли комплексообразователя, но и в качестве восстановителя, что существенно упрощало систему.

Предполагалось, что при использовании комплекса ионов серебра с нелетучим этаноламином основной причиной невоспроизводимости реакции окажутся колебания освещенности, уровень которой в течение дня может незаметно для глаз меняться в десятки раз. Однако в процессе исследования неожиданно выяснилось, что главным фактором невоспроизводимости являются колебания концентрации диоксида углерода (CO_2) в воздухе. В частности, было обнаружено, что даже незначительные концентрации CO_2 могут существенно тормозить восстановление ионов серебра из их комплекса с этаноламином как в геле, так и в растворе.

Предварительные опыты показали, что ингибирующее действие CO_2 распространяется и на восстановление ионов серебра из комплекса с аммиаком. Поэтому практика использования комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ для проявления белков в геле также требует изучения влияния CO_2 на воспроизводимость результатов.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 954-40-84; эл. почта: agmalygin@mail.ru).

Настоящая работа посвящена систематическому исследованию влияния низких концентраций CO_2 на чувствительность обнаружения белков в ПААГ или в растворе при использовании комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в качестве источника серебра и формальдегида – в качестве восстановителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект подавления проявления серебром белковых зон в ПААГ в результате свободного контакта проявляющих растворов с воздухом, содержащим CO_2

Чтобы выяснить, на какой из трех стадий методики проявления белков в ПААГ с использованием комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ контакт с воздухом приводит к ослаблению интенсивности окраски гелей, были поставлены опыты, в которых две кюветы оставляли открытыми только на изучаемой стадии прокрашивания, в то время как на других стадиях их закрывали стеклянными пластинами. При этом две контрольные кюветы оставались закрытыми на всех стадиях.

Результаты, представленные на рис. 1, показывают, что наиболее чувствительной к контакту с воздухом была первая стадия – насыщение гелей комплексом $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. Обработка гелей в открытых кюветках на этой стадии приводила к подавлению интенсивности окраски, обнаруживаемой на последней стадии. Чувствительность второй стадии – промывание водой – выражалась лишь в некоторой задержке проявления на последней стадии при выравнивании окраски в конце процесса. Контакт с воздухом на третьей стадии – обработка раствором формальдегида и лимонной кислоты – никак не сказывался ни на ходе анализа, ни на конечном результате. Опыты осуществляли при температуре 20°C .

Аналогичные результаты были получены при проведении опытов в воздушном термостате в условиях повышенной температуры ($32\text{--}34^\circ\text{C}$). Отличие состояло лишь в увеличении скорости проявления на последней стадии (данные не представлены).

Эти и все последующие опыты проводились при концентрации CO_2 в воздухе $0.06\text{--}0.08\%$ (по объему). Из полученных результатов следует, что при обработке гелей в условиях свободного контакта с воздухом, содержащим CO_2 в низких концентрациях, наблюдается эффект подавления восстановления ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, аналогично тому, как это происходит в случае использования комплекса ионов серебра с этаноламином [6]. То есть, эффект не зависит от природы амина, участвующего в образовании комплекса.



Рис. 1. Результаты проявления белков сыворотки крови в полосках ПААГ с использованием аммиачного комплекса серебра. 1, 2 – кюветы открыты только на первой стадии процесса (контакт с воздухом подавляет прокрашивание); 3, 4 – кюветы прикрыты стеклянными пластинами на всех стадиях; 5, 6 – кюветы открыты только на второй стадии; 7, 8 – кюветы прикрыты стеклянными пластинами на всех стадиях (контакт с воздухом не влияет на конечный результат).

Подавление образования наночастиц серебра в гомогенной системе при ее свободном контакте с воздухом, содержащим CO_2

Ввиду трудности исследования ингибирующего влияния CO_2 на восстановление серебра в гетерогенной системе гель–раствор, изучение этого явления было продолжено в однофазной гомогенной системе. Полоски геля заменили водным раствором белка. Обработку методики обнаружения белков в гомогенной системе первоначально проводили с использованием комплекса ионов серебра с этаноламином. Ввиду низкой скорости реакции восстановления серебра этаноламином результаты опыта наблюдали спустя сутки или более. Низкая скорость реакции обеспечивала опережающее проникновение CO_2 из газовой фазы в жидкую и его равномерное распределение по объему жидкости. Гомогенность условий реакции подтверждали специальными опытами по восстановлению серебра в горизонтально расположенных длинных пробирках (30 см) при высоких и низких концентрациях CO_2 в

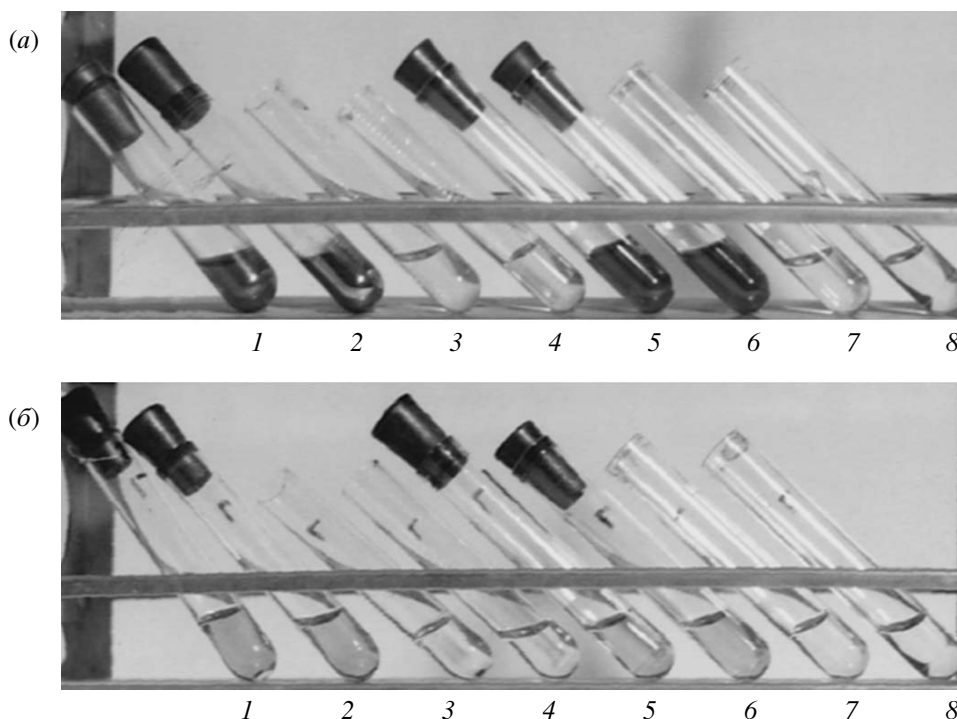


Рис. 2. Влияние контакта с воздухом на восстановление ионов серебра из комплекса с этаноламином через 24 ч инкубации в стеклянных (1–4) или полистирольных (5–8) пробирках в присутствии: альбумина (а) и гексокиназы (б). 1, 2, 5, 6 пробирки закрыты; 3, 4, 7, 8 открыты. 1, 2 – серебро осело на стенках; 3, 4 – реакция подавлена; 5, 6 – серебро перешло в форму окрашенных коллоидов; 7, 8 – реакция подавлена.

газовой фазе. Отсутствие градиента оптической плотности коллоидного серебра по длине пробирок как с высокой, так и с низкой концентрацией CO_2 в процессе протекания реакции свидетельствовало об одинаковой концентрации CO_2 в объеме пробирок.

Параллельные опыты в стеклянных или в полистирольных пробирках (рис. 2) показали, что на

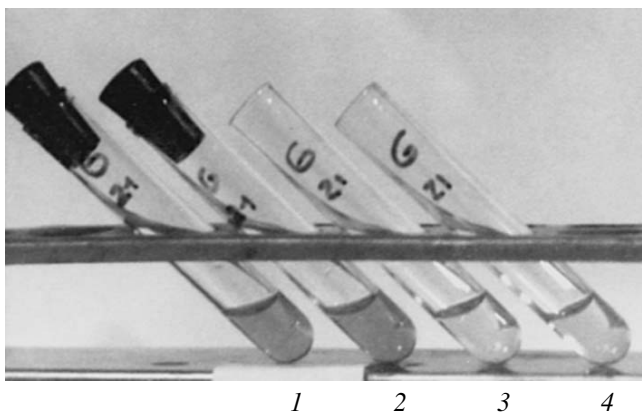


Рис. 3. Восстановление серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в присутствии глюкозооксидазы в закрытых (1, 2) и открытых (3, 4) полистирольных пробирках. Через 48 ч в пробирках 1, 2 образовались окрашенные коллоиды серебра, в пробирках 3, 4 реакция была подавлена.

стенках полистирольных пробирок осаждение серебра не происходит. На рис. 2а представлены результаты опытов с альбумином. В закрытых стеклянных пробирках (1, 2) серебро осаждалось на их стенках, а в условиях свободного доступа воздуха (3, 4) серебро на стенках не осаждалось, хотя раствор и был слабо окрашен. В закрытых пробирках из полистирола (5, 6) раствор приобретал глубокий коричневый цвет без осаждения серебра на стенках. При свободном доступе воздуха в полистирольные пробирки (7, 8) серебро на стенках также не осаждалось, а раствор был окрашен очень слабо.

Опыт с гексокиназой (рис. 2б) дал аналогичные результаты, с тем отличием, что интенсивность окраски наночастиц коллоидного серебра в закрытых пробирках была слабее, чем в опыте с альбумином, а в открытых – почти незаметной.

Чтобы изучить влияние содержащегося в воздухе CO_2 на реакцию восстановления ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, этаноламин в последующих опытах заменили на аммиак, образующийся в гомогенной системе из сульфата аммония в щелочной среде. В качестве восстанавливающего агента использовали формальдегид. Опыты с альбумином, гексокиназой, глюкозооксидазой, гиалуронидазой показали, что в открытых полистирольных пробирках раствор остается бесцветным, в то время как в закрытых – окрашивается образующимися наноча-

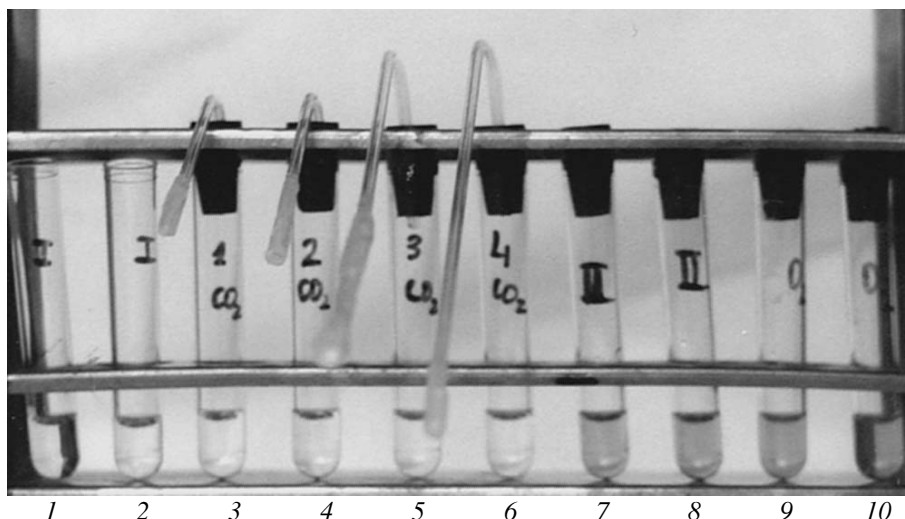


Рис. 4. Прямое доказательство участия CO_2 в подавлении восстановления серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в присутствии гексокиназы. Через 24 ч в открытых пробирках (1, 2) – реакция подавлена. В закрытых пробирках с капиллярами объемом 60 (3, 4) и 120 мкл (5, 6), заполненных CO_2 , – реакция подавлена; заполненных воздухом (7, 8) – серебро перешло в форму окрашенных коллоидов; заполненных O_2 , очищенным от примеси CO_2 (9, 10) – серебро перешло в форму окрашенных коллоидов.

стицами коллоидного серебра. Рис. 3 демонстрирует результаты восстановления ионов серебра после 2 сут инкубации реакционной смеси, содержащей глюкозооксидазу. В закрытых пробирках образовывались наночастицы коллоидного серебра, в открытых – реакция была подавлена.

Таким образом были найдены условия проявления белков в гомогенной системе, которая позволяет упростить исследование влияния диоксида углерода на процесс восстановления ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$.

Доказательство подавления восстановления ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ низкими концентрациями CO_2

В предыдущих опытах был показан лишь факт подавления реакции восстановления серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ при свободном контакте реакционной смеси с атмосферным воздухом, содержащим низкие концентрации CO_2 . Чтобы однозначно доказать, что в гомогенной системе причиной торможения реакции является содержащийся в воздухе CO_2 , были проведены опыты, которые позволили оценить количество CO_2 , оказывающее ингибирующее действие. Для этого использовали описанную выше гомогенную систему с участием комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в полистирольных пробирках. Первую пару пробирок оставляли открытыми, вторую и третью пары закрывали пробками со вставленными в них стеклянными капиллярами (вторую пару – короткими (60 мкл), третью – длинными (120 мкл), заполненными CO_2 , четвертую пару за-

крывали пробками, пятую заполняли кислородом, очищенным от примеси CO_2 , и также закрывали.

Представленные на рис. 4 результаты опыта с использованием в качестве иницирующего белка гексокиназы показали, что в первой, второй и третьей парах пробирок, где растворы контактировали с достаточным количеством CO_2 , реакция образования окрашенных наночастиц коллоидного серебра была заблокирована (пробирки 1–6). Подавление реакции в первой паре пробирок объясняется поступлением в них CO_2 из воздуха в неограниченном количестве. При концентрации CO_2 в воздухе 0.07% (по объему) его содержание в закрытых пробирках составляло ≈ 0.11 мкмоль. Ввиду малости этой величины, общее содержание CO_2 в пробирках с капиллярами определялось объемами капилляров (2.68 и 5.36 мкмоль CO_2 в капиллярах объемом 60 и 120 мкл соответственно). В закрытых пробирках, заполненных воздухом (7, 8) или очищенным от CO_2 кислородом (9, 10), ионы серебра восстанавливались до окрашенных коллоидов серебра. Количество CO_2 , содержащееся в объеме воздуха закрытых пробирок, в выбранных условиях опыта не оказывало заметного действия. Аналогичные результаты были получены при использовании в качестве белка глюкозооксидазы. Тот факт, что кислород, очищенный от CO_2 , не тормозит образование коллоидного серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в растворах, а различные количества CO_2 в пробирках в разной степени подавляют реакцию, однозначно свидетельствует, что и при замене этаноламина на аммиак в комплексе причиной наблюдаемого эффекта также является CO_2 .

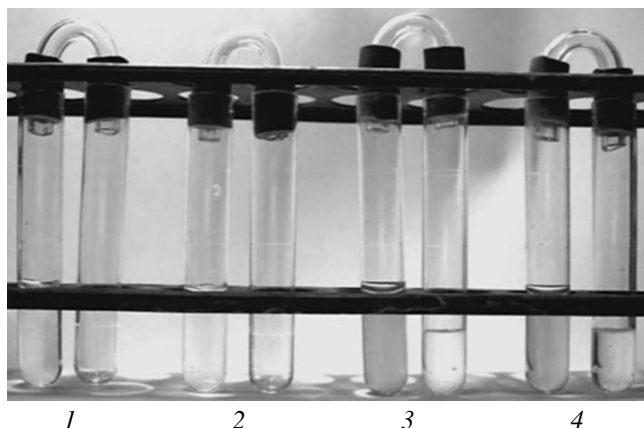


Рис. 5. Ингибирующее влияние малых количеств CO_2 воздуха на восстановление серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ в присутствии гексокиназы. Через 16 ч инкубации в пробирках 1, 2, соединенных с пробирками без $\text{Ba}(\text{OH})_2$, образование окрашенных коллоидов серебра едва заметно. В пробирках 3, 4, соединенных с пробирками, содержащими 1 мл 0.08 М раствор $\text{Ba}(\text{OH})_2$, образование окрашенных коллоидов явно выражено. Исходная концентрация CO_2 в пробирках – 0.08% по объему. Чтобы соответствовать общему объему воздуха в соединенных пробирках, объем реакционной смеси удвоен по сравнению с указанным в разделе “Эксперимент. часть”.

Чтобы доказать, что в разработанной гомогенной системе еще более низкие количества CO_2 тормозят восстановление ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, поставили следующий опыт с гексокиназой или глюкозооксидазой (рис. 5). Две пробирки (1 и 2), содержащие по 1.5 мл реакционной смеси, попарно соединяли U-образными трубками с двумя пустыми пробирками. Другие две пробирки (3, 4), содержащие ту же смесь, аналогичным образом попарно соединяли с пробирками, содержащими по 1 мл 0.08 М $\text{Ba}(\text{OH})_2$, который поглощал CO_2 воздуха. Количество серебра в растворе составляло 0.54 мкмоль, а количество смеси карбоната натрия (Na_2CO_3) и гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) в пересчете на CO_3^{2-} – 2.1 мкмоль, в то время как начальное содержание CO_2 в сообщающихся пробирках составляло около 0.2 мкмоль, то есть в молярном отношении было в 2.5 раза меньше, чем серебра и примерно в 10 раз меньше, чем Na_2CO_3 .

Результаты опыта показали, что в пробирках, сообщающихся при помощи U-образных трубок с пустыми пробирками, раствор после инкубации в течение 16 ч остался почти бесцветным, а в пробирках, сообщающихся с пробирками, содержащими $\text{Ba}(\text{OH})_2$, в результате удаления CO_2 воздуха образовались окрашенные наночастицы коллоидного серебра. Следовательно, не только сравнительно большие количества CO_2 , накапливающиеся в результате свободного поглощения из воздуха или

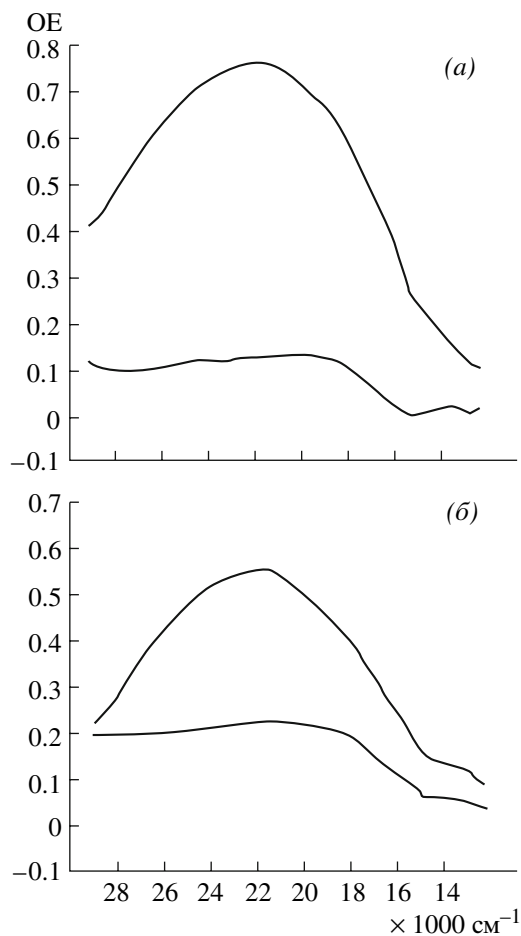


Рис. 6. Спектры поглощения реакционной среды в видимой области ($30\text{--}14 \times 1000 \text{ см}^{-1}$) после инкубации при свободном контакте с CO_2 воздуха (нижние кривые) и в закрытых пробирках (верхние кривые): при использовании для проявления комплекса серебра с этаноламином (а) и при использовании комплекса серебра с аммиаком (б).

вводимые при помощи стеклянных капилляров, но и весьма малые, определяемые объемами пробирок при концентрациях CO_2 0.08 об.%, заметно ингибируют восстановление серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$.

Как видно из рис. 6, спектры поглощения продуктов реакции в видимой области как при использовании в качестве источника серебра комплекса Ag^+ с этаноламином, так и комплекса с аммиаком имеют одинаковый колоколообразный вид с максимумом поглощения при частоте $22 \times 10^3 \text{ см}^{-1}$ и соответственно длине волны около 450 нм. Ввиду высокого уровня поглощения исходной реакционной среды в ультрафиолетовой области спектра и малой информативности последней данные по поглощению в этой области опущены.

На рис. 7 представлены результаты замеров концентрации CO_2 в воздухе на различном удалении от

лица экспериментатора. Нетрудно видеть, что в интервале расстояний от 0.3 до 0.5 м концентрация CO_2 в воздухе меняется соответственно в 2 и в 5 раз по сравнению с фоновой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тот факт, что CO_2 воздуха в равной степени подавляет осаждение серебра в гелях, на стенках стеклянных пробирок и в растворе в полистирольных пробирках, позволяет предположить, что центры, инициирующие образование серебряного зеркала и окрашенных наночастиц серебра, имеют одинаковую природу.

Что касается молекулярного механизма ингибирования восстановления серебра диоксидом углерода, то в приводимых опытах ингибирование, на первый взгляд, можно было бы объяснить закислением реакционной среды, а также действием карбонат-ионов (CO_3^{2-}) или гидрокарбонат-ионов (HCO_3^-), образующихся из CO_2 в результате диссоциации угольной кислоты. Однако в предыдущей работе [6] было обнаружено, что количество CO_2 (мкмоль), способное подавить восстановление серебра из комплекса с этаноламином, в 40 раз меньше количества этого комплекса и поэтому не может вызвать заметного сдвига кислотно-основного равновесия в реакционной среде. В той же работе было показано, что добавление в систему Na_2CO_3 в количестве, превышающем эквивалентное по отношению к количеству ионов серебра в растворе, не тормозит его осаждение на стенках стеклянных пробирок. Из приводимых в литературе расчетных данных [7] следует, что молярная концентрация промежуточного иона HCO_3^- в интервале pH от 8 до 10 меняется весьма незначительно по сравнению с изменением концентрации ионов водорода, а именно с 95 до 76%, в то время как концентрация CO_2 в растворе уменьшается с 4.25 до 0.034%, а концентрация CO_3^{2-} увеличивается с 0.30 до 24% относительно молярной суммы этих соединений.

Приведенные данные в совокупности позволяют заключить, что CO_2 подавляет восстановление ионов серебра из комплекса с этаноламином не за счет закисления реакционной среды угольной кислотой или образования ионов HCO_3^- и CO_3^{2-} в результате ее диссоциации. Это согласуется и с тем, что карбонат натрия успешно используют вместо щелочей в некоторых методиках обнаружения белков в ПААГ серебром [8, 9], а примеси карбоната калия существенно не влияют на результаты в технологии производства зеркал [10].

Использование Na_2CO_3 для поддержания щелочной среды в опытах по восстановлению ионов серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ (рис. 3–5) также

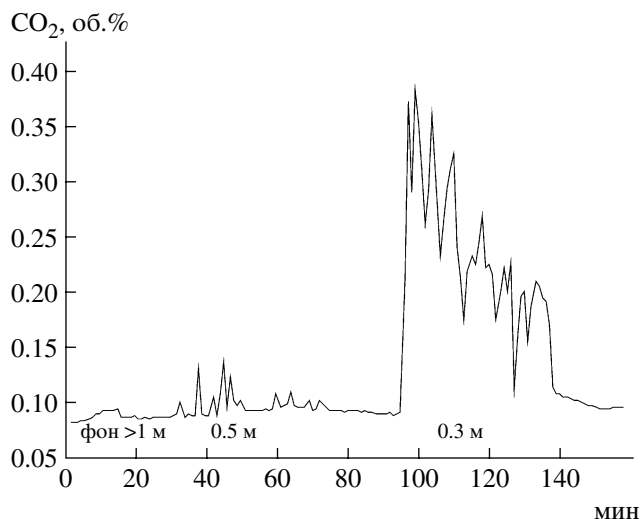


Рис. 7. Результаты замеров концентрации CO_2 на рабочем столе при удалении лица экспериментатора на 50 и 30 см. Фоновая концентрация CO_2 в помещении составляла 0.08–0.09 об.%.

свидетельствует о не причастности ионов CO_3^{2-} к торможению этой реакции. В то же время различие в значениях оптимальной концентрации Na_2CO_3 для инициации восстановления ионов серебра различными белками может быть объяснено разной буферной емкостью их растворов. С другой стороны, отмечаемый в литературе [7] замедленный переход CO_2 в угольную кислоту в воде, даже в щелочных условиях, свидетельствует в пользу того, что CO_2 подавляет восстановление серебра непосредственно в молекулярной форме. Начальную стадию ингибирования можно представить как обращение описанной радиохимики реакции восстановления ионов серебра ион-радикалом диоксида углерода (CO_2^-) [11]:



Эта реакция открывает каскад реакций, приводящих к последующему образованию кластеров Ag_2^+ , Ag_3^+ , Ag_4^{2+} , Ag_8^{2+} и далее наночастиц серебра [12]. Различие между электрохимическими потенциалами восстановления Ag^+ и CO_2 при образовании кластеров составляет всего 0.1 В и поэтому реакцию можно считать равновесной. Следовательно, избыток CO_2 в системе должен приводить к перехвату Ag^0 , обращению реакции и, как следствие – ингибированию каскада реакций образования наночастиц серебра. Этот механизм соответствует установленному нами факту, что наиболее чувствительной к тормозящему действию контакта с воздухом на проявление серебром была стадия инкубации гелей в растворе комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. То есть, содержащийся в воздухе CO_2 на первой стадии

процесса проявления препятствует образованию кластеров, инициирующих осаждение серебра. При этом аммиак, связывая свободные ионы серебра, способствует обращению реакции их восстановления анион-радикалом диоксида углерода и тем самым способствует превращению продукта реакции – CO_2 в ее ингибитор.

Задержка в окрашивании на стадии восстановления формальдегидом после контакта с воздухом на стадии отмывки гелей водой, может быть объяснена торможением роста самих кластеров под воздействием CO_2 . Последнее согласуется с данными работы [11] об участии анион-радикала $\text{CO}_2^{\cdot-}$ в восстановлении положительно заряженных кластеров серебра. Так или иначе, детальное решение вопроса о механизме участия CO_2 в подавлении восстановления серебра требует дополнительных исследований.

Как известно, концентрация CO_2 в закрытом помещении под воздействием дыхания человека может изменяться на два порядка (от 0.03 до 3%). Замеры концентраций CO_2 в воздухе (рис. 7) свидетельствуют о том, что в зависимости от положения лица экспериментатора уровень концентрации CO_2 в зоне эксперимента может меняться в несколько раз. Учитывая факт подавления центров инициации осаждения серебра низкими концентрациями CO_2 , можно сделать вывод, что колебания концентрации CO_2 в воздухе являются главным неконтролируемым параметром, влияющим на воспроизводимость методик окрашивания серебром гистологических препаратов и проявления белков серебром в ПААГ. Поэтому устойчивое проявление белков серебром может быть достигнуто поддержанием низких значений концентрации CO_2 в окружающем воздухе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. Акриламид, додецилсульфат натрия (Bio-Rad, США); бисакриламид, Трис, глюкозооксидаза (Serva, ФРГ); глицин, *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамин (TEMED), гиалуронидаза, бромфеноловый синий (Reanal, Венгрия); лизоцим Б, этанол-амин (Реахим), дважды перегнан в вакууме; спирт этиловый – ректификат; сыворотка крови человека, содержащая основные фракции: преальбумин, альбумин, α_1 , α_1' , α_2 , $\text{F}\alpha_2$, трансферрин, β_2 , β_7 , $\text{S}\alpha_2$, $\text{S}\beta$; гексокиназа (Fluka, Швейцария); альбумин (Calbiochem, Великобритания); глицерин (“ч. д. а.”); лимонная кислота (“ос. ч.”); формальдегид, уксусная кислота и неорганические реактивы имели квалификацию “х. ч.”.

Электрофорез сыворотки крови в ПААГ. Электрофорез белков в ПААГ осуществляли по частично модифицированному методу Леммли [1, 13] (в

присутствии 0.1% додецилсульфата Na при концентрации ПААГ в пластине – 10%).

Исходные растворы: 39% акриламида с 1% бисакриламида; буфер pH 8.8 (1.5 М Трис-HCl); буфер pH 6.8 (0.5 М Трис-HCl); 10% SDS; 10% персульфат аммония.

Раствор для разделяющего геля: 15 мл раствора акриламида с бисакриламидом смешивали с 12.5 мл Трис-буфера pH 8.8 и 22 мл воды. Раствор фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр, после чего к нему добавляли 0.01 мл TEMED и 0.3 мл 10% раствора персульфата аммония.

Раствор для концентрирующего геля: раствор акриламида с бисакриламидом (1.3 мл) смешивали с 2.5 мл Трис-буфера pH 6.8 и 5.1 мл воды. Раствор фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр, после чего к нему добавляли 1 мл 10% SDS; 0.003 мл TEMED и 0.1 мл 10% раствора персульфата аммония.

Электродный буфер 10-кратной концентрации: 3 г Трис, 14.3 г глицина и 1 г SDS растворяли в воде. Раствор доводили до объема 100 мл.

Буфер для растворения образца белков: смешивали 1 мл 10% раствора SDS, 0.8 мл глицерина, 24 мг дитиотреита и 3 мл воды.

Приготовление образца белков для электрофореза в ПААГ. Смесь 20 мкл лизоцима (0.1%) смешивали с 10 мкл стандартной сыворотки крови, растворяли в буфере для растворения белков и добавляли 10 мкл 0.2% раствора красителя бромфенолового синего.

Формирование пластины геля и электрофорез белков. Пластины разделяющего геля размером 150 × 140 × 1.5 мм формировали в приборе для электрофореза. Верхнюю границу гелеобразующего раствора, залитого между двумя стеклянными плоскостями, изолировали от кислорода воздуха слоем воды (3–5 мм). После окончания полимеризации воду сливали и на горизонтальную границу разделяющего геля настилали раствор для концентрирующего геля. В концентрирующем геле формировали карман на всю ширину пластины при помощи вкладыша из плексигласа. После образования пластины геля электродные камеры заполняли электродным буфером, предварительно разбавленным в 10 раз. Затем на поверхность концентрирующего геля настилали образец белков, предварительно прогретый в воде при температуре 90–95°C в течение 1 мин и содержащий глицерин с бромфеноловым синим. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 40 мА. Процесс останавливали, когда полоса бромфенолового синего приближалась к нижней границе геля. Затем пластину геля помещали в 50% раствор этилового спирта.

Проявление белковых зон в ПААГ серебром. Чтобы сравнить воспроизводимость результатов проявления белка в одинаковых полосках геля, процесс осуществляли параллельно в четырех стеклянных

ных кюветах размером $235 \times 23 \times 23$ мм: в двух кюветах проявляли с измененными условиями, а две другие служили контролем. Полоски геля размером $150 \times 9 \times 1.5$ мм получали разрезанием пластины ПААГ, в которой предварительно был осуществлен электрофорез белков, содержащихся в 20 мкл сыворотки крови человека. Перед разрезанием на полоски пластину фиксировали в течение 1 сут в 50% этаноле.

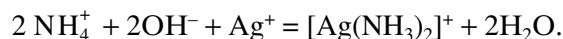
Проявление осуществляли по несколько измененной методике Рея [5]. После отмывки полосок геля от спирта в бидистиллированной воде в течение 30 мин процедура включала три стадии: 1) стадию насыщения геля в течение 1 ч раствором, содержащим 3 мМ AgNO_3 , 9 мМ аммиак, 2.4 мМ NaOH ; 2) стадию отмывки бидистиллированной водой – 20 мин; 3) стадию обработки раствором 72 мМ формальдегида и 0.17 мМ лимонной кислоты – около 10 мин. Объем растворов на всех стадиях составлял 25 мл.

Концентрацию CO_2 в воздухе измеряли либо непосредственно по ранее разработанной нами химической методике определения абсолютного содержания CO_2 в воздухе [14], либо при помощи CO_2 -газоанализатора ПКУ-4 ОАО “Практик-НЦ”, предварительно откалиброванного по этой методике. Концентрация диоксида углерода в воздухе помещения, в котором проводился опыт, составляла 0.06–0.08% объемных.

Восстановление ионов серебра в растворе из комплекса с этаноламином. Для получения комплекса серебра с этаноламином к 8 мл 0.1 М раствора AgNO_3 добавляли 230 мкл 50% этаноламина. При этом сначала выпадал коричневый осадок окиси серебра, который постепенно растворялся до образования бесцветного раствора. Затем к приготовленному раствору добавляли 0.4 мл раствора белка в воде (альбумина или гексокиназы) с концентрацией 1 мг/мл. Полученный раствор разливали в пробирки по 1 мл в каждую. Раствор изолировали от контакта с внешним воздухом, закрывая пробирки резиновыми пробками. Объем воздуха над раствором в закрытых пробирках составлял ≈ 3.3 мл. Образование окрашенных коллоидов серебра в пробирках в результате восстановления этаноламином ионов серебра из комплекса с этаноламином происходило обычно в течение суток.

Восстановление ионов серебра в растворе из комплекса с аммиаком. Восстановление серебра из комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ осуществляли формальдегидом. Скорость реакции в заданных пределах удерживали регуляцией щелочной среды посредством изменения концентрации эквимольной смеси Na_2CO_3 и NaHCO_3 . Чтобы строго контролировать концентрацию аммиака в реакционной среде, в качестве источника аммиака использовали раствор сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Из него в щелочной

среде выделялся свободный аммиак, образующий комплекс с ионами Ag^+ по реакции:



Концентрации компонентов раствора подбирались так, чтобы молярные отношения AgNO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ соответствовали стехиометрии реакции образования аммиачного комплекса серебра.

Конечную смесь составляли следующим образом. К 7.35 мл водного раствора белка с концентрацией 1 мг/мл добавляли 105 мкл смеси, содержащей 40 мМ AgNO_3 и 40 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Раствор перемешивали и разливали в пробирки из полистирола или стекла по 480 мкл. опыты проводили с белками: альбумин, гексокиназа, глюкозооксидаза, гиалуронидаза – как в открытых полистирольных пробирках, так и в закрытых. Концентрацию смеси Na_2CO_3 и NaHCO_3 для каждого из этих белков подбирали так, чтобы скорость восстановления серебра формальдегидом была сравнима со скоростью восстановления этаноламином. В результате было найдено, что оптимальный объем смеси 25 мМ Na_2CO_3 и 25 мМ NaHCO_3 для альбумина составляет 21 мкл, для гексокиназы – 35 мкл, для гиалуронидазы – 28 мкл, для глюкозооксидазы – 21 мкл. Реакцию запускали добавлением в пробирки по 250 мкл 7.3 мМ свежеприготовленного раствора формальдегида. Конечные концентрации реагентов в системе из расчета на одну пробирку составляли: белок – 0.06%; 0.36 мМ AgNO_3 ; 0.36 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.6–1.15 мМ каждого из компонентов смеси Na_2CO_3 и NaHCO_3 ; 2.4 мМ формальдегид. Суммарный объем реакционной смеси в пробирках составлял 751–765 мкл. Содержимое пробирок изолировали от контакта с внешним воздухом резиновыми пробками. Объем воздуха над раствором в закрытых пробирках составлял ≈ 3.5 мл. Количество CO_2 в них регулировали при помощи стеклянных капилляров измеренного объема, заполненных CO_2 и закрытых с внешнего конца парафильмом. Капилляры были пропущены через резиновые пробки, закрывавшие пробирки. Для открытых пробирок концентрацию CO_2 в воздухе контролировали как описано в предыдущем разделе.

Диоксид углерода получали разложением гидрокарбоната натрия серной кислотой непосредственно в газометре [15].

Кислород получали разложением сухого KMnO_4 нагреванием в колбе Вюрца. Для удаления примеси CO_2 полученный кислород хранили в газометре над 3% раствором гидроксида калия [15].

Спектры поглощения в видимой области получали на спектрофотометре Specord UV VIS.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00864).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малыгин А.Г. // Успехи биол. химии. 1993. Т. 33. С. 173–213.
2. Малыгин А.Г., Дорохина Н.И., Ганцеров И.Н. // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 517–530.
3. Oakley B., Kirsh D.R., Morris D. // Anal. Biochemistry. 1980. V. 105. P. 361–363.
4. Roehling H.-M., Neuhoff V. // Electroforesis. 1981. V. 2. P. 141–147.
5. Wray W. // Anal. Biochemistry. 1981. V. 118. P. 197–203.
6. Малыгин А.Г., Султанова Д.О. // Докл. академии наук. 2002. Т. 386. С. 124–126.
7. Рабинович Е. Фотосинтез. М.: Иностранная литература, 1951.
8. Merrill C.R., Goldman D., van Keuren M. // Electrophoresis. 1982. V. 3. P. 17–23.
9. Sammons D.W., Adams L.D., Nishizawa E.E. // Electrophoresis. 1981. V. 2. P. 135–141.
10. Винокуров В.М. Химические методы серебрения зеркал. М., 1950.
11. Ershov B.G., Janata E., Henglein A., Fojtik A. // J. Phys. Chem. 1993. V. 97. P. 4589–4594.
12. Еришов Б.Г. // Журн. неорганической химии. 2002. Т. 4. С. 644–654.
13. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
14. Малыгин А.Г., Пономарева В.Д. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. С. 23–31.
15. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. Чистые химические вещества. М.: Химия, 1974.

Carbon Dioxide of Air Inhibits the Formation of Silver Nanoparticles Initiated by Proteins in Polyacrylamide Gel and in Solution

A. G. Malygin[#] and V. D. Ponomareva

[#] Phone: +7 (495) 954-4084; e-mail: agmalygin@mail.ru

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

It was shown that the detection of proteins in polyacrylamide gel by silver is inhibited by contact with air of the ammonia complex with silver ions used at the first stage of detection. It was proved by experiments on the reduction of silver by ethanolamine from a complex with ethanolamine and by formaldehyde from a complex with ammonia that the formation of silver nanoparticles initiated by proteins is inhibited by air carbon dioxide. The participation of carbon dioxide in this process is discussed. It was found that even the breathing of an experimenter can induce variations in carbon dioxide concentration sufficient to adversely affect the reproducibility of the silver staining techniques. It was concluded that, for stable staining of proteins by silver in polyacrylamide gel, it is necessary to maintain a low concentration of carbon dioxide in air over the detection solutions.

Key words: silver, detection, colloids, proteins, polyacrylamide gel, carbon dioxide, nanoparticles