

5. Альбертсон П. О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. — М.: Мир, 1974. — 381 с.
6. Бабаян Т. Л., Безруков М. Г. Метаболиты-индукторы автолиза дрожжей // Acta biotechnol. — 1985. — 5, № 3. — С. 279—284.
7. Спириг А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — 23, № 5. — С. 656—662.
8. Schwenke K. D., Prahl L. Functional properties of plant proteins // Die Nahrung. — 1981. — 25, N 1. — P. 59—69.
9. Krumphanz V., Rehacek Z. Modern biotechnology. — Paris: UNESCO, 1984. — 527 p.
10. Sergeev V. A., Solosenko V. M., Bezrucov M. G. Vergleichscharakteristik von Isolaten der Gesamteiweibe der Hefe in Abhängigkeit von den Bedingungen ihrer Abscheidung // Acta Biotechnol. — 1984. — 4, N 2. — S. 105—115.
11. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. — М.: Химия, 1978. — 584 с.
12. McCormick D. B. Interactions of flavins with aminoacid residues // Photochem. and Photobiol. — 1974. — 261, N 15. — P. 169—182.

ВНИИсинтезбелок, Москва

Получено 25.08.89

УДК 577.113.4

© И. А. Назаренко, Л. В. Мацкова, 1990

## ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДОВ НА ОКРАШИВАНИЕ СЕРЕБРОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ

*Описан простой и хорошо воспроизводимый метод окрашивания тРНК и гомополирибонуклеотидов серебром в денатурирующих ПААГ, чувствительность которого на три порядка превышает таковую при окрашивании этих полинуклеотидов метиленовым синим. Предложенный способ позволяет избирательно окрашивать серебром нуклеиновые кислоты в присутствии примесей белков. Исследована зависимость эффективности окрашивания полинуклеотидов и цвета образовавшихся комплексов от нуклеотидного состава. Так, поли(G) и поли(I) окрашиваются наиболее ярко, тогда как поли(U) демонстрирует негативное окрашивание.*

**Введение.** Постоянно растущий интерес исследователей к выявлению и характеристике бесконечно малых количеств белков и полинуклеотидов определил развитие целого ряда высокочувствительных методов окрашивания этих молекул. Одним из таких методов является окрашивание белков и нуклеиновых кислот в гелях серебром. По чувствительности данный метод сравним с радиоактивным мечением биомолекул. Окрашивание белков в ПААГ серебром, изначально предложенное Мериллом и др. [1], позволяет обнаружить в DS-Na-ПААГ в 100 раз меньшее количество белка, чем обычно используемый метод окрашивания белков кумасси бриллиантовым голубым R-250. Позднее были опубликованы различные модификации метода, различающиеся по сложности выполнения, воспроизводимости и числу стадий [2—7].

Одна из модификаций метода окрашивания белков в ПААГ серебром [3] была использована рядом исследователей для окрашивания ДНК в полиакриламидных [8, 9] и агарозных [10] гелях, а также для обнаружения двуспиральной РНК [11]. Оказалось, что серебро является в 10—100 раз более эффективным реагентом для окрашивания двуспиральных нуклеиновых кислот, чем бромистый этидий.

Несмотря на многочисленные исследования в области окрашивания биополимеров серебром, механизм этой реакции до сих пор остается невыясненным. В частности, не объяснена зависимость эффективности окрашивания и цвета получаемого комплекса от аминокислотного состава белков [12—14]. Влияние нуклеотидного состава ДНК и РНК на окрашивание серебром не описано. В данной работе предложена простая, хорошо воспроизводимая и высокочувствительная процедура окрашивания серебром тРНК и полирибонуклеотидов различного состава в ПААГ, содержащих 7 М мочевины. Исследовано влия-

ние нуклеотидного состава РНК на окрашивание данным методом. Кроме того, предложенная процедура позволяет избирательно окрашивать РНК и ДНК в присутствии белковых примесей.

**Материалы и методы.** В работе использованы препараты суммарной тРНК и смесь белков для электрофореза N4 («Serva», ФРГ), ДНК бактериофага  $\lambda$  (НПО «Фермент», Вильнюс), гомополирибонуклеотиды (НИКТИ БАВ, Бердск), акриламид и N, N'-метиленбисакриламид производства фирмы «Sigma» (США). Для приготовления растворов использовали реактивы марки «хч» или «осч» и бидистиллированную воду.

Электрофорез препаратов суммарной тРНК в 20 %-ном ПААГ (15×15 см, 1,5 мм толщиной), содержащем 7 М мочевины, проводили в 50 мМ трис-боратном буфере (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА при напряжении 300 В в течение 2 ч.

Для сравнительного анализа окрашивания полирибонуклеотидов различной длины и состава, РНК, ДНК и белков серебром указанные препараты в 1—2 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСI, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА) наносили на 10—20 % ПААГ, предварительно обработанный 10 % глицерином. Нанесенную каплю подсушивали на воздухе в течение 30 мин, далее гель фиксировали и окрашивали, как описано ниже.

**Фиксация и окрашивание гелей.** За исключением фиксации, которую желательно проводить при 2—5 °С для уменьшения диффузии материала в геле, все стадии окрашивания осуществляли при комнатной температуре. Гели фиксировали в двух сменах 30 % этанола — 10 % уксусной кислоты в течение 12 ч. Гели, содержащие РНК, окрашивали в течение 30 мин в 0,02 %-ном растворе метиленового синего (рН 4,8) и отмывали водой. Окрашивание серебром проводили, как описано в таблице. Все растворы для приготовления гелей и окрашивания их серебром фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Прикасались к гелям только в перчатках во избежание окрашивания серебром отпечатков пальцев.

**Результаты и обсуждение.** Известные способы окрашивания биополимеров серебром можно разделить на две группы:

1) окрашивание на основе метода, описанного Оукли и др. [2], когда гель выдерживают в щелочном растворе диамина серебра, а затем восстанавливают в кислом растворе формальдегида;

2) модификация метода Мерилла и др. [1], где гель сначала обрабатывают слабокислым раствором нитрата серебра, а затем раствором формальдегида в карбонате натрия.

Общей чертой этих способов является обработка геля перед добавлением серебра различными реагентами: окислителями [3, 14], солями меди [1], формальдегидом [6], облучение светом определенной длины волны [15] и т. д. Как видно из полученных результатов, представленных на рис. 1, РНК эффективно окрашивается серебром в денатурирующем ПААГ без предварительной обработки указанными реагентами. Причем на электрофореграмме отчетливо видно 0,1 нг РНК, т. е. чувствительность предложенного метода по крайней мере на три порядка превышает чувствительность окрашивания тРНК метиленовым синим. Кроме того, на электрофореграмме хорошо видны фрагменты тРНК длиной до 10 нуклеотидов, что свидетельствует о возможности использования серебра для выявления сравнительно коротких олигонуклеотидов.

*Условия процедуры окрашивания полинуклеотидов серебром в ПААГ*  
*Procedure for silver staining of polynucleotides in PAAG*

| Стадия                      | Условия  |
|-----------------------------|--|
| Фиксация                    | 30 % этанол — 10 % уксусная кислота; 12 ч в двух сменах              |
| Промывка                    | Бидистиллированная вода; 3 раза по 5 мин                             |
| Обработка AgNO <sub>3</sub> | 0,1 %-ный раствор; 30 мин  |
| Промывка                    | Бидистиллированная вода; 3 раза по 10—20 с                           |
| Восстановление              | 0,02 % формальдегид в 3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 5—10 мин |
| Остановка реакции           | 1 % уксусная кислота; 5 мин  |

Следует отметить также, что гели, окрашенные серебром, можно сколько угодно долго хранить в воде, тогда как метиленовый синий быстро вымывается из зон, содержащих РНК.

При исследовании окрашивания серебром белков без предварительной обработки геля (таблица) оказалось, что чувствительность окрашивания значительно ниже, чем в случае метода Мерила [3], когда белки, фиксированные в геле, обрабатывали бихроматом калия.

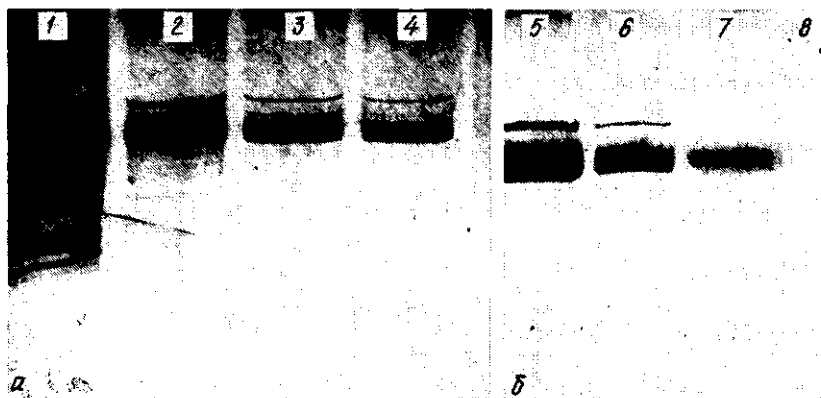


Рис. 1. Электрофореграммы суммарной тРНК *E. coli*, окрашенные серебром (а) и метиленовым синим (б). Количество тРНК на дорожку (мкг): 1—1; 2—0,1; 3—0,01; 4—0,001; 5—5; 6—0,1; 7—0,01

Fig. 1. Staining of unfractionated tRNA from *E. coli* in 20 % polyacrylamide gel with silver (a) and methylene blue (b). Lanes contain RNA in  $\mu\text{g}$ : 1—1; 2—0.1; 3—0.01; 4—0.001; 5—5; 6—0.1; 7—0.01

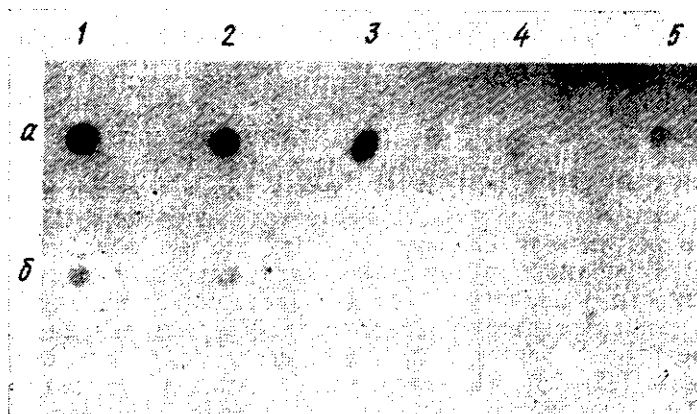


Рис. 2. Окрашивание серебром белков и РНК. Суммарную тРНК (а) и смесь белков (б) наносили на 10 %-ный ПААГ капельным способом в количестве (мкг): 1—1; 2—0,1; 3—0,01; 4—0,001; 5—0,0001 и окрашивали, как указано в таблице

Fig. 2. Silver staining of proteins and RNA. Molecular weight marker proteins (a) and unfractionated RNA (b) were spotted on 10 % polyacrylamide gel as described in «Methods» in quantity ( $\mu\text{g}$ ) 1—1; 2—0.1; 3—0.01; 4—0.001; 5—0.0001. Staining was performed according to the present method (Table)

Чтобы сравнить эффективность окрашивания РНК и белков, оба препарата наносили на 10 %-ный ПААГ, содержащий 7 М мочевины, капельным способом, как описано в «Материалах и методах». Хотя чувствительность окрашивания при нанесении материала на гель несколько ниже, чем при введении его электрофорезом, капельный способ позволяет сделать сравнительный анализ взаимодействия различных биополимеров с серебром. Как видно из рис. 2, чувствительность предложенного метода в отношении РНК по крайней мере на два порядка превышает таковую при окрашивании белков. Поскольку серебром

можно отчетливо окрасить 1 нг РНК (рис. 1), очевидно, что даже 90 % примеси белка в препарате не скажутся в этом случае на результатах анализа.

Окрашивание гомополирибонуклеотидов серебром. Для ответа на вопрос, влияет ли нуклеотидный состав РНК на окрашивание серебром, были использованы препараты гомополирибонуклеотидов, суммарной тРНК и ДНК бактериофага  $\lambda$ , которые

капельным способом наносили на гель и окрашивали, как представлено в таблице. Капельный способ введения материала в гель позволяет одновременно окрашивать полинуклеотиды различной длины и состава, хотя чувствительность в этом случае несколько ниже, чем при введении полимеров в гель посредством электрофореза.

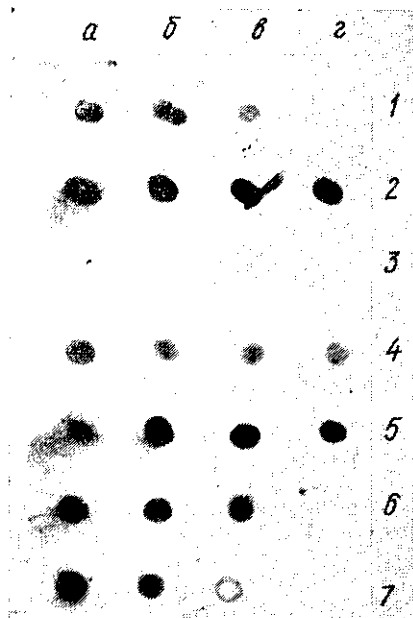


Рис. 3. Окрашивание полинуклеотидов различного состава серебром: 1—поли(А); 2—поли(Г); 3—поли(У); 4—поли(С); 5—поли(И); 6—тРНК; 7—ДНК фага  $\lambda$  в количестве (мкг): а—1; б—0,1; в—0,01; з—0,001 наносили на 10 %-ный ПААГ капельным способом и окрашивали, как указано в таблице  
Fig. 3. Silver staining of polynucleotides of different composition: 1—poly(A), 2—poly(G), 3—poly(U), 4—poly(C), 5—poly(I), 6—tRNA, 7—bacteriophage  $\lambda$  DNA were spotted on 10 % polyacrylamide gel in following quantities (in  $\mu\text{g}$ ): а—1; б—0.1; в—0.01; з—0.001 and stained as described in Table

На рис. 3 представлены результаты окрашивания различных полинуклеотидов, РНК и ДНК серебром. Видно, что наиболее высокая чувствительность наблюдается при окрашивании поли(Г) и поли(И); поли(А) и поли(С) окрашиваются несколько хуже (сравнимо с суммарной тРНК и ДНК), а поли(У) демонстрирует негативное окрашивание, т. е. связывание серебра в месте нанесения поли(У) происходит хуже, чем в чистом геле. Следует отметить, что при обработке серебром различных гомополирибонуклеотидов наблюдаются отличия не только в эффективности окрашивания, но и в цвете образовавшихся комплексов. Как указывалось выше, подобное дифференцирование было описано для некоторых белков и полипептидов с различным аминокислотным составом [12—14]. Поскольку механизм взаимодействия серебра с белками и нуклеиновыми кислотами до сих пор остается неясным, данные о влиянии нуклеотидного состава РНК на взаимодействие с серебром представляют полезную информацию для дальнейшего исследования этой реакции.

#### THE DEPENDENCE OF SILVER STAINING OF POLYRIBONUCLEOTIDES IN POLYACRYLAMIDE GELS ON NUCLEOTIDE SEQUENCE

I. A. Nazarenko, L. V. Matskova

University, Novosibirsk  
Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

#### Summary

A simple and reliable method for silver staining of RNA and homopolyribonucleotides after electrophoresis in PAAG, containing 7M of urea, is described. The sensitivity of the method is by three orders of magnitude higher than that of the staining with methylene blue. RNA-silver complex formation is shown to be dependent on the composition of polyribonucleotides. Thus, maximum sensitivity of the method is observed with poly (G) and poly (I), while poly (U) demonstrates negative staining.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Switzer R. S., Merrill C. R., Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1979. — 98, N 1. — P. 231—237.
2. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in PAAG // *Ibid.* — 1980. — 105, N 2. — P. 361—363.
3. *Ultrasensitive stain for proteins in PAAG shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins* / C. R. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman, M. N. Ebert // *Science.* — 1981. — 211, N 4489. — P. 1437—1438.
4. Ohsawa K., Ebata N. Silver stain for detection 10 femtogram quantities of protein after PAAG // *Anal. Biochem.* — 1983. — 135, N 2. — P. 409—415.
5. Heukeshoven J., Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining // *Electrophoresis.* — 1985. — 6, N 1. — P. 103—112.
6. Blum H., Beier H., Gross H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1987. — 8, N 1. — P. 93—99.
7. Wedrychowski A., Olinski R., Hnilica L. S. Modified method of silver staining of proteins in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1986. — 159, N 2. — P. 323—328.
8. Beidler J. L., Hilliard P. R., Rill R. L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver // *Ibid.* — 1982. — 126, N 2. — P. 374—380.
9. Brown M., Petric M., Middleton P. J. Silver staining of DNA restriction fragments for the rapid identification of adenovirus isolated // *J. Virol. Meth.* — 1984. — 9, N 1. — P. 87—98.
10. Peats S. Quantitation of protein and DNA in silver stained agarose gels // *Anal. Biochem.* — 1984. — 140, N 1. — P. 178—182.
11. Berry M. J., Samuel C. E. Detection of subnanogram amounts of RNA in polyacrylamide gels in the presence and absence of proteins by staining with silver // *Ibid.* — 1982. — 124, N 1. — P. 180—184.
12. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels / W. Wray, T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancoc // *Ibid.* — 1981. — 118, N 1. — P. 197—203.
13. Friedman R. D. Comparison of four different silver staining techniques for salivary proteins detection in alaline polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1982. — 126, N 2. — P. 346—349.
14. Nielsen B. L., Brown L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels // *Ibid.* — 1984. — 141, N 2. — P. 311—315.
15. *Molecular probes for human genetics diseases by two-dimensional electrophoresis and silver staining* / C. R. Merrill, D. Goldman, M. L. van Keuren, M. H. Ebert // *Electrophoresis-82. Adv. Meth. Biochem. and Clin. Appl. Proc.* / Ed. D. Stathkos. — Berlin; New York: Walter de Gruyted and Co., 1983. — P. 327—342.

Новосиб. гос. ун-т им. Ленинского комсомола  
ВНИИ молекуляр. биологии, пос. Кольцово Новосибир. обл.

Получено 02.01.90

УДК 535.3:543.423:577.1

© Д. Н. Говорун, Я. Р. Мищук, Н. В. Желтовский, 1990

## К ВОПРОСУ О ПРИРОДЕ НИЗКОЧАСТОТНЫХ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА БИОПОЛИМЕРОВ

*Работа посвящена анализу некоторых особенностей низкочастотного КР света в биополимерах. Авторы уделяют внимание проблеме идентификации низкочастотных колебательных мод биополимеров на внутренние и внешние, показывают, к каким неконтролируемым погрешностям приводит неучет фактора Бозе — Эйнштейна, приходят к выводу о перспективности низкочастотного КР света для определения фрактальных свойств биополимеров.*

В последнее время возрос интерес к экспериментальному исследованию низкоэнергетических ( $\nu < 200 \text{ см}^{-1}$ ) колебательных состояний биополимеров (см., например, работы [1—8]), а также приведенную в них библиографию) методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света. Это объясняется, по-видимому, тем, что низкочастотным (НЧ) коллективным модам биополимеров, в частности ДНК, приписываются важные биологические функции [9, 10].

В этом сообщении обсуждаются некоторые особенности НЧ спектров КР биополимеров.