

Т. Г. ВОРОНОВА, С. В. КУЗЬМИН, Н. И. МИКИЧУР,  
Л. С. САНДАХЧИЕВ, Ю. Н. ШУМИЛОВ

**АНАЛИЗ ПЛАВУЧЕЙ ПЛОТНОСТИ ДНК  
В МАСШТАБЕ  $10^{-8}$ — $10^{-9}$  г**

(Представлено академиком А. С. Спириным 26 V 1971)

Ультрацентрифугирование в установившемся градиенте плотности является важнейшим методом исследования в молекулярной биологии, позволяющим получить ценную информацию о природе макромолекул и их комплексов<sup>(1)</sup>. Применение этого метода для анализа макромолекул из уникальных клеточных ансамблей или отдельных клеток требует значительного снижения числа процедур. Радиохимические методы детектирования не всегда возможны и сопряжены с определенными трудностями. В данной работе был разработан количественный метод анализа плавучей плотности в объеме нескольких микролитров с количествами ДНК порядка  $10^{-8}$ — $10^{-9}$  г. Перспективным подходом к решению этой задачи является уменьшение объема без изменения концентрации исследуемых веществ в комбинации с чувствительными методами микрофотометрирования. Подобный прием реализован нами в ультрамикроварианте хроматографического анализа<sup>(2)</sup>. В случае анализа плавучей плотности снижение масштаба на 3—4 порядка требует работы с пробирками диаметром 0,3—0,5 мм и длиной 20—40 мм. Наш экспериментальный опыт показал, что количественный анализ результатов разделения в таких пробирках встречает большие трудности. Неоднородность капилляров по поглощению и преломлению вносит значительные погрешности при прямом сканировании, а продавливание содержимого при фиксированном положении рабочего луча микрофотометра на капилляре, как это описано нами для случая хроматографического анализа<sup>(2)</sup>, приводит к сильному размыванию разделенной зоны. Следующий подход позволил преодолеть отмеченные трудности. К содержимому капилляров добавляли мономеры и инициаторы фотополимеризации<sup>(3)</sup>, что позволило после разделения превращать содержимое капилляров в гель и тем самым полностью устранить размывание зон при последующем продавливании. После окрашивания ДНК метиленовым синим<sup>(4)</sup> проводили сканирование геля на двухцветном фотометре<sup>(5)</sup> с низкой чувствительностью к преломлению или рассеиванию света.

Пробирки изготавливали из стеклянных капилляров с внутренним диаметром 0,3—0,5 мм и длиной 40 мм. Для анализа использовали растворы А и В, содержащие следующие компоненты в одинаковой концентрации ( $W/V$ , %): акриламид — 10; метилен-бис-акриламид 1,50;  $\beta$ -диметиламинопропионитрил 0,04; тритон X-100 0,05; рибофлавин 0,0024; трис-HCl 0,61 (0,05 M);  $MgSO_4$  0,17 ( $1,4 \cdot 10^{-2}$  M). Кроме того, раствор А содержал CsCl 51,16  $W/W$ %, плотность раствора ( $20^\circ$ )  $1,6$  г/см<sup>3</sup>, pH 7,2; раствор В—CsCl 60,76  $W/W$ % и ДНК тимуса телянка<sup>(6)</sup> 20—100  $\mu$ г/мл, плотность раствора ( $20^\circ$ )  $1,8$  г/см<sup>3</sup>, pH 7,2. Раствор С с плотностью  $1,7$  г/см<sup>3</sup> получали смешением равных объемов растворов А и В.

Приведенный состав обеспечивает быструю (0,5—2 мин.) фотополимеризацию и дает гели, сохраняющие линейные размеры при процедурах ок-

рашивания и отмывки. Все манипуляции с растворами А, В и С проводили при красном свете.

В обычном варианте анализа капилляры полностью заполняли раствором С. В случае анализа плавучей плотности ускоренным методом (7) капилляры наполняли микропипеткой до высоты 20 мм раствором В, затем осторожно наслаивали раствор А. Капилляры вставляли в полиамидный вкладыш (8) с использованием в качестве поддерживающей среды смеси  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  с  $d = 2,1 \text{ г/см}^3$ . Вкладыши помещали в стаканы свинг-аут ротора (ультрацентрифуга АС-60, Janetzky, ГДР), заливали вазелиновым маслом и проводили центрифугирование при  $20^\circ$  (24–72 часа при

35 000 об/мин). После фотополимеризации гель фиксировали и окрашивали метиленовым синим (4), после чего снова засасывали в капилляр. Капилляр сканировали на микрофотометре, работающем по двухволновому принципу (5), сконструированном и изготовленном в нашем институте. В этом приборе при сканировании на один и тот же участок геля подается поочередно свет двух спектральных интервалов, один из которых совпадает с областью поглощения комплекса ДНК с метиленовым синим (580–680 мμ), а другой находится вне этой области (500–570 мμ). Выделение и регистрацию переменной составляющей осуществляли описанным ранее методом (2). Чувствительность прибора  $2 \cdot 10^{-2}$  о.е. (630 мμ) на всю шкалу, точность 2%, размер зонда  $100 \times 15 \text{ м}$ .

Результаты эксперимента, в котором распределение ДНК в капиллярах определяли

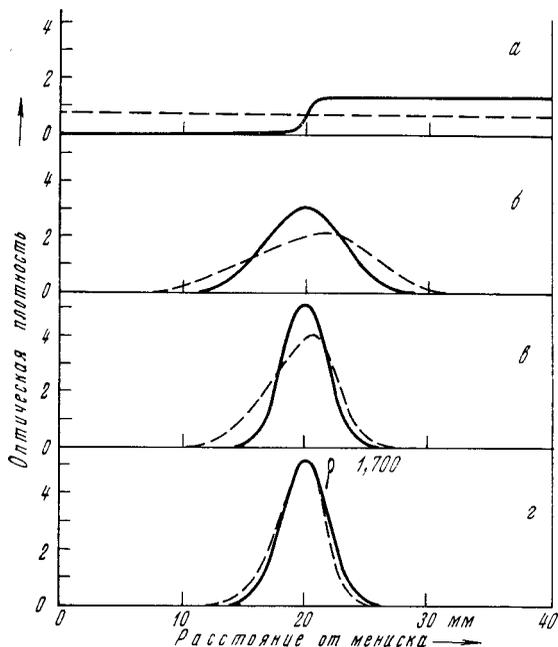


Рис. 1. Распределение ДНК при центрифугировании в капиллярах. Результаты приведены к диаметру капилляра 0,3 мм. Во всех случаях в пробу вводили  $2 \cdot 10^{-8}$  г ДНК. а — исходное распределение, б — 24 часа, в — 48 час., з — 72 часа после начала центрифугирования

при различной длительности центрифугирования, приведены на рис. 1. Видно, что в капиллярах возникает распределение ДНК, весьма напоминающее картины, наблюдаемые в препаративном плотностном анализе (7). При центрифугировании в преформированной концентрационной ступеньке (7) ширина зоны ДНК и положение максимума после 24 час. анализа меняются незначительно. При центрифугировании гомогенного раствора этот же результат достигается за 72 часа. Величина плавучей плотности ДНК, найденная по положению максимума и теоретически рассчитанному градиенту  $\text{CsCl}$  (без учета эффекта акриламида), составила  $1,700 \text{ г/см}^3$ , что хорошо согласуется с литературными данными (1, 9). В предложенном в этой работе варианте анализа ДНК уверенно определяется в количествах  $5 \cdot 10^{-8} - 10^{-8}$  на пробу и, с несколько большей погрешностью, в количествах до  $1 - 5 \cdot 10^{-9}$ . Предлагаемая нами процедура может быть, по-видимому, распространена на анализ ДНК-комплексов (10) и РНК-частиц (11).

Предлагаемый метод анализа, помимо существенного уменьшения количества анализируемого материала, решает другой важный вопрос, а именно, позволяет одновременно анализировать большое число проб (в нашем

случае 30), которые после центрифугирования консервируются фотополимеризацией для дальнейшего анализа.

Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило  
25 V 1971

Новосибирский государственный университет

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> J. Vinograd, J. E. Hearst, In: Progr. in the Chem. of Org. Natural products, 20, Wien, 1962. <sup>2</sup> С. В. Кузьмин, В. В. Матвеев и др., Биохимия, 34, 706 (1969). <sup>3</sup> T. A. Cole, T. W. Brooks, Science, 161, 386 (1968). <sup>4</sup> A. C. Peacock, C. W. Dingman, Biochemistry, 6, 4818 (1967). <sup>5</sup> W. L. Butler, K. H. Norris et al., Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., 45, 1703 (1959). <sup>6</sup> E. R. M. Kay, N. S. Simmons, A. L. Dounce, J. Am. Chem. Sci., 74, 1724 (1952). <sup>7</sup> C. F. Brunk, V. Leick, Biochim. et biophys. acta, 179, 136 (1969). <sup>8</sup> V. Neuhoff, Anal. Biochem., 23, 359 (1968). <sup>9</sup> W. Szybalski, In: Nucleic Acids, N. Y., 1966. <sup>10</sup> Ю. В. Ильин, А. Я. Варшавский, Г. П. Георгиев, Молекулярная биология, 4, 821 (1970). <sup>11</sup> A. S. Spirin, Europ. J. Biochem., 10, 20 (1969).