

УДК 532.692. : 547.963.32

БИОФИЗИКА

Ю. Ю. ВЕНГЕРОВ, В. И. ПОПЕНКО, В. А. КАДЫКОВ

НОВЫЙ МЕТОД БЕЗБЕЛКОВОЙ ПЛЕНКИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДНК

(Представлено академиком А. А. Баевым 29 V 1975)

Для приготовления электронно-микроскопических препаратов нуклеиновых кислот разработаны различные методы, из которых в настоящее время наибольшее распространение получил метод белковой пленки в той или иной модификации. Все модификации основаны на использовании пленки денатурированного белка на поверхности раздела гидрофобная — воздух (¹⁻³). При применении метода белковой пленки ДНК покрыта слоем белка, улучшающим расположение молекул на подложке. Но наличие белковой шубы является одним из недостатков метода белковой пленки, что ограничивает применение этого метода для изучения комплексов ДНК с белком.

Чтобы получить удобную для наблюдений форму молекул ДНК в отсутствие белка одни авторы добиваются увеличения жесткости нитей добавлением интеркалирующих красителей (⁴), другие заменяют цитохром с веществом небелковой природы, связывающимся с ДНК (⁵). Рядом авторов также предложены методы нанесения ДНК, использующие адсорбцию ДНК на угольные пленки-подложки, предварительно заряженные положительно (⁶), или на поверхность свежесколотой слюды, заряженной положительно с помощью ионообмена (⁷).

В нашей работе предлагается метод приготовления препаратов ДНК, позволяющий избежать внесения белка в раствор ДНК. Этот метод обеспечивает равномерное распределение на пленке-подложке молекул ДНК, имеющих удобную для наблюдений форму.

Исследуя образование белковой пленки на поверхности гидрофобной фазы 0,5 *M* ацетата аммония при нанесении раствора различных концентраций цитохрома с в 1 *M* ацетате аммония, мы обнаружили следующие закономерности. Если на поверхность гидрофобной фазы осторожно нанести каплю раствора цитохрома с, то при уменьшении концентрации белка площадь пленки сначала уменьшается, достигая минимума при концентрации белка 10—20 мкг/мл, а затем резко увеличивается. Более того, пленка образуется и при полном отсутствии цитохрома в наносимом растворе (рис. 1).

Гидрофаза находилась в тефлоновой кювете размерами 180×120×10 мм. Растекаемость наносимого раствора контролировали по меткам талька и диаметр образующегося пятна измеряли линейкой.

Из данных, представленных на рис. 1, мы сделали вывод, что наблюдаемое при низких концентрациях белка и в его отсутствие образование пленки имеет иную природу, чем образование белкового монослоя. При нанесении аммоний-ацетатного буфера высокой концентрации на поверхность гидрофобной фазы того же буфера более низкой концентрации на границе раздела гидрофобная — воздух образуется тонкий поверхностный слой буфера высокой концентрации. По аналогии с методом белковой пленки мы будем называть этот поверхностный слой пленкой, хотя, естественно, термин «пленка» здесь может быть применен лишь условно, так как образующийся на поверхности гидрофобной фазы слой буфера более высокой концентрации не имеет четкой границы.

Подобную пленку может образовывать не только аммоний-ацетатный буфер, но и растворы других солей слабых кислот и оснований. Эксперимент

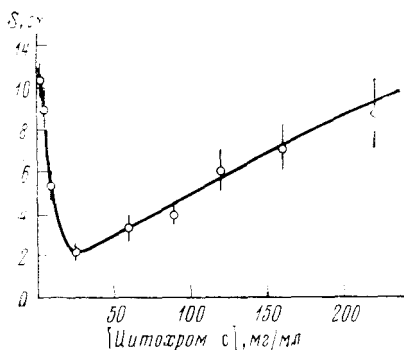


Рис 1

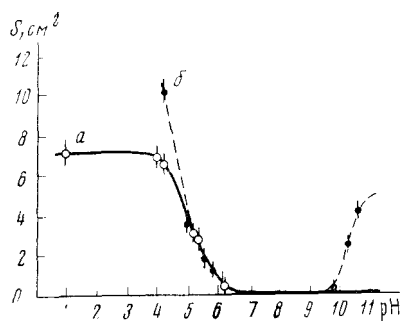


Рис 2

Рис. 1. Зависимость площади пленки от концентрации цитохрома с в наносимом растворе. Концентрация $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в наносимом растворе 1 M, в гипофазе 0,5 M при pH 5

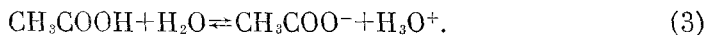
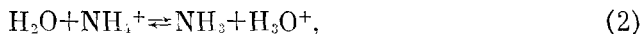
Рис. 2. Зависимость площади пленки от pH. Концентрация $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ та же, что и на рис. 1. а — для NaCH_3COO , б — $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

ментально установлено, что пленку образуют практически все обычно используемые буферы (ЭДТА, трис, цитрат натрия и т. п.). При этом присутствие в растворе катионов сильных оснований или анионных групп сильных кислот не влияет на образование пленки.

Для каждой из солей есть свой диапазон pH, в котором происходит образование описанного выше поверхностного слоя. Результаты измерения площади пленки при разных значениях pH для ацетата аммония и ацетата натрия представлены на рис. 2. Видно, что пленка образуется при тех значениях pH, где присутствуют недиссоциированные молекулы слабого основания или кислоты.

Было также обнаружено, что пленка образуется, если концентрация ацетата аммония в наносимом растворе больше, чем в гипофазе, на определенную величину, которая уменьшается с уменьшением концентрации ацетата аммония в гипофазе. При нанесении на гипофазу 0,5 M ацетата аммония для образования пленки необходимо, чтобы концентрация ацетата аммония в наносимом растворе была 0,8–0,85 M или выше. В случае использования в качестве гипофазы воды, для образования пленки достаточно концентрации 0,1 M ацетата аммония в наносимом растворе.

Полученные данные дают основание предполагать, что явление образования пленки связано с присутствием в наносимом растворе либо недиссоциированной слабой кислоты, либо недиссоциированного слабого основания. Действительно, диссоциация ацетата аммония описывается следующими уравнениями:



При значении $\text{pH} > 9$ равновесие в реакциях (2) и (3) сдвинуто вправо. В растворах с разной концентрацией ацетата аммония молекулы аммиака сольватированы в разной степени, и капля наносимого раствора, растекаясь по поверхности и образуя тонкий слой — пленку, обеспечивает максимальную поверхность контакта с гипофазой. При этом облегчается перераспределение молекул воды между гипофазой и наносимым раствором. При $\text{pH} < 6$ равновесие реакций (2) и (3) смещено влево, и образование пленки происходит благодаря присутствию молекул уксусной кислоты. Константы равновесий реакций (2) и (3) равны $4,1 \cdot 10^{-10}$ и $1,85 \cdot 10^{-5}$, что соответствует pK 9,4 и 4,7⁽⁸⁾. Таким образом, в диапазоне pH примерно от 6 до 9 в растворе ацетата аммония практически не содержится недиссо-

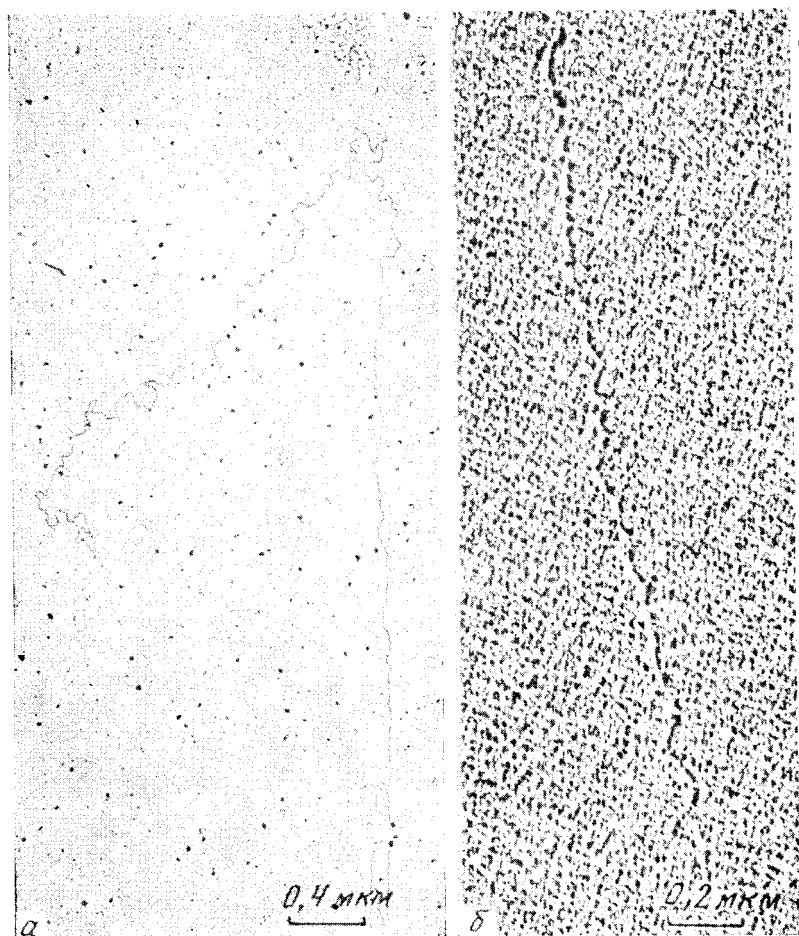


Рис. 3. *a* — микрофотография ДНК фага λ b2, 25 000 $\times$; *б* — фрагмент молекулы ДНК фага T2, 50 000 $\times$

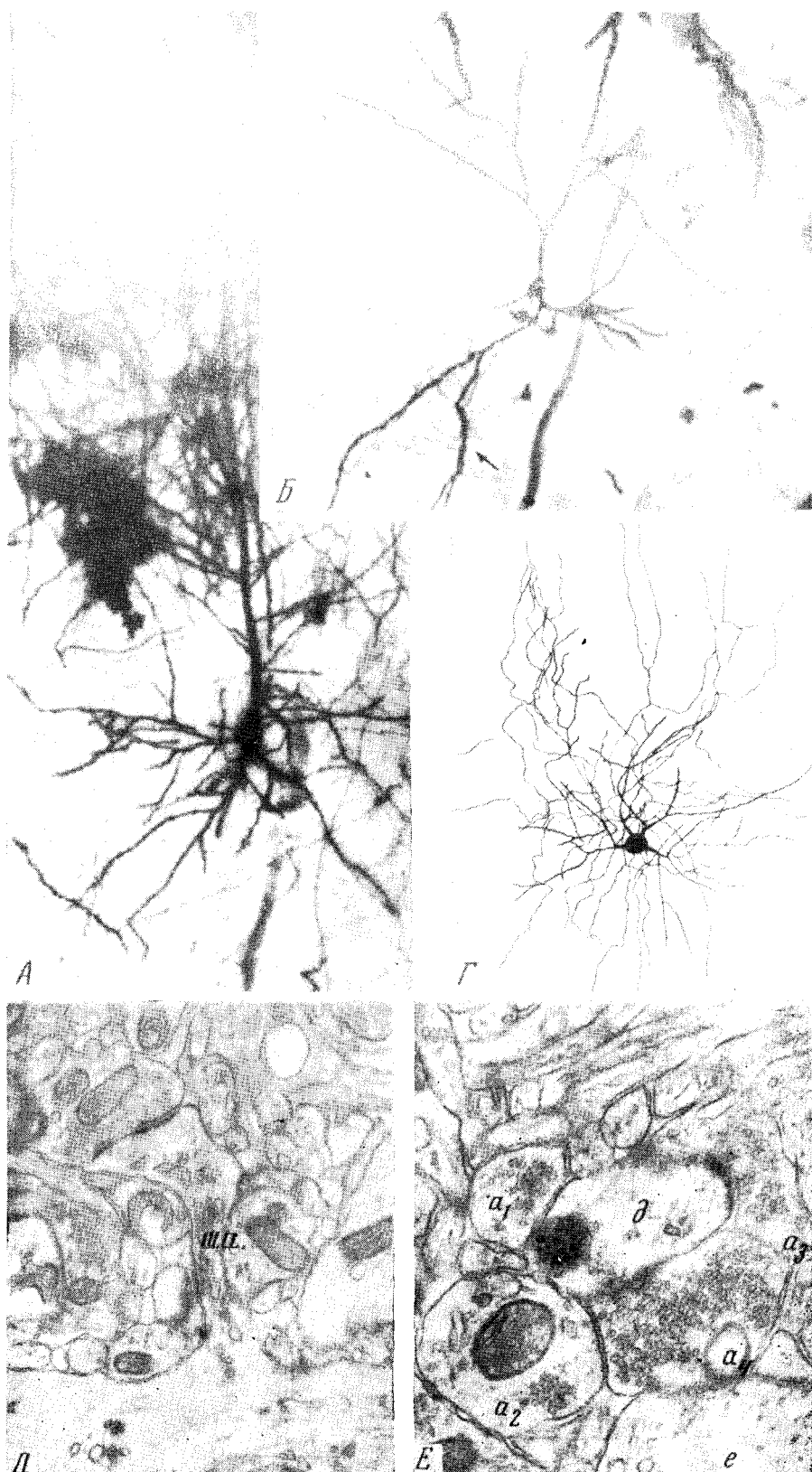


Рис. 2

цированных молекул уксусной кислоты и аммиака, и, как следует из рис. 2, в этом интервале значений pH ацетат аммония не образует пленку.

Установленные закономерности привели нас к мысли об использовании наблюдаемого равномерного распределения капли наносимого раствора по большой площади поверхности гипofазы для изучения ДНК методом электронной микроскопии. Действительно, если в наносимый раствор добавить ДНК, то при образовании пленки молекулы ДНК равномерно распределяются по поверхности гипofазы. Время жизни пленки, т. е. время выравнивания концентраций ацетата аммония в поверхностном слое и гипofазе, не менее 3—5 мин. Этого времени вполне достаточно для перенесения молекул ДНК на пленки-подложки.

Для приготовления электронно-микроскопических препаратов на поверхность гипofазы 0,5 М ацетата аммония осторожно наносили каплю раствора, содержащего 5 мкг/мл ДНК в 1 М ацетате аммония при pH 5. К поверхности образовавшегося пятна прикасались сеточкой, покрытой угольной пленкой, затем сеточку промывали в 96% этаноле 10—20 сек. Полученные препараты оттеняли сплавом платины с палладием под углом в 6°. Выбор ацетата аммония в качестве буфера для нанесения ДНК объясняется тем, что при высушивании он не дает нежелательного фона на подложке. По описанной методике препараты ДНК можно готовить при различных значениях pH (от 3 до 11).

На рис. 3а представлена микрофотография ДНК фага $\lambda b2$, нанесенной на пленки-подложки описанным способом при pH 5. Распределение по длинам 52 произвольно взятых молекул показало следующее. Средняя длина молекул составляет $11,4 \pm 0,2$ мкм. Малый разброс молекул по длинам (от 10,5 до 12 мкм) дает основание считать, что при нанесении они не подвергаются деформациям и находятся на подложке в ненапряженном состоянии.

Для определения толщины молекул, нанесенных на пленки-подложки по описанной методике, использовали напыление под углом в 6° с двух взаимно перпендикулярных направлений (рис. 3б). Диаметр молекул, измеренный по длине тени, составляет 20—25 Å, что соответствует истинному диаметру молекулы ДНК.

Предлагаемый метод нанесения ДНК для электронной микроскопии имеет ряд преимуществ перед другими методами. Во-первых, он прост; во-вторых, его применение позволяет избежать привнесения белка в раствор ДНК и дает возможность наблюдать нити, толщина которых соответствует истинной толщине нити ДНК; в-третьих, этот метод дает возможность наносить ДНК в широком диапазоне ионных сил и pH.

В заключение мы хотим выразить свою благодарность А. С. Тихоненко и Э. Н. Трифонову за полезное обсуждение полученных результатов, а также, за любезно предоставленный препарат ДНК фага $\lambda b2$.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
14 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. K. Kleinschmidt, *Methods in Enzymology*, v. 12B, N. Y., 1968, p. 361.
² D. Lang, H. Bujard et al., *J. Mol. Biol.*, v. 23, 463 (1967). ³ D. Lang, *J. Mol. Biol.*, v. 54, 557 (1970). ⁴ T. Koller, J. M. Sogo, H. Bujard, *Biopolymers*, v. 13, 995 (1974).
⁵ T. J. Vollenweider, J. M. Sogo, Th. Koller, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 72, 83 (1975). ⁶ J. Dubochet, M. Ducommun et al., *J. Ultrastr. Res.*, v. 35, 147 (1971).
⁷ C. N. Gordon, *J. Mol. Biol.*, v. 78, 604 (1973). ⁸ Курс физической химии, под ред. Я. И. Герасимова, Н. И. Матвиенко, т. 2, М., «Химия», 1966.

Рис. 2. Нейроны «ассоциативной» области коры ежа. А — пирамидная клетка III слоя; Б — короткоаксонная пирамидная клетка II слоя; В — место контакта (указано стрелкой на Б) аксона с дендритом своей клетки; Г — короткоаксонная звездчатая клетка II слоя. Метод Гольджи, об. 10×, ок. 20×. Д, Е — синапсы в «ассоциативной» области коры ежа: Д — аксошипииковый синапс (*u.a.* — шипиковый аппарат), Е — синаптический комплекс (δ — дендрит, а — аксон)