

Т. Н. ЕВРЕИНОВА и Н. В. КОРОЛЕВ

**ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
В КОАЦЕРВАТАХ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 13 IX 1952)

В процессе возникновения жизни на земле, по теории, развиваемой А. И. Опариным, большую роль играет обособление органического вещества в форме крупных надмолекулярных белковых комплексов — коацерватов. Коацервация — это физико-химическое явление, сопровождающееся отщеплением из раствора капель более концентрированного коллоида. Возникшие капли обладают рядом свойств, отличных от свойств раствора, из которого они образовались. При дальнейшей эволюции таких коацерватов имеют значение не только общие для всех капель свойства, но и те характерные черты, которые присущи каждой индивидуальной коацерватной капле^(8, 9).

Коацерватные капли могут состоять из различных веществ, как например, углеводов, белков, липоидов, а также и нуклеиновых кислот⁽¹¹⁾. Одним из таких сложных коацерватов являются капли, образовавшиеся из гуммиарабика, желатины и нуклеиновой кислоты. При долгом стоянии и при центрифугировании капли сливаются, образуя коацерватный слой. Определить содержание нуклеиновых кислот в таком слое можно различными химическими методами. Однако эти методы не применимы для определения концентрации нуклеиновой кислоты, содержащейся в одной коацерватной капле.

В последнее время все большее значение приобретает определение концентрации нуклеиновой кислоты спектроскопическими методами. Известно, что нуклеиновые кислоты прозрачны для видимых лучей, но весьма интенсивно поглощают ультрафиолетовое излучение в области длин волн короче 300 м μ . Первый максимум поглощения ультрафиолетовых лучей нуклеиновыми кислотами находится при длине волны 260 м μ ⁽⁷⁾. Измеряя поглощение ультрафиолетовых лучей, удается обнаружить присутствие нуклеиновых кислот в растворах в количестве 10⁻⁹ мг⁽⁵⁾.

Ультрафиолетовый микроскоп и спектральная насадка к нему, сконструированные Е. М. Брумбергом и С. А. Гершгориным⁽⁴⁾, дают возможность определять концентрацию нуклеиновых кислот не только в растворах, но и в форменных образованиях, к которым относятся и коацерваты.

В предлагаемой работе были проведены наблюдения в ультрафиолетовых лучах над коацерватными каплями, содержащими дрожжевую нуклеиновую кислоту, а также определено количество этой кислоты в одной коацерватной капелке.

I. Виды коацерватных капель в ультрафиолетовых лучах. Для получения коацерватов бралось 3 мл раствора

0,67% гуммиарабика и 5 мл 0,67% желатинны. Смесь подкислялась до рН 3,5—4,0 и нагревалась до +40—42°. Образовавшиеся капли коацервата рассматривались с помощью визуального ультрафиолетового микроскопа при освещении его поля зрения ультрафиолетовым излучением ртутной лампы высокого давления. В состав ультрафиолетового излучения, выделяемого из стекла УФС-1 и хлорно-бромным светофильтром, входят три яркие ртутные линии: 254, 265 и 280 м μ . Как оказалось, коацерватные капли и окружающий их раствор остаются прозрачными как для ультрафиолетовых лучей в области 250—280 м μ , так и для лучей видимых.

После добавления к раствору с каплями коацервата натриевой соли дрожжевой нуклеиновой кислоты (растворенной в небольшом количестве воды) капли коацервата интенсивно поглощают ультрафиолетовое излучение в области 250—280 м μ , оставаясь прозрачными для видимых лучей. Вид коацерватных капель, набравших в себя натриевую соль дрожжевой нуклеиновой кислоты, так, как они выглядят через визуальный ультрафиолетовый микроскоп, представлен на рис. 1. Микрофотография рис. 2 а дает вид тех же капель через микроскоп при освещении их видимым светом, а микрофотография рис. 2 б — их вид при освещении ультрафиолетовым излучением в области 250—280 м μ . Эти снимки получены на приборе МУФ-2. Цветная микрофотография (см. рис. 1) выполнена В. П. Дуткинским с позитивных снимков 2 а и 2 б на хромоскопе, прилагаемом к прибору МУФ-2.

При получении коацерватов во всех последующих опытах натриевая соль дрожжевой нуклеиновой кислоты растворялась непосредственно в 0,67% гуммиарабике для того, чтобы не нарушать равновесия коацерватной системы. При помощи визуального ультрафиолетового микроскопа удалось установить, что с увеличением концентрации дрожжевой нуклеиновой кислоты до известного предела вся она удерживается в коацерватных каплях и может быть обнаружена в окружающем капли растворе лишь при переходе за этот предел. Например, при содержании 48,75 мг% дрожжевой нуклеиновой кислоты вся она переходит в коацерватные капли, а при 192,5 мг% часть ее остается в растворе. (Пересчет на дрожжевую нуклеиновую кислоту производился по количеству фосфора, содержащегося в абсолютно сухой навеске натриевой соли дрожжевой нуклеиновой кислоты с умножением его на коэффициент: 10,3 (1).)

Аналогичные результаты были получены при определении дрожжевой нуклеиновой кислоты в коацерватном слое по количеству содержащегося в нем фосфора.

II. Количественное определение дрожжей нуклеиновой кислоты в коацерватной капле. Содержание дрожжевой нуклеиновой кислоты в отдельной коацерватной капле определялось на основе измерения прозрачности коацерватных капель для ультрафиолетовых лучей. Исходя из результатов, полученных ранее, в 8 мл раствора коацервата содержалось 48,75 мг % дрожжевой нуклеиновой кислоты. Такой коацерватный раствор наливался в кювету со стенками из кварцевых предметных стекол. Расстояние между внутренними поверхностями кюветы было равно 0,1 мм. Кювета помещалась на столик ультрафиолетового микроскопа и освещалась излучением ртутной лампы ПРК-4 через зеркально-линзовый микрообъектив 40 \times 0,5. Другим таким же микрообъективом содержимое кюветы изображалось в плоскость щели спектральной насадки. Расположив таким образом изображение капли, производили фотографирование спектра.

Для измерения прозрачности коацерватной капли рядом с разложенным в спектр излучением, проходящим через каплю, фотографировалось также излучение, проходящее мимо капли, но ослабленное ступенчатым ослабителем. Для того чтобы учесть поглощение ультрафиолетовых лу-

чей гуммиарабиком и желатиной, был сфотографирован спектр, изображенный на рис. 3 а, через коацерватную каплю, которая не содержала нуклеиновой кислоты. Этот снимок показывает, что заметное поглощение излучения наступает только в области короче 254 м μ . На рис. 3 б приводится спектр коацерватных капель, содержащих натриевую соль дрожжевой нуклеиновой кислоты. Снимок сделан при освещении ультрафиолетовыми лучами в области 250—280 м μ . Спектр ясно показывает, что капля сильно поглощает ультрафиолетовые лучи в области короче 300 м μ и почти совсем не поглощает видимого света.

Обработка результатов фотографирования спектров производилась на микрофотометре. Измерив плотности почернения фотопластины, вызванные излучениями, которые прошли через каплю и градуированный ступенчатый ослабитель, сравнением почернений находили ослабление света в коацерватной капле. Концентрация нуклеиновой кислоты в капле находилась при помощи известной формулы Бугера — Беера (10):

$$I = I_0 \cdot 10^{-(x_1 c_1 + x_2 c_2 + \dots + x_n c_n) d} \quad (1)$$

Здесь I_0 — интенсивность падающего света, I — интенсивность света после прохождения через слой вещества толщиной d , c_i — концентрации компонент, x_i — коэффициенты погашения компонента для излучения с данной длиной волны.

Из формулы видно, что для определения концентрации нуклеиновой кислоты, кроме отношения I/I_0 и размера капли d , необходимо знать еще коэффициент погашения для употребляемой Na-соли дрожжевой нуклеиновой кислоты x в той области спектра, где он достаточно велик. С этой целью был снят спектр поглощения через раствор натриевой соли дрожжевой нуклеиновой кислоты, в котором концентрация дрожжевой нуклеиновой кислоты равнялась 390 мг% при толщине слоя 0,1 мм.

Результаты обработки спектрограмм для линии 280 м μ приводятся в табл. 1.

Из формулы (1) можно найти, что коэффициент погашения для нуклеиновой кислоты при $\lambda = 280$ м μ должен определяться по формуле

$$x = \frac{2 - \lg\left(\frac{I}{I_0} \cdot 100\right)}{cd} = \frac{2 - 1,0}{390 \cdot 0,01} \approx 0,25 \frac{1}{\text{см} \cdot \text{мг}\%}$$

После несложных преобразований из формулы (1) для нахождения концентрации дрожжевой нуклеиновой кислоты в коацерватной капле получается следующая формула:

$$c_1 = \frac{\lg\left(\frac{I_2}{I_0} \cdot 100\right) - \lg\left(\frac{I_1}{I_0} \cdot 100\right)}{x d} \quad (2)$$

Здесь I_2/I_0 — ослабление света коацерватной каплей диаметра d_2 , не содержащей Na-соли дрожжевой нуклеиновой кислоты; I_1/I_0 — ослабление света каплей диаметра d_1 , содержащей Na-соль дрожжевой нуклеиновой кислоты; x — коэффициент погашения нуклеиновой кислоты.

Таблица 1

	$\lg \frac{I}{I_0} \cdot 100$ для $\lambda = 280$ м μ
Раствор Na-соли дрожжевой нуклеиновой кислоты, $d = 0,1$ мм	1,00
Капля коацервата с Na-солью дрожжевой нуклеиновой кислоты, $d_1 = 29$	1,39
Капля коацервата без Na-соли дрожжевой нуклеиновой кислоты, $d_2 = 29$	1,94

В формуле (2) не принято во внимание изменение концентрации желатина и гуммиарабика при соединении их с натриевой солью дрожжевой нуклеиновой кислоты, а также ослабление света за счет отражения на поверхностях капли. Однако это не может внести большой ошибки, так как желатина и гуммиарабик имеют малый коэффициент погашения света в области 280 м μ , а отражение света на поверхностях капли столь мало по величине, что ошибка по этой причине будет гораздо меньше ряда других ошибок, возникающих при фотографировании спектров и их фотометрировании.

Концентрация c_1 дрожжевой нуклеиновой кислоты в капле коацервата диаметром $d_1 = 29 \mu$ будет:

$$c_1 = \frac{1,94 - 1,39}{0,25 \cdot 29 \cdot 10^{-4}} \approx 760 \text{ мг}\%.$$

Содержание дрожжевой нуклеиновой кислоты в 8 мл коацерватного раствора, из которого была взята капля, составляло 48,75 мг%. Таким образом, концентрация дрожжевой нуклеиновой кислоты в капле примерно в 15 раз больше, чем в исходном растворе. Коацерватные капли концентрируют дрожжевую нуклеиновую кислоту. Более высокое содержание нуклеиновых кислот в коацерватном слое по сравнению с окружающим раствором также было определено ранее и химическим методом.

Объем исследованной коацерватной капли, содержащей натриевую соль дрожжевой нуклеиновой кислоты, был равен $12,7 \cdot 10^{-6}$ мм³. Количество дрожжевой нуклеиновой кислоты в такой капле равнялось $9,6 \cdot 10^{-5}$ мг, что соответствует $2,8 \cdot 10^{13}$ молекулам дрожжевой нуклеиновой кислоты (2).

Авторы приносят глубокую благодарность акад. А. И. Опарину и Е. М. Брумбергу за ценные указания, которые были ими сделаны при проведении данной работы. Авторы пользуются также возможностью поблагодарить И. Л. Ильеву за помощь при постановке опытов и С. Е. Манойлова за предоставление препарата натриевой соли дрожжевой нуклеиновой кислоты.

Поступило
21 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Белозерский и Н. И. Проскуряков, Практическое руководство по биохимии растений, 1951.
- ² Э. Болдуин, Основы динамической биохимии, 1949.
- ³ Е. М. Брумберг, Изв. АН СССР, сер. физ., **6**, 32 (1942).
- ⁴ Е. М. Брумберг, Ф. М. Пекерман, там же, **13**, 218 (1949).
- ⁵ Л. Ф. Ларионов, М. П. Бухман, Журн. общ. биол., **12**, 394 (1951).
- ⁶ Э. Лехер, Курс физики для медиков и биологов, 1931.
- ⁷ С. Е. Манойлов, Б. А. Орлов, О. Н. Сеткина, Биохимия, **13**, 337 (1948).
- ⁸ А. И. Опарин, Происхождение жизни на земле, 1940.
- ⁹ А. И. Опарин, Журн. общ. биол., **12**, 369 (1951).
- ¹⁰ В. М. Чулановский, Введение в молекулярный спектральный анализ, 1951.
- ¹¹ H. Bungenberg de Jong, La coacervation, Actual. scient. industr. exp. Biologie, Paris, 1936.

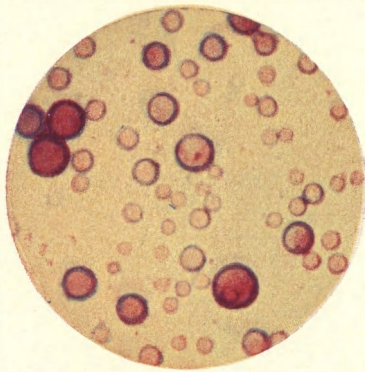


Рис. 1

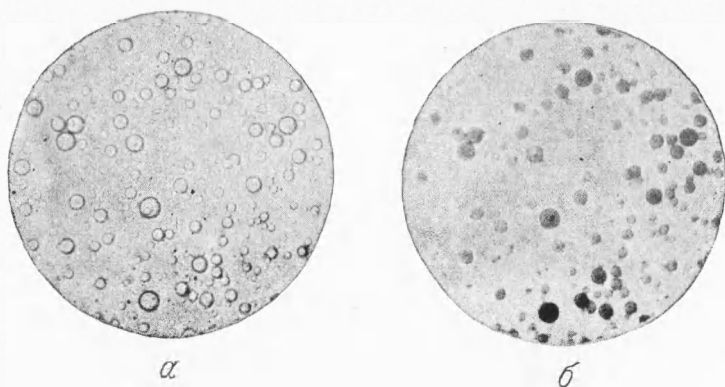


Рис. 2. $\times 80$

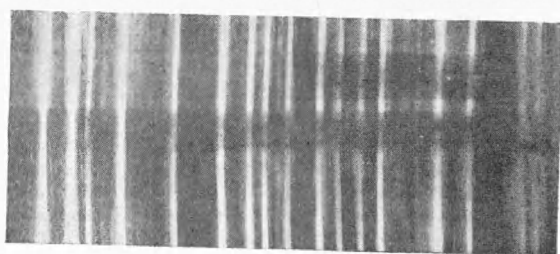
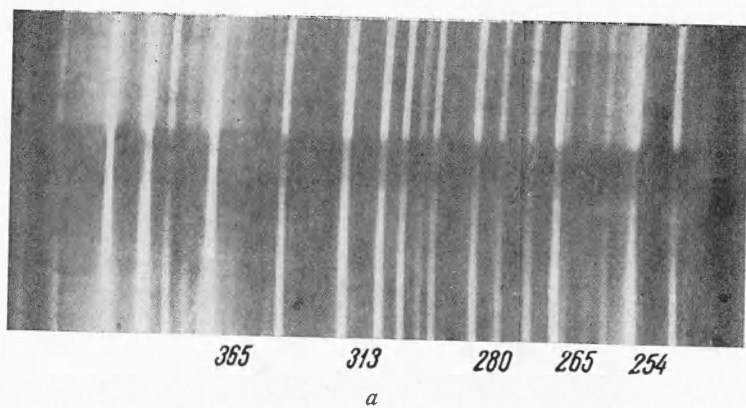


Рис. 3. $\times 320$