

Электрофорез клеток и биологических макромолекул получил широкое распространение как один из основных методов их фракционирования и анализа. Он отличается универсальностью, доступностью технических средств и методик, высокой разрешающей способностью. III Всесоюзное рабочее совещание по теории и практике электрофореза, состоявшееся в Каневе в мае 1985 г., позволило обсудить различные варианты и приложения этого метода, оценить перспективные направления его развития. Содержание наиболее показательных для современного состояния метода электрофореза докладов, заслушанных на совещании, отражено в статьях и хронике, опубликованных в этом выпуске журнала. В них представлены отечественные достижения в разработке аппаратуры и реактивов для электрофореза, оригинальных методик и теоретических моделей.

УДК 57.086.088.3

## БЕЛКОВЫЙ БЛОТИНГ

Б. А. Маргулис

Метод белкового блотинга, сочетающий высокую разрешающую способность электрофоретических техник с огромной чувствительностью твердофазного анализа макромолекулярных комплексов, применяют для идентификации ДНК- и РНК-связывающих белков, гликопротеидов, ферментов, для определения специфичности антигенов и антител. Само название метода говорит о сущности процедуры (блот — англ. — промокашка), которая заключается в переносе зон полипептидов после электрофореза (ЭФ) из толщи акриламидного или агарового геля на поверхность целлюлозной мембраны или аффинной бумаги. Находясь в иммобилизованном состоянии на таких репликах или отпечатках, белки доступны для взаимодействия с другими молекулами, в растворе которых инкубируется блот. Основы метода изложены в книге Л. А. Остермана [1]. В данном сообщении приведена характеристика отдельных этапов блотинга и даны примеры использования этого метода в молекулярнобиологических исследованиях.

Белковый блотинг производится в следующей последовательности: ЭФ, перенос белков на реплику, исключение центров неспецифического связывания на блоте и чередующиеся этапы формирования комплексов типа белок — белок (или белок — ДНК) и отмывок слабо или неспецифически связанных молекул с поверхности блота. Последним этапом является автордиография блота или выявление специфически связанной с зонами биологической активности. Согласно порядку процедур при блотинге, рассмотрим подробнее этапы эксперимента.

**Электрофорез.** Для разделения белков или пептидов можно использовать любой подходящий метод ЭФ в вертикальном блоке или тонком слое, включая наиболее чувствительный, двухмерный ЭФ [2, 3]. Поскольку часть блота можно окрашивать на общий белок (Амидо черным или Кумасси), рекомендуется на соседние с необходимой для опыта дорожки наносить смесь белков — стандартов с известными молекулярными массами. После переноса блот разрезается вдоль направления ЭФ, и одна полоса используется для выявления специфических комплексов, другая — окрашивается. Таким образом можно определить молекулярную массу исследуемого белка, перенесенного на блот.

Материалы для блотинга. В качестве сорбирующей пленки обычно используют нитроцеллюлозные мембраны фирм «Schleicher and Schulle» (ФРГ) или «Millipore» (США). Размер пор нитроцеллюлозных пленок — 0,22 или 0,45 мкм. С 1984 г. начался выпуск нитроцеллюлозных мембран на нейлоновой основе для многократного использования [4]. Белковый блотинг можно проводить на аминокбензилоксиметил целлюлозной бумаге, которую применяют в качестве ионообменного носителя, но она нуждается в предварительной активации [5].

Перенос белков на мембрану. Есть два основных варианта приготовления отпечатков с геля: пассивный диффузионный перенос (или в условиях повышенного осмоса) по Саузерну и электро-блотинг, Вестерн-блотинг. В первом случае в какой-либо емкости собирается «сэндвич», состоящий из следующих элементов: стопка листов фильтровальной бумаги, нижний блот (нитроцеллюлоза), гель, верхний блот, стопка фильтров, стекло, груз. Нижнюю стопку фильтров погружают в раствор для блотинга или соединяют с ним при помощи мостиков из фильтровальной бумаги. В качестве такого раствора мы применяли 10-кратный электродный буфер для ЭФ по Лаэммли [2] или тот же неконцентрированный раствор (20 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3—8,6). Процедура диффузионного переноса длится от 8—12 ч до нескольких дней. Эффективность его определяется концентрацией геля, размером мембранных пор и молекулярной массой белков [6]. В наших опытах метод с применением мембраны 0,45 мкм при длительности переноса 12—14 ч подходит для белков с молекулярными массами менее 100 000. При одновременном использовании двух блотов с обеих сторон геля после нативного изoeлектрофокусирования (буфер: 10 мМ трис-НСl, рН 8,15) 40 % белкового материала переходит в нижний, 60 % — в верхний блот. Эффективность любого из видов блотинга можно проверить окрашиванием геля, с которого приготовлена реплика, и сравнением с необработанным гелем.

Метод электропереноса белков предложен в работе [8]. Блотинг производится в специальных камерах, смонтированных по следующей схеме: катод, сборка, содержащая гель и блот, и анод. Гель и блот должны плотно прижиматься друг к другу. Основные требования к конструкции: отсутствие пузырьков воздуха в сборке и равномерность электрического поля. Для электропереноса белков с геля после ЭФ с DS-Na [2, 3] применяют раствор: 20 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3—8,6, 20 %-ный метанол [8]. Метанол (по нашим данным, его можно заменить этанолом) служит для растворения DS-Na, т. е. для частичной ренатурации белков, переносимых на блот. Удаление метанола из электродного раствора приводит к ускорению переноса, а введение 0,1 %-ного DS-Na обеспечивает более полный перенос крупных белков с молекулярными массами около 100 000 [6]. Электроблотинг с «кислых гелей» (например, после ЭФ гистонов) проводится в растворе 0,9 М уксусной кислоты при обратной полярности. При величине градиента напряжения 5—6 В/см и токе 300 мА электроблотинг проходит за 1—3 ч [8], однако можно увеличить это время до 12—14 ч (т. е. в течение ночи). Недавно появилось сообщение об использовании горизонтального прибора для получения сразу большого количества реплик [9].

После окончания переноса белков блот быстро промывают в нескольких сменах воды либо в солевых растворах: 0,14 М NaCl, 10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,2—7,4 (ЗФС) или 0,14 М NaCl, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4—7,5 (ЗТС). Высушенный после промывки блот можно хранить по крайней мере несколько дней. Часть блота обычно используют для определения позиции маркерных зон и для проверки качества блотинга. Эта полоса реплики окрашивается в растворах: 0,1 %-ный Амидо черный 10 В, 25 %-ный изопропанол (или 40 %-ный метанол), 10 %-ная уксусная кислота или 0,2 %-ный Кумасси ярко голубой R-250, 10 %-ный метанол, 10 %-ная уксусная кислота. Обесцвечивание фона производится в тех же растворах (без красителя).

Основную, неокрашенную часть блота используют для формирования и выявления специфических комплексов, чаще всего иммунных. Процедуры иммуноблотинга после переноса белка на реплику проводятся в следующем порядке.

1. Блокирование неспецифически активных участков блота. Для этого применяются растворы в ЗФС или ЗТС белков: 1—5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1—3 % овальбумина, 10—15 % сыворотки крупного рогатого скота, 0,25 % желатина, 14 % обезжиренного молока и т. д. Инкубация в блокирующем растворе при помешивании длится 45—60 мин.

2. Взаимодействие с первыми антителами. Специфические антитела добавляют к блокирующему раствору в концентрации 1—10 мкг/мл; при использовании неочищенной сыворотки последнюю разбавляют ЗФС или ЗТС в соответствии с титром. Нанесение первых антител на блот производится в течение 60—150 мин.

3. Отмывка неспецифически связывающихся первых антител. После нескольких быстрых промывок в ЗФС или ЗТС для удаления белков со стенок сосуда следуют 2—3 инкубации с постоянным помешиванием в растворах 0,05 %-ного Твина-20 или Нонидета Р-40 в ЗФС или ЗТС.

4. Инкубация с мечеными вторыми антителами или белком А. Последний этап формирования иммунного комплекса заключается в добавлении вторых антител, конъюгированных с каким-либо ферментом (пероксидаза, щелочная фосфатаза или галактозидаза), или меченных  $^{125}I$ . При использовании конъюгата концентрация вторых антител 1—10 мкг/мл; меченые антитела или белок А разбавляют до содержания метки  $1—2 \cdot 10^6$  имп·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ . Вторые антитела растворяют в блокирующем растворе; время инкубации составляет 45—60 мин для меченых антител и 60—90 мин — для конъюгатов.

В последнее время для иммуноферментного анализа на блоте применяют ПАП — комплекс пероксидазы с антителами к пероксидазе. Опыт идет по такой схеме: антиген — первые антитела — вторые антитела — ПАП. Первые антитела и антитела к пероксидазе должны быть выработаны в животных одного вида. Недавно появилось сообщение о применении иммунозолота для белкового блотинга [10]. В этом случае меткой для образованного иммунного комплекса служат частицы коллоидного золота с прикрепленными вторыми антителами. Чувствительность метода иммуноблотинга может быть повышена при использовании биотинилированных вторых антител и авидина с изотопной и ферментативной меткой [11]. Применяют также способ модификации антигенов, например динитрофенолом, и выявление зон антителами к модифицирующим лигандам [12].

5. Отмывка блота после инкубации со вторыми антителами. Эта процедура производится в соответствии с пунктом 3. Для снижения фоновой окраски или активности можно повышать концентрацию неионного детергента.

Рассмотрим два примера использования метода иммуноблотинга для анализа специфичности моно- и поликлональных антител к  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерферонам человека.

А. В Институте цитологии АН СССР (совместно с ВНИИОНБ Главмикробиопрома при СМ СССР) была получена серия моноклональных антител (МКА) к лейкоцитарному ( $\alpha_2$ ) интерферону человека. Анализ специфичности МКА к  $\alpha_2$ -интерферону проводили методом иммуноблотинга. Антиген, содержащийся в бактериальном экстракте, наносили на 13 %-ный полиакриламидный гель в концентрации  $1—3 \cdot 10^5$  МЕ на лунку. Перенос белка на нитроцеллюлозу (ФРГ, ВА85, 0,45 мкм) проводили при токе 300 мА в приборе собственной конструкции. После переноса блот инкубировали 1 ч в растворе 15 %-ного БСА, куда затем добавляли МКА 218. Блот инкубировали ночь с этими антителами, отмывали в растворе 0,05 %-ного Твин-20 и 1 ч в растворе меченных  $^{125}I$  вторых антител в ЗФС ( $10^6$  имп·мин $^{-1}$ ·мл $^{-1}$ ). Мечение антимиоциновых кроличьих антител производили по стандартному методу

с хлорамином Т до удельной активности  $2 \cdot 10^7$  имп·мин<sup>-1</sup>·мкг<sup>-1</sup> Ig. Отмывку вторых антител проводили в двух сменах (по 30 мин) раствора: 3ФС, 0,5 %-ный Нонидет Р-40, 0,1 %- DS-Na, 0,2 %-ный желатин, 5 мМ ЭДТА. На рис. 1 представлена электрофореграмма бактериального экстракта и фотография блота. Отметим высокую специфичность метода при использовании МКА.

Б. Поликлональные антитела (в кролике) к  $\beta$ -интерферону для анализа экспрессии этого белка в клетках человека *HeLa* в норме и при

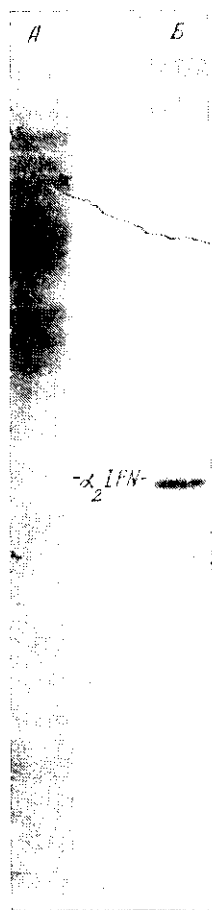


Рис. 1. Определение специфичности моноклональных антител МКА 218 к  $\alpha_2$ -интерферону человека: А — электрофореграмма бактериального экстракта, содержащего  $\alpha_2$ -интерферон ( $\alpha_2$ -IFN) (13 %-ный ПААГ); Б — автордиограмма с иммуноблота после его обработки МКА 218 и кроличьими (антимышиными)  $^{125}\text{I}$ -IgG.

Fig. 1. Determination of the specificity of monoclonal antibodies МКА 218 for human  $\alpha_2$ -interferon: А — electrophoretic pattern of bacterial lysate, containing  $\alpha_2$ -interferon ( $\alpha_2$  IFN) (13 % PAAG); Б — autoradiogram of immunoblot after its incubation with МКА 218 and rabbit (antimouse)  $^{125}\text{I}$ -IgG.

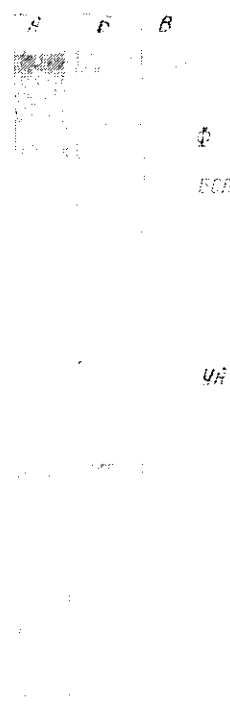


Рис. 2. Выявление  $\beta$ -интерферона в клетках человека *HeLa*: иммуноблоты, полученные с геля (12 %-ный ПААГ) после ЭФ экстрактов нормальных клеток (А) и клеток после теплового шока в течение 40 мин при 44 °С (Б) (блоты обработаны моноспецифическими антителами к  $\beta$ -интерферону и конъюгатом антикроличьих антител с пероксидазой); В — блот с перенесенными стандартами молекулярных масс: фосфорилаза *b* ( $\Phi$ ) — 94 000; BSA — 67 000; угольная ангидраза (YA) — 30 000.

Fig. 2. Detection of  $\beta$ -interferon in human *HeLa* cells: А, Б — immunoblots of the gels (12 % PAAG) after the electrophoresis of normal (А) and heat-shocked (44 °С, 40 min) cell extracts (Б). Blots were treated by anti- $\beta$ -interferon monospecific antibodies and antirabbit antibodies conjugated with

peroxidase; В — blot with molecular-weight standards (Pharmacia):  $\Phi$  — phosphorylase *b*, 94 kD, BSA — bovine serum albumin, 67 kD, YA — carbonic anhydrase, 30 kD.

действию теплового шока. Белки клеточных препаратов разделяли по Лаэммли [2] и переносили на мембрану ВА85. Блот инкубировали в ЗТС с 1 %-ным овальбумином 1 ч. Затем в инкубационный раствор добавляли антитела к  $\beta$ -интерферону (ВНИИгенетики Главмикробиопроба при СМ СССР) до концентрации, не превышающей 1 мкг/мл. После 3—4 ч инкубации и отмывок в 0,05 %-ном Твин-20 ЗТС блот переносили в раствор антикроличьих антител, полученных из овечьей сыворотки и конъюгированных с пероксидазой хрена (препарат Ин-та вакцин и сывороток МЗ СССР, Ленингр. обл.) и разбавленных в ЗТС с 0,05 %-ным Твин-20. Через 1 ч блот снова промывали и помещали в раствор диаминобензидина (1 мг/мл в 50 мМ трис-НСl, рН 7,5), куда добавляли 3,5 мкл  $\text{H}_2\text{O}_2$ . На рис. 2 представлена фотография окрашенного блота. Зона  $\beta$ -интерферона выявляется в нормальных и обработанных теплом клетках. По данным радиоиммуноанализа, с теми же антителами на плате синтез  $\beta$ -интерферона в *HeLa* после теплового шока не идет. Результаты блотинга в этом случае указывают на сохра-

нение в течение 3 ч (45 мин — тепловой шок и 2 ч 15 мин — восстановление и мечение) исходного пула интерферона в клетках.

Рост количества работ с использованием белкового блотинга, появившихся в последние годы, свидетельствует о широких возможностях метода. Появились сообщения об использовании его для характеристики олигосахаридных цепей гликопротеинов [13], гликолипидов [14], мембранных белков бактерий [15], изоферментов креатинкиназы [16] и динеинов [17]. Необходимо отметить также работы по совершенствованию самой техники блотинга: приготовление нескольких последовательных иммунореплик с одного блота [18], применение блотов для очистки антигенов [19, 20], использование флюорографии [21] и высокоэффективных иммунохимических методов [17] для выявления белковых зон на блотах. Как и любой другой метод, белковый блотинг имеет ограничения, связанные с особенностями антигена, техникой переноса или сорбирующей способностью мембран [22]. Способ обойти подобные затруднения и выбрать оптимальный вариант процедуры блотинга заключается в проведении предварительных экспериментов с каждым новым антигеном (или антителами) в системе капиллярного точечного блотинга (дот-блотинг). Антиген (или антитела) наносится точками на мембрану [23] в различных разбавлениях и в разных буферных растворах с детергентом или без него. Отработав способ нанесения антигена (аналог блотинга), титр антител, условия отмывок и определив общую чувствительность метода и эффективность системы сборки комплексов, можно переходить к опытам по методу иммуноблотинга.

## THE PROTEIN BLOTTING

*B. A. Margulis*

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

### Summary

The detailed procedure of protein blotting is described in the following order: protein transfer onto the replica, blocking of the non-specific interactions, the interaction of the immobilized antigen with the 1st and 2nd antibodies, the visualization of immune complexes on the blot. Two practical applications of immunoblotting are considered when analyzing anti- $\alpha_2$ -interferon monAbs' specificity and investigating  $\beta$ -interferon expression in human *HeLa* cells.

1. *Остерман Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. — М.: Наука, 1983.—304 с.
2. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of T4 // *Nature*. — 1970.—227, N 5259. — P. 680—685.
3. *O'Farrell P. H.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins // *J. Biol. Chem.* — 1975.—250, N 10. — P. 4907—4921.
4. *Chromatography. Electrophoresis. Immunochemistry: BioRad Catalogue K1985.* — Richmond: BioRad Lab., 1985.—256 p.
5. *Products for nucleic acids and protein research: Schleicher and Schull Catalogue.* — Dassel: Schleicher and Schull, 1982.—11 p.
6. *Sodium dodecyl sulfate-mediated transfer of electrophoretically separated DNA binding proteins / A. M. Aubertin, L. Tondre, C. Lopez et al. // Anal. Biochem.* — 1983.—131, N 1.— P. 127—134.
7. *Reinhardt M. P., Malamud D.* Protein transfer from isoelectric focusing gels: the native blot // *Ibid.* — 1982.—123, N 2. — P. 229—235.
8. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1979.—76, N 9. — P. 4350—4354.
9. *Manabe T., Takahashi Y., Okuyama T.* An electroblotting apparatus for multiple replica technique and identification of human serum proteins on micro two-dimensional gels // *Anal. Biochem.* — 1984.—143, N 1. — P. 39—45.
10. *Sensitive visualisation of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining / M. Moeremans, G. Dancels, A. van Dijk et al. // J. Immunol.* — 1984.—74, N 3. — P. 353—360.
11. *Heggeness M. H., Ash J. F.* Use of the avidin-biotin complex for the localisation of actin and myosin with fluorescence microscopy // *J. Cell Biol.* — 1977.—73, N 3. — P. 783—788.

12. *Wojtkowiak Z., Briggs R. C., Hnilica L. C.* A sensitive method for staining proteins transferred to nitrocellulose sheets // *Anal. Biochem.* — 1983.—129, N 2. — P. 486—489.
13. *Faye L., Chrispeels M. J.* Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases // *Ibid.*— 1985.—149, N 1.— P. 218—224.
14. *Handman E., Jarvis H. M.* Nitrocellulose-based assays for the detection of glycolipids and other antigens: mechanism of binding to nitrocellulose // *J. Immunol. Meth.* — 1985.—83, N 1. — P. 113—123.
15. *Loeb M. R.* Immunoblot method for identifying surface components, determining their cross-reactivity, and investigating cell topology: results with *Haemophilus influenzae* type *b* // *Anal. Biochem.* — 1984.—143, N 1. — P. 196—204.
16. *Grace A. M., Strauss A. W., Sobel B. E.* Sensitive quantification of isoforms of canine MM creatine kinase with an immunoblot procedure suitable for large numbers of samples // *Ibid.* — 1985.—149, N 1. — P. 209—217.
17. *King S. M., Offer T., Witman G. B.* Characterization of monoclonal antibodies against *Chlamydomonas flagellar* dyneins by high-resolution protein blotting // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1985.—82, N 14. — P. 4717—4721.
18. *Legocki R. P., Verma D. P. S.* Multiple immunoreplica technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel // *Anal. Biochem.* — 1981.—111, N 2. — P. 385—392.
19. *Preparative* elution of proteins from nitrocellulose membranes after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / *B. S. Parekh, H. B. Mehta, M. D. West, R. C. Montelaro* // *Ibid.* — 1985.—148, N 1. — P. 87—92.
20. *Atkinson P. J.* The recovery of nitrocellulose-bound protein // *Ibid.* — P. 105—110.
21. *Roberts R. L.* Comparison of fluorographic methods for detecting radioactivity in polyacrylamide gels or on nitrocellulose filters // *Ibid.* — 147, N 2. — P. 521—524.
22. *Lin W., Kasamatsu H.* On the electrotransfer of polypeptides from gels to nitrocellulose membranes // *Ibid.* — 1983.—128, N 2. — P. 302—311.
23. *Jahn R., Shieber W., Greengard P.* A quantitative dot-immunoblotting assay for proteins using nitrocellulose membrane filter // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1984.—81, N 6. — P. 1684—1687.

Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 21.10.85

УДК 576.8.094.2.087.4:543.545

## АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ КЛЕТОК И БЕЛКОВ

**И. С. Габуев, А. Л. Мазанов, В. Н. Брезгунов,  
И. Н. Прелова, А. С. Колезнев**

**Введение.** Электрофоретическая подвижность (ЭФП) клеток микроорганизмов является весьма информативной их характеристикой [1]. ЭФП клеток измеряют в основном методом микроэлектрофореза [2]. В лабораторной практике часто приходится измерять ЭФП белков и других макромолекул, для чего обычно используют метод подвижной границы [3]. Недостатками этих методов являются длительность, трудоемкость, низкая точность измерений.

В последнее время успешно разрабатывается метод электрофореза в свободном потоке (ЭФСП), который обеспечивает непрерывное препаративное разделение смесей микроорганизмов [4], клеток крови, лимфоцитов, субклеточных частиц, фагов, белков и других макромолекул [5] за 1—5 мин. В ряде экспериментальных установок ЭФСП осуществляется оптическая регистрация разделившихся фракций [6]. Однако в настоящее время нет серийно выпускаемой аппаратуры, обеспечивающей как препаративное разделение, так и точное измерение ЭФП частиц. Поэтому нами была разработана универсальная установка для препаративного и аналитического ЭФСП, изучены ее эксплуатационные и метрологические характеристики.

**Материалы и методы.** Аппаратура для ЭФСП. Структурная схема установки для ЭФСП приведена на рис. 1. Буферный раствор поступает в камеру разделения через демпферные сосуды (ДС) 60 каналов ввода. Два центробежных насоса