

УДК 571.27: 57.088.1

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ВЕСТЕРН-БЛОТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ЗЕЛЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА EGFP

*Семенова В.О., студентка 4 курса ФВМиБ
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
Научный руководитель – Мима К.А., кандидат
биологических наук, научный сотрудник
ФГБНУ ФИЦВиМ*

Ключевые слова: *вестерн-блот, белковый иммуноблот, EGFP.*

Работа посвящена оптимизации техники белкового иммуноблота для исследования иммуногенных свойств зеленого флуоресцентного белка EGFP. В ходе работы выяснено, что оптимальным разведением EGFP является 1:20, лучший рабочий раствор вторичных антивидовых антител – 1:5000.

Вестерн-блот или белковый иммуноблот – это метод, используемый в молекулярной биологии для определения в исследуемом образце специфичных белков. Вестерн-блот включает в себя два главных процесса: электрофорез в полиакриламидном геле и блоттинг белков [1, 2].

Для определения оптимальной концентрации EGFP мы развели белок в концентрациях 1:100, 1:50, 1:20 и отдельно взяли белок в количестве 0,188 мкг/мл. К образцам добавили равный объем буфера для внесения Laemmli Sample Buffer (BioRad, США). Прогрели 5 минут при 95°C и внесли в гель.

После проведения электрофореза осуществили перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. Для этого использовали полусухой метод переноса. Он основан на электропроводности буфера для трансфера. Этот метод занимает мало времени, так как электрический ток действует непосредственно на мембрану и гель. Белки переносятся под действием высокоинтенсивного электрического поля, производимого электродной пластиной, расположенной параллельно сэндвичу из мембраны и фильтровальной бумаги [4].

В технике вестерн-блота важно заблокировать свободные сайты в мембране [3]. Для этого мы использовали инертные белки сухого молока. После блокирования сайтов промыли стрипы раствором 0,1% TBS (забуференный физиологический раствор с 0,1% Tween 20) и осуществи-

Таблица 1 – Схема внесения EGFP в ПААГ для электрофореза

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Количество EGFP, мкл	7	15	10	5	15	10	5	15	10	5	15	10	5	20	20
Разведение EGFP	M ¹	1:100			1:50			1:20			0,188			1:100	1:50

¹ M – маркер молекулярной массы белков (kDa)

Таблица 2 – Схема внесения стрипов в растворы антител

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Кол-во EGFP, мкл	M ¹	15	10	5	15	10	5	15	10	5	15	10	5	20	20
Разведение EGFP		1:100			1:50			1:20			0,188			1:100	1:50
Разведение исслед-х сывороток		1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
Разведение вторичных антител		1:1000	1:3000	1:5000	1:1000	1:3000	1:5000	1:1000	1:3000	1:5000	1:1000	1:3000	1:5000	1:3000	1:3000

¹ M – маркер молекулярной массы белков (kDa)

ли их инкубацию с первичными антителами (сыворотки крови от исследуемых животных) в разведении 1: 100 в течение ночи при 4°C.

Осуществив отмывку от первичных антител, не связавшихся с белком, внесли вторичные антитела, конъюгированные пероксидазой хрена в разведении 1:3000 разведенные на 0,1% TBS с бычьим сывороточным альбумином (1% раствор). Инкубировали час на шейкере. Отмывали стрипы от несвязавшихся вторичных антивидовых антител и осуществили детекцию с помощью Clarity substrat (BioRad, США) в гель-документирующей системе ChemiDoc Imaging Systems (BioRad, США). В качестве положительных контролей использовали коммерческие моноклональные кроличьи антитела к белку EGFP в разведении 1:3000 и гипериммунные сыворотки от кроликов (нативная и денатурированная) в разведении 1:200. В качестве вторичных антител использовали ком-

мерческие конъюгированные пероксидазой хрена антисвинные и антикроличьи иммуноглобулины в разведениях 1:3000.

Таким образом, мы оптимизировали технику вестерн-блота для исследования иммуногенных свойств белка EGFP, выяснив, что оптимальное его разведение составляет 1:20, а рабочее разведение антител – 1:3000.

Библиографический список

1. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / под ред. К. Уилсона, Д. Уолкера. М.: БИНОМ, 2015. С. 368.
2. Introduction to Protein Electrophoresis [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.bio-rad.com/ru-ru/applications-technologies/introduction-protein-electrophoresis?ID=LUSOVO47B> (дата обращения: 24.04.2018).
3. Mahmood T. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting [Электронный ресурс] / Т. Mahmood, P-С. Yang. // North American Journal of Medical Sciences. 2012;4(9):429-434. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/> (дата обращения: 24.04.2018).
4. Protein Blotting Guide [Электронный ресурс]. – URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf (дата обращения: 24.04.2018).

OPTIMIZATION OF WESTERN BLOT TECHNIQUE FOR INVESTIGATION OF GFP IMMUNOGENICITY

Semenova V., Mima K.

Key words: *western blot, EGFP, immunogenicity.*

The study is concerned with optimization of western blot method for investigation of GFP immunogenicity. We discovered that the optimal dilution of GFP is 1:20, the optimal dilution for primary antibodies is 1:3000.