



УДК 577.112.088.3

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОБЛОТТИНГА В КАЧЕСТВЕ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАЗЦОВ БЕЛКОВ И ИХ ФРАГМЕНТОВ ДЛЯ МИКРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

*Левина Н. В., Слепак В. З., Киселев О. Г.,
Шемякин В. В., Хожлачев А. А.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Метод электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия с последующим электроблоттингом использован для получения образцов белков и их фрагментов с целью определения их структуры с помощью микросеквенирования. Проведен сравнительный анализ эффективности известных видов подложек для адсорбции белков: фильтров из стекловолокна, модифицированных аминопропилтриэтоксисилоном [4] или содержащих сорбированный полибрен [2], а также мембран из поливинилдендифторида [3]. С помощью газофазового секвенатора по стандартной программе определена N-концевая аминокислотная последовательность различных белков с молекулярными массами от 14 до 140 кДа, при этом использовалось от 20 до 200 пкмоль образца.

Выделение белков из многокомпонентных смесей до сих пор является сложной задачей. Если для коротких пептидов существует более или менее универсальный метод разделения — высокоэффективная жидкостная хроматография на обращенной фазе (за последние годы более 95% пептидов было выделено этим методом [4]), то для белков подобный метод пока не столь широко применим. Благодаря уникальной разрешающей способности, простоте и воспроизводимости на роль универсального метода разделения белков может претендовать электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS).

Такие недостатки, как денатурация белков SDS и аналитический характер метода, ограничивают сферу его применения. Однако для определения первичной структуры нативность белка необязательна, а развитие методов секвенирования белков и пептидов, в частности создание газофазового секвенатора [5], сделало возможным определение N-концевой аминокислотной последовательности на уровне десятков и даже единиц пикомолей образца. При наличии надежных методов идентификации и выделения из ПААГ аминокислотная последовательность полипептида может быть определена непосредственно после электрофореза [4—6].

Известно несколько способов переноса белков из пластины ПААГ электрофорезом в поперечном направлении с иммобилизацией на мембранных фильтрах (белковый электроблоттинг) [7, 8].

Способность полипептидов к адсорбции на фильтрах из модифицированного стекловолокна [4, 2] и поливинилдендифторида (PVDF) [3] позволила использовать их в качестве подложек при электроблоттинге с целью получения образцов для микросеквенирования. На стекловолоконистых фильтрах, модифицированных γ -аминопропилтриэтоксисилоном (NH₂-фильтрах) или обработанных полибреном (PB-фильтрах), несущих положительный заряд, сорбция белков происходит за счет ионных взаимодействий, а на PVDF-мембранах — за счет гидрофобных сил.

После электроблоттинга участок фильтра, содержащий исследуемый белок, помещается непосредственно в реакционную камеру секвенатора, и сорбированный полипептид подвергается деградации по Эдману.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ эффективности методов [1—3] и надежности определения с их помощью структуры ряда белков и их фрагментов различной природы и молекулярной массы.

Результаты анализа N-концевой аминокислотной последовательности белков после их переноса на разные типы подложек

Белок	Молекулярная масса, кДа	Исходное количество, пмоль	Тип подложки	Начальный выход *, %	Число идентифицированных аминокислотных остатков	Постадийный выход **, %	Способ нанесения образца	Способ детекции белка на подложке
β-Лактоглобулин	14	100	GF/F, TFA, полибрен	100	15/15	94-97	Традиционно	—
	14	200	NH ₂ -фильтр	40	15/15	91-97	Электроблоттинг	По белкам-стандартам
	14	100	PVDF-мембрана	70	15/15	90-95	»	»
	14	100	PVDF-мембрана	86	15/15	93-96	»	Кумасси ярко-синий R-250
Лизоцим	14	25	»	85	12/12	90-96	»	»
	14	200	PV-фильтр	82	12/13	95	»	Флуорескамин
	24	200	»	80	9/10	—	»	»
	14	200	»	82	12/13	—	»	По белкам-стандартам
	24	200	»	83	9/10	—	»	То же
	38	200	»	30	8/10	86	»	»
	37	400	NH ₂ -фильтр	30	18/20	93-97	»	»
	20	400	PV-фильтр	65	6/7	84	»	Флуорескамин
	14	100	»	60	8/12	92-96	»	»
	67	50	PVDF-мембрана	85	9/9	96-97	»	Кумасси R-250
То же [9]	67	25	GF/F, TFA, полибрен	90	9/9	95-97	Традиционно	—
	12	50	PVDF-мембрана	80	14/14	93-95	Электроблоттинг	Кумасси R-250
Белок L-12, секреторный естественными киллерами	30	100	»	80	15/15	90	»	»
	140	50	GF/F, TFA, полибрен	90	10/10	85	Традиционно	—
	140	40	PVDF-мембрана	60	6/6	88	Электроблоттинг	Кумасси R-250

* Начальный выход, % = начальный выход, пмоль/исходное количество белка, пмоль · 100%.

** Постадийный выход = 100% · e^(ln A_i - ln A_i) (I-i)⁻¹, где A_i — площадь или высота пика-Rth-производного аминокислоты, I, i — ес порядковый номер [5].

*** Протеолизические фрагменты белка G₉₆.

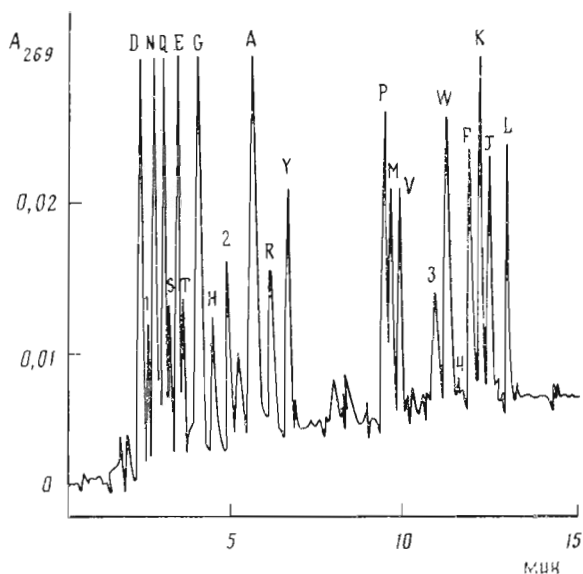


Рис. 1. Хроматограмма стандартной смеси 20 Pth-производных аминокислот и побочных продуктов секвенирования. Pth-производные аминокислот даны в однобуквенном коде. Побочные продукты секвенирования: продукт окисления DTT (1), DMPTU (2), DPTU (3), DPU (4). Условия хроматографического разделения — см. «Экспер. часть»

Условия электрофореза, электроблоттинга и секвенирования, предложенные Аберсолдом [1] и Вандекерхове [2], были сначала проверены на стандартных белках: β -лактоглобулине, лизоциме и трипсиногене. Оценка процесса переноса осуществлялась по количественным результатам автоматической деградации сорбированных на различных мембранных фильтрах белков (таблица). Количество перенесенного из геля на мембрану белка, способного подвергаться автоматической деградации (начальный выход белка, пкмоль), оценивали по количеству Pth-производного N-концевой аминокислоты*. Когда N-концевым является остаток аминокислоты, образующий нестабильное Pth-производное, например Ser или Thr, выход оценивался по ближайшему шагу, содержащему относительно стабильное производное. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография Pth-производных аминокислот была оптимизирована таким образом, чтобы разделялись также и побочные продукты автоматической деградации: N,N'-диметил-N'-фенилтиомочевина (DMPTU), N,N-дифенилтиомочевина (DPTU), дифенилмочевина (DPU), а также дитиотреит и продукты его окисления, подобно тому как это сделано в режиме «ON-LINE» Ханкапиллером [10]. Картина хроматографического разделения Pth-производных аминокислот приведена на рис. 1. Подобранные условия позволили определять пикомольные количества Pth-производных аминокислот, они используются нами в течение 2 лет для определения N-концевой последовательности белков и пептидов на газофазовом секвенаторе.

В первой серии экспериментов в качестве подложки для электроблоттинга мы использовали NH_2 - и РВ-фильтры. Детекция белковых полос на NH_2 -фильтрах осложнена, поскольку положительно заряженный фильтр сам окрашивается кумасси R-250, а применение такого реагента, как флуорескамин, невозможно из-за того, что он вступает в реакцию с аминогруппами стекла. Последнего недостатка лишены фильтры, обработанные полибреном, так как его тетраметиламмониевые груп-

* За 100 пмоль Pth-производного аминокислоты принималось количество (высота или площадь пика) производного, полученного при секвенировании 100 пмоль β -лактоглобулина.

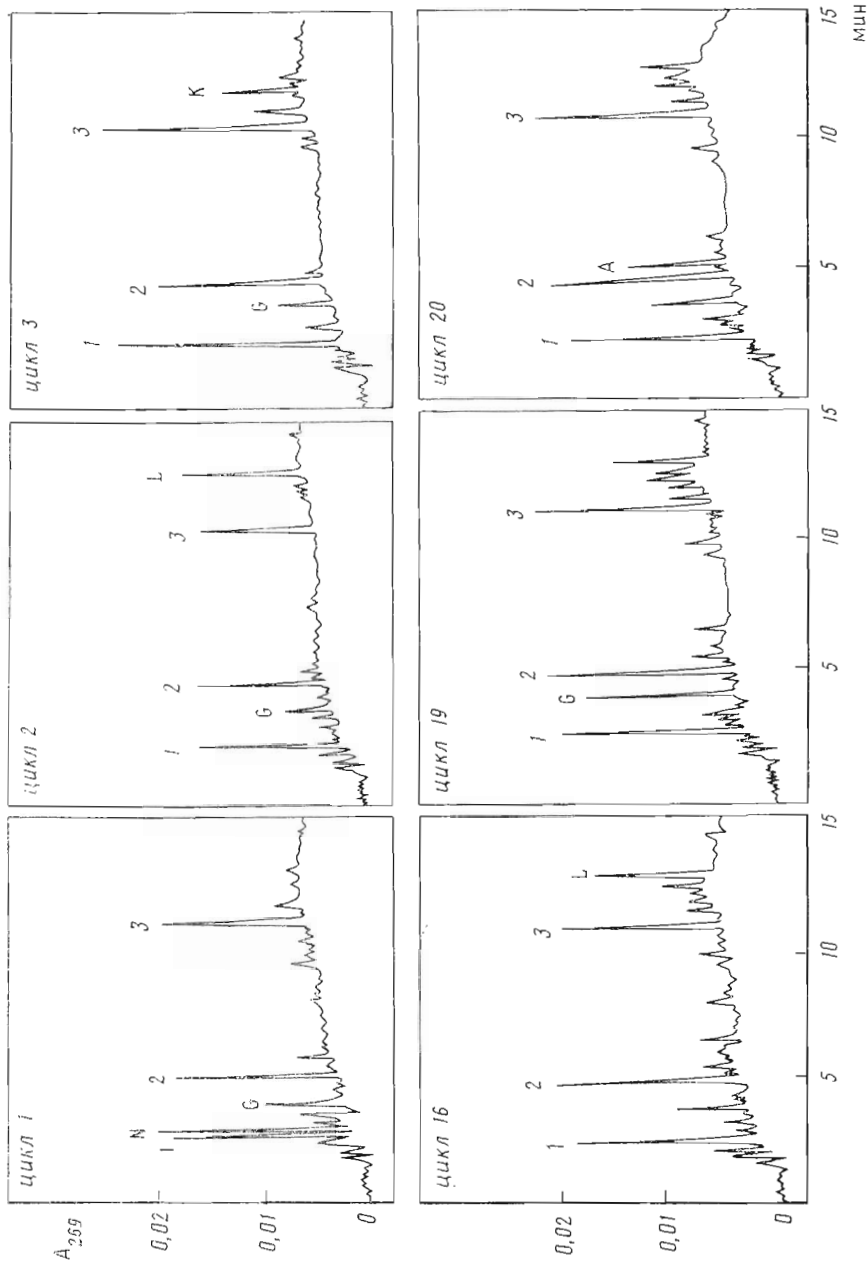


Рис. 2. Анализ N-концевой последовательности одного из фрагментов (37 кДа) СТР-связывающего белка С₃ мозга быка. Образец (200 пмоль) перенесен методом электрооблитога с 12,5% геля на NH₂-фильтр. Показаны циклы 1, 2, 3, 16, 19, 20 автоматической деградации по Эдману. На каждом цикле анализировалось 50% образца. Обозначения P₁H-производных аминокислот и побочных продуктов секвенирования, а также условия хроматографического разделения P₁H-производных как на рис. 1

пы не взаимодействуют с флуорескаминном. Обработка белка флуорескаминном не снижала начального выхода Pth-производных N-концевых остатков лизоцима и трипсиногена на ГВ-фильтрах (таблица). Следовательно, заметной модификации α -аминогруппы N-концевых аминокислотных остатков белков не происходило.

Перенос белка на NH_2 - и РВ-фильтры был использован нами при структурно-функциональном изучении одного из GTP-связывающих белков («С-белков») мозга быка — белка G_{39} [11]. С целью определения мест расщепления белка при ограниченном протеолизе определена N-концевая последовательность его стабильных фрагментов с молекулярными массами 38, 37, 20 и 14 кДа. На рис. 2 показаны хроматограммы Pth-производных аминокислот, полученные при определении N-концевой последовательности пептида 37 кДа, образовавшегося при ограниченном протеолизе G_{39} трипсином и перенесенного методом электроблоттинга на NH_2 -фильтр.

В случае NH_2 -фильтров начальный выход белка составил 40%, для β -лактоглобулина и 30% для фрагмента белка G_{39} с молекулярной массой 37 кДа (таблица). Для РВ-фильтров эта величина равнялась 60% и выше. Дополнительное нанесение полибрена на вырезанный участок фильтра непосредственно перед секвенированием [4] приводило к увеличению начального выхода белка до 70—80%, что, по-видимому, можно объяснить более прочным в этом случае удерживанием белка на подложке.

Относительно низкая емкость NH_2 - и РВ-фильтров (7 и 20 мкг/см² соответственно) [1, 2] затрудняет их применение для изучения структуры высокомолекулярных белков: так, например, для белка 100 кДа емкость ограничивается величиной 30 пкмоль. Большей адсорбционной емкостью обладают PVDF-мембраны (170 мкг/см²) [3]. На этих мембранах детекция белков, сорбированных за счет гидрофобных взаимодействий, легко осуществима с помощью кумасси R-250, присутствие которого не мешает секвенированию. Использование PVDF-мембран позволяет анализировать до 20—25 пкмоль образца. Следует отметить также, что PVDF-мембраны обладают рядом преимуществ по сравнению с NH_2 - и РВ-фильтрами. Во-первых, при переносе на PVDF-мембрану белковые полосы получались более узкими, чем при использовании NH_2 - и РВ-фильтров. Это особенно важно при разделении белков с близкими молекулярными массами. Во-вторых, механические свойства PVDF-мембраны позволяют вырезать несколько полосок и помещать их вместе в реакционную камеру секвенатора. Это упрощает задачу, когда, например, из-за плохой растворимости трудно получить образец белка в маленьком объеме и его приходится вносить в несколько карманов геля. В конечном счете это позволяет увеличить количество белка, подвергаемого секвенированию. Такой прием был использован нами при определении N-концевой последовательности кальмодулиннезависимой аденилатциклазы мозга быка (AC) — белка с молекулярной массой 140 кДа. В-третьих, благодаря своей гидрофобности PVDF-мембраны сорбируют меньше заряженных примесей, чем фильтры из стекловолокна, что позволяет с большей степенью достоверности проводить идентификацию Pth-производных аминокислот при секвенировании. На рис. 3 представлены хроматограммы Pth-производных аминокислот, полученных при определении N-концевой последовательности аденилатциклазы, перенесенной методом электроблоттинга из 7,5% ПААГ на PVDF-мембрану. Полученные данные подтверждают определенную нами ранее для белка N-концевую последовательность L-Q-V-D-I-V-P- [12, 13].

Постадийный выход, рассчитанный для Pth-производных остатков L, I, V, находящихся соответственно в положениях 1 и 10, 2 и 12, 3 и 15 β -лактоглобулина, составил 90—97% для всех видов подложек. Для остальных белков его рассчитывали по стабильным Pth-производным повторяющимся аминокислотным остаткам. Полученные при этом значения были не ниже выходов, достигаемых при секвенировании белков и пептидов, нанесенных на фильтр газофазового секвенатора традиционным способом. Это свидетельствует о том, что стандартная секвенаторная

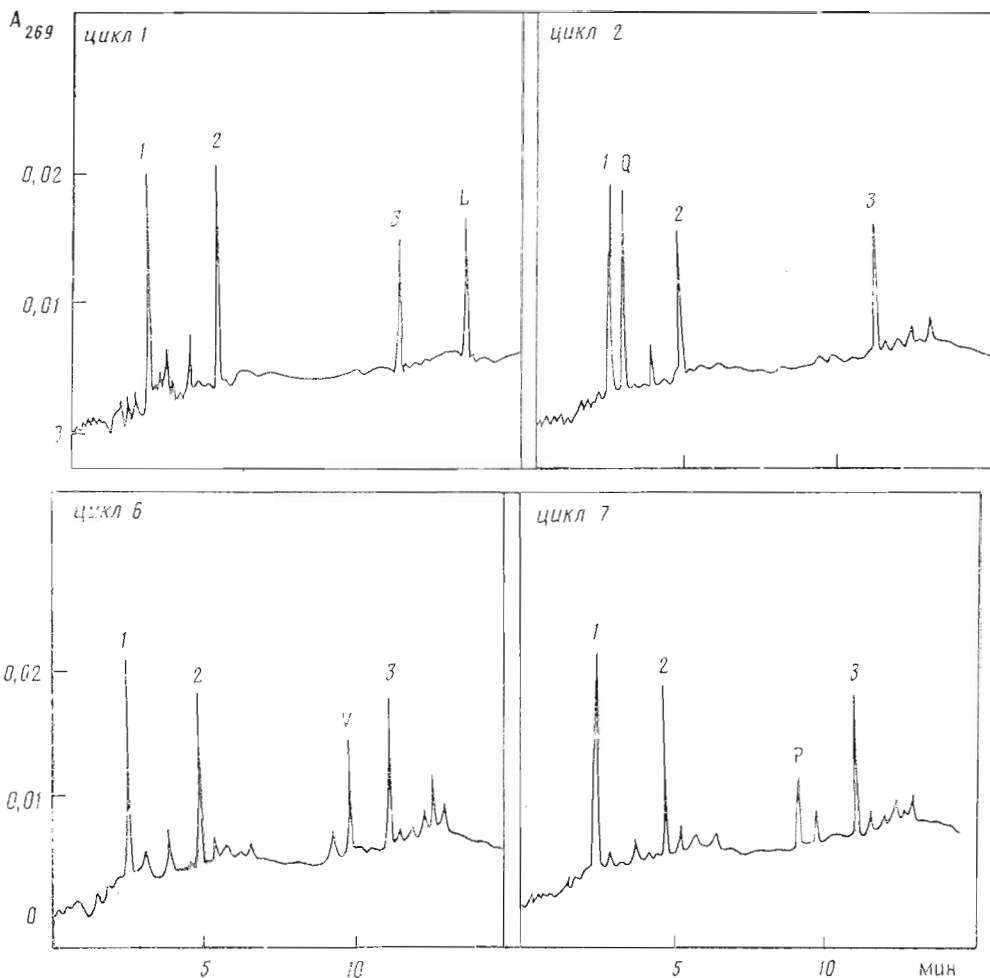


Рис. 3. Анализ N-концевой последовательности аденилатциклазы (50 пкмоль, M 140 кДа) из мозга быка, перенесенной методом электроблоттинга из 7.5% ПААГ на PVDF-мембрану. Показаны циклы 1, 2, 6, 7 автоматической деградации по Эдману. 90% образца анализировалось на каждом цикле. Условия хроматографического разделения Pth-производных аминокислот и обозначения как на рис. 1

программа 02RPTN, предложенная Ханкапиллером [5], может с успехом применяться при работе с образцами, полученными после электроблоттинга.

Таким образом, электрофоретическое разделение с последующим электроблоттингом является весьма перспективным методом выделения белка для определения его N-концевой аминокислотной последовательности на уровне 20—200 пкмоль. Применение этого метода исключает стадию элюирования белка из геля и 3-часовую программу нанесения полибрена на фильтр в секвенаторе, что упрощает процедуру подготовки образца и сокращает общее время анализа. PVDF-мембраны следует считать по обсуждавшимся параметрам лучшей подложкой, хотя модифицированные фильтры из стекловолокна для белков с M 10—50 кДа дают вполне удовлетворительные результаты.

Авторы благодарны В. М. Липкину, О. Ю. Чертову и Н. А. Алдановой за предоставленные для анализа образцы белков и плодотворное обсуждение результатов.

Экспериментальная часть

В работе использовались акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, TEMED, персульфат аммония, трис, глицин (Bio-Rad, США), кумасси R-250 (Serva, ФРГ), CAPS (Sigma, США), карбонат натрия (Merck, ФРГ), гидрат окиси натрия (Chemapol, СССР).

SDS (Bio-Rad, США) подвергался перекристаллизации как описано в работе [14]. Метанол и уксусная кислота (х. ч., Союзреактив) использовались перегнанными. Для получения модифицированных стекловолокнистых фильтров применяли фильтры GF/F (Whatman, Англия), полибрен (Pearce, США), γ -аминопропилтриэтоксисилан (Союзреактив). PVDF-мембрана — Immobilon (Millipore, США). Реактивы, примененные при секвенировании, получены от фирмы Applied Biosystems (США). β -Лактоглобулин, трипсиноген, лизоцим — фирмы Sigma (США); белки G_{3a} и аденилатциклаза из мозга быка выделены в лаборатории белков гормональной регуляции, а белки P-1, L-12 выделены в группе белков-модуляторов клеточного развития ИБХ АН СССР.

Подготовка фильтров для электроблоттинга. Для получения NH₂-фильтров фильтры GF/F в течение 1 ч вымачивали в трифторуксусной кислоте (TFA), затем высушивали под струей инертного газа и под вакуумом несколько часов для удаления следов кислоты. После этого промывали 95% этанолом, инкубировали с γ -аминопропилтриэтоксисиланом, 0,1% раствор которого в 95% этаноле готовили непосредственно перед употреблением. Реакция проходила в течение 1—2 ч. Затем фильтры несколько раз промывали этанолом, высушивали и хранили при 20° С в закрытой чашке Петри. Все инкубации и промывки проводили при 20° С.

Для получения РВ-фильтров фильтры GF/F 1 ч вымачивали в 0,3% растворе полибрепа, высушивали, хранили также, как и фильтры из NH₂-стекла. Перед блоттингом фильтр 5 мин промывали водой.

PVDF-мембраны на 1—2 мин замачивали в 100% метаноле, затем 5 мин в буфере для блоттинга.

Электрофорез в ПААГ проводили по методу Лэмбли [15] в пластинах ПААГ с 10 или 15% разделяющим и 5% концентрирующим гелями.

Электроблоттинг. После электрофореза гель вынимали из пластины и накладывали на два листа бумаги Whatman 3 MM, смоченные буфером для блоттинга. Сверху на гель помещали смоченные в этом же буфере NH₂-, РВ-фильтры или PVDF-мембрану и далее — два листа бумаги Whatman 3 MM. При сборке такого «сэндвича» следует избегать образования пузырей воздуха.

В работе использовался прибор Trans-Blot (Bio-Rad, США) или прибор для электроблоттинга, собранный нами с целью минимизации объема буфера. В качестве катода использовали пластину из нержавеющей стали, в качестве анода — сетку из платиновой проволоки с шагом 1 см, прикрепленную к плексигласовой пластинке. Электроды укреплялись параллельно на расстоянии 10 мм в пластмассовом держателе. Между пластинами располагали «сэндвич», который ориентировали таким образом, чтобы фильтр находился между гелем и анодом. Систему герметизировали, заполняли 50 мл 20 мМ трис-глицинового буфера, рН 8,5, содержащего 1 мМ DTT, и опускали в лед для охлаждения. Электроблоттинг проводили при напряжении 12 В в течение 1—2 ч.

Перенос белков P-1 и L-12 (таблица) осуществляли как описано в работе [3], а при переносе аденилатциклазы в качестве буфера использовали 20 мМ карбонат натрия, рН 10,5, содержащий 1 мМ DTT и 0,05% SDS.

Детектирование белков после электроблоттинга. Для контроля полноты переноса гели после электроблоттинга окрашивали кумасси R-250 [16]. При переносе на NH₂-фильтры белки локализовали согласно положению дансильированных стандартных белков соответствующей молекулярной массы. Дансильирование проводили как описано в работе [16].

Белки на РВ-фильтрах детектировали реакцией с флуоресцином по методу [2].

Для отмывки от трис-глицинового буфера фильтр после электроблоттинга промывали 1 ч 20 мМ NaCl, а затем 1 ч деионизованной водой, потом ацетоном (5 мин) и опускали (на 5 мин) в раствор флуорескамина (1 мг/мл) в ацетоне. Процесс «проявления» при комнатной температуре занимал около 5 мин. Появление полос наблюдалось по флуоресценции (длина волны возбуждающего света 330 нм). После появления полос фильтр быстро отмывали ацетоном.

Окраску белков, сорбированных на PVDF-мембране, проводили в 0,1% растворе кумасси R-250 в 50% метаноле (10—15 мин) и затем промывали водой 10—15 мин.

После детекции полоски фильтров с иммобилизованными белками вырезали, высушивали под вакуумом и хранили при —20° С.

Кумасси R-250, флуорескамин и SDS не давали артефактных пиков при идентификации Pth-производных; 2-часовая отмывка NH₂- и РВ-фильтров 25 мМ NaCl и H₂O при 5-кратных смехах воды приводила к появлению пика Pth-производного глицина, соответствующего 5—10 пкмоль аминокислоты. Для PVDF-мембран требовалась только 10—15-минутная отмывка. Следует, однако, учесть, что потеря белка при отмывке в воде может составлять 5—10% [8].

Секвенирование полипептидов проводили на газофазовом секвенаторе 470 А (Applied Biosystems, США). Узкие полоски фильтра (1—2 мм) с перенесенным белком укладывали на тefлоновую подложку в реакционной камере секвенатора, высушивали 10—15 мин, NH₂- и РВ-фильтры обрабатывали полибреном (1 мг/20 мкл), снова высушивали, покрывали стеклянным фильтром, обработанным TFA, и проводили секвенирование по стандартной программе 02 RPTH. Фракции с раствором Pth-производных аминокислот упаривали, растворяли в 20% ацетонитриле и аликвоту вводили в инжектор жидкостного хроматографа.

Хроматография Pth-производных аминокислот. Для разделения Pth-производных использовали хроматографическую систему 322 MP (Altex, США), колонку (4,6 × × 250 мм) с сорбентом C₁₈ (Applied Biosystems, США) или Ultrasphere ODS (Altex, США). Температуру колонки (45° С) поддерживали при помощи термостата U-1 (ГДР),

детекция Pth-производных аминокислот проводилась с использованием проточного адсорбциометра, модель 757 (Cratos, США). Условия разделения: буфер А — 5% тетрагидрофурана (THF) и 95% 130 мМ ацетата натрия, рН 4,3; буфер В — ацетонитрил; градиент В в А от 25 до 50% за 12 мин, с 50 до 25% за 1 мин и в течение 5 мин — 25% В. Время разделения 13 мин, время анализа одного цикла 18 мин, скорость потока 1 мл/мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abersold R. N., Teplow D. B., Hood L. E., Kent S. B.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 9. P. 4229—4238.
2. *Vandekerckove J., Bauw G., Puype M., Van Damme J., Van Montadu M.* // *Eur. J. Biochem.* 1985. v. 152. N 1. P. 9—19.
3. *Matsudaira P.* // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 21. P. 10035—10038.
4. *Yuen S., Hunkapiller M. W., Wilson K. I., Yuan P. M.* // *Anal. Biochem.* 1988. V. 168. № 1. P. 5—15.
5. *Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 15. P. 7990—7997.
6. *Xu Q. Y., Shively J. E.* // *Anal. Biochem.* 1988. V. 170. № 1. P. 19—23.
7. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 9. P. 4350—4354.
8. *Montelaro R. C.* // *Electroforesis.* 1987. V. 8. № 9. P. 432—438.
9. *Chertov O. Yu., Krasnoselsky A. L., Sashenko L. P., Gnuchev N. V., Lukandin E. M.* // *J. Cell. Biochem.* 1988. V. 12E. P. 165.
10. *Hunkapiller M. W.* // *Applied Biosystems User Bulletin.* № 14. Nov. 18. 1985.
11. *Ovchinnikov Yu. A., Slepak V. Z., Pronin A. N., Shlensky A. B., Levina N. B., Voeikov V. L., Lipkin V. M.* // *FEBS Lett.* 1987. V. 226. № 1. P. 91—95.
12. *Зайцева Ф. Б., Петров В. М., Елистратова Е. Ю., Липкин В. М.* // *Биол. мембраны.* 1988. Т. 5. № 11. С. 1125—1134.
13. *Липкин В. М., Мирзоева С. Ф., Драницына С. М., Мошнягов М. В., Петров В. М., Чернова М. Н., Сурина Е. А., Обухов А. Н., Левина Н. Б., Храмов Н. В., Андреева С. Г., Ракимина Т. В., Феценко Е. А., Овчинников Ю. А.* // *Биоорг. химия.* 1989. Т. 15. № 1. С. 5—17.
14. *Hunkapiller M. W., Hood L. E.* // *Meth. Enzymol.* 1983. V. 91. P. 486—493.
15. *Laemmli U. K.* // *Nature.* 1970. V. 227. № 5258. P. 680—685.
16. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование М.: Наука. 1981. С. 97—98.

Поступила в редакцию
15.VI.1988.

ELECTROBLOTTING AS A METHOD OF PROTEINS AND PROTEIN FRAGMENTS. SAMPLE PREPARATION FOR MICROSEQUENCING

LEVINA N. B., SLEPAK V. Z., KISELYOV O. G., SHEMYAKIN V. V., CHSCHLACHEV A. A.,

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

Gel electroforesis in the presence of sodium dodecyl sulphate followed by electroblotting was employed in sample preparation for microsequencing proteins and protein fragments. Three types of solid supports were compared: glass fiber filters modified by aminopropyltriethoxysilane or covered with polybrene, and polyvinylidenedifluoride membranes. N-Terminal amino acid sequences of several proteins (M_r 14—140 kDa) were determined on a gas-phase sequencer with the standard programme; 20—200 pmoles of the protein can be assayed by this method.