



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 1/14 (2006.01); C07K 1/26 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016111874, 30.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.03.2016Дата регистрации:  
01.03.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.03.2016

(43) Дата публикации заявки: 05.10.2017 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 01.03.2018 Бюл. № 7

Адрес для переписки:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п.  
Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

(72) Автор(ы):

Перовская Ольга Николаевна (RU),  
Панферцев Евгений Александрович (RU),  
Щит Ирина Юрьевна (RU),  
Федюкина Галина Николаевна (RU),  
Ганина Елена Анатольевна (RU),  
Игнатов Сергей Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и биотехнологии  
(ФБУН ГНЦ ПМБ) (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2208445 C1, 20.07.2003. WO  
1990000200 A1, 11.01.1990. RU 2070888 C1,  
27.12.1996. RU 2278870 C2, 27.06.2006. RU  
2448116 C2, 20.04.2012. WO 2002057296 A1,  
25.07.2002.

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ РЕНАТУРИРОВАННОГО БЕЛКА G ИЗ МАРКИРОВАННОГО  
ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ выделения ренатурированного белка G из маркированного полиакриламидного геля. Предложенный способ включает этапы маркирования положения белка G в составе полиакриламидного геля, отделения фрагмента маркированного геля, содержащего белок G, последовательной обработки фрагмента геля денатурирующим буферным раствором, содержащим 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 6 M мочевину, 2 M тиомочевину, в течение 1 час и ренатурирующим

буферным раствором, содержащим 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM сульфобетамина, 1 mM ЭДТА, в течение 3 час при 20°C с трехкратной сменой буфера и завершающей электроэлюзией ренатурированного белка G из измельченного геля в буферном растворе, содержащем 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 7,5), в течение 2 часов и силой тока 200 mA. Предложенный способ может быть использован для выделения белка G, имеющего сохраненные иммунобиологические свойства. 7 ил., 7 пр.

RU 2646103 С2

RU 2646103 С2



(51) Int. Cl.  
*C07K 1/14* (2006.01)  
*C07K 1/26* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC  
*C07K 1/14* (2006.01); *C07K 1/26* (2006.01)

(21)(22) Application: 2016111874, 30.03.2016

(24) Effective date for property rights:  
30.03.2016

Registration date:  
01.03.2018

Priority:

(22) Date of filing: 30.03.2016

(43) Application published: 05.10.2017 Bull. № 28

(45) Date of publication: 01.03.2018 Bull. № 7

Mail address:  
142279, Moskovskaya obl., Serpukhovskij r-n, p.  
Obolensk, FBUN GNTs PMB

(72) Inventor(s):

Perovskaya Olga Nikolaevna (RU),  
Panfertsev Evgenij Aleksandrovich (RU),  
Shchit Irina Yurevna (RU),  
Fedyukina Galina Nikolaevna (RU),  
Ganina Elena Anatolevna (RU),  
Ignatov Sergej Georgievich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki  
Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr prikladnoj  
mikrobiologii i biotekhnologii (FBUN GNTs  
PMB) (RU)

RU 2646103 C2

(54) METHOD FOR RENATURED PROTEIN G ISOLATION FROM MARKED POLYACRYLAMIDE GEL

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: method is proposed for renatured protein G isolation from the marked polyacrylamide gel. The proposed method includes the steps of marking of the protein G position in a polyacrylamide gel, separation of fragment of the marked gel containing protein G, sequential treatment of the gel fragment with a denaturing buffer solution containing 20 mM of Tris (pH 8.0), 100 mM of NaCl, 1% Triton X-100, 6 M urea, 2 M thiourea for 1 hour and a renaturing buffer solution

containing 20 mM of Tris (pH 8.0), 100 mM of NaCl, 2 mM of sulfobetaine, 1 mM of EDTA, for 3 hours at 20°C with a three-fold change in the buffer and final electro-elution of the renatured protein G from the ground gel in a buffer solution containing 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), for 2 hours and at a current strength of 200 mA.

EFFECT: method can be used to isolate protein G, which has preserved immunobiological properties.

7 dwg, 7 ex

RU 2646103 C2

Изобретение относится к биотехнологии и описывает сочетанный способ очистки и ренатурации белка G, который может использоваться при создании специфических иммунодиагностических и иммунопрофилактических средств.

Известны многочисленные методы очистки белков, включающие, в том числе,

- 5 электроэлюцию из агарозных и полиакриламидных гелей, которые широко распространены в повседневной лабораторной практике [Михайлов А.Т., Симирский В.Н. Методы иммунохимического анализа в биологии развития. - М.: Наука, 1991. - 290 с., Финдлей Д.Б. Биологические мембранны: Методы / Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза. М.: Мир, 1990. С. 271-273]. Их популярность связана с возможностью
- 10 наработать некоторые необходимые для исследователей количества белка и избегать при этом трудоемких этапов выделения индивидуальных белков как и фрагментов ДНК (для выделения последних электроэлюция применяется значительно чаще). При очистке белков электроэлюция может не только выступать в качестве единственного и самостоятельного метода выделения, но и дополняется в некоторых случаях
- 15 хроматографией, дифференциальным осаждением и другими.

Известны ренатурационные способы, имеющие одно принципиальное сходство, которое заключается в разбавлении концентрированного раствора денатурированного белка специальными буферами, что сопровождается образованием нативной, биологически активной структурой полипептида [Richard R, Burgess 2009. Meth Enzym 20 463: 259-281].

К настоящему времени опубликованы многочисленные протоколы ренатурации отдельных белков способом, в основе которого лежит разведение ренатурационных растворов, однако, метод имеет несколько существенных недостатков [Cabrita LD, Bottomley SP. 2004. Biotech Ann Rev 10: 31-49]. Известна альтернативная техника перевода 25 белков в растворы с низкой ионной силой, использующая диализ или ультрафильтрацию [Yoshii H, Furuta T, Yonehara T, Ito D, Linko Y-Y, Linko P: Biosci Biotechnol Biochem 2000, 64:1159-1165].

Предложен ряд методических подходов, имеющих целью преодолеть концентрационный барьер [Li M, Poliakov A, Danielson UH, Su Z, Janson JC: Biotechnol Lett 2003, 5:1729-1734].

Однако все вышеуказанные методы приводят к агрегации, очень низкому выходу и сильному разбавлению конечного раствора.

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в том, что не изменяется антигенная и функциональная активность белка, что сохраняет 35 иммунобиологические и функциональные свойства очищенного белка и позволяет включать его в состав иммунохимических тест-систем.

Технический результат достигается путем получения очищенного белка при помощи препаративного электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия с последующей ренатурацией в геле и электроэлюции 40 биологически активного восстановленного белка, а ренатурация биологически активной третичной структуры белка G оценивается по восстановлению его антителсвязывающей способности в иммунохимических тестах.

Технический результат достигается тем, что лизированную бактериальную культуру, 45 продуцировавшую белок G преимущественно в составе телец включения, центрифицируют в течение 15 мин при 1500×g. Полученный осадок переосаждают при тех же условиях при 10°C, ресусцидируют в растворе 8 М мочевины, содержащем 10 mM Трис-HCl (pH 8,0) и 1,5 mM ЭДТА и перемешивают длительное время для наиболее полного растворения. Полученную суспензию центрифицируют при 14000×g в течение

30 мин и 12°C. Отбирают надосадочную фракцию и используют ее для фракционирования белков при помощи препаративного электрофореза в полиакриламидном геле в редуцирующих условиях (ДСН-ПААГ). По завершении электрофореза гели подвергают экспресс окраске холодным 0,4 М раствором калия хлористого с целью экспресс-идентификации. Идентифицированную полосу белка G вырезают из геля и промывают денатурирующим буфером, содержащим 20 mM Трис (рН 8.0), 100 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 6 M мочевину, 2 M тиомочевину в течение 1 час, после чего погружают гель в ренатурационный буфер, содержащий 20 mM Трис (рН 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM сульфобетаин, 1 mM ЭДТА. Ренатурацию проводят при умеренном перемешивании емкости с гелем в течение 3 час при 20°C, буфер меняют три раза, строго контролируя его температуру, после чего промывают деионизованной водой и замораживают при - 80°C или жидким азотом. Гель измельчают в замороженном состоянии и проводят электроэлюцию ренатурированного белка в течение 2 час и силой тока 200 mA в буферном растворе, содержащем 10 mM калий-фосфатный буфер (рН 7,5). Элюированный белок концентрируют ультрафильтрацией над мембранный YM-10 и диализуют против того же буфера, раствор меняют три раза. Полученный таким образом белок G представляет собой высокоочищенный препарат, обладающий присущими ему иммунобиологическими свойствами.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами:

Фиг. 1. Электрофорез препаратов белка G на различных этапах выделения.

Фиг. 2. Иммуноферментный анализ препаратов белка G.

Фиг. 3. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ препаратов белка G.

Фиг. 4. Электрофорез и иммуноблот белка G, обработанный различными иммуноглобулинами.

Фиг. 5. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи дот-блота по схеме иммуноблота с электропереносом белков после электрофореза в ДСН-ПААГ.

Фиг. 6. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи дот-блота.

Фиг. 7. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи непрямого дот-блота с исключением возможного неспецифического взаимодействия коньюгатов и белка G.

Пример 1. Условия ренатурации белка G.

Применение электрофореза позволяет решить две задачи: во-первых, разделить сложную белковую смесь с выделением зоны, содержащей гомогенный белок, и, во-вторых, создать условия, ограничивающие подвижность молекул белка и предотвратить агрегацию в процессе ренатурации. Предварительные опыты показали, что приемлемое разрешение белков электрофорезом достигается при нанесении на препаративный мини-гель 250 мкл препарата белков, растворенных в 8 M мочевине. Маркировку геля проводят при помощи предокрашенных белковых маркеров молекулярных масс, которые вносят в отдельный колодец препаративного мини-геля. После одновременного разделения маркеров и образца, находящегося в препаративной части геля, полосу с маркерами отделяют, окрашивают препаративную часть отдельно, используя раствор хлористого калия, после чего сопоставляют разделенные части геля для точной идентификации положения белка G.

Для экспресс-окраски и идентификации термоденатурированного ДСН белка G, находящегося в составе геля, используют обработку холодным 0,4 M раствором калия хлористого (Фиг. 1, линия 1. Числами в верхней части фигуры обозначены линии: 1 -

фрагмент геля, окрашенный хлористым калием после разделения клеточного лизата, содержащего белок G; 2 - клеточный лизат; 3 - белок G, ренатурированный и выделенный из фрагмента геля; 4 - препарат как в линии 3, разведенный в 15 раз; 5 - маркеры молекулярных масс, числовые значения приведены в правой части фигуры и выражены

5 в килодальтонах; 6 - надосадочная фракция клеточного лизата, содержащая растворимые белки; 7 - белок G, выделенный из растворимой фракции клеточного лизата при помощи аффинной хроматографии на IgG Sepharose® 6 FF с привитыми иммуноглобулинами человека из нормальной сыворотки крови).

Идентифицированную полосу белка G вырезают из геля и насыщают буфером,

10 содержащим 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 6 M мочевину и 2 M тиомочевину в течение 1 час, при этом происходит удаление хлористого калия, замещение ДСН тритоном X-100, а 6 M мочевина в составе буферного раствора поддерживает денатурирующие условия для молекул белка G. Гель помещают в ренатурационный буфер, содержащий 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM

15 сульфобетаин, 1 mM ЭДТА. Ренатурацию проводят с контролем температуры в течение 3 час при 20°C при умеренном перемешивании емкости с гелем и трехкратной сменой буфера, после чего промывают деионизованной водой, замораживают, измельчают в замороженном состоянии и проводят электроэлюцию ренатурированного белка из диспергированного геля в течение 2 час и силой тока 200 mA в буферном растворе,

20 содержащем 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 7.5). Результаты электроэлюции контролируют ДСН-ПААГ (Фиг. 1). Было выделено до 1,8 мг белка G после электрофореза в геле мини-формата с использованием аппарата MiniVE, GE Healthcare, ренатурации и электроэлюции. Функциональную активность очищенного и ренатурированного белка G в дальнейшем подтверждают иммуноферментным анализом

25 и иммуноблотами.

Пример 2. Применение буферного раствора с увеличенной концентрацией денатурирующего компонента.

Электрофорез проводят как в примере 1, вместе с тем, для растворения препарата белков используют буфер состава - 125 mM трис-HCl, pH 6,8, 4% додецилсульфата

30 натрия (SDS), 20% глицерина, 10% 2-меркаптоэтанола и 0,02% бромфенолового синего. Растворение белков достигается прогреванием проб, сусpenзированных в этом буфере в объемном соотношении 1:1 в течение 15 мин [Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259): 680-685].

Определяют положение полосы белка G, вырезают ее из геля и помещают для насыщения 35 в буферный раствор, содержащий 25 mM Трис (pH 8.0-8.2), 1% Тритон X-100 и 8 M мочевину в течение 1-2 час, в результате чего происходит удаление хлористого калия, введенного для обратимой окраски геля, замещение ДСН тритоном X-100, а 8 M мочевина в составе денатурирующего буферного раствора поддерживает условия, при которых полипептидные цепи молекулы белка G находятся в «развернутом» состоянии.

40 Гель с денатурированным белком помещают в ренатурационный буфер, содержащий 25 mM Трис (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0,02% твин-80, 1 mM ЭДТА и инкубируют при умеренном перемешивании буфера в емкости с гелем в течение 18 час при 12-14°C. Объем буфера должен не менее чем в 200 раз превосходить объем полоски геля. Полученные результаты аналогичны примеру 1.

45 Пример 3. Использование буферных растворов с компонентами, обеспечивающими тиол-дисульфидное равновесие.

Электрофорез проводят как в предыдущих примерах, однако, для обработки гелевых полос, содержащих белок G, используют буферные растворы, которые на этапе

денатурации обеспечивают расщепление возможных дисульфидных связей между цистеинами полипептидной цепи, а на этапе ренатурации - их восстановление.

Денатурирующий буфер содержит 20 мМ Трис (рН 8,0), 8 М мочевину, 0,3% саркозил, 20 мМ CHAPS и 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Для ренатурации белка полоску геля

- 5 помещают в 200-кратный избыток (по объему) буферного раствора, содержащего 20 мМ Трис (рН 8,0), 150 мМ натрия хлористого, 20 мМ CHAPS, 5 мМ цистеина и 50 мМ цистина. Перед этим этапом температура буферного раствора должна быть обязательно доведена до 18°C. Наличие в буфере цистеин/цистиновой пары, слабощелочная среда, умеренная температура и продолжительная инкубация (не менее 12 час) способствуют 10 восстановлению дисульфидных связей. Полученные результаты аналогичны примеру 1.

Пример 4. Твердофазный иммуноферментный анализ.

Планшеты (96 лунок) сенсибилизируют последовательным внесением в каждую лунку 100 мкл раствора, содержащего 0,1 М карбонатный буфер (рН 9,6) и 800 нг белка

- 15 G с инкубацией при температуре 6°C в течение 18 час, после чего проводят четырехкратную промывку 10 мМ фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,2), содержащим 0,05% твина-20 (ФСБТ). Неспецифическую сорбцию блокируют 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБТ в течение 2 час при 37°C, причем на этом этапе объем наполнения лунок составлял 120 мкл. Лунки промывают, как

- 20 описано ранее, но трехкратно, после чего сразу же наполняют предварительно приготовленными растворами нормальных иммуноглобулинов кролика в ФСБТ. Иммуноглобулины разводят, начиная с наибольшей концентрации, составлявшей 2500 нг/мл с кратностью разведения 2,5. Последующие стадии анализа проводят аналогично с включением промежуточных промывок ФСБТ между каждой инкубацией. Этапы 25 включали инкубацию с раствором биотинилированных антikроличьих F(ab)<sub>2</sub> фрагментов антител (1:3000, 2 час, 37°C) в ФСБТ, с раствором стрептавидин-пероксидазы (1:4000, 1 час, 37°C), визуализацию субстратом и остановку реакции 2 М раствором серной кислоты. Субстратом служил 0,1% раствор о-фенилендиамина и 0,03% раствор перекиси водорода в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере (рН 5,0) (Фиг. 2. Буквами в верхней части 30 фигуры обозначены кривые: А, В - лунки сенсибилизированы белком G, очищенным аффинной хроматографией на IgG Sepharose® 6 FF с привитыми иммуноглобулиниами человека из нормальной сыворотки крови; С, D - лунки сенсибилизированы белком G, ренатурированного и выделенного электроэлюзией из полиакриламидного геля).

- 35 Титрование IgG на планшетах, сенсибилизованных различными препаратами белка G, представлено S-образными кривыми, горизонтальные участки которых в области высоких концентраций соответствуют области насыщения. Восходящие участки кривых А и В расположены в области концентраций IgG от 2,5 нг/мл до 80 нг/мл, для кривых С и D - от 10 нг/мл до 300 нг/мл. Принимая во внимание одинаковые номинальные концентрации белка G в препаратах, установленное различие концентрационных 40 интервалов показывает сниженную долю функционально-активных молекул белка G в ренатурированном препарате по сравнению с белком G, очищенным аффинной хроматографией на IgG Sepharose® 6 FF с привитыми иммуноглобулиниами человека из нормальной сыворотки крови.

Пример 5. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ.

- 45 Для проведения непрямого твердофазного ИФА каждую лунку планшета (96 лунок) сенсибилизируют, заполняя 100 мкл раствора, содержащего 0,1 М карбонатный буфер (рН 9,6) и 500 нг иммуноглобулинов нормальной сыворотки кролика с инкубацией при температуре 6°C в течение 18 час, после чего проводят четырехкратную промывку

ФСБТ. Неспецифическую сорбцию блокируют 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в ФСБТ в течение 2 час при 37°C, причем на этом этапе объем наполнения лунок составлял 120 мкл. В последующем, этапы анализа проводят аналогично, с промежуточными промывками ФСБТ и включают инкубацию с приготовленными 5 предварительно разведениями белка G (начиная с наибольшей концентрации 600 нг/мл), с кратностью 2,5, с раствором нормальной сыворотки мыши (1:350, 2 час, 37°C), раствором антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:4000, 2 час, 37°C), и субстратом. Раствор субстрата содержал 0,1% о-фенилендиамина и 0,03% перекиси водорода в 50 мМ цитрат-фосфатном буфере (рН 5,0). Реакцию останавливают 10 2 М раствором серной кислоты. (Фиг. 3 показывает, что белок G титруется в интервале концентраций от 10 нг/мл до 150 нг/мл для кривых А и В и от 20 нг/мл до 300 нг/мл для кривых С и D. Буквами в верхней части фигуры обозначены кривые титрования: А, В - белка G, очищенного аффинной хроматографией на IgG Sepharose® 6 FF с привитыми иммуноглобулинами человека из нормальной сыворотки крови; С, D - белка G, 15 ренатурированного и выделенного электроэлюзией из полиакриламидного геля.) Различие интервалов титрования и их параллельный характер указывают на концентрационные, но не функциональные различия двух использованных препаратов белка G.

Пример 6. Иммуноблот.

20 Разделение очищенного белка G и предокрашенных маркеров проводили ДСН-электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле в редуцирующих условиях в режиме постоянного тока 20 mA. После завершения ДСН-ПААГ гель освобождали от стеклянных пластин и помещали на 15 мин в буферный раствор, содержащий 25 мМ триц основной, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, 20% этанол (рН 8,3). Раствор в кювете с гелем 25 периодически перемешивают. Гель с необходимыми прокладками помещают в устройство для переноса, накладывают на него нитроцеллюлозную мембрану со стороны анода, слои фильтровальной бумаги для уплотнения, предварительно увлажненные буфером, электроды и подключают ток. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводят перпендикулярно первому направлению разделения при постоянном 30 токе 400 mA и температуре 22°C, в течение 1 час, после чего мембрану осторожно извлекают и немедленно помещают в блокирующий раствор, содержащий 1% бычий сывороточный альбумин, или 5% обезжиренное молоко в ФСБТ. Подавление неспецифических взаимодействий проводят при перемешивании раствора на качалке в течение 2 час при 37°C. Для промывки мембран и разведения белков на каждом 35 промежуточном этапе используют ФСБТ. Блокированную и промытую мембрану разрезают на части, каждую из которых инкубируют в отдельных кюветах с различными растворами нормальных сывороток в течение 2 час при 37°C, после чего промывают и инкубируют при тех же условиях с соответствующими растворами конъюгатов антивидовых антител с пероксидазой хрена. Далее промывают ФСБТ и помещают в 40 раствор хромогенного субстрата, содержащего 3,3'-диаминобензидин (0,5 мг/мл), хлорид никеля (0,1 мг/мл), 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,05 M Трис-HCl (рН 7,6). Перекись водорода добавляют после растворения всех компонентов субстрата и используют его немедленно, реакцию останавливают, промывая окрашенные фрагменты мембран дистиллированной водой (Фиг. 4. Числами в верхней части фигуры обозначены линии: 1, 2, 3, 4 - фрагменты 45 мембран иммуноблота; 5 - фрагмент геля, окрашенный кумасси G-250; 3 - предокрашенные маркеры молекулярных масс, числовые значения приведены в правой части фигуры и выражены в килодальтонах, все остальные линии содержат очищенный белок G. Обработка мембран: линия 1 - сыворотка крови человека; линия 2 - сыворотка

крови мышей; линия 4 - сыворотка крови кролика.). Анализ иммуноблотов позволяет сделать заключение о том, что белок G денатурируется в результате термообработки образцов в присутствии 0,1% ДСН буфера Лэмли перед электрофорезом, утрачивает способность связывать различные иммуноглобулины G и остается преимущественно

5 в денатурированном состоянии после переноса на нитроцеллюлозную мембрану, что подтверждается чрезвычайно слабой окраской полос или ее отсутствием (Фиг. 4, линии 1, 2 и 4). В это же время, электрофореграмма (Фиг. 4, линия 5) указывает на значительное (не менее 1 мкг) количество белка G в линиях.

Пример 7. Дот-блот.

10 Для подготовки различных вариантов рабочей нитроцеллюлозной мембраны готовят ряд последовательных двукратных разведений белков «первого слоя», в качестве которых выступают белок G, или иммуноглобулины G нормальной сыворотки крови различных животных, в частности кролика и мыши. Растворы белков переносят в объеме 1 мкл каждого разведения рядами на поверхность размеченной мембраны.

15 Мембрану сушат в течение 1 час при 23°C, после чего погружают в блокирующий раствор, содержащий 1% бычий сывороточный альбумин или 5% обезжиренное молоко в ФСБТ. Блокировку проводят на качалке в течение 2 час при 37°C. Для промывок мембран и разведения белков на каждом промежуточном этапе используют ФСБТ. Перечисленные этапы являются общими для всех проводок. На последующих этапах,

20 в зависимости от схемы эксперимента, применяют различные последовательности инкубации мембран в растворах нормальных сывороток животных, белка G, коньюгатов различных антител с пероксидазой хрена, как правило, в течение 2 час при 37°C с необходимыми промежуточными промывками ФСБТ. При длительных экспериментах, выходящих за пределы одного рабочего дня, этапы инкубации проводят

25 в течение ночного времени, но при 6°C. Этап обработки субстратом является общим и завершающим для всех схем проводки: промытую мембрану помещают в раствор субстрата, содержащего 3,3'-диаминобензидин (0,5 мг/мл), хлорид никеля (0,1 мг/мл), 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,05 М Трис-НСl (pН 7,6). После добавления перекиси водорода субстрат используют немедленно, реакцию останавливают, промывая мембрану

30 дистиллированной водой. Описания всех использованных схем дот-блотов приведены на Фиг. 5. Числами в верхней части фигуры обозначены секторы нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными белками в последовательных двукратных разведениях, начиная с наибольшей концентрации, составляющей 1000 мкг/мл (секторы 1 всех полос). Полосы с сорбированным белком G обозначены слева надписью «Белок G», полосы с

35 сорбированным бычьим сывороточным альбумином обозначены слева надписью «Альбумин». Полосы, обозначенные справа как «А» и «В» вместе с прилегающими полосами «Альбумин», отличаются проводкой мембран.

Проводка А: этап 1 - сорбция белка G и альбумина, 1 час, 24°C; этап 2 - промывка ФСБТ; этап 3 - инкубация с блокирующим агентом, 2 час, 37°C; этап 4 - промывка ФСБТ; этап 5 - инкубация с раствором IgG мыши, 1 мкг/мл, 2 час, 37°C; этап 6 - промывка ФСБТ; этап 7 - инкубация с коньюгатами антимышьиных антител с пероксидазой хрена, 2 час, 37°C; этап 8 - промывка ФСБТ; этап 9 - хромогенный субстрат.

Проводка В: этап 1 - сорбция белка G и альбумина, 1 час, 24°C; этап 2 - промывка ФСБТ; этап 3 - инкубация с блокирующим агентом, 2 час, 37°C; этап 4 - промывка ФСБТ; этап 5 - инкубация с раствором IgG кролика, 1 мкг/мл, 2 час, 37°C; этап 6 - промывка ФСБТ; этап 7 - инкубация с коньюгатами антикроличьих антител с пероксидазой хрена, 2 час, 37°C; этап 8 - промывка ФСБТ; этап 9 - хромогенный

субстрат. Числами в верхней части фигуры обозначены участки нитроцеллюлозной мембранны с сорбированными иммуноглобулинами G (IgG) в последовательных двукратных разведениях, начиная с наибольшей концентрации IgG, составляющей 1000 мкг/мл (участки 1). Виды сорбированных на нитроцеллюлозную мембранны IgG обозначены в левой части фигуры.

Проводку мембран осуществляли следующим образом: этап 1 - сорбция IgG мыши или кролика, 1 час, 24°C; этап 2 - промывка ФСБТ; этап 3 - инкубация с блокирующим агентом, 2 час, 37°C; этап 4 - инкубация с раствором ренатурированного белка G, 1 мкг/мл, 2 час, 37°C; этап 5 - промывка ФСБТ; этап 6 - инкубация с растворами IgG:

5 верхний ряд - IgG кролика, нижний ряд - IgG мыши, 1 мкг/мл, 18 час, 6°C; этап 7 - промывка ФСБТ; этап 8 - инкубация с конъюгированными с пероксидазой хрена антивидовыми антителами против IgG, использованных на этапе 6, 2 час, 37°C; этап 9 - промывка ФСБТ; этап 10 - хромогенный субстрат. Числами в верхней части фигуры обозначены секторы нитроцеллюлозной мембранны с сорбированными белками в 10 последовательных двукратных разведениях, начиная с наибольшей концентрации, составляющей 1000 мкг/мл (секторы 1 всех полос). Полосы с сорбированными IgG мыши в составе сыворотки крови мышей также обозначены надписью слева. Полосы, обозначенные справа как «А», используют в проводке белок G, очищенный из растворимой фракции лизатов клеток *E. coli* аффинной хроматографией при помощи 15 IgG Sepharose 6B. Полосы «В» используют в проводке белок G, ренатурированный и выделенный электроэлюзией в настоящем исследовании.

Проводка полос «А» и «В» с сорбированными IgG кролика: этап 1 - сорбция IgG кролика, 1 час, 24°C; этап 2 - промывка ФСБТ; этап 3 - инкубация с блокирующим агентом, 2 час, 37°C; этап 4 - промывка ФСБТ; этап 5 - инкубация с растворами белка 25 G: линия «А» - очищенного аффинной хроматографией, линия «В» - ренатурированного и выделенного электроэлюзией, 1 мкг/мл, 2 час, 37°C; этап 6 - промывка ФСБТ; этап 7 - инкубация с раствором нормальной сыворотки мышей (1:100), 2 час, 37°C; этап 8 - промывка ФСБТ; этап 9 - инкубация с конъюгатами антимышиных антител с 30 пероксидазой хрена, 2 час, 37°C; этап 10 - промывка ФСБТ; этап 11 - хромогенный субстрат.

Проводка полос «А» и «В» с сорбированной нормальной сывороткой мышей (1:30): этап 1 - сорбция белков сыворотки, включая IgG мыши, 1 час, 24°C; этап 2 - промывка ФСБТ; этап 3 - инкубация с блокирующим агентом, 2 час, 37°C; этап 4 - промывка ФСБТ; этап 5 - инкубация с растворами белка G: линия «А» - очищенного аффинной 35 хроматографией, линия «В» - ренатурированного и выделенного электроэлюзией, 1 мкг/мл, 2 час, 37°C; этап 6 - промывка ФСБТ; этап 7 - инкубация с раствором IgG кролика (1 мкг/мл), 2 час, 37°C; этап 8 - промывка ФСБТ; этап 9 - инкубация с биотинилированными F(ab)<sub>2</sub> фрагментами антикроличьих антител, 2 час, 37°C; этап 10 - промывка ФСБТ; этап 11 - стрептавидин-пероксидаза (1:3000), 2 час, 37°C; этап 12 - 40 промывка ФСБТ; этап 13 - хромогенный субстрат.

Для подтверждения свойств ренатурированного белка используют различные схемы последовательных иммунохимических взаимодействий (различные проводки). При схеме прямого дот-блота, как и в иммуноблоте (Фиг. 4), на нитроцеллюлозную мембранны первым слоем сорбируют очищенный, функционально активный ренатурированный 45 белок G и после блокировки проводят через растворы различных антител, соответствующих антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена и субстрата (Фиг. 5). Появление окрашенных пятен в 11 секторе для кроличьих антител и в 12 секторе для антител мыши соответствуют количествам белка G 0,98 нг и 0,49 нг

в 1 мкл раствора, сорбированного на мембранны. Альбумин, использованный в качестве контроля в проводках А и В, не показывает окраски пятен даже при сорбции на мембранию 1000 нг белка (Фиг. 5). По сравнению с иммуноблотом (Фиг. 4) 5 ренатурированный белок G в прямом варианте дот-блота проявляет способность связывать IgG кролика и мыши в концентрациях на три порядка меньше, чем белок G, термоденатурированный перед ДСН-электрофорезом.

В отличие от прямого дот-блота, новый вариант использует белок G в качестве «мостика», связывающего иммуноглобулины различных видов животных (Фиг. 6). В этом случае макромолекула белка G должна нести по крайней мере два центра 10 связывания константных областей IgG, и проявление такой способности доказывает наличие функциональной активности белка G, подвергнутого ренатурации. Для подтверждения, в эксперименте на нитроцеллюлозную мембранию сорбируют различные 15 виды иммуноглобулинов G, соответственно, кролика и мыши в последовательных двукратных разведениях от нулевого до 1:2048, что соответствует в последней, 12-й ступени концентрации 0,488 мкг/мл. Далее, IgG первого слоя взаимодействуют с белком G, к которому перекрестно присоединяют IgG мыши и кролика. Обработка 20 соответствующими конъюгированными антивидовыми антителами и субстратом приводит к появлению окрашенных пятен, отчетливо различимых в шестом и седьмом разведениях, что доказывает наличие у ренатурированного белка G способности связывать IgG мыши и кролика. Расчеты показывают, что для связывания белка G 25 необходимо сорбировать на мембранию в одном пятне не менее 30 нг антител (Фиг. 6, участки 6 и 7). Однако в этой схеме мы не можем исключить вероятность прямого взаимодействия антивидовых конъюгатов с сорбированным белком G первого слоя за счет оставшихся свободных мест связывания. Схема дот-блота, исключающая такую 30 возможность, и его результаты приведены на Фиг. 7. Проводка отличается от предыдущего варианта тем, что на завершающих этапах вместо конъюгатов антивидовых антител используют биотинилированные F(ab)<sub>2</sub> фрагменты антител, утратившие способность к взаимодействию с белком G вследствие удаления константной Fc области молекулы IgG. Окраска пятен на полосах А и В с сорбированной сывороткой мыши доказывает отсутствие неспецифического связывания конъюгата с белком G.

### (57) Формула изобретения

Способ выделения ренатурированного белка G из маркированного 35 полиакриламидного геля, включающий разделение субфракций бактериальной массы центрифугированием в течение 15 мин при 1500×g с последующим переосаждением полученного осадка при тех же условиях при 10°C, ресуспендионием в растворе 8 М мочевины, содержащем 10 mM Трис-HCl (pH 8,0) и 1,5 mM ЭДТА и длительным 40 перемешиванием с финальным центрифугированием суспензии при 14000×g в течение 30 мин при 12°C для получения надосадочной фракции, отличающейся тем, что для денатурации и ренатурации используют белок G, иммобилизованный в составе 45 полиакриламидного геля в редуцирующих условиях (ДСН-ПААГ) с маркированием положения белка G по завершении и отделением фрагмента маркированного геля, содержащего белок G с последующей последовательной обработкой фрагмента геля денатурирующим буферным раствором, содержащим 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% Тритон X-100, 6 M мочевину, 2 M тиомочевину в течение 1 час и 50 ренатурирующим буферным раствором, содержащим 20 mM Трис (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM сульфобетамина, 1 mM ЭДТА в течение 3 час при 20°C с трехкратной сменой буфера и завершающей электроэлюзией ренатурированного белка G из измельченного

геля в буферном растворе, содержащем 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,5) в течение 2 час и силой тока 200 мА.

5

10

15

20

25

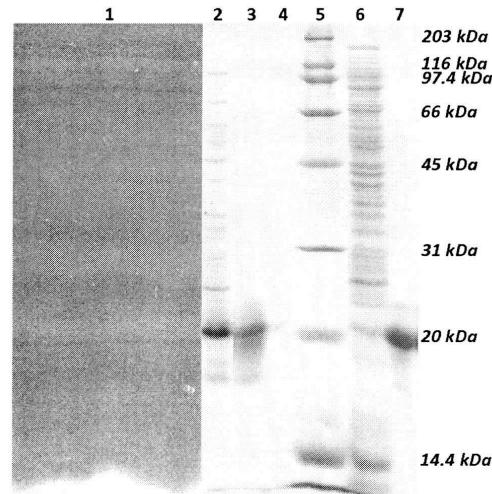
30

35

40

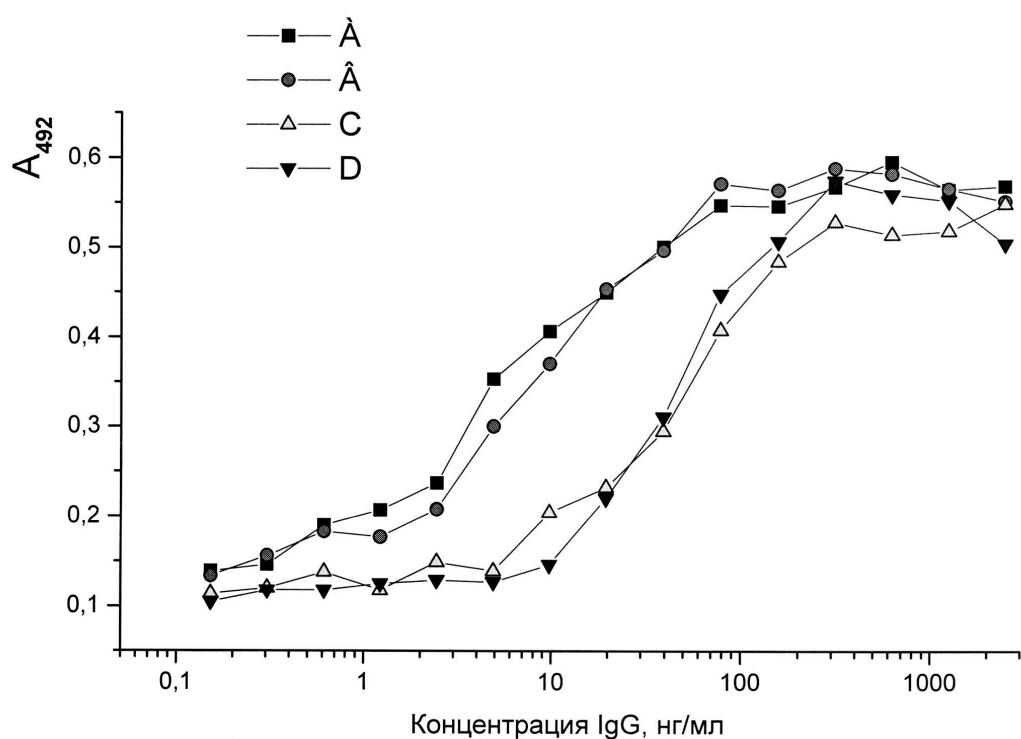
45

Способ выделения ренатурированного белка  
G из маркированного полиакриламидного  
геля



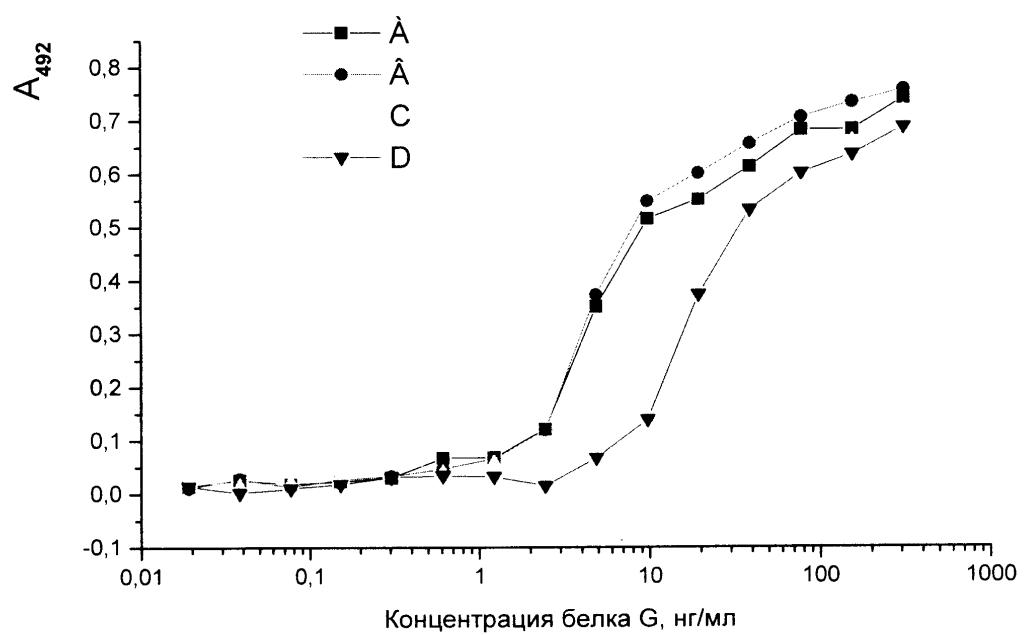
Фиг.1.

Способ выделения ренатурированного белка  
G из маркированного полиакриламидного  
геля

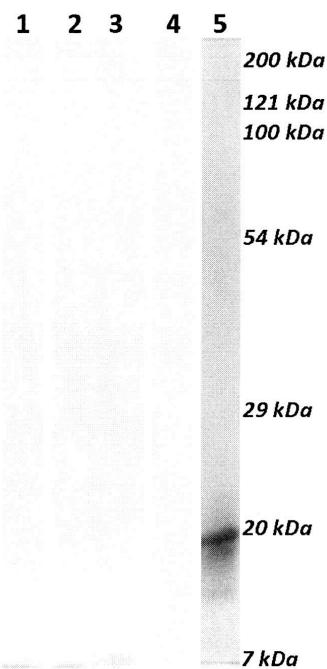


Фиг. 2.

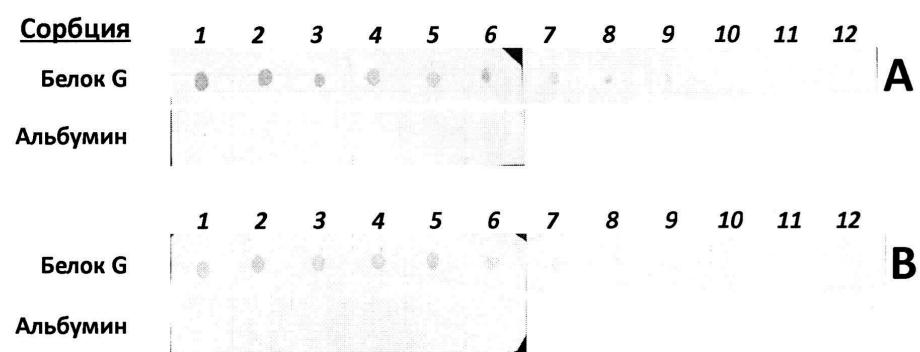
Способ выделения ренатурированного белка G  
из маркированного полиакриламидного геля



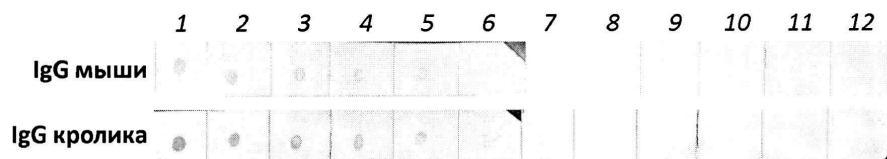
Фиг. 3



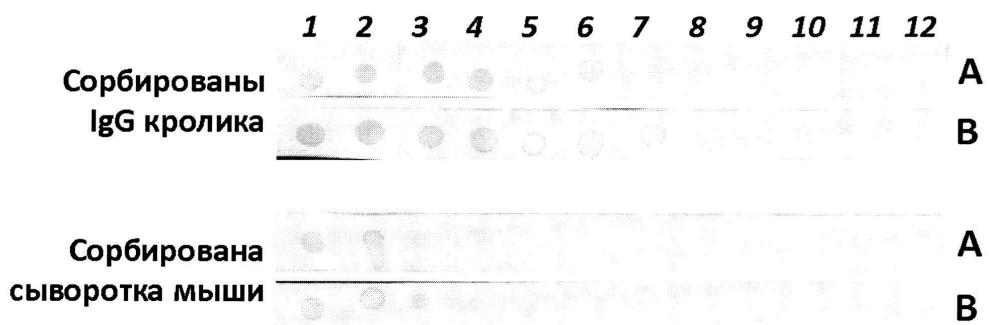
Фиг. 4. Электрофорез и иммуноблот белка G, обработанный различными иммуноглобулинами.



Фиг. 5. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи дот-блота по схеме иммуноблота с электропереносом белков после электрофореза в ДСН-ПААГ.



Фиг. 6. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи дот-блота.



Фиг. 7. Определение иммунохимических свойств ренатурированного белка G при помощи непрямого дот-блота с исключением возможного неспецифического взаимодействия коньюгатов и белка G.