

6. Johnston F. B., Stern H. *Nature (Lond)*, 179, 145, 160, 1957.
7. Holt C., Brandt W. *Methods in Cell Biology*, 18, 514, 1978.
8. Lange B., Huang G. H. *Biochim. Biophys. Acta*, 521, 324, 1978.
9. Panyam S., Chalkley R. *Arch. Biochem and Biophys.*, 130, 337, 1969.
10. Simon J. H., Becker W. M. *Biochim et Biophys. Acta*, 474, 1, 154, 1951.

*«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 12, 1985*

УДК 547.952:612.8.015

## ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КИСЛЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ МЕТОДОМ ПЕРЕКРЕСТНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

А. А. КОСТЯНИН, Р. А. КАЗАРЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, К. Б. НАЗАРЯН

Использован метод перекрестного иммуноэлектрофореза для фракционирования кислых водорастворимых белков головного мозга крысы. Обнаружено 10 зон precipitation для нестойкой антисыворотки и 2 зоны после ее истощения. Получена возможность для их идентификации и количественного анализа.

*Ключевые слова:* перекрестный иммуноэлектрофорез, нейроспецифические белки.

Разделение и количественный анализ нативных белков головного мозга сопряжены со значительными трудностями ввиду их высокой гетерогенности и лабильности [5]. Например, широко распространенный метод электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях позволяет различить лишь 10—12 белковых фракций со значительным фоновым и плохой воспроизводимостью, что сильно затрудняет количественные исследования и идентификацию. Более адекватными для решения подобных задач могут быть различные модификации иммуноэлектрического метода, в котором сочетаются мягкие условия проведения эксперимента с высокой воспроизводимостью и широкими возможностями идентификации полученных фракций.

Настоящая работа посвящена разработке высокочувствительного метода количественного анализа кислых белков головного мозга, большинство которых являются нейроспецифическими белками [4, 11], с целью дальнейшего изучения количественных сдвигов их пула при различных физиологических состояниях и патологических проявлениях нервной системы. Кроме того, существует большая вероятность обнаружения новых нейроспецифических белков, поскольку величина транскрибируемых участков генома нервной системы более чем в 2 раза превосходит таковую других тканей [1].

*Материал и методика.* Ткани головного мозга беспородных белых крыс гомогенизировали в 0,01 М трис-фосфатном буфере, pH 7,5 (буфер А), и центрифугировали 30 мин при 105 000 g. Надосадочную жидкость стужали до концентрации белка 50 мг/мл и подавали на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ДФ-32, «Whatman», Англия), которую промывали буфером А до снижения оптической плотности элюата ниже 0,01 О. Е. при 260 нм. Затем элюировали связавшиеся кислые белки тремя объемами 1 М NaCl, приготовленного на буфере А. К полученному белковому пулу добавляли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 80%-ного насыщения, центрифугировали 30 мин при 15 000 g и белко-

ный осадок, отфильтрованный против буфера А, использовали для фракционирования, а против 0,15 М NaCl, приготовленного на буфере А, — для иммунизации. Полнозрелых кроликов-самцов иммунизировали по следующей схеме: в область подкожных лимфоузлов вводили 0,1 мл белкового раствора (10 мг/мл) с 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда («Difco», США); через 30 дней приводили реиммунизацию введением 1 мл белка в той же концентрации без адьюванта: 0,4 мл — внутривенно, 0,4 мл — внутримышечно и 0,2 мл — в область лимфоузлов. Кровь брали на восьмой день после реиммунизации из краевой ушной вены. Из сыворотки крови высеивали с сульфатом аммония 50%-ного насыщения получали глобулиновую фракцию, которую использовали в качестве источника антител. Истощение иммунных сывороток проводили экстрактами водорастворимых белков печени, почек, сердца, а также сыворотки крови. Полноту истощения проверяли реакцией двойной иммунизации в геле по Ухтерлонн, которую проводили по Гусеву [2]. Белок определяли по Лоурн [9], иммуноэлектрофорез — по Фримелю [6] в 1,5%-ном агаре («Fetaka», Зап. Берлин). Для перекрестного иммуноэлектрофореза использовали 1%-ный гель агарозы (тип А, «Calbiochem», США) с эндосмосом 0,13, приготовленный на 0,075 М барбиталовом буфере с лактатом кальция, pH 8,6. Стеклопластинки размером 25×60 мм заливали расплавленной агарозой (3 мл) и после застывания фракционировали белковый раствор (15 мкл) при напряженности 5 В/см 75 мин. Затем проводили электрофорез в перпендикулярном направлении на пластинках размером 60×90 мм в течение 24 ч при напряженности 2 В/см, используя при этом 8 мл агарозного геля и антитела с концентрацией 0,9 мг белка/см<sup>2</sup>. Температуру гелей поддерживали при 10°. После электрофореза гели обрабатывали — «отжимание» по Лореллу [6] — 15 мин, промывание в нескольких сменах физиологического раствора — 24 ч, промывание в дистиллированной воде — 15 мин, «отжимание» и высушивание при 80°, окрашивание в растворе 0,5%-ного куамси K-250 («Fetaka», Зап. Берлин) с составом этанол:уксусная кислота:вода (4,5:1,4,5) — и обезцвечивали в той же смеси без красителя.

**Результаты и обсуждение.** Одним из основных условий высококачественного разделения при перекрестном иммуноэлектрофорезе является подбор буферной системы, обеспечивающий наилучшие условия фракционирования и нулевую подвижность иммуноглобулинов, включенных во второй гель. Из используемых и испробованных нами барбиталовых и трис-глицериновых буферов наиболее приемлемым оказался барбитал-натрий-барбиталовый буфер с лактатом кальция и pH 8,6. Он имеет вполне удовлетворительную емкость, стоек при хранении в течение нескольких недель (при добавлении консерванта), его можно многократно использовать. Указанные в методической части время проведения иммуноэлектрофореза, толщина геля, концентрация антигена и антител, напряженность электрического поля и т. д. также подобраны экспериментально и являются оптимальными для фракционирования кислых белков головного мозга.

Полученные неистощенные антисыворотки дают в реакции двойной иммунодиффузии не менее трех линий преципитации с белками кислой фракции (рис. 1а). Титр антисыворотки, определенный методом последовательных разбавлений антигена, начиная с концентрации 10 мг/мл оказался равным 32. Из рис. 1 б видно, что экстракты водорастворимых белков печени, почек, сердца и сыворотки крови также интенсивно реагируют с неистощенной антисывороткой. После истощения в реакции Ухтерлонн удастся различить одну полосу преципитации, которая соответствует неспецифическому антигену, а точнее антигену, не имеющему общих детерминант с водорастворимыми белками используемых тканей (рис. 1 в, г).

При иммуноэлектрофоретическом разделении истощенная анти-сыворотка выявляет 4 дуги преципитации с подвижностью, соответствующей альбумину и  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -глобулинам сыворотки крови (рис. 1 д).

Перекрестным иммуноэлектрофорезом удается получить до 10 зон преципитации (рис. 2 а), что хорошо иллюстрирует более высокую разрешающую способность этого метода по сравнению с иммуноэлектрофорезом. По классификации Шульца и Хиреманса [12] для сывороточных белков, полученные зоны обладают следующей электрофоретической подвижностью: 1, 1а, 2—альбумины; 3, 3а— $\alpha_1$ -липопротеиды; 4, 5—гаптоглобины; 6, 7, 8—трансферины. После истощения антисыворотки перекрестный иммуноэлектрофорез выявляет два нейроспецифических белка с подвижностью альбуминов (рис. 3 б). Это согласуется с результатами ряда авторов [8, 10], показавших, что электрофоретическая подвижность нейроспецифических белков, таких как ендолаза  $\gamma\gamma$ , креатинкиназа ВВ, альдолаза С<sub>4</sub> и др., при электрофорезе в неденатурирующих условиях соответствует подвижности альбумина и преальбумина сыворотки крови. По некоторым данным [3, 7], в кислой фракции водорастворимых белков содержится не менее 5 нейроспецифических белков, однако при использованной нами схеме иммунизации достаточный для видимой преципитации титр антител был получен только для двух нейроспецифических белков. Возможности повышения титра, а также применения более чувствительного метода регистрации иммунных комплексов изучаются. Идентификация полученных зон возможна при наличии высокоочищенных нейроспецифических белков простой модификацией перекрестного иммуноэлектрофореза («тандем» иммунофорез), а количественный анализ—определением площади зон преципитации.

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР,  
Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Поступило 25.VI 1984 г.

## ԱՌՆՏՆԵՐԻ ԿԼԻՆԻԿԱԿԱՆ ԶՐԱԼԱԽ ԹԹՈՒ ՍՊԵՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ ՀՐԱՎՅՈՒՆՈՒՄԸ ԽԱՉԱԶԵՎ ԻՄՈՒՆՈԼՈԳԻԱՅԻՆ ԵՐԵՎԱՆԻ ՄԵԹՈԴՈՎ

Ա. Ա. ԿՈՍՏԱՆՅԱՆ, Ռ. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Է. Ս. ԴԵՎՈՐՅԱՆ, Վ. Բ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ

Խաչաձև իմունոլոգիաբարձրագույն մեթոդով հաշվարկովիչ են պրեցիպիտացիայի 10 շրջաններ, երբ օգտագործվել է ոչ զտված հակաշիճուկ, իսկ զտված օգտագործելիս՝ 2 շրջան: Հնարավորություն է ունեղծվել ալղ շրջանների իղևնաթիկացիայի և քանակական անալիզի համար:

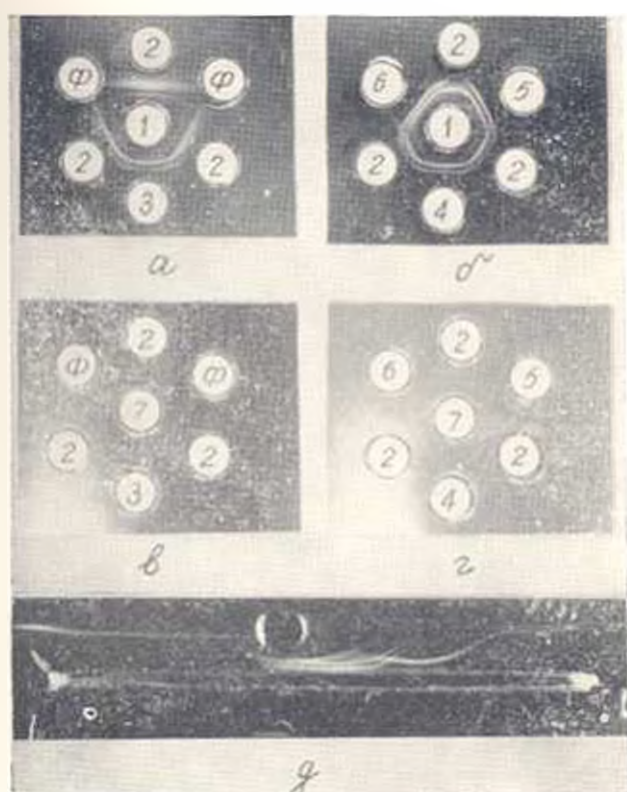


Рис. 1. Реакция двойной иммунной диффузии (а, б, в, г) и иммуноэлектрофорез кислой фракции водорастворимых белков головного мозга крысы с неистощенной антисывороткой (а) 1—неистощенная антисыворотка; 2—кислая фракция водорастворимых белков головного мозга крысы; 3, 4, 5, 6—водорастворимые белки экстракта печени, почки, сердца и сыворотки крови; 7—истощенная антисыворотка; φ—физиологический раствор

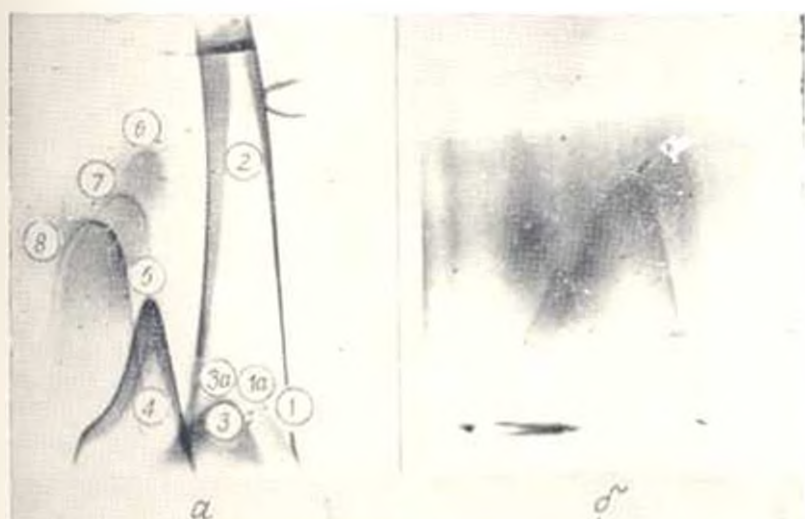


Рис. 2. Перекрестный иммуноэлектрофорез кислых водорастворимых белков головного мозга крысы с неистощенной антисывороткой (а) и истощенной антисывороткой (б)



# FRACTIONATION OF THE RAT BRAIN WATERSOLUBLE ACIDIC PROTEINS BY CROSS IMMUNOELECTROPHORESIS METHOD

A. A. KOSTANJAN, R. A. KAZARJAN, E. S. GEVORKJAN, K. B. NAZARJAN

10 zones of precipitation for inexhausted antiserum and 2 zones for exhausted antiserum have been received by cross immunoelectrophoresis of the rat brain acidic watersoluble proteins. This allows the possibility of their identification and quantitative analysis.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Витвицкий В. Н. В кн.: Системогенез и проблемы генетики мозга. Под ред. Н. П. Дубинина, 192—222, М., 1983.
2. Гусев А. И. В кн.: Иммунохимический анализ. Под ред. А. А. Зильбера, 99—119, М., 1968.
3. Корочкин Л. И., Полякова Е. В., Свиридов С. М. Бюлл. экспер. биол. и мед., 8, 80—83, 1971.
4. Назарян К. Б. Ж. невропат. и психиатр., 78, 283—291, 1978.
5. Прохорова М. И. В кн.: Нейрохимия. Под ред. М. И. Прохорова, 5—11, Л., 1979.
6. Фримель Х. В кн.: Иммунологические методы. Под ред. Х. Фримеля, 9—18, М., 1979.
7. Jackson P., Thompson R. J. J. Neurol. Sci., 49, 429—438, 1981.
8. Lim L., Hall C., Leung T. J. Neurochem., 41, 1177—1182, 1983.
9. Lowry O. H., Resebrough N. J., Farr A. L., Randal R. I. J. Biol. Chem., 193, 265—275, 1951.
10. Maragos P. J., Zauzely—Neurath C., Luk D. C. M., York C. J. J. Biol. Chem., 250, 1774—1791, 1975.
11. Moore B. W. Adv. Neurochem., 1, 137—155, 1976.
12. Shultze H. E., Heremans J. E. Molecular Biol. Human Prot., Amsterdam—London—New—York, 1, 1966.

«Биолог. Х. Архив», т. XXXVIII, № 12, 1985

УДК 612.825.612.822.3.612.828

## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ - И $\beta$ -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ НА АМПЛИТУДНО-ВРЕМЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВП КОРЫ СОМАТОСЕНСОРНОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА У КРЫС

И. Г. САРКИСЯН, Т. Г. УРГАНЦУЖЯН

Показано, что блокирование  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов с помощью албидана и Фен-толамина вызывает облегчение соматических вызванных первичных ответов. Установлено также превалирующее влияние  $\beta$ -адренорецепторов на соматосенсорную область коры мозга.

*Ключевые слова:* адренорецепторы, адреноблокаторы, вызванный потенциал.

Изучение механизмов порадергергического участия в интегративной деятельности мозга представляет не только теоретический интерес, но и имеет определенное практическое значение в связи с наличием