



УДК 591.11.8:612.017

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРНОГО БЕЛКА МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

РОЗАНОВ С. Н., ЯНЮШИНА Г. В.

Институт биологической физики АН СССР, г. Пущино

Предложена модификация метода линейного иммуноэлектрофореза для определения ацетилхолинорецепторного белка (АХР) в количествах порядка 10^{-8} г. Метод основан на иммуноэлектрофоретическом определении остатка кобротоксина после его предварительного связывания с АХР в исследуемой пробе. Показана возможность определения АХР при помощи этого метода в полоске ПААГ после электрофореза с тритоном X-100.

Рецепторный белок никотинчувствительных ацетилхолинорецепторов из электрических органов электрического ската *Torpedo* и электрического угря *Electrophorus*—один из наиболее изученных белков-рецепторов. Разработаны методы его выделения и очистки [1—6], получены сведения об аминокислотном составе [1, 7, 8], четвертичной структуре [1, 4, 7, 9—12], взаимодействии активного центра с лигандами [7, 8, 10, 11, 13, 14] и молекулярных механизмах, обеспечивающих физиологическую функцию АХР—изменение ионной проводимости хеморецептивной мембраны при взаимодействии рецептора с нативным лигандом АХ. В то же время остается без ответа вопрос о том, изменяется ли под действием интенсивной стимуляции или фармакологического воздействия на нейроны содержание АХР в их хеморецептивных мембранах.

Работа с малыми системами нейронов требует применения методов, сочетающих высокую специфичность идентификации белка с возможностью работы с микро- и ультрамикроколичествами материала.

Данное сообщение посвящено определению микроколичеств холинорецептивного белка путем сочетания электрофореза в ПААГ и иммуноэлектрофореза. Электрофорез в ПААГ позволяет разделить на большое количество фракций белки гомогената ткани без промежуточных операций очистки, что крайне важно при работе с миллиграммовыми навесками ткани. Последующий электрофорез в направлении, перпендикулярном первому, через среду, содержащую антитела к идентифи-

цируемому белку, позволяет получить представление о количестве этого белка в пробе.

Однако получение антител к АХР сопряжено с рядом трудностей. Поэтому в примененной модификации метода двумерного иммуноэлектрофореза в качестве антигена был использован нейротоксин 2 (НТ-2) из яда кобры *Naja laja oxiana*, на который у кроликов вырабатывали антисыворотку по методу, описанному ранее [15]. Метод иммунизации в лимфоузлы позволяет при минимальном расходе антигена получить антисыворотку с высоким титром антител, кролики хорошо переносят иммунизацию и могут быть многократно реиммунизированы. Титр антител, определенный по кольцевому тесту [16], у разных кроликов отличался; использовали антисыворотки с титром не менее 256.

НТ-2 — основной белок с изоэлектрической точкой 9,1 и при pH, близким к 8, движется в электрическом поле к катоду, тогда как АХР в этих условиях движется к аноду. При нанесении раствора НТ-2 в траншею, расположенную у анодной стороны пластинки с агарозным гелем, токсин, двигаясь к катоду и проходя через агарозу, содержащую антитела к нему, образует линию преципитации, параллельную траншее. При расположении пробы с АХР на пути НТ-2 АХР движется навстречу токсину и связывает его. Уменьшение количества НТ-2 в зоне, содержащей АХР, приводит к тому, что линия преципитации в этом месте образует провал, площадь которого пропорциональна недостатку НТ-2, то есть количеству АХР в пробе. В настоящей работе исследована возможность определения чистого АХР указанным методом — прямого иммуноэлектрофоретического титрования.

Материалы и методы

Реактивы и оборудование. Препарат н-АХР из электрических органов ската *Torpedo*, содержащий 30% активного по связыванию с НТ-2 белка, и иммунологически чистый препарат НТ-2 были любезно предоставлены В. И. Цетлиным (Институт биоорганической химии АН СССР), которому авторы глубоко признательны. Реактивы для электрофореза в ПААГ — из комплекта фирмы «Reanal», акриламид, метил-лен-бисакриламид и трис перекристаллизовывали. Тритон X-100 фирмы «Koch—Light», агароза марки «С» фирмы «Pharmacia». Все операции по гомогенизации, приготовлению градиентных гелей, электрофорезу и денситометрии проводили на аппаратуре, разработанной Санталовым в нашей лаборатории и Лариным в СКБ БИ АН СССР [17]. Иммуноэлектрофорез осуществляли в аппарате типа Лорелла [18] на стеклах 75×50×1 мм.

Электрофорез в ПААГ. АХР — гидрофобный белок, удерживающийся в растворе только в присутствии детергентов. Электрофорез в ПААГ в нашей постановке должен был сохранить нативные свойства белка, в частности его способность связываться с НТ-2. 0,025%-ный тритон X-100 в трис-глициновой системе давал повышение концентрации

детергента при переходе из концентрирующего геля в разделяющий, что ухудшало разделение белков, особенно высокомолекулярных. Удовлетворительные результаты были получены при замене глицина валином. В остальной методика электрофореза соответствовала описанной в литературе рекомендациям [19, 20]. Плоские гели $90 \times 55 \times 1$ мм формировали по 6 одновременно в кассете при помощи градиентного прибора с графически задаваемой программой. Концентрация геля увеличивалась от 4 до 6% на верхних 10 мм геля, с 6 до 10% на следующих 3 мм, затем линейно возрастала до 20%. Применение ступенчатого градиента оказалось необходимым, поскольку АХР, как и большинство гидрофобных белков, ни в однородном, ни в линейно-градиентном геле не концентрируется в узкую полосу в системе с тритоном X-100.

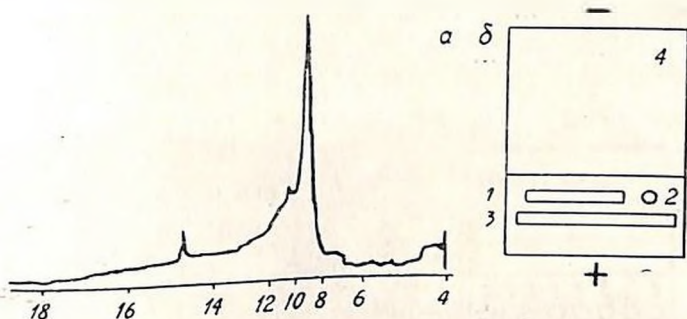


Рис. 1. Иммунофоретическое определение ацетилхолинорецепторов в пластинке ПААГ после предварительного электрофореза. а—денситограмма электрофореза ацетилхолинорецепторов в градиентном ПААГ. По оси абсцисс—содержание полиакриламида в геле в %. б—схема расположения компонентов реакции на пластинке: 1—траншея для полоски ПААГ, 2—лунка для внесения стандарта ацетилхолинорецепторов, 3—траншея для внесения NT-2, 4—агароза, содержащая антисыворотку к NT-2

Для разделяющего геля использовали 0,375 М трис-HCl буфер, pH 8, 7, для концентрирующего—0,0625 М трис-HCl буфер, pH 6, 8. Разделяющий гель содержал 4,7% метилен-бис-акриламида для предотвращения набухания в буфере для иммуноэлектрофореза, концентрирующий—3,5%. Все растворы содержали 0,025% тритона X-100. В качестве электродного буфера использовали 10 мМ трис-валиновый буфер, pH 8, 45. Пластинку с гелем переносили в камеру для электрофореза, заполняли ее электродным буфером и микропипеткой наносили в ячейки пробы, утяжеленные сахарозой до 10% и подкрашенные бромфеноловым синим. Часть проб содержала 0,35—0,70 мкг АХР (0,1—0,2 мкг активного белка), остальные—гемогенат ганглиев большого прудовника с общим содержанием белка от 2 до 5 мкг в пробе для контроля качества разделения белков. Электрофорез проводили в течение 30—40 мин при комнатной температуре и силе тока 24 мА от стабилизированного по току источника постоянного тока. По окончании электрофореза из пластинки вырезали полоски от 6 до 12% акриламида, пред-

назначенные для иммуноэлектрофореза, и переносили их на 30 мин в соответствующий буфер. Остальной гель фиксировали 15 мин в 12,5%-ной трихлоруксусной кислоте, затем окрашивали в 0,22%-ном растворе Кумасси R-250 («Serva») в смеси уксусная кислота: этанол: вода (1:4:15) в течение ночи, после чего избыток красителя удаляли электрофоретически в 7%-ной уксусной кислоте. Полученные электрофореграммы денситометрировали на двуволновом сканирующем денситометре с чувствительностью 0,005 оптических единиц плотности (рис. 1, а). Описанный метод электрофореза в ступенчатом градиенте ПААГ с тритеном X-100 позволил получить АХР, сконцентрированный в одной полосе, при удовлетворительном разделении других кислых и нейтральных белков гомогената нервной ткани моллюска. 1%-ную агарозу приготавливали на 0,05 М трис-НСl буфере, pH 8, 15, в качестве электрода не использовали буфер вдвое большей концентрации. На расположенную строго горизонтально стеклянную пластинку 50×75 мм накладывали смоченную водой стеклянную полоску толщиной 1 мм, отделяя

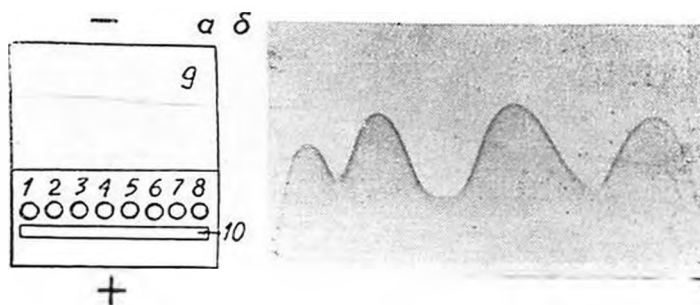


Рис. 2. Зависимость величины провалов линии преципитации от дозы ацетилхолинорецепторов. а—схема расположения проб на пластинке: 1, 3, 5, 7, 8—буфер, 2—20 нг ацетилхолинорецепторов, 4—60 нг ацетилхолинорецепторов, 6—40 нг ацетилхолинорецепторов, 9—агароза с антитывороткой к НТ-2, 10—раствор НТ-2 в буфере; б—результат иммуноэлектрофореза

ею часть пластинки 25×50 мм, на которую наносили 1 мл расплавленной агарозы и устанавливали штамп из оргстекла для формирования двух траншей. Наружная траншея шириной 3 мм была предназначена для внесения раствора НТ-2, внутренняя, шириной 4 мм,—для размещения полоски ПААГ с исследуемой на АХР пробой. После застывания агарозы осторожно снимали штамп и стеклянную разграничительную пластинку; остальную часть пластинки заливали 2,5 мл раствора агарозы при температуре 50°, содержащей 0,1—0,2 мл кроличьей антитыворотки к НТ-2 (рис. 1, б). Дальнейшее уменьшение количества антитыворотки, особенно при сравнительно низком титре антител, хотя и повышало чувствительность метода, но давало слишком бледные, трудно определяемые преципитаты. В части опытов формировали только траншею для НТ-2, а пробы с разным количеством АХР заносили в лунки диаметром 3 мм, формировавшиеся в промежутке между

траншеей для НТ-2 и агарозой с антисывороткой. Такая схема расположения на пластинке компонентов реакции приведена на рис. 2, а. Пластинку переносили в прибор для иммуноэлектрофореза, контактными полосками из агарозы толщиной 1,5 мм соединяли ее с вертикальными агарозными мостиками, контактирующими с буфером в электродных камерах, и устанавливали прибор в строго горизонтальном положении. Во внутреннюю траншею помещали полоску ПААГ, вырезанную из пластинки после электрофореза и выдержанную 30 мин в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 8,15, промежутки между ПААГ и агарозой заполняли буфером. В другом варианте микропипеткой вносили в лунки по 5 мкл раствора АХР разной концентрации в буфере с 0,025% тритона X-100. В наружную траншею вносили 120 мкл буфера, содержащего 2-4 мкг НТ-2, и включали ток и охлаждение. Электрофорез проводили в течение 12 ч при напряжении 2 В/см от источника, стабилизированного по напряжению. По окончании электрофореза гель ополаскивали несколько минут в 0,9%-ном NaCl, затем отжимали [18], ополаскивали дистиллированной водой, снова отжимали, сушили в токе теплого воздуха и окрашивали 30—40 мин в 0,5% Кумасси R-250 в смеси уксусная кислота: этанол: вода (2:9:9), избыток красителя удаляли промыванием в растворителе и сушили пластинку с гелем в токе теплого воздуха.

Результаты и обсуждение

В серии из 10 опытов, где электрофорезу в ПААГ подвергали пробы АХР из электрического органа ската *Torpedo*, содержавшие 20, 40 и 80 нг активного АХР, были получены линии промежуточного связывания НТ-2, площадь которых была пропорциональна количеству АХР в пробе (рис. 2, б). В 8 опытах по сравнению связывания НТ-2 одинаковыми дозами АХР, одна из которых подвергалась предварительному электрофорезу в ПААГ, а другая вносилась непосредственно в лунку

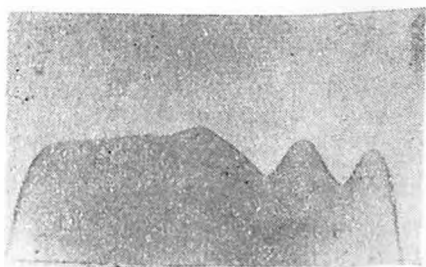


Рис. 3. Результат иммуноэлектрофореза 20 нг ацетилхолинорецепторов после электрофореза в ПААГ и 20 нг ацетилхолинорецепторов, внесенных в лунку

(рис. 3), было получено удовлетворительное совпадение площадей провалов линии преципитации. Площадь пиков связывания определяли приблизительно, как половину произведения расстояния между соседними вершинами и глубиной провала в линии преципитации. При отношении количества белка в пробах, равном 1:2, отношение площадей

провалов в отдельных опытах составляло от 1:1,6 до 1:2,38, в среднем 1:2,04, а при соотношении белка 1:3—от 1:2,66 до 1:3,33, в среднем 1:2,99. Однако, несмотря на удовлетворительное совпадение средних величин с ожидаемыми, при работе с микропробами можно рассчитывать лишь на отдельные определения, ошибка которых достигает 25%.

Высокая специфичность связывания НТ-2 с АХР, возможность получения кроличьей антисыворотки к НТ-2 с высоким титром преципитирующих антител дают возможность определять АХР в нервной и, возможно, мышечной тканях при содержании активного белка в пробе около 10^{-8} г. Дальнейшее увеличение чувствительности может быть достигнуто за счет применения более низких концентраций НТ-2 и антисыворотки, а также меченых антител с последующей авторадиграфией.

Таким образом, АХР может быть идентифицирован при помощи метода иммуноэлектрофореза по описанной методике, предусматривающей предварительный электрофорез в ПААГ при pH, близком к 8, оставляющий только кислые и нейтральные белки, среди которых находится АХР. Метод может быть использован для приблизительного количественного определения АХР в исследуемом материале при наличии чистого препарата АХР для сравнения, либо, в отсутствие препарата АХР, для определения относительного содержания АХР в нескольких пробах при одновременном их иммуноэлектрофорезе на одной пластинке.

INDIRECT IMMUNOLOGICAL TITRATION AS A MICROTEST FOR DETECTION OF ACETYLCHOLINE RECEPTOR PROTEIN

ROZANOV S. I., YANJUSHINA G. V.

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Poustchino

A highly sensitive modification of linear immunoelectrophoretic method for determination of acetylcholine receptor protein (AChR) has been developed. The method is based on the immunological determination of kobrotoxin remaining after its precoupling with AChR. The method can be used also for determination of AChR in the strip of polyacrylamide gel after electrophoresis in the presence of Triton X-100.

ЛИТЕРАТУРА

1. Miledi R., Molinoff P., Potter L. T. *Nature*, 229, 5286, 551—557, 1971.
2. Dolly J. O., Barnard E. A. *FEBS Lett.*, 57, 3, 267—271, 1975.
3. Sobel A., Weber M., Changeux J.—R. *Eur. J. Biochem.*, 80, 1, 215—224, 1977.
4. Heidmann T., Changeux J.—R. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 317—357, 1978.
5. Weinald G., Frisman D., Taylor P. *Mol. Pharmacol.*, 15, 2, 213—226, 1979.
6. Elliot J., Blanchard S. G., Wu W., Miller J., Strader C. D., Hartig P., Moore H.—P., Racs J., Raftery M. A. *Biochem. J.*, 185, 3, 667—677, 1980.
7. Changeux J.—P., Girardat J., Heidmann T., Popot J.—L., Sobel A. *Neurochem. Int.*, 2, 219—231, 1980.

8. *Hucho F.* Trends in Biochemical Sciences, 6, 9, 242—245, 1981.
9. *Claudio T., Raftery M. A.* Arch. Biochem. and Biophys., 181, 2, 484—489, 1977.
10. *Lindstrom J., Mertie J., Yogeewaran G.* Biochemistry, 18, 21, 4465—4470, 1979.
11. *Schiebler W., Bandini G., Huch F.* Neurochem. Int., 2, 281—290, 1980.
12. *Raftery M. A.* Science, 208, 4451, 1454—1457, 1980.
13. *Lindstrom J., Walter B., Einarson B.* Biochemistry, 18, 21, 4470—4480, 1979.
14. *Wenngie L. P., Oswald R., Saitoh T., Changuen J.-P.* Biochemistry, 20, 9, 2492—2497, 1981.
15. *Бортник А. Т., Розанов С. И.* Журн. эволюц. биохимии и физиологии, 15, 5, 543—545, 1979.
16. *Остерман Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, М., Наука, 1983.
17. *Ларин В. Т., Санталов Б. Ф., Хохлов А. М., Розанов С. И.*—В кн.: Описание научных принципов устройства новых приборов и методики пользования ими, с. 14—28, Пушкино, 1981.
18. *Беек Б.*—В кн.: Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу (ред. Аксельсен Н., Крелль П., Беек Б.), с. 11—42, М., Мир, 1977.
19. *Маурер Г.* Электрофорез, М., Мир, 1971.
20. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот, М., Наука, 1981.

Поступила 24. V 1984

В ИЗДАТЕЛЬСТВЕ МГУ ГОТОВИТСЯ К ВЫПУСКУ В 1985 ГОДУ:

БОЛДЫРЕВ А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М., МГУ, 1985—15 л. Цена 70 к.

В учебном пособии рассмотрена биологическая мембрана как динамическая структура, представлены общие принципы организации мембранного барьера, особенности методических подходов к мембранной биохимии, обмен мембранных компонентов и способы модификации барьера. Дана характеристика свойств и принципов функционирования мембранных интегральных и периферических белков. Охарактеризованы функции биологических мембран в процессах транспорта, осуществляемого различными механизмами. Особое внимание обращено на описание свойств нонтранспортирующих систем и транспортных АТФаз.

Для студентов и аспирантов университетов, педагогических институтов, специализирующихся в области биохимии, биофизики, молекулярной биологии, физиологии.

Заказы на книгу направляйте по адресам:

117296, Москва, Ломоносовский пр., 18, магазин № 110

«Университетская книжная лавка» (для москвичей).

117168, Москва, ул. Кржижановского, 14, магазин № 93, «Книга—почтой».