

32. Ichida S., Moriyama M., Hirooka Y., Otazaki Y., Yoshitaka K. *Europ. J. Pharmacol.*, v. 106, p. 657—660, 1985.
33. Kishimoto A., Takai Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka Y. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 2273—2276, 1980.
34. Takai Y., Minakuchi R., Kikkawa U., Sano K., Kaibuchi K., Yu B., Matsubara T., Nishizuka Y. *Progr. Brain Res.*, v. 56, p. 283—301, 1982.
35. Nishizuka Y. *Trends Biochem. Sci.*, v. 8, p. 13—16, 1983.
36. Schulman H. *TIPS Rev.*, v. 5, p. 188—192, 1984.
37. Cheung W. Y. *J. Cycl. Nucl. Res.*, v. 7, p. 71—84, 1981.
38. Этингоф Р. Н., Нейрохимия, № 3, с. 405—418, 1984.
39. Dawson R. M. C., Hemington N. L., Irvine R. F. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 117, p. 196—201, 1984.
40. Snider R. M., McKinney M., Forray C., Richelson E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biol. Sci.*, v. 81, p. 3905—3909, 1984.
41. Roberts M. L., Tennes K. A. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 109, № 2, p. 293—296, 1985.
42. Долго-Сабуров В. Б., Подосиновикова Н. П., Матвеев В. И., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 9, с. 294—297, 1979.
43. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П. *Докл. АН СССР*, т. 264, № 4, с. 994—996, 1982.
44. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П., *Вопр. мед. химии*, № 5, с. 83—87, 1984.
45. Долго-Сабуров В. Б., Матвеев В. И., Подосиновикова Н. П., *Тез. докл. XVI конф. ФЕБО*, Москва, с. 313, 1984.
46. Голиков С. Н., Долго-Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Кулешов В. И., —В кн.: *Холинэргическая регуляция биохимических систем клетки*, с. 124—140, Медицина, М., 1985.

Поступила 7. I 1986

УДК 577.112.083.42.398—088.1/543.545

УЛЬТРАМИКРОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР

ШТАРК М. Б., МИКИЧУР Н. И., БЕРЕТЕННИКОВ Н. А.

Институт автоматики и электрометрии СО АН СССР
Институт клинической и экспериментальной медицины СО АМН СССР, Новосибирск

В обзоре анализируются различные варианты ультрамикроелектрофоретических исследований применительно к изучению белков и пептидов различных структур мозга, нервных клеток и их органелл. Рассматриваются последовательные процедуры выделения структур и их обработка; обсуждаются особенности фракционирования материала в гелях с однородным диаметром пор и градиентных гелях, бескапиллярные варианты ультрамикроелектрофореза, комбинированные методы анализа, встречная иммунодиффузия, импергнационные методы, их возможности и перспективы использования.

Получившие широкое распространение методы электрофоретического фракционирования биологического материала на ПААГ легко адаптируются к исследованиям белка в микромасштабе путем применения их микро- и ультрамикроэлектрофоретических модификаций. Неоспоримым преимуществом микроэлектрофореза (МЭФ) перед соответствующими макровариантами является возможность анализа минимального количества материала и резкое сокращение времени фракционирования и окрашивания образцов, что составляет примерно одну десятую времени, необходимого для выполнения этих процедур при макроисследованиях. Сравнительный анализ микро- и макровариантов показал, что увеличение чувствительности измерений, достигаемое в микромасштабе благодаря значительному уменьшению сечения геля, не приводит к изменению белковых спектров, получаемых в макроэлектрофорезе как при окрашивании специфическими красителями, так и в условиях изотопного анализа [1, 2].

В обзоре рассмотрены появившиеся позднее различные варианты МЭФ и существенно необходимые детали, улучшающие описанные ранее методы.

1. *Подготовка капилляров и полиакриламидных микрогелей.* Важнейшим этапом МЭФ является подготовка капилляров для фракционирования. Их следует предварительно откалибровать под контролем стереомикроскопа [3]. Существует несколько способов мытья капилляров: с применением водоструйного насоса [4], с использованием шприца [3], центрифугированием [5] и др. Считается необходимым покрывать внутренние стенки капилляров слоем гидрофобизирующей жидкости, чтобы сделать их несмачиваемым водой и, таким образом, облегчить процесс извлечения геля из капилляров. Для этого чистые и сухие внутренние поверхности капилляров обрабатывают, например, 0,3%-ным раствором диметилдихлорсилана в бензоле и сушат при 120° в течение часа [3, 6].

Существуют разные варианты приемов, разделяющих и концентрирующих ПААГ. Наибольшее распространение получили системы Neuhoﬀ [7], Davis [8]. Для капиллярного МЭФ более предпочтительными являются разделяющие гели, приготовленные по Neuhoﬀ [7]. Сравнительный анализ, проведенный с использованием маркерных белков (человеческого сывороточного альбумина), а также водорастворимых и тритон-X-100-экстрагируемых белков ганглия улитки *H. pomatia*, показал, что этот метод дает максимальное разрешение с большим числом полос, чем метод Davis [8]. По мнению Neuhoﬀ [4], чем меньше диаметр капилляра, тем выше концентрация ПААГ. Кроме того, разделяющий гель, применяемый для анализа в микрошкале, должен иметь высокое отношение концентрации акриламида к N, N'-метилденбисакриламиду (около 100:1). Добавление гидантона (гликолил-мочевины) к разделяющему гелю в концентрации 0,5% увеличивает разрешающую способность геля, так как гидантон уменьшает длину цепей и, возможно, количество сшивок между ними,

а также увеличивает время полимеризации [7]. Однако применение гидантона не приводит к контролируемому течению реакции полимеризации [13], поэтому воспроизводимость по подвижности отдельных фракций в этом методе невысока. Сравнение концентрирующих гелей в обеих системах [7, 8] показало обратную картину: разрешение улучшается при использовании 3,75%-ного концентрирующего геля по методу Davis [8], ибо рибофлавин, применяемый в качестве катализатора реакции сополимеризации, делает гель однородно крупнопористым.

2. *Фракционирование материала.* МЭФ на ПААГ можно выполнять как в непрерывных, так и в прерывистых (диск) системах. При этом используются разные буферы с отличающимися значениями pH, что позволяет получать узкую стартовую зону, создаваемую благодаря эффекту концентрирования [9, 10]. Фракционирование осуществляется либо на гелях с однородным диаметром пор, либо с применением градиента концентрации ПААГ.

Высокой степени концентрирования, которую можно получить при диск-электрофорезе, с помощью других методов пока достичь не удастся [11, 3], что делает целесообразным фракционирование белков в данных системах по сравнению с непрерывным электрофорезом.

2. 1. *Применение гелей с однородным диаметром пор.* Модификации капиллярного МЭФ, в котором для фракционирования макромолекул используются разделяющие гели с однородным диаметром пор, освещены в литературе [4, 12]. Следует отметить особо важные детали. После приготовления полимеризующей смеси и дегазации ее для устранения кислорода, который является ингибитором реакции полимеризации, капилляры значительно надежнее можно заполнить раствором ПААГ на 2/3 их длины, но не за счет капиллярных сил, как это рекомендует Neuhoﬀ [4]. Мы предлагаем каждый из них вставлять поочередно в полиэтиленовый шланг, соединенный с тормозным шприцем, имеющим винтовую подачу, и заполнять на необходимую высоту. Способ следует использовать при работе с силиконизированными капиллярами, в которых капиллярные силы отсутствуют [5].

Морозов [13] проводил капиллярный МЭФ по Neuhoﬀ [7], используя капилляры диаметром 0,4; 0,32; 0,2; 0,1 мм, и определил, что оптимальное разделение наблюдается в том случае, когда выполняется эмпирически найденная формула, в которой произведение высоты слоя образца (в мм) на концентрацию белка (мг/мл) есть величина постоянная, равная 12 для капилляров любого диаметра. Пользуясь этой формулой, легко определить оптимальную высоту слоя образца для раствора любой концентрации независимо от диаметра капилляра.

Расстояние в геле, на котором производят разделение, определяется количеством фракций в исследуемом материале и различиями в их подвижностях. Следует учитывать два противоположно действующих фактора: 1) с увеличением длины пути (или, что то же, при заданной напряженности поля—с увеличением времени разделения)

возрастает расстояние между отдельными фракциями, обладающими различной подвижностью, то есть улучшается разрешение; 2) пропорционально корню квадратному из времени растет диффузное уширение зон, так как в соответствии с уравнением Эйнштейна $X=2\sqrt{2Dt}$, где X —диффузное уширение зоны, D —коэффициент диффузии, t —время разделения [3].

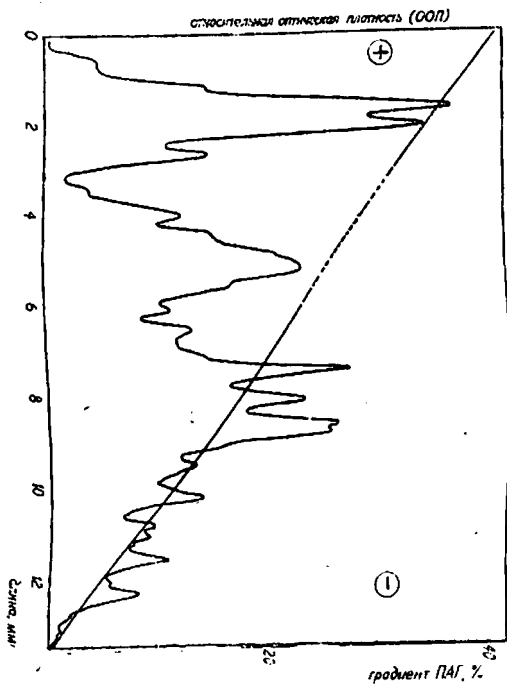
Основная трудность, встречающаяся при миниатюризации метода гель-электрофореза, заключается в том, что уменьшение линейных размеров участка геля ведет к возрастанию роли диффузного уширения зон. Это следует учитывать при выборе оптимального расстояния, на котором происходит разделение образца.

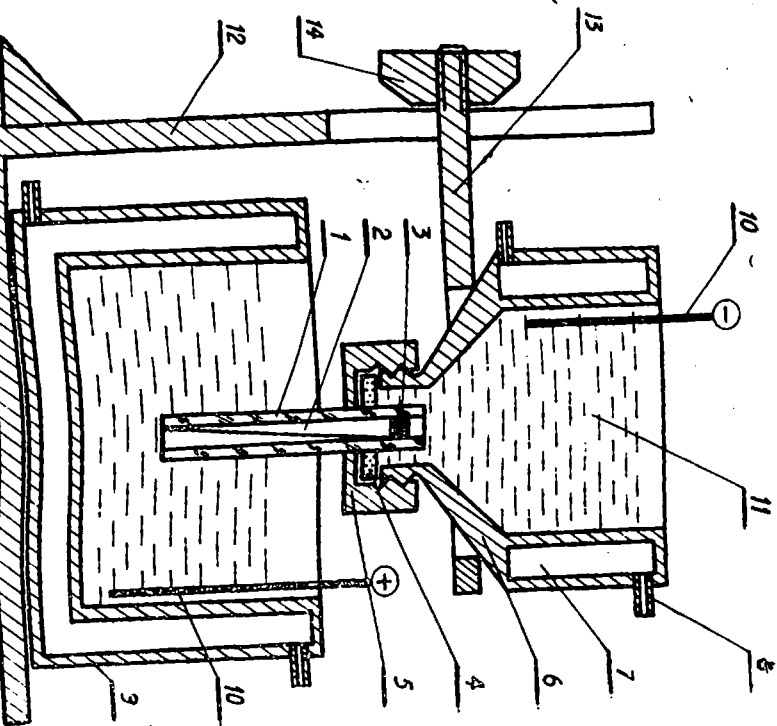
МЭФ предпочтительнее проводить в условиях стабилизации силы тока, так как в ходе электрофореза в прерывных буферных системах при стабилизации по напряжению происходит увеличение сопротивления, поэтому скорость миграции молекул уменьшается и зоны уширяются вследствие диффузии [14].

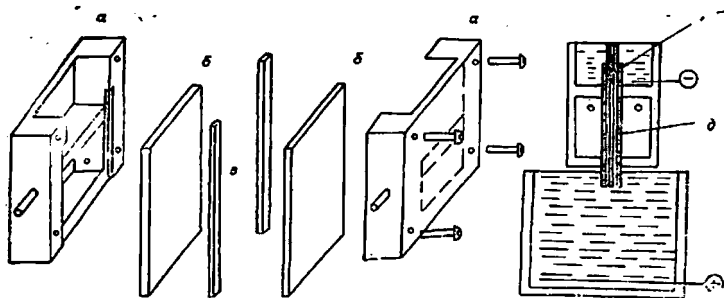
На рис. 1 представлена камера для МЭФ, разработанная и используемая нами в работе [5]. Она изготовлена из органического стекла, отполированного до прозрачности, что позволяет наблюдать с помощью стереомикроскопа МБС-1 течение электрофореза. Капилляр (1) вставляют в резиновую прокладку (4) и гайкой (5) поджимают к верхнему электродному резервуару (6). После этого резервуар располагают на кронштейне (13) и регулируют глубину погружения капилляра в нижний электродный буфер. Сосуд для нижнего электродного буфера (9) фиксирован на штативе (12). Верхний и нижний электродные буферы охлаждают проточной водой (7).

Таким образом, применяя для фракционирования гели с однородным диаметром пор и диск-буферные системы, можно без затруднений анализировать белки, экстрагируемые неионными детергентами типа тритон X-100 и твин, то есть исследовать примерно 40% общего белка мозга позвоночных и до 55% белков НС беспозвоночных животных [15, 16]. Однако такой метод трудно приспособить для разделения белков, экстрагируемых ДДС-Na, что позволило бы анализировать до 97% общего белка [15], ибо для выдавливания геля из капилляра надо добавлять тритон X-100, который преципитирует с ДДС-Na, делая невозможным использование этих двух детергентов одновременно.

2. 2. Анализ белков на градиентных гелях. В случае использования гелей с линейным градиентом концентрации акриламида облегчается процедура выталкивания геля из капилляра, так как высококонцентрированная нижняя его часть, с которой обычно начинается выдавливание, играет роль «пробки» и не приводит к повреждению геля. Такое преимущество обеспечивает проведение фракционирования белков, выделяемых уже описанными тремя способами экстракции. Кроме того, метод позволяет определять величину M_r и увеличивать количество фракционируемых белков. При использовании градиентных гелей происходит значительное увеличение расстояния меж-







6а

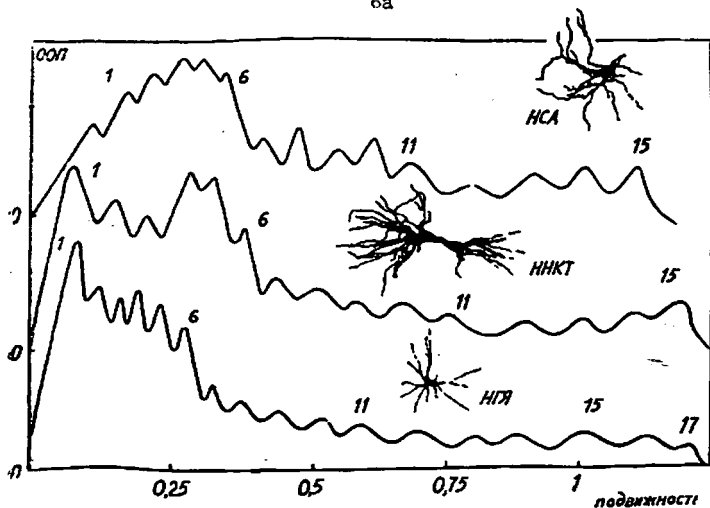


Рис. 1. Камера для выполнения капиллярного микроэлектрофореза. 1—капилляр, 2—гель, 3—проба, 4—уплотнитель, 5—гайка, 6—корпус, 7—рубашка охлаждения, 8—оливы. 9—нижняя электродная камера, 10—электроды, 11—электродный буфер, 12—штатив, 13—кронштейн, 14—зажим Н. romatia. Направление движения полипептидов справа налево (от—к+)

Рис. 2. Денситограмма белкового спектра отдельного нейрона улитки Н. romatia. Направление движения полипептидов справа налево (от—к+)

Рис. 3. Схема камеры для проведения микроэлектрофореза из плоских гелях; а—матрицы из оргстекла, б—предметные стекла, в—прокладки из пластической ленты, г—капилляр с образцом (всего их 10), д—ПААГ.

Рис. 4. Типичные денситограммы трех исследованных видов нейронов.

НГЯ—гигантские мультиполярные нейроны гигантоклеточного ретикулярного ядра продолговатого мозга, НСА—пирамидные клетки CA_3 — CA_4 полей гиппокампа, ННКТ—релейные нейроны наружного коленчатого тела. По оси абсцисс—подвижность, по оси ординат: ООП—относительная оптическая плотность

ду отдельными фракциями по сравнению с однородными гелями, что позволяет не предъявлять строгих требований к разрешающей способности микроденситометров.

В литературе описан простой способ формирования градиентных гелей, который требует для получения линейной концентрации ПААГ всего лишь трех растворов: раствора мономеров, буферного раствора и раствора катализаторов реакции сополимеризации [17]. Наиболее уязвимым моментом методики формирования градиентных гелей является «торможение» подъема жидкости пальцем при заполнении капилляра раствором катализатора, что не позволяет добиться максимальной стандартизации процедуры. Модификация способа формирования градиента, предложенная нами, основана на принципе «тормозной» пипетки и обеспечивает более воспроизводимые результаты [16].

3. *Анализ полипептидов на гелях с линейным градиентом ПААГ в присутствии ДДС-Na*. Эта методика наиболее подробно освещена Rüchel и соавт. [17], которые использовали те же растворы, что и при фракционировании в отсутствие детергента. Наличие ДДС-Na в геле не требуется, так как молекулы детергента мигрируют в электрическом поле быстрее любого из полипептидов, что можно наблюдать в течение 5 мин в 0,5%-ном толуидиновом голубом. Так как ДДС-Na в высоких концентрациях нарушает анионную границу, его следует добавлять в электродный буфер в концентрациях, не больших 0,2% (обычно 0,1%).

Особое внимание следует обратить на приготовление образцов: концентрация детергента не должна превышать 2,5%, при большей концентрации фракционирование идет хуже. Ионная сила не оказывает прямого влияния на связывание ДДС-Na с белком так же, как и рН раствора в интервале 7,2—9,3 [18]. На рис. 2 представлена денситограмма фракционирования полипептидов отдельного нейрона улитки *H. pomatia*, полученная нами этим методом. Rüchel и соавт. [18] нашли, что фракционирование с ДДС-Na лучше осуществлять на непрерывных буферных системах, чем в диск-электрофореze, так как в последних могут появляться дополнительные фракции, отражающие разную загрузенность белка детергентом (это может наблюдаться в случае фракционирования белков, не имеющих специальной аффинности к ДДС-Na). Например, это имеет место при разделении бычьего сывороточного альбумина, в ходе электрофореza которого ДДС-Na отделяется от полипептидов, приводя к разной загрузке его детергентом. Изменяющаяся сила электрического поля, возникающая в диск-системах, способствует разложению комплексов «ДДС-Na-полипептид». Поэтому, несмотря на такие очевидные недостатки непрерывного МЭФ, как его продолжительность (до 1 ч) и меньшая четкость полюс, его следует в данном случае предпочесть.

4. «Бескапиллярные» варианты ультрамикроэлектрофореza. Применяя методы капиллярного МЭФ, можно легко определить 10^{-9} г

белка в отдельной полосе. Однако задачи по анализу существенно меньших количеств материала (пикограммы) трудно решить, используя описанные методы. Повышения чувствительности МЭФ добиваются сокращением диаметра геля, но затруднительно применять в работе гели диаметром меньше 300 мкм и объемом меньше 2 мкл из-за сложности механического удаления геля из капилляра (для фиксации, окрашивания и дальнейшего сканирования белков).

Эту проблему можно решить, проводя МЭФ на ПААГ, сформированных в капиллярах, которые затем растворяют. Электрофорез проводят на ПААГ, лишенных капиллярных оболочек, что позволяет работать с гелями диаметром до 40 мкм. Впервые такой принцип был реализован Бердниковым, Слободняком [19] при анализе гистоновых белков и в дальнейшем успешно применен нами для фракционирования щелочных белков отдельных нейронов улитки *H. pomatia* [20]. Одно из преимуществ такой системы, кроме возможности работы с гелями до 40 мкм и фракционирования отдельных нейронов и их органелл, заключается в резком снижении диффузии белков в геле, что обусловлено присутствием уксусной кислоты, входящей в состав исходных растворов. Нами был описан подобный способ для фракционирования кислых белков, имеющий чувствительность до 10^{-11} г на отдельную полосу образца в геле [21].

5. *Комбинированные методы анализа.* Капиллярный МЭФ можно объединить с иммунодиффузионными и иммуноэлектрофоретическими методами, анализируя и разделяя различные антигены с помощью антисывороток, полученных к нервной ткани и индивидуальным белкам мозга. Примером такого рода может быть работа Felgenhauer [22], в которой микродиск-электрофорез проводили с использованием 6%-ных разделяющих гелей.

В литературе описан МЭФ в комбинации с перекрестным иммуноэлектрофорезом [23]; для проведения одного анализа требуется примерно 1 мкг антигена и около 20 мкл антисыворотки. Сочетание описанных методов позволяет расходовать небольшие количества антител и антигенов, добиться высокого разрешения антигенов благодаря эффекту «молекулярного сита», осуществлять анализ в течение очень короткого времени.

6. *Микроэлектрофорез на плоских гелях.* Применяя методы капиллярного МЭФ хорошей воспроизводимости можно добиться при наличии очень точно калиброванных капилляров и стандартизации всех этапов работы. Возникающие при несоблюдении этих условий ошибки, не имеющие, на первый взгляд, особого значения, могут оказаться решающими и изменить характер фракционирования.

Во избежание этих недостатков нами был разработан микрометод, с помощью которого можно анализировать полипептиды, экстрагируемые из нейронов при помощи ДДС-Na [24]. Метод сохраняет чувствительность и все преимущества, свойственные МЭФ. Фракционирование выполняют в простой и удобной камере (рис. 3), состоящей

из 2 матриц оргстекла (рис. 3, а), в которые вставляют стекла размером 25×30 мм (рис. 3, б). Между ними находятся прокладки из пластической ленты толщиной 0,3 мм (рис. 3, в). Для герметизации боковых поверхностей камеры прокладки покрывают тонким слоем Arieson—Fett M, затем матрицы осторожно стягивают болтами. При заполнении камеры полимеризующей смесью выступающие из нее нижние части стекол прижимают к кусочку резины при помощи зажимов. Растворы для приготовления 3%-ного концентрирующего геля, 15 и 12,5%-ных разделяющих гелей готовят по Laemmli [25] в собственной модификации (исходный мономер для концентрирующего геля: $T=54,8\%$; $C=2,5\%$). В качестве буфера концентрирующих гелей используется 0,125 М трис-HCl, pH 6,8, а для разделяющих гелей—0,75 М трис-HCl, pH 8,8. Концентрирующие гели полимеризуют 0,04%-ным персульфатом аммония и 0,025% TEMED (конечные концентрации). Электродным буфером является 50 мМ трис-глицин (pH 8,4), содержащий 0,1 ДДС-Na и 0,02% бромфенолового красного.

С помощью капиллярной пипетки камеру заполняют на 2/3 раствором разделяющего геля под контролем стереомикроскопа. По завершении полимеризации разделяющего геля воду отсасывают пипеткой и до верха стекол заливают раствором концентрирующего геля. На этом этапе в концентрирующий гель погружают на глубину 4 мм специально вырезанную тефлоновую ленту, после чего камеру помещают на емкость с нижним электродным буфером. Одним из преимуществ предлагаемой камеры является то, что матрицы одновременно выполняют роль отсека для верхнего электродного буфера. На выступающие части стекол в этот отсек надевают перфорированный держатель для капилляров, отверстия которого совпадают с щелью между стеклами (10 отверстий). Капилляры объемом порядка 60 нл (длина 6 мм, диаметр 0,11 мм) заполняют образцами за счет капиллярных сил и вставляют вертикально в отверстия держателя (рис. 3, г). В образцы нельзя добавлять вещества, повышающие его плотность (сахароза, глицерин), так как это ведет к их вытеканию во время внесения капилляра в электродный буфер и искажает картину фракционирования. Применение капилляров столь малого диаметра позволяет не уменьшать для увеличения чувствительности метода толщину геля. Электрофорез проводят в течение 20 мин, стабилизируя напряжение: 30 В—для концентрирования и 50 В—для разделения геля. Фракционирование завершают, когда фронт бромфенолового красного пройдет в разделяющем геле 10 мм.

Для хранения плоских гелей их сначала вымачивают в смеси этанол-глицерин-вода (30:10:60) в течение 20 мин, затем оборачивают целлофаном, предварительно пропитанным тем же раствором, целлофан растягивают на рамке и сушат 4 ч. Приготовленные гели можно хранить при 4° долгое время.

Увеличения чувствительности в различных вариантах МЭФ можно добиться либо путем уменьшения диаметра геля (в случае капил-

лярного МЭФ), либо за счет применения более тонких гелей (в случае использования плоских ПААГ). Однако абсолютный предел детекции зависит от окрашиваемости белка, которая как для амидо-черного, так и для Кумасси голубого находится в интервале 10^{-9} — 10^{-10} г на отдельную белковую полосу в геле. Окрашивание гелей после завершения МЭФ, особенно для случаев, когда при фракционировании применяют ДДС-Na, надо проводить без предварительной префиксации в смеси спирта и уксусной кислоты, так как она приводит к потере 70—80% связывающей способности красителя [26]. Наш взгляд, наибольшая чувствительность достигается при окрашивании образцов фракционирования 0,33%-ным раствором Кумасси голубого, приготовленным на 45%-ном метаноле и 10%-ной уксусной кислоте в течение 10 мин, и отмывании избытка красителя в 7,5%-ной уксусной кислоте в течение 40 мин для всех модификаций МЭФ.

7. *Импregnация белков серебрением.* Трудность определения белков в количествах, меньших 10^{-10} г, с использованием общепринятого красителя Кумасси голубого ограничивает применение МЭФ, в частности при изучении тонких изменений метаболизма. Более чувствительные методы идентификации протеинов в гелях—авторадиография и флуорография—требуют длительной экспозиции, применения дорогих и редких изотопов, имеют ограничения при получении высокоспецифической активности меченых белков в исследованиях *in vivo* и, наконец, мало применимы в клинике. Дальнейшее повышение чувствительности МЭФ может быть связано с совершенно иным способом окрашивания после фракционирования—методом импregnации белков серебром, которое обеспечивает увеличение чувствительности по сравнению с Кумасси голубым на два порядка и делает его соизмеримым с авторадиографией. Кроме того, серебрение позволяет произвести экспресс-обзор белков ткани, что невозможно при авторадиографии из-за длительного времени проникновения изотопов в белки.

Серебрение белков после электрофореза на ПААГ впервые было предложено Switzer и соавт. [27], в дальнейшем эту методику упростили, сократив число операций с 10 до 6 и уменьшив количество нитрата серебра, необходимого для проведения реакции [28]. Модификация была использована Pochling, Neuhoﬀ [29] при выявлении полипептидов после завершения МЭФ. Ввиду того, что механизм серебрения неизвестен, был исследован ряд параметров, влияющих на импregnацию белков и показывающих соотношение между загрузкой протеинов серебрением и уровнем их окрашивания [30].

При выполнении серебрения гелей, на которых не проводилось фракционирование, удалось показать, что фон при окрашивании зависит от степени отмывания веществ, которые могут появиться в ПААГ после МЭФ в связи с избытком глутаральдегида и ионов серебра, времени серебрения и восстановления серебра, концентрации формальдегида. Этот метод используется обычно в тех случаях, когда требуются качественные или полуколичественные оценки содержа-

ния белков, а также при сравнении содержания белков различных органов и тканей в масштабе 10^{-11} — 10^{-12} г.

Меггил и соавт. [31] объединили гистологический и фотохимический методы в новый способ серебрения полипептидов в макрогелях (серебрение 2), использующий три относительно стабильных раствора, выполняемый менее чем за час и требующий 2% серебра, что является обычным для гистологической методики. Сравнение чувствительности определения полипептидов новым способом (серебрение 1), выполненное на лизатах клеток *E. coli* и оцененное при помощи денситометра, показало, что чувствительность «серебрения 2» составляет 59% по отношению к «серебрению 1». Тщательный счет «пятен» полипептидов, полученный по методу O'Farrell [32], показал, что эффективность нового способа серебрения равна 90% от «серебрения 1». Кроме того, чувствительность метода строго зависела от уровня освещения гелей на стадиях их обработки нитратом серебра и его последующего восстановления.

Нами была разработана модификация «серебрения 2» для плоских гелей размером $25 \times 30 \times 0,3$ мм [33], позволяющая осуществлять импрегнацию ДДС-Na-экстрагируемых полипептидов, фракционируемых по разработанному нами методу [24]. Дальнейшее увеличение чувствительности метода предполагает специальные исследования механизмов серебрения, знание которых позволит выбрать оптимальные инградненты и экспозиции.

8. Микроэлектрофорез белков различных образований мозга. Какие же возможности для анализа белковых экстрактов предлагают различные модификации микроэлектрофоретических методов? Основываясь на том, что они позволяют фракционировать нативные белки и полипептиды в количествах 10^{-9} — 10^{-10} г, их логичнее всего применять не только при анализе белков отдельных нейронов, но и для замены исследований в макрошкале. Оба эти варианта применения МЭФ были использованы в ряде исследований.

Особый интерес представляют работы, в которых идентифицируются уникальные (маркерные) белки для различных в функциональном отношении образований мозга и изучаются особенности функционирования различных органов и тканей в связи с уникальным набором свойственных им белков.

Такова работа пионеров исследования белков мозга в микрошкале Pun, Lombroso [11]. Авторы описали оригинальный прибор для МЭФ (ячейки $1,8 \times 1,0 \times 70$ мм). За основу была взята система Davis [8]. Прибор обеспечивает проведение окраски и отмывки избытка красителя в той же микроячейке, относительно большая площадь которой позволяла использовать высокие значения тока без заметного разогревания геля. Нагель наносили по 100 мкл супернатанта водорастворимых белков, содержащего от 0,8 до 2 мг ткани. Метод позволил получить в среднем 19 фракций различных белков. Сравнение белковых экстрактов эпифиза, переднего гипоталамуса, скорлупы, сз-

рого и белого вещества коры мозга крысы показало значительные количественные и умеренные качественные различия в области спектров белков с высокой электрофоретической подвижностью.

Даниловский [1] провел сравнительное изучение тритон X-100-экстрагируемых белковых образцов премоторной зоны коры, СА₃ поля гиппокампа, хвостатого ядра, мозжечка крыс. Использовались МЭФ по методу Наумовой [3] на 7%-ных разделяющих гелях диаметром 0,36—0,40 мм, позволяющий определить пикогаммы материала, а также макроэлектрофорез по Маггер [9]. Белковые зоны идентифицировали по их относительной электрофоретической подвижности, рассчитанной к подвижности маркерного белка—ингибитора трипсина из бобов сои (М 21,5 кД). Во всех опытах анализировали частоты появления отдельных белковых зон. Результаты работы указывают на большую разрешающую способность микрометода в сравнении с макроэлектрофорезом. Ansorg и соавт. [34] исследовали экстрагируемость различных групп белков мозга. Фракционирование проводили по методу Neuhoft [7] на 20%-ных разделяющих и 5%-ных концентрирующих гелях. Метод позволил максимально анализировать 18 фракций различных белков.

Сравнительный анализ водорастворимых белков (экстракция 0,01 М трис-НСI, рН 7,4) из различных органов показал наличие относительно малого количества их в сердце, легких и еще меньшего—в мышцах и жире. Быстродвижущиеся фракции преобладали в мозгу, надпочечниках, причем в экстракте мозга обнаруживается компонент, движущийся вместе с фронтом буфера, которого нет в других органах. Было проведено сравнительное исследование белковых паттернов, экстрагированных 0,01 М трис-НСI, рН 7,4 из серого и белого вещества коры мозга, верхнего и нижнего четверохолмия, гиппокампа, продолговатого мозга, моста, мозжечка, гипофиза и зрительного нерва. Общая картина оставалась примерно одинаковой в разных образованиях, но наблюдались различия как в области высокомолекулярных белков (которые, правда, трудно сравнивать, так как картина сглаживается высоким фоном липопротеннов), так и низкомолекулярных. Фракция белка S-100, мигрирующая с фронтом буфера, присутствует во всех образованиях мозга в различных количествах так же, как и фракция, следующая сразу за ней и экстрагируемая изопенталоном (Р-фракция).

Корочкин [35] описал микрометод, выполняемый в плоских стеклянных «капиллярах» (0,5×1 мм или 0,5×0,2 мм) на ПААГ, в которые перед нанесением раствора персульфата аммония вносят суспензию исследуемых клеток. Оказалось, что в глиальных клетках интенсивнее окрашивались медленные фракции лактатдегидрогеназы, в нейронах—быстрые.

9. *Анализ нейрональных белков и полипептидов.* Использование методов микроэлектрофоретического фракционирования дает исследователям уникальную возможность анализа белковых спектров отдель-

ных идентифицируемых клеточных типов и, в первую очередь, белков индивидуальных клеток. Несмотря на обостренный интерес в последние два десятилетия к нейроспецифическим белкам, большинство исследований их проводилось на уровне экстрактов целого мозга или его отдельных образований с помощью традиционных биохимических или иммунологических методов.

9. 1. Белки-маркеры идентифицированных нейронов моллюсков. Удобным объектом для микроэлектрофоретического изучения нейроспецифических белков и пептидов являются крупные нейроны моллюсков.

В 1971 г. Wilson анализировал белки отдельных нейронов (R_2 и R_{15}) *Aplisia californica* [36], впервые применив радиоизотопный анализ для исследования вновь синтезируемых полипептидов, меченных по ^3H -лейцину и фракционированных МЭФ по Shapiro и соавт. [37], Davis [8] в присутствии ДДС-Na с использованием непрерывной буферной системы на 5%-ных разделяющих гелях.

Распределение метки в нейронах R_{15} и R_2 существенно различалось, что наглядно можно показать, рассмотрев отношение счета радиоактивности в гелях для полипептидов с M_r 60 кД к счету для полипептидов с M_r 12 кД 2,3:2,0 для R_2 и 0,4:0,45 для R_{15} . Это подтверждает наличие специфических для определенного типа нейронов белков.

Более совершенную технику микроэлектрофоретического фракционирования для исследования синтеза полипептидов нейронов моллюсков *Aplisia* и *Otala lactea* применил Gainer [2], который использовал эффект концентрирования диск-буферных систем, позволяющих значительно повысить разрешение системы и определять полипептиды в количестве $5 \cdot 10^{10}$ г.

Микроэлектрофорез был выполнен в капиллярах, имеющих внутренний диаметр 0,58 мм. Фракционирование проводили по Davis [8] и Neville [38] на 5, 10, 15%-ных разделяющих и 3%-ных концентрирующих гелях в присутствии ДДС-Na. Введение метки проводили при инкубации ганглия в физиологическом растворе в присутствии 1—4, 5- ^{14}C -лейцина, либо 1—4, 5- ^3H -лейцина. Эти эксперименты показали существование нейроспецифичности в образцах полипептидов (у нейронов 11, 12 *Otala* и у нейронов R_2 и R_{15} *Aplisia*). Wilson [36] отмечал различия в образцах синтеза между нейронами R_2 и R_{15} *Aplisia*, однако с помощью его метода нельзя было разделить полипептиды с M_r меньше 12 кД, поэтому, хотя Wilson и указал на способность нейрона R_{15} синтезировать в большем количестве низкомолекулярные белки (12 кД) по отношению к высокомолекулярным (60 кД), чем R_2 , тем не менее он не мог показать, что это различие обусловлено синтезом уникального для R_{15} полипептида (5 кД по Gainer). Белок с такой же величиной M_r был найден Gainer и у нейрона 11 *Otala*; автор указывает на возможную гормональную природу полипептида.

Loh, Peterson [39] исследовали нейроны улитки *Aplisia californica*.

причем измеряли как относительные концентрации полипептидов (при окрашивании Кумасси), так и скорость синтеза белков не только различных нейронов, но и их субклеточных фракций для локализации специфических, вновь синтезированных полипептидов внутри клеток. Фракционирование проводили по методам Gainer [2], Davis [8]. Система позволяла разрешать маркерные белки в диапазоне от 15 до 60 кД (использовали 2,5%-ные концентрирующие и 15%-ные разделяющие гели). Сравнение электрофореграмм после окрашивания их Кумасси показало различия концентраций полипептидов в разных нейронах [39].

Таким образом, приведенные результаты показали, что для моллюсков *Aplisia* и *Otala* существует высокий уровень специфической транскрипции в различных типах нейронов. Такое же заключение делается на основании экспериментальных результатов Любославского, Микичура [20], полученных при анализе нейронов улитки *H. pomatia* в бескапиллярном варианте МЭФ, и исследования Гринкевич [6]. В этих работах было показано, что фенотипически различные нейроны виноградной улитки характеризуются присутствием индивидуальных белковых спектров. При выработке у моллюсков условного рефлекса в командных нейронах оборонительного поведения (ППаз) значительно увеличивается содержание кислого нейроспецифического белка, дающего перекрестную реакцию с анти-S-100 сывороткой. На поздних этапах формирования рефлекса для командных нейронов оборонительного поведения характерна корреляция увеличения процентного содержания кислого нейроспецифического белка со степенью вовлечения их рецептивных полей в процедуру обучения.

Говоря о возможности фракционирования белков отдельных нейронов моллюсков, нельзя не отметить прекрасный метод, предложенный Osborn, Ruchel [40], в котором фракционирование материала осуществляли на градиентных гелях в присутствии ДДС-Na с использованием следующих буферов: 350 мМ трис-сульфат, pH 8,4; электродный буфер—50 мМ трис-глицин, pH 8,4, с 0,1% ДДС-Na; раствор для экстракции полипептидов из нейронов: 20 мМ трис-сульфата, pH 8,4, содержащий 1% ДДС-Na и 1% меркаптоэтанола. После формирования градиентного геля незаполимеризовавшийся раствор отсасывали с верхней поверхности геля и эту часть капилляра заполняли раствором для экстракции полипептидов, в котором и производили извлечение нейронов. Капилляры с клетками помещали вертикально в маленьком объеме гелевого буфера, накрывали мензуркой для создания влажной атмосферы и оставляли в термостате на 2 ч при 55°. После завершения этой процедуры испарившуюся часть раствора для экстракции полипептидов восполняли раствором концентрированной сахарозы, содержащим небольшое количество бромфенолового синего, и образец подвергали электрофорезу. Авторы указывают на возможность фракционировать подобным образом водорастворимые и три-тон X-100 экстрагированные белки отдельных нейронов.

9. 2. Белки, специфичные для нейронов позвоночных животных. Нуден [41] анализировал белки нервных клеток животных, подвергнутых «обучению». Крыс обучали менять лапу при доставании пищи, затем декапитировали, извлекали область CA_3 гиппокампа, экстрагировали белок и анализировали его методом капиллярного МЭФ. Анализ денситограмм показал, что у обученных животных имеются два пика для белка S-100, а у контрольных—один. Микроэлектрофоретический метод также позволяет наблюдать изменения, происходящие после специфической электростимуляции. Althaus и соавт. [42], исследуя гетеросинаптическое облегчение моносинаптического рефлекса, наблюдали изменения в спектрах водорастворимых белков α -мотонейронов спинного мозга—увеличение интенсивности включения в белок S-100.

Было проведено исследование по выявлению белковой специфики гигантских мультиполярных нейронов гигантоклеточного ядра (НГЯ) ретикулярной формации продолговатого мозга, являющихся интегративно-пусковыми элементами стволовых образований, организующих двигательные автоматические реакции. Для выявления этой специфики сравнивали белковые спектры нейронов, имеющих другой морфофункциональный «статус»—пирамидных клеток CA_3 — CA_4 (НСА) полей гиппокампа и релейных нейронов наружного коленчатого тела (ННКТ). Выделение нейронов из исследованных областей осуществляли при помощи метода микроманипуляций [43]. Из 20—30 нейронов каждого вида экстрагировали полипептиды при помощи ДДС-Na. Для фракционирования образцов был использован метод микроэлектрофореза на плоских ПААГ в присутствии ДДС-Na [24].

Сопоставление полипептидов трех исследованных видов нейронов позволило выявить специфичность для НГЯ полипептидной фракции с M_r 8,8 кД а для ННКТ—фракции с M_r 9,5 кД (рис. 4, фракции № 17 и 15 соответственно).

Таким образом, ультрамикроэлектрофорез представляет исследователям возможность сравнивать белки и полипептиды отдельных идентифицированных нейронов (тест на специфичность) и их изменения в различных экспериментальных условиях (тест на пластичность). Метод применим для анализа белков и полипептидов отдельных клеток мозга позвоночных животных, несмотря на их малые размеры, чрезвычайно низкие концентрации веществ, а также множественность и сложность синаптических связей.

Главный интерес и перспективу представляют «гибридные» методы, сочетающие чувствительность иммунохимических тестов с решением микрохимических способов оценки индивидуальных антигенов нервной системы.

ULTRAMICROELECTROPHORETIC SEPARATION OF POLYPEPTIDES FROM NEURONAL STRUCTURES

SHTARK M. B., MIKICHUR N. I., VERETENNIKOV N. A.

Institute of Automatics and Electrometry, Acad. Sci. of the USSR, Siberian Division; Institute of Clinical and Experimental Medicine, Acad. Med. Sci. of the USSR, Siberian Division, Novosibirsk

Different variants of ultramicroelectrophoretic techniques used when studying proteins and peptides from different brain structures, neurons and their organelles are analysed. Consecutive procedures of isolation of these structures and their treatment are examined; peculiarities of fractionation in gels with uniform pore diameter and in gradient gels, noncapillary variants of ultramicroelectrophoresis, combined methods of analysis, counter-immunodiffusion, impregnation methods are presented. The advantages and perspectives of further use of these methods are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даниловский М. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 84, № 11, с. 556—559, 1977.
2. Gainer H. Anal. Biochem., v. 41, p. 539—605, 1971.
3. Наулюва Л. П. Исследование природы цитоплазматического градиента распределения РНК у *Acetabularia mediterranea* методами ультрамикрoанализа, канд. дис., Новосибирск, ННХ СО АН СССР, 1976.
4. Neuhoﬀ V.—In: *Micromethods in Molecular Biology*. Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag, p. 1—85, 1973.
5. Крылова И. Н., Микичур Н. И.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований, с. 71—75, Новосибирск, 1983.
6. Гринкевич Л. Н. Исследование белковых спектров командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки при обучении, канд. дисс., Новосибирск, Институт автоматизации и электрометрии СО АН СССР, 1980.
7. Neuhoﬀ V. *Arzneimittel Forsch.*, Bd. 8, p. 35—38, 1968.
8. Davis B. J. Disc-electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 121, № 2, p. 404—427, 1964.
9. Maurer K. *Disk-electrophoresis*. Walter de Gruyter, Berlin, 1968.
10. Остерман Л. А. Электрофорез и ультрацентрифугирование, М., Наука, 1981.
11. Pun J. V., Lombroso L. Anal. Biochem., v. 9, p. 9—20, 1964.
12. Osborne N. N. Oxford, New York, Toronto, Sydney; Pergamon Press, 1974.
13. Морозов В. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 80, № 9, с. 120—121, 1975.
14. Grossbach U. *Techniques of biochem. and biophys. morphology*, v. 3, p. 81—101, 1977.
15. Заалишвили Э. А. Изв. АН ГССР. Сер. биол. н., т. 2, № 4, с. 329—332, 1976.
16. Штark М. Б. Иммунонейрофизиология, Л., Медицина, 1978.
17. Ruchel R., Mesecke S., Wolfrum D., Neuhoﬀ V. *Hoppe-Seyler's. Z. physiol. Chem.*, Bd 354, p. 1351—1368, 1973.
18. Ruchel R., Mesecke S., Wolfrum D., Neuhoﬀ V., Hoppe-Seyler's, *Z. physiol. Chem.*, Bd 355, p. 997—1020, 1974.
19. Бердников В. А., Слободянюк С. Я. Биохимия, т. 43, с. 1001—1005, 1978.
20. Любославский В. А., Микичур Н. И.—В кн.: Новые методы научных исследований

- в клинической и экспериментальной медицине, с. 59—62. Новосибирск, СО АМН СССР, 1980.
21. Веретенников Н. А., Микичур Н. И. Бюл. экперим. биол. и мед., т. 95, № 4, с. 124—126, 1983.
 22. Feldenhauer K. *Biochim. et biophys. acta*, v. 160, № 2, p. 267—269, 1968.
 23. Dames W., Maurer U. R., Neuhoﬀ V. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, v. 35, p. 554—558, 1972.
 24. Веретенников Н. А., Микичур Н. И.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований, с. 75—79, Новосибирск, СО АМН СССР, 1983.
 25. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, № 5259, p. 670—685, 1970.
 26. Neuhoﬀ V., Philipp K., Zimmer H. G., Mesecke S. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, v. 360, p. 1657—1670, 1979.
 27. Switzer R. C., Merril C. R., Shifrin S. *Anal. Biochem.*, v. 98, p. 231—237, 1979.
 28. Oakley B. R., Kirsh D. R., Morris N. R. *Anal. Biochem.*, v. 105, p. 361—363, 1980.
 29. Poehling H.—M., Neuhoﬀ V. *Electrophoresis*, v. 2, p. 141—147, 1981.
 30. Poehling H.—M., Neuhoﬀ V. *Electrophoresis*, v. 1, p. 90—102, 1980.
 31. Merril C. R., Dunau M. L., Goldman D. *Anal. Biochem.*, v. 110, № 1, p. 201—202, 1981.
 32. O'Farrell P. H. *J. Biol. Chem.*, v. 250, p. 4007—4021, 1975.
 33. Веретенников Н. А., Леонтович Т. А., Микичур Н. И., Штарк М. Б. Ультрамикрo-электрофоретические исследования нейронных структур. Препринт № 207 ИАН СО АН СССР, Новосибирск, 1983.
 34. Ansorg R., Dames W., Neuhoﬀ V., *Arzneim.-Forsch (Drug Res.)*, Bd. 21, № 5, p. 699—710, 1971.
 35. Корочкин Л. И. Цитология, т. 14, 670—673, 1972.
 36. Wilson D. L. *J. Gen. Physiol.*, v. 57, p. 26—40, 1971.
 37. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. M. *Biochem. and Biophys., Res. Commun.*, v. 28, p. 815—822, 1967.
 38. Neville D. M. *Biochim. et biophys. acta*, v. 133, p. 168—170, 1967.
 39. Loh Y. P., Peterson R. P. *Brain Res.*, v. 78, p. 83—98, 1974.
 40. Osborne N. N., Ruchel R. J. *Chromatogr.*, v. 105, p. 197—200, 1975.
 41. Hyden H., Lange P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.* v. 64, № 4, p. 898—904, 1970.
 42. Althaus H. H., Eriel G., Dames W., Neuhoﬀ V.—In: *Sonderforschungsbereich 33*, p. 107—121, *Nervensystem und biologische Information*, Göttingen, 1969—1972.
 43. Микичур Н. И., Веретенников Н. А.—В кн.: Новые методы для медицинской практики и медико-биологических исследований (под ред. Ю. П. Никитина), с. 50—52, Новосибирск, СО АМН СССР, 1983.

Поступила 12. II 1986