

Zastosowanie metody transferu na błony z fluorku poliwinylidenu (PVDF) i nitrocelulozy w oczyszczaniu i analizie strukturalnej białek

Bogusław Szewczyk

Krzyszyna Bieńkowska-Szewczyk

Pracownia Biochemii Wirusów

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Akademii Medycznej i Uniwersytetu Gdańskiego

Gdańsk

1. Wstęp

Transfer białek lub kwasów nukleinowych na membrany porowate po przeprowadzeniu analizy elektroforetycznej (określany najczęściej terminem *blotting*) umożliwia badanie różnorodnych właściwości biologicznych rozdzielonych związków. Kwasy nukleinowe są przeważnie przenoszone z żeli agarozowych na membrany metodą kapilarną, natomiast białka są najczęściej przenoszone z żeli poliakrylamidowych pod wpływem prądu elektrycznego. W zależności od tego, czy przeniesieniu ulega DNA czy RNA metoda nosi nazwę odpowiednio *Southern* lub *northern blotting*, natomiast do metody przenoszenia białek stosuje się często nazwę *western blotting*. Nazwa *Southern blotting* pochodzi od nazwiska badacza, który pierwszy tę technikę zastosował (1). Nazwy *northern* i *western* powstały na zasadzie gry słów utworzonej przez pionierów tych technik i określają jedynie stronę geograficzną USA, z której ci naukowcy pochodzili.

Podobnie jak w transferze kwasów nukleinowych, tak i w transferze białek dąży się do uzyskania wiernej repliki żelu elektroforetycznego na membranę, która to replika może być następnie użyta w reakcjach ze specyficznymi sondami. Pierwsze próby uzyskiwania replik białkowych żeli poliakrylamidowych były wykonane metodą kapilarną (2), podobnie jak w przypadku przenoszenia DNA. Dopiero jednak zastosowanie transferu elektroforetycznego spowodowało gwałtowny rozwój tej techniki. Wprowadzenie transferu elektroforetycznego jest związane przede wszystkim z nazwiskami Towbina i wsp. (3) oraz Burnette (4), który również po raz pierwszy użył określenia *western blotting*. Mimo że nazwa *western blotting* nie jest najszcześliwszą nazwą techniki, jest ona tak rozpowszechniona (również w laboratoriach polskich), iż będąc jej używał w oryginalnej formie rezygnując z utworzenia odpowiednika polskiego.

2. Typy membran porowatych

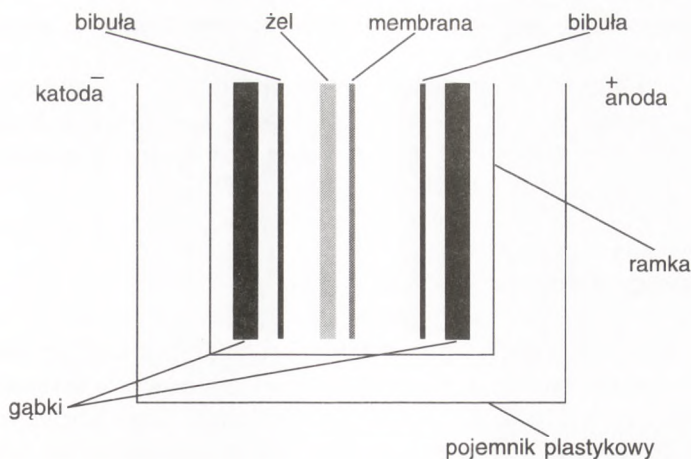
W najwcześniejszych pracach stosowano bibułę jako membranę do przenoszenia białek. Bibuła była modyfikowana najczęściej poprzez wprowadzenie ugrupowań dwufazowych (5), lecz wkrótce okazało się, że membrany nitrocelulozowe są znacznie wygodniejsze w użyciu (6). Membrany nitrocelulozowe są produkowane przez wiele firm (m.in. Schleicher & Schuell, Millipore, Bio-Rad) i w dalszym ciągu są najczęściej stosowane. Mają one jednak kilka wad. Bardzo małe białka są zatrzymywane na nitrocelulozie z dość niską wydajnością (4). Nitroceluloza jest poza tym krucha, szczególnie po wysuszeniu łatwo ulega pęknięciom. Wad tych nie posiadają membrany z modyfikowanego nylonu. Są one produkowane przez takie firmy jak: Amersham, NEN, Boehringer. Membrany nylonowe oznaczają się dużą wytrzymałością, ale z kolei ze względu na ładunek elektryczny nylonu nie można używać większości popularnych barwników do barwienia białek (7). Membrany te wymagają również bardzo długiego blokowania (proces blokowania omówiony zostanie w dalszej części tego rozdziału). Firma Amersham wprowadziła na rynek membrany nitrocelulozowe na podłożu nylonowym co zdecydowanie zwiększyło odporność nitrocelulozy na pęknięcia. Innym typem są membrany z fluorku poliwinylidenu (PVDF). Są one odporne na pęknięcia, można je barwić większością barwników białkowych i nie wymagają specjalnego blokowania. Jedyną ich wadą jest konieczność wstępnego zwilżania metanolem. Membrana z fluorku poliwinylidenu została po raz pierwszy wprowadzona przez firmę Millipore.

3. Aparatura i buforory stosowane do elektrotransferu białek na membrany

W pierwszym okresie rozwoju *blottingu* stosowano aparat do elektrotransferu, który schematycznie pokazano na rys. 1.

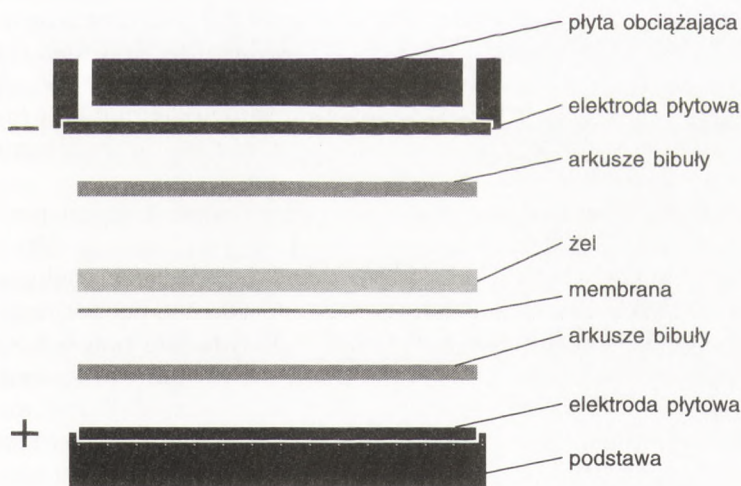
Naczynie o pojemności około trzech litrów wykonane ze szkła organicznego wyposażone jest w elektrody z drutu platynowego rozmieszczone w taki sposób aby zapewnić równomierne pole elektryczne. W środku naczynia znajduje się ramka, w której umieszcza się żel poliakrylamidowy i membranę. Ten typ aparatu jest w dalszym ciągu szeroko stosowany, ale coraz częściej używany jest aparat do tzw. transferu „półsuchego” (rys. 2). W tym aparacie używa się małej ilości buforu; konieczny jest on jedynie do namoczenia bibuły umieszczonej pomiędzy dwoma płytowymi elektrodami (8,9). Elektrody w zależności od producenta aparatu mogą być wykonane z grafitu, przewodzącego tworzywa plastikowego lub metalu. Czas transferu jest znacznie krótszy w aparacie do transferu „półsuchego” (1-3 godzin) niż w konwencjonalnym aparacie o dużej pojemności buforu (do kilkunastu godzin).

W przeszłości najczęściej używanym buforem do elektrotransferu był bufor



Rys. 1. Schemat aparatu do elektrotransferu „mokrego” przy użyciu dużej ilości buforu; (kolejność ułożenia żelu względem membrany może zmienić się jeśli prowadzono elektroforezę natywną bez siarczuanu dodecyłu).

Tris-glicyna z metanolem (192 mM glicyna, 25 mM Tris, 20%[v/v] metanol). Obecność metanolu polepsza wiązanie białek do nitrocelulozy, zmniejsza pęcznienie żelu i ułatwia chłodzenie. Metanol ułatwia jednak odszczepienie siarczuanu dodecyłu (SDS) od białek w przypadku transferu po elektroforezie poliakrylamidowej w obecności SDS, co negatywnie wpływa na efektywność transferu. Obecnie często stosuje się bufor Tris-glicyna bez dodatku metanolu. Stosowane są również buforu oparte na związkach buforujących inne niż Tris. Należą do nich AMPPO, CAPSO, CAPS (produkowane m.in. przez firmę Research Organics, a sprzedawane przez Sigma Chemical Co.), a nawet etanolamina. Stosowanie pH transferu wyższego niż jest to możliwe w przypadku buforów opartych na Tris ma również pozytywny wpływ na transfer białek z żeli poliakrylamidowych z SDS. Jeśli białko przeniesione na membranę ma



Rys. 2. Schemat aparatu do elektrotransferu „półsuchego”.

być sekwencjonowane, nie zaleca się używania buforów zawierających grupy aminowe (m.in. buforów opartych na Tris).

Należy podkreślić, że w niektórych szczególnych przypadkach, np. gdy białko wytrąca się po elucji z żelu, konieczne jest stosowanie specjalnych buforów, często zawierających detergenty (7,10). Specjalne bufory są stosowane również przy transferze białek bardzo silnie zasadowych (11).

4. Metody sprawdzania wydajności transferu

Najprostszą metodą oszacowania wydajności transferu białek z żelu na błonę jest umieszczenie na jednej ścieżce elektroforetycznej białkowych wzorców masy cząsteczkowej z dołączonymi kowalencyjnie barwnikami. Brak barwnych wzorców białkowych na żelu i ich obecność na membranie wskazuje na właściwie przeprowadzony transfer. Barwne wzorce masy cząsteczkowej są dostępne w handlu. Zestaw wzorców niebieskich jest sprzedawany m.in. przez firmy Sigma i BRL. Firma Amersham produkuje tzw. *rainbow molecular weight standards*, w którym to zestawie każdy wzorzec jest innego koloru. Można stosować również wzorce masy cząsteczkowej z dołączonymi barwnikami fluorescencyjnymi (12). Wzorce te są widoczne na żelu poliakrylamidowym czy membranie dopiero po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali. W tym przypadku można również uzyskać mieszaninę białek wzorcowych o różnych barwach, np. białka barwione: DTAF (dwuchlorotriazyńloaminofluoresceiną) są żółtozielone; TRITC (izotiocyjanianem czterometylorodaminy) są czerwone; XRITC (izotiocyjanianem 5- i 6-karboksyrodaminy) są fioletowe.

Czasami wnioski, jakie możemy wyciągnąć obserwując przeniesione na błonę barwne wzorce masy cząsteczkowej nie są wystarczające i konieczne jest zabarwienie wszystkich białek na membranie. Niektóre z barwników wiążą się z białkami w sposób odwracalny, a zatem po sfotografowaniu pełnego profilu białkowego na membranie, można usunąć barwnik i przystąpić do reakcji z sondą. Często stosowany jest barwnik Ponceau S (13), czerń amidowa w roztworze wodnym (14) lub słabokwaśnym (15). Alternatywną metodą jest przyłączenie barwnika fluorescencyjnego po transferze (16,17,18). W tej ostatniej metodzie białka bezbarwne w świetle widzialnym uwidacznia się i fotografuje w świetle ultrafioletowym. Żadnej z metod nie zaleca się do membran nylonowych ze względu na wysokie tło.

Czułość metod barwienia odwracalnego jest dość niska (około 1 µg na prążek). Przy metodzie barwienia fluorescencyjnego czułość jest wyższa (20 – 100 ng w zależności od białka). Często jednak pożądana jest jeszcze większa czułość detekcji białek. W tym celu opracowano szereg metod nieodwracalnego barwienia białek. Aby móc stosować takie barwienie, wykonuje się najczęściej transfer z żelu poliakrylamidowego, na którym znajdują się próbki naniesione w duplikacie. Po transferze membranę przecina się i jedną część barwi się barwnikiem do białek, natomiast drugą identyczną część poddaje się reakcji z odpowiednią sondą. Również tutaj przy barwieniu nieodwracalnym tylko nie-

które barwniki mogą być użyte do błon nylonowych. Błony PVDF mogą być barwione bardzo wieloma barwnikami, nieco mniejsza liczba barwników może być stosowana do błon nitrocelulozowych. Dwa najczęściej stosowane barwniki to *Coomassie brilliant blue* i czerń amidowa. Pierwszy z nich jest stosowany tylko do błon PVDF (19,20), natomiast czerń amidową w mieszaninie kwas octowy/metanol/woda używa się zarówno do błon PVDF, jak i do nitrocelulozy. Barwienie czernią amidową w tym roztworze zwiększa znacznie czułość detekcji w porównaniu z barwieniem czernią amidową w roztworze wodnym. Białka mogą być też barwione roztworem atramentu (*India ink*); w tym przypadku można również barwić błony nylonowe (21,22). Bardzo czułą metodą barwienia białek jest barwienie złotem koloidalnym (19,20,23). Jest to jednak metoda dość droga i czasochłonna.

5. Zastosowanie replik żeli poliakrylamidowych

Białka przeniesione z żelu poliakrylamidowego na membranę poddaje się różnym procesom w zależności od celu doświadczenia. Kilka najważniejszych zastosowań replik białkowych wymienionych poniżej zostanie omówionych dokładniej. Są to:

- 1) reakcja z przeciwciałami — *immunoblotting*,
- 2) elucja białek z membrany,
- 3) analiza aminokwasowa i sekwencjonowanie białek,
- 4) reakcja z sondami innymi niż przeciwciała.

5.1. *Immunoblotting*

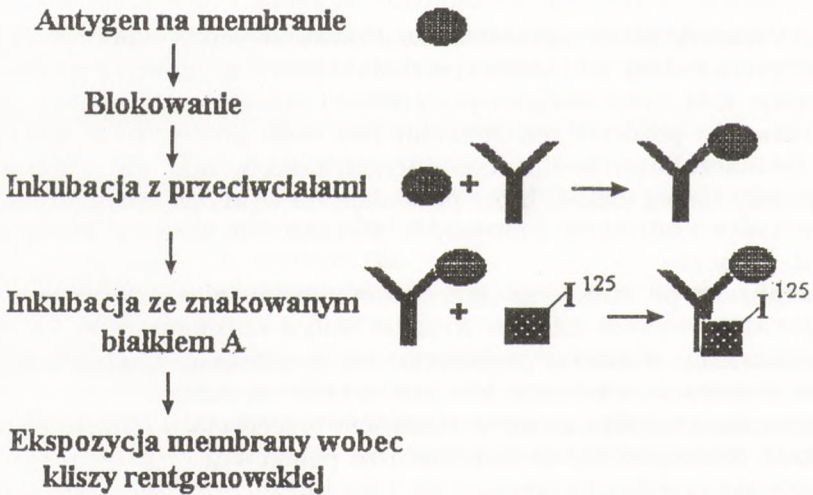
Jest to bezwzględnie najczęstsze zastosowanie replik białkowych. Antygen białkowy przeniesiony na membranę zostaje poddany reakcji z przeciwciałami, a następnie kompleks antygen-przeciwciało zostaje uwidoczniony na membranie. Choć pozornie ten schemat jest dość prosty, to w rzeczywistości proces uwidaczniania kompleksu antygen-przeciwciało jest skomplikowany i istnieje cały szereg metod, które pozwalają na wykrycie antygeny w ilościach nanogramowych lub nawet mniejszych. Metodycznie przebieg *immunoblottingu* jest następujący:

- 1) membrana po transferze umieszczona zostaje w roztworze czynnika blokującego, który wysyca miejsca wiążące białka na membranie, co zapobiega niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał na membranie. Czynnikiem blokującym jest najczęściej albumina lub mleko odtłuszczone;
- 2) membranę umieszcza się w roztworze przeciwciał i reakcję prowadzi się przeważnie około godziny w temperaturze pokojowej;
- 3) nadmiar przeciwciał odmywa się i membranę umieszcza się w roztworze przeciwciał gatunkowo specyficznych, które połączone są z odpowiednim enzymem, barwnikiem fluorescencyjnym lub są znakowane radioaktywnym izo-

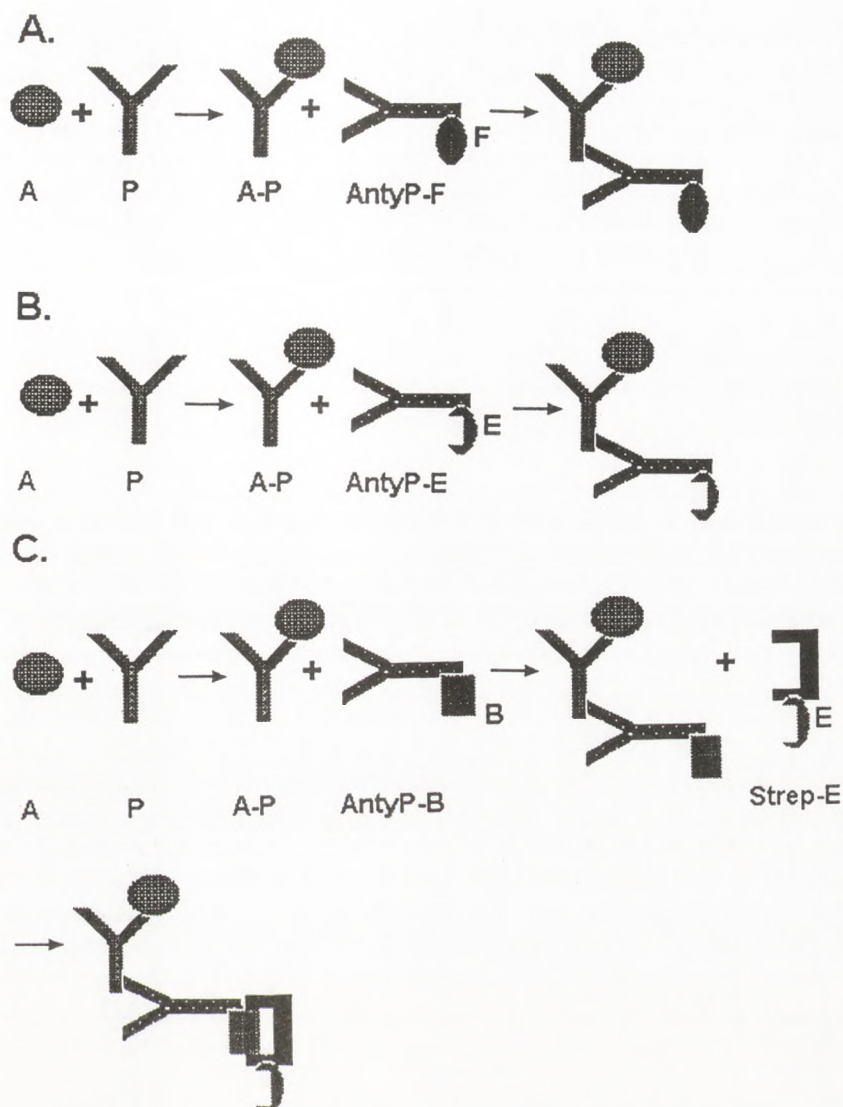
topem (np. jeśli przeciwciała w p. 2 pochodziły od królika to przeciwciałami gatunkowo specyficznymi mogą być kozie anty-IgG królicze). Zamiast przeciwciał gatunkowo specyficznych można zamiennie stosować białko A znakowane enzymem lub izotopem [^{125}I] (4). Białko A izolowane jest z bakterii *Staphylococcus aureus* i wiąże się z rejonem Fc immunoglobulin. Ten etap *immunoblottingu* ma na celu wzmocnienie sygnału i uwidocznienie kompleksu antygen-przeciwciało;

4) nadmiar znakowanych przeciwciał gatunkowo specyficznych lub znakowanego białka A odmywa się przez płukanie w odpowiednim buforze. Następnie, jeśli białko A lub przeciwciała gatunkowo specyficzne były znakowane izotopem, to membranę eksponuje się wobec kliszy rentgenowskiej. Jeśli były one powiązane z enzymem, membranę umieszcza się w roztworze odpowiednich substratów, natomiast jeśli przyłączony był barwnik fluorescencyjny, membranę wzbudza się światłem o odpowiedniej długości fali.

Kolejne etapy *blottingu* przedstawione są schematycznie na rys. 3. Na schemacie tym podany jest najprostszy wariant detekcji kompleksu antygen-przeciwciało. Istnieje szereg bardziej skomplikowanych, ale jednocześnie zapewniających większą czułość metod (3, 24-34). Możliwe jest np. włączenie dodatkowo układu streptawidyna-biotyna; przeciwciała gatunkowo specyficzne są znakowane biotyną, streptawidyna jest znakowana enzymem. Niektóre z ważniejszych, klasycznych schematów kolejnych reakcji *immunoblottingu* są podane na rys. 4, natomiast najczęściej stosowane substraty dla enzymów używanych do detekcji kompleksów antygen-przeciwciało są zamieszczone w tab. 1.



Rys. 3. Przykładowe przedstawienie kolejnych reakcji *immunoblottingu*.



Rys. 4. Schematy kilku częściej stosowanych metod detekcji kompleksów antygen — przeciwciało na membranach.

A. antyprzeciwciało znakowane barwnikiem fluorescencyjnym;

B. antyprzeciwciało znakowane enzymem;

C. antyprzeciwciało połączone z biotyną, streptawidyna znakowana enzymem;

(oznaczenia A — antygen, P — przeciwciało, antyP — antyprzeciwciało, F — barwnik fluorescencyjny, E — enzym alkaliczna fosfataza lub peroksydaza, B — biotyna, Strep — streptawidyna).

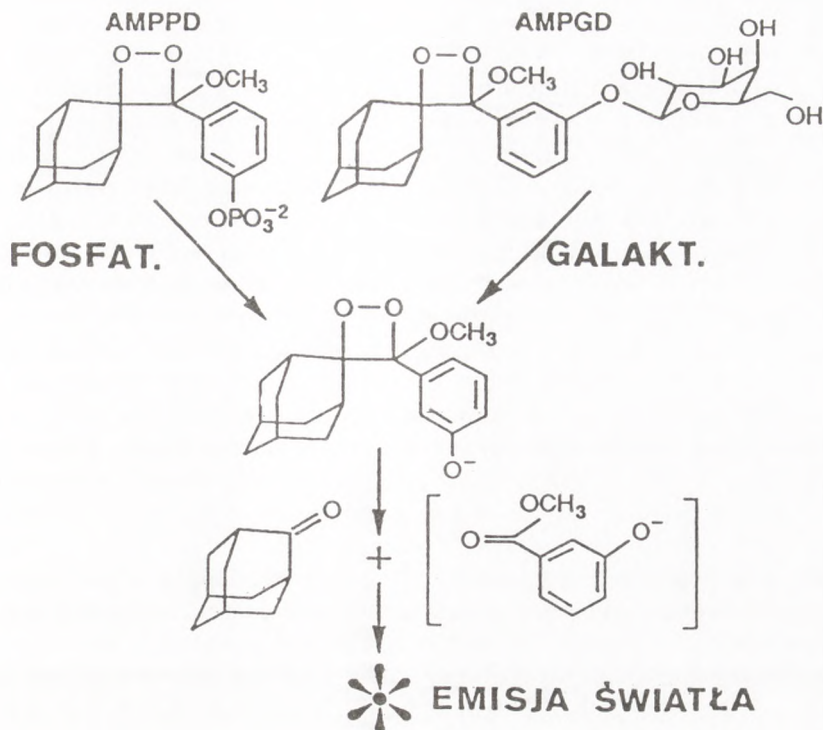
TABELA 1

DETEKCJA KOMPLEKSÓW ANTYGEN-PRZECIWCIAŁO NA MEMBRANACH PRZY UŻYCIU SUBSTRATÓW DAJĄCYCH W EFEKCIE KOŃCOWYM BARWNE NIEROZPUSZCZALNE PRODUKTY

Enzym	Substraty	Barwa produktu końcowego
alkaliczna fosfataza	naftylofosforan AS-TR/czerwień trwała RC	czerwona
	bromochloroindolylofosforan/błękit nitrotetrazoliowy (BCIP/NBT)	brązowo-purpurowa
peroksydaza chrzanowa	H ₂ O ₂ / diaminobenzzydina (DAB)	brązowa
	H ₂ O ₂ / diaminobenzzydina + sole niklu lub kobaltu	granatowa
	H ₂ O ₂ / aminoetylokarbazol (AEC)	czerwona
	H ₂ O ₂ / 4-chloro-1-naftol	ciemnogramatowa

Od kilku lat prowadzone są próby stosowania metod chemiluminescencyjnych do detekcji kompleksów antygen-przeciwciała (35,36,37). Czulość tych metod jest porównywalna z czulością metod izotopowych (kilka do kilkudziesięciu pikogramów). Dwa rodzaje substratów, które pod wpływem enzymów używanych do detekcji tworzą produkty emitujące promieniowanie w zakresie widzialnym widma są już dość często używane. Pierwszy rodzaj został wprowadzony do sprzedaży przez firmę Amersham w systemie detekcji o nazwie ECL (38). Enzymem uczestniczącym w reakcji jest peroksydaza chrzanowa. Enzym ten rozkłada wodę utlenioną, a wolny tlen reaguje z luminolem. W obecności czynnika wzmacniającego promieniowanie obserwuje się zaczerwienie kliszy w miejscach kontaktu z kompleksem antygen-przeciwciała na membranie. System wprowadzony przez firmę Tropix wykorzystuje pochodne dioksetanowe, a przede wszystkim związek przedstawiony na rys. 5 zapisywany w skrócie jako AMPPD (39,40). W wyniku reakcji katalizowanej przez alkaliczną fosfatazę tworzy się związek emitujący światło o długości fali około 500 nm. Około dziesięciokrotne zwiększenie czulości można uzyskać stosując 5-chloropochodną AMPPD, związek zapisywany skrótem CSPD (41).

Zastosowanie *immunoblottingu* jest bardzo szerokie, począwszy od metody badawczej pozwalającej na wykrycie konkretnego białka po metody diagnostyczne pozwalające na wykrycie chorób wirusowych i bakteryjnych, niektórych rodzajów nowotworów czy nawet alergii (42-46). Między innymi *immunoblotting* stosuje się do diagnostyki wirusa HIV (47,48,49). Paski nitrocelulozy z rozdzielonymi antygenami wirusa HIV są inkubowane z surowicami pacjentów. Wiązanie przeciwciał przez antygeny na membranie jednoznacznie wskazuje na kontakt pacjenta z wirusem. *Immunoblotting* jest tu stosowany jako metoda potwierdzająca wyniki innych metod diagnostycznych. Oczywiście bardzo wiele innych chorób wirusowych może być diagnozowana w ten sam sposób. Diagnostyka alergienów opiera się na tej samej zasadzie. Roz-



Rys. 5. Przemiany AMPPD i AMPGD zachodzące pod wpływem alkalicznej fosfatazy i beta-galaktozydazy.

dzielone elektroforetycznie alergeny (np. białka roztoczy) przenosi się na membranę i inkubuje w roztworze surowicy pacjenta. Kompleksy alergen-IgE uwiadczenia się stosując jedną z metod wcześniej wymienionych.

5.2. Elucja białek z membran

Ze względu na doskonałą rozdzielczość elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, w bardzo wielu laboratoriach próbowano opracować wydajną metodę elucji białek z żelu. W ostatnich kilkunastu latach ukazało się co najmniej kilkadziesiąt publikacji na temat elucji białek z żelu poliakrylamidowego (kilka częściściej stosowanych metod wymieniono w pozycjach 50-56). Żadna z metod elucji bezpośrednio z żelu nie jest doskonała. Większość z nich nie może być stosowana do elucji dużych białek ponieważ wydajność elucji białek o masie cząsteczkowej powyżej 60 kD jest niska, jeśli stosuje się typowy zakres procentowości żelu poliakrylamidowego. Precyzyjne wycięcie prążka białkowego również nie jest proste ze względu na elastyczność żelu. W związku z tymi ograniczeniami bezpośredniej elucji z żelu, elucja

białek z replik żelu na membranach jest bardzo często stosowana (przede wszystkim w celu uzyskania czystych białek do immunizacji zwierząt). Historycznie pierwsze próby elucji białek z membran wykonano dla replik nitrocelulozowych ponieważ wiązanie białek z nylonem jest praktycznie nieodwracalne. Jednak także z nitrocelulozy elucja białek jest bardzo trudna. Anderson (57) traktował nitrocelulozę acetonem. Ulegała ona rozpuszczeniu i z takiego roztworu wytrącane były białka. Knudsen (58) rozpuszczała membranę nitrocelulozową w dwumetylosulfotlenku i bezpośrednio wstrzykiwała taki roztwór królikom w celu uzyskania przeciwciał. Parekh i wsp. (59) eluowali białka z nitrocelulozy niepolarnymi rozpuszczalnikami organicznymi, kwasem mrówkowym oraz mieszaniną jonowych i niejonowych detergentów. Wydajności elucji nie były wysokie, ponadto zabarwienie repliki błękitem *Coomassie* lub czernią amidową powodowało całkowite zahamowanie elucji. Wydajność elucji w optymalnych warunkach była odwrotnie proporcjonalna do masy cząsteczkowej i dla dużych białek wydajność elucji była bardzo niska. Diano i wsp. (60) zaproponowali inne podejście do uzyskania przeciwciał skierowanych przeciwko białkom związanym na nitrocelulozie. Po zabarwieniu membrany prążek białkowy wycinano i krojono na małe kawałki. Te kawałki umieszczano w probówce z odpowiednim roztworem i rozdrabniano dalej sonifikując mieszaninę. Po uzyskaniu właściwej konsystencji, zawiesinę wstrzykiwano podskórnie królikom.

Metody izolacji białek z nitrocelulozy nie są jednak szeroko stosowane ze względu na niską wydajność odzyskiwania białka oraz możliwość trwałego okaleczenia zwierzęcia poprzez wstrzyknięcie zawiesiny nitrocelulozy lub roztworu nitrocelulozy w rozpuszczalnikach organicznych. Przyspieszony rozwój metod izolacji białek z membran obserwuje się po wprowadzeniu membran z fluorku poliwinylidenu. PVDF jest odporny na działanie większości eluentów i w związku z tym eluowane białka nie zawierają żadnego dodatkowego składnika z membrany. Eluenty stosowane do elucji białek z błon PVDF można podzielić na dwie grupy: 1) mieszaniny kwasów z rozpuszczalnikami organicznymi; 2) mieszaniny różnych detergentów.

Mieszaniny zawarte w drugiej grupie prowadzą do lepszej wydajności odzyskania białka z membrany. Błona PVDF po transferze białek z żelu poliakrylamidowego zostaje najpierw zabarwiona, najlepiej barwnikiem w roztworze niedenaturującym. Dwa często używane barwniki to Ponceau S w 1% kwasie octowym i czernią amidową w wodzie lub 1% kwasie octowym. Jeśli czułość barwienia nie jest wystarczająca, to można stosować roztwór błękitu *Coomassie* w układzie rozpuszczalników kwas octowy/ metanol/woda, ale należy liczyć się z mniejszą wydajnością elucji białka. Przy pewnej wprawie nie ma potrzeby barwienia błony szczególnie jeśli ilość białka jest dość duża (kilka mikrogramów na prążek). Metoda opiera się na obserwacji błony oświetlonej zwykłą żarówką tuż po zakończeniu transferu (61). Prążki białkowe są widoczne jako białe, prawie nieprzezroczyste obszary na częściowo przezroczystej membranie. Białko, które ma być eluowane, zostaje zaznaczone ołówkiem (należy uważać, żeby nie wysuszyć membrany), prążek wycina się i umieszcza

w buforze lub wodzie, gdzie przechowywany jest do momentu elucji białka z błony.

Po wycięciu prążka lub prążków białkowych przystępuje się do elucji. W tym celu kawałek błony, na której znajduje się białko, umieszcza się w probówce Eppendorfa, zalewa się go małą ilością roztworu eluującego i delikatnie miesza przez kilkanaście minut. Następnie usuwa się supernatant i w zależności od eluentu białko jest wytrącane lub lotny eluent zostaje odparowany. Wydajność odzyskiwania białka z membrany PVDF została najdokładniej przebadana przez Simpsona i wsp. (62). Podsumowanie wyników tych badań zawarto w tab. 2. Układ do elucji zawierający 2% (w/v) SDS i 1% (w/v) Triton X-100, a zatem mieszaninę jonowego i niejonowego detergentu w buforze słabozasadowym (14,63) prowadzi do najwyższej wydajności odzyskania białka z membrany PVDF.

TABELA 2
WYDAJNOŚCI ODZYSKIWANIA BIAŁEK Z BŁONY PVDF*

Eluent	Odzysk białka w (%)		
	BSA	Owalbumina	Anhydraza węglanowa
2% SDS / 1% Triton X-100	64,6	69,2	74,5
2% SDS / 1% Triton X-100 / 0,1% DTT	73,1	74,1	78,0
2% SDS / 1% Tween 20	60,9	59,7	71,3
2% SDS / 1% Lubrol	55,7	57,6	72,8
2% SDS / 1% Brij-35	56,6	56,0	73,4
70% propanol / 5% TFA	44,0	23,2	45,1
70% propanol / 5% TFA / 0,1% DTT	47,1	29,7	37,8
20% acetonitryl / 2% SDS	15,3	12,5	11,8

Stężenia podano w % w/v.

*przy opracowywaniu tabeli wykorzystano wyniki Simpsona i wsp. (62).

Oprócz eluentów wymienionych przez Simpsona i wsp. (62), istnieje układ do elucji, który daje bardzo dobre wyniki i może być użyty w pH zbliżonym do 7 (64). Jest to mieszanina 7M chlorowodoru guanidyny i 0,5% (w/v) lizolecytyny (lizofosfatydylocholiny). Zaletą tego układu do elucji jest możliwość odzyskania częściowo aktywności enzymatycznej po dializie roztworu eluowanego białka.

Przy analizie wyników elucji należy brać pod uwagę to, że na ostateczną wydajność elucji składają się dwa procesy: 1) właściwa elucja białka z membrany, 2) wyodrębnienie białka z eluatu. O ile pierwszy proces jest bardzo wydajny, jeśli używa się mieszaniny detergentu jonowego i niejonowego, to drugi, którym jest najczęściej wytrącenie białka, może prowadzić do dużych strat. Wytrącenie białka jest przeprowadzane najczęściej przez dodanie acetonu do próbki. Hydrofobowość i wielkość białka może odgrywać istotną rolę

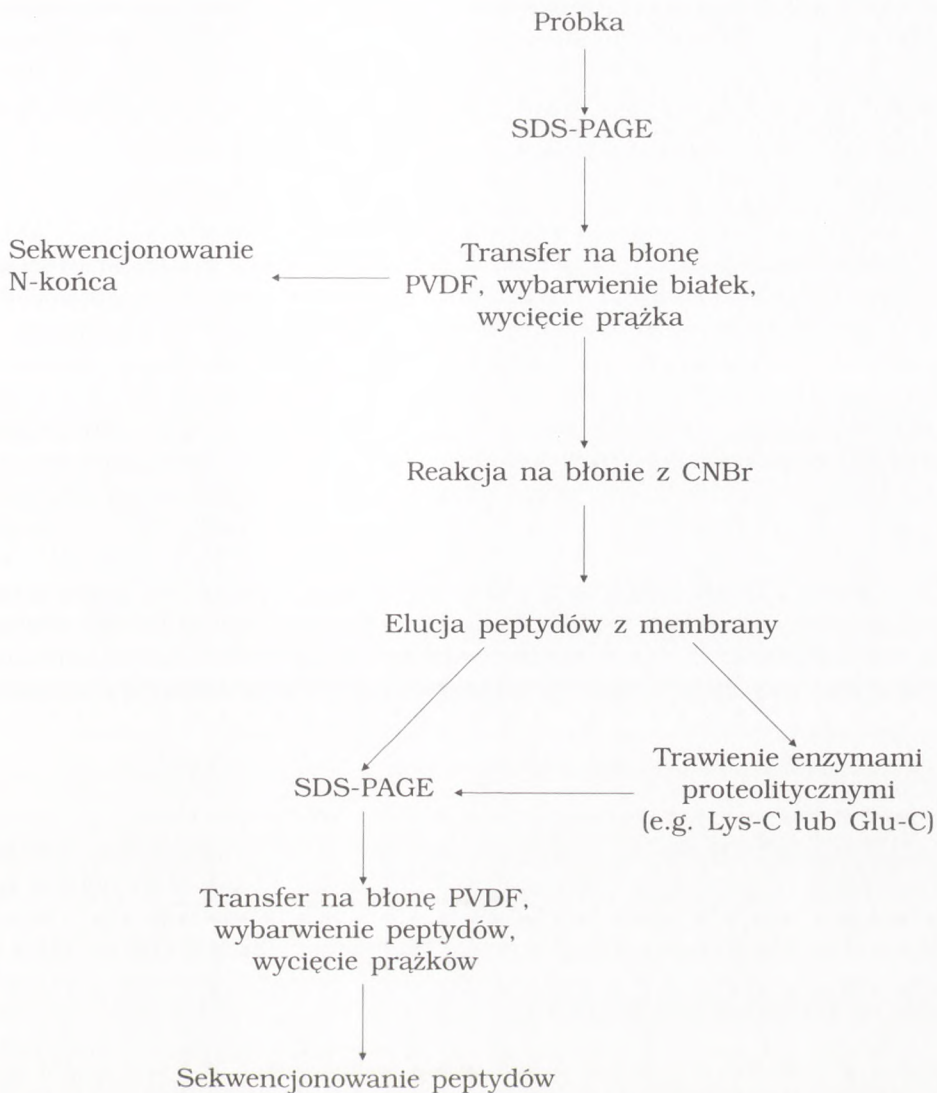
przy wytrącaniu. Białka hydrofobowe są słabo wytrącane, natomiast białka o dużej masie cząsteczkowej są wytrącane przez rozpuszczalniki organiczne lepiej niż białka małe o podobnych właściwościach. Również pH odgrywa rolę przy wytrącaniu białek rozpuszczalnikami organicznymi. Im wartość pH jest bliższa wartości pI białka, tym wytrącanie jest efektywniejsze.

Wytrącone białka są najczęściej używane do immunizacji zwierząt. Jeśli dodaje się adjuwantu Freund'a do roztworu białka i z tych składników sporządza się emulsję o konsystencji zalecanej do szczepienia, to przeważnie kilkanaście do kilkudziesięciu mikrogramów białka wystarcza do uzyskania przeciwciał. Jednak ilość ta jest tylko wskaźnikiem, ponieważ czasami, szczególnie dla małych białek, obserwuje się wyjątki od tej reguły. Jeżeli napotyka się na trudności w uzyskaniu przeciwciał mimo wstrzyknięcia dużej ilości immunogenu, to często można uzyskać pozytywny wynik sprzęgając polipeptyd z obojętnym nośnikiem białkowym (65). Najczęściej do sprzęgania polipeptydu z nośnikiem stosuje się aldehyd glutarowy lub karbodwuimidy.

5.3. Analiza aminokwasowa i sekwencjonowanie białek

Rozwój technik mikrosekwencjonowania białek stał się możliwy zarówno dzięki ulepszeniom aparaturowym jak i ulepszeniom sposobów przygotowania próbek białkowych. Metoda wysokorozdzielczej chromatografii cieczonej (HPLC) jest często stosowaną techniką oczyszczania białek przed sekwencjonowaniem, ale czasami rozdzielczość tej metody nie jest wystarczająca. Z kolei elektroelucja białek z żelu poliakrylamidowego z SDS prowadzi często do blokowania N-końca oraz do wymycia niebiałkowych składników, które przeszkadzają w kolejnych etapach degradacji Edmana i analizy aminokwasów. Od kilkunastu lat próbowano stosować przed sekwencjonowaniem różne membrany używane do wykonywania replik białkowych w celu wyeliminowania wad bezpośredniej elucji z żelu poliakrylamidowego. Membrany nitrocelulozowe i nylonowe są jednak chemicznie niestabilne i dopiero wprowadzenie membran z modyfikowanego włókna szklanego (66) pozwoliło na zastosowanie replik białkowych na membranach do sekwencjonowania. Metoda ta jest dość skomplikowana, a rezultaty sekwencjonowania białek izolowanych z włókna szklanego nie zawsze były zadowalające. Zastosowanie Immobilonu P przy sekwencjonowaniu (67) wyeliminowało wszystkie opisane trudności i obecnie repliki na błonach PVDF są najczęściej stosowaną metodą przygotowania próbki homogennego preparatu białka do sekwencjonowania. Membrany te mogą być użyte do sekwencjonowania *in situ* od końca NH₂-, do analizy aminokwasowej oraz do określania sekwencji wewnętrznych w białku. Ilość białka potrzebna do tego typu analiz zmienia się znacznie w zależności od membrany, strategii sekwencjonowania i hydrofobowości białka, ale przeważnie są to ilości pikomolowe.

Kolejne etapy przygotowania próbki białkowej do sekwencjonowania przedstawione są na rys. 6. Zostaną one omówione w dalszej części tego rozdziału.



Rys. 6. Przygotowanie białka i peptydów wchodzących w jego skład w celu uzyskania sekwencji aminokwasów.

5.3.1. Warunki elektroforezy i transferu białek przeznaczonych do mikrosekwencjonowania

Najczęściej białka są rozdzielane metodą elektroforezy poliakrylamidowej w obecności SDS, ale czasami stosuje się również żele z mocznikiem lub elektroforezę dwukierunkową. Ponieważ degradacja Edmana wymaga wolnej

końcowej grupy aminowej, w związku z tym warunki elektroforezy muszą być takie, aby nie zaszła modyfikacja grup N-terminalnych łańcucha polipeptydowego. Konieczne jest stosowanie najwyższej jakości wody, SDS, akrylamidu i soli. Przeprowadza się też często preelektroforezę przez 2-6 godzin dodając 0,1M tioglikolanu sodu do górnego zbiornika elektrodowego.

5.3.2. Przeniesienie białek na błonę PVDF

Białka rozdzielone w żelu przenosi się na błonę PVDF, najczęściej stosując metodę transferu mokrego. Jako bufor transferowy stosuje się 10 mM CAPS (kwas 3-[cykloheksyloamino]-1-propanosulfonowy), pH 11 zawierający 10% metanol i 0,1 mM tioglikolan. Jeśli ten bufor nie jest dostępny, można stosować klasyczny bufor Tris-glicyna z dodatkiem tioglikolanu, ale po transferze trzeba kilkakrotnie przemyć membranę wodą destylowaną w celu usunięcia związków zawierających grupy aminowe. Często stosuje się membrany o wysokiej pojemności białkowej, jak np. Immobilon P^{SQ}, które mogą związać kilkakrotnie więcej białka niż wcześniejszy odpowiednik Immobilon P. Membranę barwi się następnie błękitem *Coomassie* (0,1% w 50% metanolu + 2% kwas octowy), czernią amidową (0,1% w 50% metanolu + 1% kwas octowy). Jeśli nie jest wymagana wysoka czułość, membranę można barwić odwracalnie 0,2% Ponceau S w 1% kwasie octowym. Po wybarwieniu żądany prążek wycina się nożyczkami lub skalpelem i poddaje się go sekwencjonowaniu.

5.3.3. Sekwencjonowanie nienaruszonego białka od N-końca

Białka przeniesione na błonę PVDF, jeśli nie mają zablokowanego N-końca, mogą być analizowane w sekwenatorach Applied Biosystems, Inc. lub Beckman/Porton Instruments. Dla białek dużych (ponad 50 kDa) rzadko udaje się uzyskać sekwencję więcej niż 25 reszt aminokwasowych przy ilościach białka rzędu kilkudziesięciu pikomoli. Dla małych białek (15-20 kDa) przy tych samych ilościach białka, można nawet uzyskać sekwencję ponad 60 reszt aminokwasowych (68).

Bardzo często nawet w warunkach naturalnych N-koniec białka jest zablokowany. Przy niewielkich ilościach białka (5-50 pikomoli) metody odblokowania N-końca nie są wydajne. W takich przypadkach oraz przy większych białkach, w pierwszym etapie należy przeprowadzić kontrolowaną degradację łańcucha peptydowego przed dalszą analizą sekwencji.

5.3.4. Otrzymywanie krótkich peptydów poprzez kontrolowaną degradację łańcucha białkowego

Istnieje wiele metod kontrolowanej degradacji łańcucha peptydowego. Niektóre z ważniejszych modyfikacji przygotowania peptydów do sekwencjonowania podane są w pozycjach (69-75). Najczęściej jednak do degradacji łańcucha stosuje się bromocyjan (CNBr) i 2-(2'-nitrofenylo-sulfenilo)-3-metylo-

3'-bromoindol (BNPS-skatoł). Pierwszy z nich powoduje hydrolizę łańcucha przy metioninie, drugi przy tryptofanie. W jednym i drugim przypadku degradację łańcucha prowadzi się na membranie PVDF (76,77). Po reakcji trwającej od 16 do 24 godzin w przypadku CNBr i 1 godzinę w przypadku BNPS-skatołu, peptydy eluuje się najczęściej mieszaniną kwasu trójfluorooctowego i izopropanolu (78) lub mieszaniną detergentów (14,62). Po elucji peptydy nanosi się na żel SDS-PAGE o wysokiej procentowości akrylamidu (ponad 15% lub żel gradientowy), przeprowadza się elektroforezę, a następnie transfer na błonę PVDF. Replikę barwi się błękitem *Coomassie* lub czernią amidową, prażki peptydów wycina się i poddaje analizie w sekwenatorze.

Czasami białko zawiera mało reszt metioniny i tryptofanu; konieczne są zatem dodatkowe cięcia dużych peptydów. Często stosuje się w tym celu enzymy proteolityczne Lys-C i Glu-C, które przecinają łańcuch peptydowy odpowiednio przy lizynie i kwasie glutaminowym (68,79). Reakcję tę prowadzi się w roztworze, w którym znajduje się duży peptyd wyizolowany z membrany PVDF według poprzednich procedur po usunięciu eluentów. Po reakcji enzymatycznej trwającej 2-16 godzin, próbkę nanosi się na żel SDS-PAGE, przeprowadza elektroforezę, wykonuje replikę na błonie PVDF, po zabarwieniu wycina prażki i peptydy poddaje się sekwencjonowaniu.

5.3.5. Hydroliza białka na membranie i analiza składu aminokwasowego

Membrana PVDF jest bardzo odporna na działanie kwasów i zasad, w związku z tym można hydrolizować białka bezpośrednio na membranie (80,81,82). Aby uzyskać całkowitą hydrolizę białka stosuje się najczęściej inkubację w 6N HCl/7% kwas tioglikolowy. Skład aminokwasowy uzyskany po hydrolizie na membranie nie różni się praktycznie od składu aminokwasowego uzyskanego bardziej tradycyjnymi metodami.

5.5.4. Reakcje z sondami innymi niż przeciwciała

Immunoblotting jest bez wątpienia najbardziej rozpowszechnionym zastosowaniem replik białkowych żeli poliakrylamidowych. Jednak już od początku stosowania transferu próbowano rozszerzyć zastosowanie tej metody do reakcji z innymi sondami. W odróżnieniu od *immunoblottingu*, reakcje replik białkowych z innymi sondami niż przeciwciała, określa się najczęściej terminem *ligand-blotting*. Ligandami wiążącymi się z białkami na replice żelu mogą być bardzo różne związki chemiczne. Do najczęściej stosowanych należą kwasy nukleinowe (DNA lub RNA), lektyny, hormony czy też czynniki wzrostu. Wykrywanie białek wiążących się z określonymi sekwencjami DNA jest bardzo szeroko stosowane (83-86). Ta technika czasami nosi nazwę zwyczajową *southwestern blotting*. Nie różni się ona specjalnie od *immunoblottingu*, ale czasami stosuje się pewne modyfikacje ułatwiające wiązanie i zwiększające specyficzność reakcji. Często są to modyfikacje dotyczące samej elektroforezy żelowej, a nie transferu. Między innymi można usunąć odczynnik redukujący

z buforu, w którym przygotowywane są próbki oraz obniżyć stężenie SDS. Po transferze i zablokowaniu miejsc niespecyficznie wiążących białko (mlekiem odtłuszczonym, albuminą krwi bydlęcej lub innym czynnikiem blokującym), membranę inkubuje się z sondą DNA lub RNA znakowaną najczęściej fosforem radioaktywnym przez kilkanaście minut do kilku godzin. Następnie odmywa się nadmiar niezwiązanej sondy buforem o dość wysokiej sile jonowej. Siłę jonową buforu wyznacza się empirycznie. Musi ona być na tyle wysoka aby ograniczyć maksymalnie niespecyficzne wiązanie DNA-białko. W ostatnim etapie membranę eksponuje się wobec kliszy rentgenowskiej w celu uwidocznienia prążków białkowych, które związały radioaktywną sondę.

Metoda *southern* musi być stosowana z dużą ostrożnością. Poza wymienionymi wcześniej środkami ograniczającymi niespecyficzne wiązania, można stosować jako kontrolę negatywne odcinki DNA homologiczne do DNA sondy, ale posiadające tak zmienione krótkie sekwencje w łańcuchu, że nie jest możliwe wiązanie z białkiem (88). Często do roztworu, w którym inkubowana jest membrana, dodaje się nadmiar obcego DNA aby wyeliminować przypadkowe wiązania.

Lektyny to białka wiążące się selektywnie z łańcuchami cukrowymi glikoprotein. Można je stosować do wykrywania glikoprotein na membranach (32,89,90). Olbrzymia różnorodność obecnie dostępnych lektyn pozwala na bardzo szerokie zastosowanie analityczne tej metody. Oddziaływania między glikoproteinami a lektynami są na tyle silne, że zasadniczo można stosować bez większych zmian metodykę używaną przy *immunoblottingu*. Lektyna może być znakowana przy użyciu radioizotopów lub też można stosować metodę pośrednią detekcji, np. używając przeciwciał antylektyna ze związaną fosfatazą lub peroksydazą. Uzyskane w ten sposób wyniki pozwalają na określenie połączeń międzycukrowych w łańcuchach oligosacharydowych glikoprotein.

Badanie słabszych oddziaływań międzybiałkowych typu receptor-ligand wymaga często modyfikacji klasycznej metody *immunoblottingu*. Na membranie związany jest najczęściej receptor przeniesiony na błonę z żelu poliakrylamidowego (91,92,93). Aby reakcja z ligandem mogła zajść, receptor powinien być przynajmniej częściowo zrenaturowany. Zniszczenie mostków dwusiarczkowych prowadzi przeważnie do utraty właściwości receptorowych. Dlatego zaleca się prowadzenie elektroforezy poliakrylamidowej w nieobecności czynników redukujących (94). Nie jest to jednak reguła absolutna, gdyż niekiedy, jak np. w przypadku receptora białka aktywowującego plazminogen (t-PA) czy białka wiążącego plazminogen, redukcja przed elektroforezą nie zmienia właściwości receptorowych (95). Czasami warunki elektroforezy muszą być na tyle łagodne, że rezygnuje się ze stosowania siarczanu dodecyłu w buforach elektrodowych, a bufor do próbek zamiast soli sodowej siarczanu dodecyłu zawiera łagodniejszy detergent — sól litową siarczanu dodecyłu. Procedura blokowania membrany i inkubacji z ligandem nie zawsze jest taka sama. Przy blokowaniu należy zwrócić uwagę, żeby czynnik blokujący (np. mleko) nie zawierał liganda w swoim składzie. Inkubacja musi przebiegać w roztworze o składzie optymalnym do wiązania liganda. Stężenie soli, pH roztworu czy obecność innych związków muszą być zoptymalizowane dla każdego układu

receptor-ligand i nie można tutaj podać żadnego uniwersalnego roztworu do inkubacji. Najprostszą metodą detekcji kompleksów jest autoradiografia, ale w tym przypadku konieczne jest znakowanie liganda radioizotopem. Aby tego uniknąć, najczęściej stosuje się ligandy znakowane biotyną, a następnie przeprowadza się reakcję z awidyną lub streptawidyną połączoną z enzymem (fosfatazą lub peroksydazą). Można również użyć przeciwciał antyligand i prowadzić dalsze reakcje jak w klasycznym *immunoblottingu*.

Wiązanie receptor-ligand na membranach może dawać czasami nie w pełni zadowalające wyniki. Mimo stosowania warunków zapewniających minimalne zniszczenie struktury receptora, niekiedy nawet podczas łagodnej elektroforezy i transferu zmiany struktury białka są na tyle znaczące, że wiązanie nie zachodzi. Odnosi się to przede wszystkim do układów, gdzie oddziaływania między dwoma komponentami kompleksów są stosunkowo słabe. Zdarza się również, że do utworzenia kompleksu receptor-ligand konieczne jest oddziaływanie kilku cząsteczek receptora, co oczywiście jest utrudnione po związaniu receptora na membranie.

5.5. Inne zastosowania transferu na membrany

Omówione w poprzednich podrozdziałach zastosowania replik żeli białkowych nie wyczerpują wszystkich możliwości jakie daje technika transferu. Jednym z prostych zastosowań replik na błonach jest autoradiografia białek rozdzielonych w żelach. Przeniesienie białek na membranę powoduje co najmniej kilkukrotne skrócenie czasu ekspozycji wobec kliszy rentgenowskiej w porównaniu z wysuszonym żelem poliakrylamidowym. Prążki białkowe są poza tym bardziej wyraźne, ponieważ przy barwieniu i suszeniu żelu poliakrylamidowego następuje rozmywanie prążków. Przeniesienie na membranę przed autoradiografią jest szczególnie ważne w przypadkach, gdy ilość radioizotopu włączonego do białek jest niewielka.

W pewnych szczególnych przypadkach można odzyskiwać aktywność enzymatyczną białek rozdzielonych metodą elektroforetyczną i przeniesionych na membranę (96-101). Metody stosowane do renaturacji białek są bardzo różne i tylko niektóre z białek można zrenaturować w mierzalnym stopniu. Jest to jednak technika, która zaczyna powoli zyskiwać na znaczeniu ze względu na wysoką rozdzielczość SDS-PAGE i prostotę technik elektroforetycznych. Jeśli białko ma być renaturowane po transferze, to powinno ono zostać zdenaturowane w jak najmniejszym stopniu we wcześniejszych etapach. Podobnie jak przy badaniu oddziaływań receptor-ligand we wstępnych etapach elektroforezy nie zaleca się stosowania czynników redukujących mogących zniszczyć wiązania dwusiarczkowe. Również zastosowanie soli litowej zamiast soli sodowej siarczanu dodecyłu przy elektroforezie często zmniejsza stopień denaturacji białka. Zamiast gotowania próbki przed naniesieniem na elektroforezę, korzystniej jest stosować łagodniejsze warunki (30-50°C) po zmieszaniu próbki z buforem lizującym. Transfer po elektroforezie powinien być również maksy-

malnie łagodny, a zatem bez żadnych czynników denaturujących w buforze do transferu i w temperaturze około 4°C. Jeśli białka mają być eluowane z membrany przed renaturacją konieczne jest stosowanie bardzo łagodnej metody elucji. Dość wydajną elucję białek z Immobilonu P uzyskiwano stosując tylko 1% Triton X-100 w pH 9,0 jako eluent. Ten łagodny niejonowy detergent nie powoduje denaturacji białek, a wręcz ułatwia renaturację. Jednak jest to eluent, który czasami daje negatywne wyniki. Spowodowane jest to różnicami w składzie poszczególnych partii Immobilonu P. Przed przystąpieniem do elucji właściwego białka, należy sprawdzić dla wzorcowych białek czy dana partia Immobilonu P nadaje się do elucji roztworem Tritonu X-100. Elucję można prowadzić również przy użyciu eluentu 7M chlorowodorek guanidyny/0,5% lizolecytyna. Po elucji białko renaturowane jest w trakcie kilkustopniowej dializy.

Oprócz reakcji z lektynami na błonach, glikoproteiny można wykrywać wprowadzając specyficzny znacznik na łańcuchach cukrowych (102,103,104). Obecnie najczęściej wprowadzanym znacznikiem w glikoproteinach jest biotyna (105) lub digoksygenina (106). Aktywnymi pochodnymi tych związków używanymi do znakowania łańcuchów cukrowych są hydrazydy biotyny lub digoksygeniny. Znakowanie glikoprotein może odbywać się przed elektroforezą lub już po transferze na błonie. Po wprowadzeniu znaczników dalsze etapy detekcji to w pierwszym przypadku reakcja ze streptawidyną lub awidyną z połączonym enzymem (fosfatazą bądź peroksydazą) lub w drugim przypadku reakcja z przeciwciałami antydigoksygenina związanymi z fosfatazą lub peroksydazą.

Prawdopodobnie niedługo repliki na membranach będą szeroko stosowane nie tylko do sekwencjonowania białek, ale również do sekwencjonowania łańcuchów cukrowych w glikoproteinach. Jak na razie repliki na membranach są stosowane przede wszystkim do analizy składu cukrowego (107,108,109), ale jest prawie pewne, że w przyszłości ich zastosowanie zostanie rozszerzone. Ponieważ do uzyskania sekwencji łańcuchów cukrowych potrzeba kilkaset mikrogramów glikoproteiny, w związku z tym ze względu na ograniczoną pojemność membrany wstępnym etapem powinna być elucja glikoproteiny z kilku lub kilkunastu replik aby uzyskać odpowiednią ilość glikoproteiny do analizy.

6. Podsumowanie

Od czasu wprowadzenia transferu na membrany w 1979 r. obserwujemy bardzo szybki rozwój tej techniki, który można porównać do rozwoju elektroforezy białek w żelach poliakrylamidowych. Towbin i wsp. (3) stali się klasykami biologii molekularnej cytowanymi kilkaset razy rocznie, podobnie jak Laemmli (110), pionier elektroforezy białek w żelach poliakrylamidowych w obecności siarczanu dodecyłu. Stało się to możliwe, ponieważ technika transferu białek wypełniła lukę w zastosowaniach elektroforezy poliakrylamidowej, która wprawdzie zapewniała doskonałą rozdzielczość, ale ograniczała dostępność białka do dalszych analiz. Rozszerzenie zastosowania transferu białek wiąże się również z wprowadzeniem membran nitrocelulozowych w koń-

cu lat siedemdziesiątych, a następnie membran z fluorku poliwinylidenu (PVDF) w roku 1986. Te ostatnie membrany pozwoliły na zastosowanie transferu do sekwencjonowania i elucji białek, co znacznie zwiększyło użyteczność transferu na błony. Rozwój technik transferu potrwa jeszcze co najmniej kilka lat. Coraz większą rolę będą odgrywały metody chemiluminescencyjne detekcji ponieważ wyeliminują one użycie radioizotopów. Sekwencjonowanie oligosacharydów, ciągle jeszcze niedoskonałe, może zostać znacznie usprawnione dzięki technice transferu, tak jak to miało miejsce przy sekwencjonowaniu białek. Należy również oczekiwać dalszego rozwoju metod renaturacji białek przeniesionych na błony oraz, co jest z tym związane, rozwoju techniki *ligand-blotting* czyli badania oddziaływań pomiędzy różnymi, funkcjonalnie związanymi białkami.

Literatura

1. Southern E. M., (1975), *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
2. Renart J., Reiser J., Stark G. R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3116-3120.
3. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
4. Burnette W. N., (1981), *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.
5. Bittner M., Kupferer P., Morris C. F., (1980), *Anal. Biochem.*, 102, 459-471.
6. Gooderham K., (1983), *Protein blotting*, in: *Techniques in Molecular Biology*, Eds. J. Walker, W. Gaastra, Macmillan Publishing Co., New York.
7. Gershoni J. M., Palade G. E., (1983), *Anal. Biochem.*, 131, 1-15.
8. Svoboda M., Meuris S., Robyn C., Christophe J., (1985), *Anal. Biochem.*, 151, 16-23.
9. Tovey E. R., Baldo B. A., (1987), *Electrophoresis*, 8, 384-387.
10. Harper D. R., Ming-Liu K., Kangro H. O., (1990), *J. Virol. Meth.*, 30, 25-40.
11. Szewczyk B., Kozloff L. M., (1985), *Anal. Biochem.*, 150, 403-407.
12. Szewczyk B., Bienkowska-Szewczyk K., Kozloff L. M., (1987), *Electrophoresis*, 8, 25-28.
13. Salinovich O., Montelaro R. C., (1986), *Anal. Biochem.*, 156, 341-347.
14. Szewczyk B., Summers D. F., (1988), *Anal. Biochem.*, 168, 48-53.
15. Harper D. R., Ming-Liu K., Kangro H. O., (1986), *Anal. Biochem.*, 157, 270-274.
16. Szewczyk B., Summers D. F., (1987), *Anal. Biochem.*, 164, 303-306.
17. Szewczyk B., Summers D. F., (1992), *Fluorescent protein staining on nitrocellulose with subsequent immunodetection of antigen*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol.10: *Immunochemical Protocols*, Ed. M. Manson, The Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA.
18. Coull J. M., Pappin D. J., (1990), *J. Prot. Chem.*, 9, 259-260.
19. Gultekin H., Heermann K., (1988), *Anal. Biochem.*, 172, 320-329.
20. Pluskal M. G., Przekop M. B., Kavonian M. R., Vecoli C., Hicks D., (1986), *Bio-Techniques*, 4, 272-283.
21. Hancock K., Tsang V. C. W., (1983), *Anal. Biochem.*, 133, 157-162.
22. Hughes J., Mack K., Hamparian V., (1988), *Anal. Biochem.*, 173, 18-25.
23. Moeremans M., Daneels G., De Mey J., (1985), *Anal. Biochem.*, 145, 315-321.
24. De Blas A. L., Cherwinski H. M., (1983), *Anal. Biochem.*, 133, 214-219.
25. Hawkes R., Niday E., Gordon J., (1982), *Anal. Biochem.*, 119, 142-147.
26. Blake M. S., Johnston K. H., Russell-Jones G. J., Gotschlich E. C., (1984), *Anal. Biochem.*, 136, 175-179.
27. Brada D., Roth J., (1984), *Anal. Biochem.*, 142, 79-83.
28. Hsu Y.-H., (1984), *Anal. Biochem.*, 142, 221-225.

29. Knecht D. A., Dimond R. L. (1984), *Anal. Biochem.*, 136, 180-184.
30. Bers G., Garfin G., (1985), *BioTechniques*, 3, 276-288.
31. Dao M.L., (1985), *J. Immunol. Meth.*, 82, 225-231.
32. Rohringer R., Holden D.W., (1985), *Anal. Biochem.*, 144, 118-127.
33. Theisen N., Lohoff E. S., von Figura K., Hasilik A., (1986), *Anal. Biochem.*, 152, 211-214.
34. Bernstein J. M., Stokes C. E., Fermie B., (1987), *J. Clin. Microbiol.*, 25, 72-75.
35. Voyta J. C., Edwards B., Bronstein I., (1988), *Clin. Chem.*, 34, 1157.
36. Vachereau A., (1989), *Anal. Biochem.*, 179, 206-208.
37. Sandhu G. S., Eckloff W. B., Kline B. C., (1991), *BioTechniques*, 11, 14-16.
38. Durrant I., Fowler S., (1994), *Chemiluminescent detection systems for protein blotting*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. S. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.
39. Bronstein I., Edwards B., Voyta J. C., (1989), *J. Biolumin. Chemilumin.*, 5, 99-111.
40. Gillespie P. G., Hudspeth A. J., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2563-2567.
41. Bronstein I., Voyta J. C., Murphy O. J., Bresnick L., Kricka L. J., (1992), *Bio-Techniques*, 12, 748-753.
42. Snowden B. W., Halliburton I. W., (1985), *J. Gen. Virol.*, 66, 2039-2044.
43. Tovey E. R., Baldo B. A., (1987), *Electrophoresis*, 8, 452-463.
44. Harper D. R., Kangro H. O., Heath R. B., (1988), *J. Med. Virol.*, 25, 387-398.
45. Yamaguchi K., Matuta E., Kiyokawa T., Nishimura Y., Ishii T., Takatsuki K., Catovsky P., (1988), *J. Clin. Pathol.*, 41, 57-61.
46. Rijksen G., van Oirschot B. A., Staal G. E. J., (1989), *Anal. Biochem.*, 182, 98-102.
47. Saah A. J., Farzadegan H., Fox R., Nishanian P., Rinaldo C. R., Phair J. P., Fahey J. L., Tun-Hou L., Polk B. F. et al, (1987), *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1605-1610.
48. Centers for Disease Control, (1989), *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 38 (S-7), 1-7.
49. Griffith B. P., Ferguson D., Mellors J. W., (1989), *J. Infect. Dis.*, 160, 160-161.
50. Ziola B. R., Scraba D. G., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 366-371.
51. Karsnas P., Roos P., (1977), *Anal. Biochem.*, 77, 168-175.
52. Tuszyński G. P., Damsky C. H., Fuhrer J. P., Warren L., (1977), *Anal. Biochem.*, 83, 119-129.
53. Hager D. A., Burgess R. R., (1980), *Anal. Biochem.*, 109, 76-86.
54. Nguyen N. Y., DiFonzo J., Chrambach A., (1980), *Anal. Biochem.*, 106, 78-91.
55. Ofverstedt L.-G., Johansson G., Froman G., Hjerten S., (1981), *Electrophoresis*, 2, 168-173.
56. Otto M., Snejdarkova M., (1981), *Anal. Biochem.*, 111, 111-114.
57. Anderson P. J., (1985), *Anal. Biochem.*, 148, 105-110.
58. Knudsen K. A., (1985), *Anal. Biochem.*, 147, 285-288.
59. Parekh B. S., Mehta H. B., West M. D., Montelaro R. C., (1985), *Anal. Biochem.*, 148, 87-92.
60. Diano M., Le Bivic A., Hirn M., (1992), *Raising polyclonal antibodies using nitro-cellulose-bound antigen*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol.10: *Immunochemical Protocols*, Ed. M. Manson, The Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA.
61. Walsh M., McDougall J., Wittmann-Liebold B., (1988), *Biochemistry*, 27, 6867-6876.
62. Simpson R. J., Ward L. D., Reid G. E., Batterham M. P., Moritz R., (1989), *J. Chromatogr.*, 476, 345-361.
63. Szewczyk B., Summers D. F., (1992), *Efficient elution of purified proteins from polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon) after transfer from SDS-PAGE and their use as immunogens*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol.10: *Immunochemical Protocols*, Ed. M. Manson, The Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA.
64. Szewczyk B., Harper D. R., (1994), *Use of blotted proteins as immunogens*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.

65. Hancock D. C., Evan G. I., (1992), *Synthesis of peptides for use as immunogens*, in: *Methods in Molecular Biology*, vol.10: *Immunochemical Protocols*, Ed. M. Man-son, The Humana Press, Inc., Totowa, NJ, USA.
66. Aebersold R. H., Teplow D. B., Hood L. E., Kent S. B. H., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 4229-4238.
67. Matsudaira P., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038.
68. Cook R. G., (1994), *Amino acid sequence analysis of blotted proteins*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.
69. Choli T., Kapp U., Wittmann-Liebold B., (1989), *J. Chromatogr.*, 476, 59-72.
70. Choli T., Wittmann-Liebold B., (1990), *Electrophoresis*, 11, 562-568.
71. Pappin D. J., Coull J. M., Koster H., (1990), *Anal. Biochem.*, 187, 10-19.
72. Ward L. D., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., (1990), *J. Chromatogr.*, 519, 199-216.
73. Hulmes J. D., Pan Y. C., (1991), *Anal. Biochem.*, 197, 368-376.
74. Mozdzanowski J., Speicher D. W., (1992), *Anal. Biochem.*, 207, 11-18.
75. Ploug M., Stoffer B., Jensen A. L., (1992), *Electrophoresis*, 13, 148-153.
76. Scott M. G., Crimmins D. L., McCourt D. W., Terrand J. J., Eyerman M. C., Naham M. H., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 1353-1359.
77. Crimmins D. L., McCourt D. W., Thoma R. S., Scott M. G., Macke K., Schwartz B. D., (1990), *Anal. Biochem.*, 187, 27-38.
78. Yuen S. W., Chui A. H., Wilson K. J., Yuan P. M., (1989), *BioTechniques*, 7, 74-83.
79. Fernanadez J., De Mott M., Atherton D., Mische S. M., (1992), *Anal. Biochem.*, 201, 255-264.
80. Nakagawa S., Fukuda T., (1989), *Anal. Biochem.*, 181, 75-78.
81. Santucci A., Lozzi L., Bracci L., Petreni S., Rustici M., Soldani P., Neri P., (1989), *Ital. J. Biochem.*, 38, 349-359.
82. Tous G. I., Fausnaugh J. L., Akinyosoye O., Lackland H., Winter-Cash P., Vitorica F. J., Stein S., (1989), *Anal. Biochem.*, 179, 50-55.
83. Bowen B., Steinberg J., Laemmli U. K., Weintraub H., (1980), *Nucl. Acids Res.*, 8, 1-20.
84. Granger-Schnarr M., Llobes R., De Murcia G., Schnarr M., (1988), *Anal. Biochem.*, 172, 320-329.
85. Herlt M., Schwarz H. P., Neumann R., Eggert H. J., (1988), *BioTechniques*, 6, 324-331.
86. Lelong J. C., Prevost G., Lee K., Crepur M., (1989), *Anal. Biochem.*, 179, 299-303.
87. Wendler I., Grossbach U., (1988), *Anal. Biochem.*, 172, 29-38.
88. Flytzanis C. N., (1994), *DNA binding of immobilized proteins*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.
89. Erlich H. A., Levinson J. R., Cohen S. N., McDevitt H. O., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 12240-12247.
90. Faye L., Chrispels M. J., (1985), *Anal. Biochem.*, 149, 218-224.
91. Zorzato F., Volpe P., (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, 261, 324-329.
92. Le Maire M., Lund S., Viel A., Champeil P., Moller J. V., (1989), *J. Biol. Chem.*, 265, 1111-1123.
93. Roche P. C., Ryan R. J., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 4636-4641.
94. Gershoni J. M., (1987), *Electrophoresis*, 8, 428-431.
95. Hossenlopp P., Binoux M., (1994), *Use of peptide ligands for the detection of binding proteins by Western blotting*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.
96. Szewczyk B., Laver W. G., Summers D. F., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7907-7911.
97. Dutta C., Henry H. L., (1990), *Anal. Biochem.*, 184, 96-99.
98. Homan H. E., Willenbrink W., Buchholz C. J., Neubert W. J., (1991), *J. Virol.*, 65, 1304-1309.

99. Garrett M. D., Major G. N., Totty N., Hall A., (1991), *Biochem. J.*, 276, 833-836.
100. Shackelford D. A., Zivin J. A., (1993), *Anal. Biochem.*, 211, 131-138.
101. Zhu J.-S., Gray G. M., (1994), *Renaturative catalytic blotting of enzyme proteins*, in: *Protein Blotting — A Practical Approach*, Ed. B. Dunbar, Oxford University Press, Oxford.
102. Gershoni J. M., Bayer E. A., Wilchek M., (1985), *Anal. Biochem.*, 146, 59-63.
103. Keren Z., Berke G., Gershoni J. M., (1986), *Anal. Biochem.*, 155, 182-187.
104. Bayer E. A., Ben-Hur H., Wilchek M., (1987), *Anal. Biochem.*, 161, 123-131.
105. O'Shannessy D. J., Voorstad P. J., Quarles R. H., (1987), *Anal. Biochem.*, 163, 204-209.
106. Haselbeck A., Hosel W., (1990), *Glyconjugate J.*, 7, 63-74.
107. Ogawa H., Ueno M., Uchibori H., Matsumoto I., Seno N., (1990), *Anal. Biochem.*, 190, 165-169.
108. Kawashima H., Murata T., Yamamoto K., Takeishi A., Irimura T., Osawa T., (1992), *J. Biochem. (Tokyo)*, 111, 620-622.
109. Weitzhandler M., Kadlecck D., Avdalovic N., Forte J. G., Chow D., Townsend R. R., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 5121-5130.
110. Laemmli U. K., (1970), *Nature*, 227, 680-685.

Application of transfer onto PVDF and nitrocellulose membranes in the purification and structural analyses of proteins

Summary

Replicas of SDS-PAGE gels widen the range of application of electrophoresis to the studies of diverse biological properties of proteins as well as to the elucidation of their structures. Most often proteins are transferred to membranes made of polyvinylidene difluoride (PVDF) or nitrocellulose. Usually, a "semi-dry" blotting apparatus is used for electrophoretic transfer. SDS-PAGE gel replicas are used for the studies of these biological properties which cannot be studied directly on polyacrylamide gels. The major applications of this technique is in the immunoblotting which allows for the antigen-antibody reaction on the membrane. This reaction, after necessary amplification, is visualized with a variety of reagents. Protein microsequencing is another important application of SDS-PAGE gel replicas. In this case, a replica is stained with a general protein stain, and a band of interest is excised and used to obtain partial or complete amino acid sequence in an automatic sequencer.

Key words:

protein transfer, SDS-PAGE, PVDF membranes, immunoblotting, protein sequencing.

Praca została wykonana w ramach badań statutowych Katedry Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz w ramach badań własnych Pracowni Biochemii Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii AMG i UG.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego: „Opracowanie metody wydajnej syntezy głównego antygeny wirusa pomoru świń — białka E1 w bakteryjnych i bakulowirusowych systemach ekspresyjnych”.

Adres do korespondencji:

Bogusław Szewczyk, Pracownia Biochemii Wirusów,
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Akademii Medycznej w Gdańsku
i Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, fax: (0-58) 31 00 72.