

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

**ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ПРОТЕЇНІВ РОГІВКИ ТА
СЛІЗНОЇ РІДИНИ МЕТОДОМ ІМУНОБЛОТ-АНАЛІЗУ**

(Методичні рекомендації)

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

Рекомендовано до друку
Вченою радою Інституту
біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України
протокол № 6 від 23/07.2024

Голова Вченої ради

академік Сергій КОМІСАРЕНКО



ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ПРОТЕЇНІВ РОГІВКИ ТА
СЛІЗНОЇ РІДИНИ МЕТОДОМ ІМУНОБЛОТ-АНАЛІЗУ

(Методичні рекомендації)

УДК 577.112:57.083.3:617.7
Д 70

Дослідження складу протеїнів рогівки та слізної рідини методом імуноблот-аналізу» (для магістрантів та аспірантів біологічних та медичних спеціальностей): метод. рекомендації. – К., в-во ФОП Худяков А.О. 2024. – 30 с.

Установа – розробник:

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України
(044) 234-90-56

Укладачі:

д.б.н. Тихомиров А.О. – завідувач відділу хімії та біохімії ферментів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
Білоус В.Л. – провідний інженер відділу хімії та біохімії ферментів Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
Корса В.В. – провідний інженер відділу хімії та біохімії ферментів Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Рецензенти:

д.б.н. Великий М.М. – професор, завідувач відділу біохімії вітамінів і
коензимів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
к.б.н. Яніцька Л.В. – доцентка, завідувачка кафедри медичної біохімії та
молекулярної біології Національного медичного університету імені
О.О. Богомольця.

Рекомендовано до друку Веною радою IBX ім. О.В. Палладіна НАН України
(протокол № 6 від 23.07.2024) і навчально-методичною радою кафедри
біології IBX ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 5 від 22.08.2024).

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	5
Вступ.....	6
1. Будова, біохімічні особливості та функції рогівки.....	7
2. Протеомний склад слізної рідини.....	12
3. Експериментальний та клінічний матеріал для дослідження... ..	13
3.1. Рогівка лабораторних тварин.....	14
3.2. Слізна рідина пацієнтів.....	14
4. Гомогенізація тканини рогівки та екстракція протеїнів.....	14
5. Визначення вмісту загального протеїну в слізній рідині та лізатах рогівки.....	15
5.1. Колориметричний метод визначення протеїну в тесті з біцинхоніною кислотою (BCA).....	15
5.2. Спектрофотометричний метод.....	16
6. Гель-електрофорез (SDS-PAGE).....	17
7. Імуноблот-аналіз.....	22
7.1. Протокол проведення.....	23
7.2. Кількісне оброблення даних.....	27
Узагальнення.....	28
Перелік рекомендованої літератури.....	29

Перелік умовних скорочень

AA – акриламід;

б-AA – біс-акриламід;

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;

ДАБ – діамінобензидин;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ПСА – персульфат амонію;

РР – робочий розчин;

ТХО – трихлороцтова кислота;

ACE2 – ангіотенсинперетворювальний ензим 2;

ARVO – Association for Research in Vision and Ophthalmology;

BCA – біцинхонінова кислота;

BSA – бичачий сироватковий альбумін;

ECL – підсилена хемілюмінісценція;

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота;

GFAP – гліальний фібрилярний кислий протеїн;

HIF-1 α – індукований гіпоксією фактор 1 α ;

IL – інтерлейкіни;

Lf – лактоферин;

MMP – матриксні металопротеїнази;

NF – нейрофіламенти;

РАAG – поліакриламідний гель;

PBS – забуферений фізіологічний розчин;

PBST – забуферений фізіологічний розчин, що містить Triton X-100;

PVDF – полівініліденфлуорид;

RIPA – буфер для радіоімунопреципітації;

SDS-PAGE – електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію;

TNF α – фактор некрозу пухлин α ;

VEGF – фактор росту ендотелію судин.

Вступ.

Сучасний розвиток біохімії та біомедицини розкриває нові можливості для розуміння молекулярних основ хвороб ока, що є абсолютно необхідною умовою для розробки новітніх стратегій діагностики та лікування різних офтальмологічних захворювань. За даними ВООЗ у всьому світі кількість пацієнтів з очними хворобами, пов'язаними з травмами рогівки, щорічно збільшується на 1,4 млн. з наявною тенденцією до зростання. Ушкодження рогівки є четвертою за розповсюдженням причиною сліпоти після катаракти, глаукоми та вікової макулярної дегенерації. Через активний перебіг бойових дій в Україні особливо гостро стоїть проблема діагностики та лікування поранень ока та їхніх ускладнень, оскільки значний процент від усіх видів бойових травм складають пошкодження очного яблука та проникні поранення рогівки.

Усі процеси, що призводять до дистрофії та деформації рогівки, супроводжуються змінами на молекулярно-біохімічному рівні в пошкодженій тканині, які включають кількісні та якісні зміни її протеому. Більшість патологічних станів рогівки, пов'язаних з її травматизацією та ерозією, асоційовано з гіпоксичними явищами та індукцією неоваскуляризації, що значно погіршує якість зору й у випадку неконтрольованого розвитку може призвести до його втрати. Попри свій невеликий розмір рогівки, у цій структурі синтезується широкий спектр різних структурних і регуляторних протеїнів, які можна використовувати як маркери функціонального стану рогівки та застосовувати їхній аналіз для оцінювання ефективності терапевтичних засобів в ході тестування нових препаратів на лабораторних тваринах. Для вивчення протеїнового складу рогівки може бути запропонований метод імуноблотингу (Вестерн блот), який є різновидом твердофазного імуноензимного аналізу. Переваги імуноблоту полягають у можливості специфічної детекції певного протеїну в багатокомпонентному зразку, а також проведення напівкількісного аналізу і визначення гетерогенності поліпептидного спектру досліджуваного протеїну. На сьогоднішній день значна увага приділяється дослідженню складу протеїнів слізної рідини за ушкодження ока та інших офтальмологічних хвороб. Оскільки в слюзі міститься більше, ніж 3 тисяч різних протеїнів, а процедура її відбору в пацієнтів є неінвазивною, то ця біологічна рідина є привабливим і інформативним об'єктом для діагностики різних патологічних станів ока.

Матеріал, викладений у методичних рекомендаціях, призначений для студентів, аспірантів та науковців у галузі медичної біохімії, молекулярної біології, офтальмології та лабораторної діагностики.

1. Будова, біохімічні особливості та функції рогівки.

Рогівка – це оптично прозора вигнута структура ока, яка покриває райдужну оболонку, зіницю і передню очну камеру. Рогівка виконує бар'єрну функцію, захищаючи око від механічних і хімічних пошкоджень та мікроорганізмів, а також пропускає і заломлює промені світла. За сучасними даними, рогівка людини та приматів складається з п'яти шарів (рис. 1).

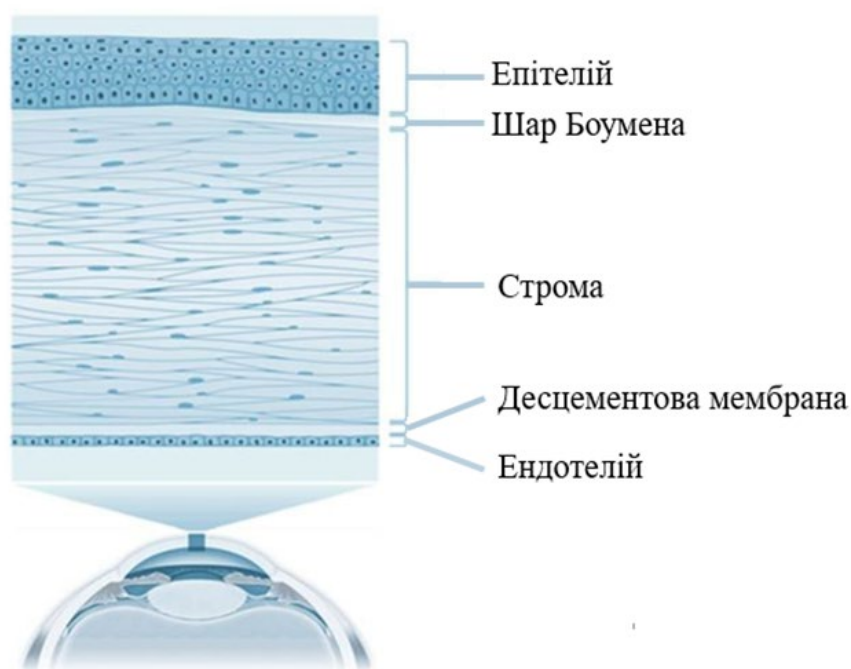


Рис. 1. Будова рогівки ока людини (за *Al-Fahdawi, 2015*).

Морфологічно розрізняють наступні шари, починаючи від зовнішнього до внутрішнього:

1. *Епітелійний шар*, який складається з 5-6 шарів клітин. Клітини в базальному шарі здатні ділитися і поступово мігрувати до поверхні епітелія. Клітини, що відмирають, відшаровуються з поверхні ока і змиваються слюзою. Це є шар клітин, що постійно регенерують, і разом зі слізною плівкою він є важливим компонентом, який забезпечує заломлення світла, а отже й гостроти зору.

2. *Боуменова мембрана (шар Боумена)* – не є мембранною структурою в прямому розумінні, а утворює перехідний неклітинний шар між базальним і шаром строми і представляє собою скупчення колагенових фібрил і протеогліканів. У боуменовій мембрані відсутні клітини, можливі лише

одиночні випадки міграції кератоцитів зі строми. При пошкодженні вона відновлюється лише шляхом утворення рубця, оскільки не має здатності регенерувати.

3. *Строма* є основною частиною структурного каркасу рогівки і становить приблизно 80%–85% від її товщини. Для цього шару характерна прозорість, що є результатом точної організації стромальних волокон та позаклітинного матриксу, який формується переважно з колагену типу I, який продукують кератиноцити. Строма є волокнистою, механічно жорсткою й абсолютно прозорою структурою. *Предесцементовий шар, або шар Дюа* – нещодавно виділено як окрему структуру. Шар Дюа складається з п'яти-восьми компактних тонких пластинок колагену типу I, містить значну кількість колагену типу VI, кератоцити відсутні або зустрічаються у дуже невеликій кількості.

4. *Десцетова мембрана* – базальна мембрана ендотелію. Представляє собою еластичну структуру, що має товщину 7 мкм, з віком може потовщуватися до 10 мкм. Вона складається, головним чином, з колагену IV типу та ламініну. Ендотелійні клітини конститутивно продукують компоненти десцементової мембрани.

5. *Ендотелій* рогівки утворений тонким шаром (близько 5 мкм) метаболічно активних клітин гексагональної форми, багатих мітохондріями. У складі клітин цього шару функціонує ендотелійний насос, який регулює вміст води. Бічна мембрана містить велику кількість ділянок з Na^+K^+ -АТФазами. Базальна поверхня ендотелію містить численні гемідесмосоми, які забезпечують адгезію клітин до десцементової мембрани. Ендотелійний шар відокремлює рогівку від передньої частини очної камери і підтримує її гідратацію, що є важливим для її оптичної прозорості.

Оскільки рогівка є тонкою структурою, вразливої до впливу негативних чинників оточуючого середовища, травмування рогівки є частим явищем. Серед таких чинників слід зазначити в першу чергу механічні пошкодження (удари, проникні й непроникні травми,пил та інші абразивні матеріали), вірусне, бактерійне або грибкове інфікування, кератокон'юктивіт, алергічні чинники, наслідки хірургічних втручань (кератотомія, рефрактивна хірургія), термічні та хімічні опіки (ураження кислотами або лугами), гіпертонічна хвороба та підвищення внутрішньоочного тиску, ультрафіолет та інші типи випромінювання, неконтрольоване носіння контактних лінз, хронічне вживання етилового спирту та ін. Рогівка у нормі є ангиогенез-привілейованою структурою, що забезпечує її аваскулярність і максимальне світлопропускання. У посттравматичній рогівці спостерігаються зміни у

регулюванні молекулярних процесів функціонування тканини, що супроводжуються розвитком патологічного ангіогенезу – неоваскуляризації. Порушення балансу між про- та антиангіогенними факторами сприяє розвитку нових, розгалужених та ламких судин у тканині рогівки, що тісно пов'язано зі стійким запальним процесом, активним ремоделюванням тканин та фіброзом. Під час тяжких ушкоджень, травм та ерозії рогівки неоваскуляризація може мати значний негативний вплив на зір. За перебігу запальних процесів у рогівці, які розвиваються за гіпоксичного стану, епітелійні та ендотелійні клітини, макрофаги та деякі інші прозапальні клітини продукують низку проангіогенних цитокінів та факторів росту. Головним мітогеном для ендотеліальних клітин та індуктором ангіогенезу є фактор росту ендотелію судин (VEGF), синтез якого активує індукований гіпоксією фактор-1 α (HIF-1 α) – основний транскрипційний фактор, який регулює адаптивну відповідь на гіпоксію. Крім того, експресія матриксних металопротеїназ (ММР), відомих як проангіогенні та профібротичні ензими, які здійснюють деградацію позаклітинного матриксу, ремоделювання тканини і сприяють міграції клітин, також знаходиться під контролем HIF-1 α . У рогівці за нормального фізіологічного стану ММР відповідають за компактну організацію колагенових фібрил у стромі, що є важливим для підтримання оптичної прозорості рогівки та належної гідратації стромального шару. Однак, надекспресія/надактивація ММР у тканині рогівки може призводити до неконтрольованого руйнування просторової організації колагенової матриці стромі, що є одним з патогенетичних механізмів розвитку дистрофічних змін цієї структури ока (рис. 2).

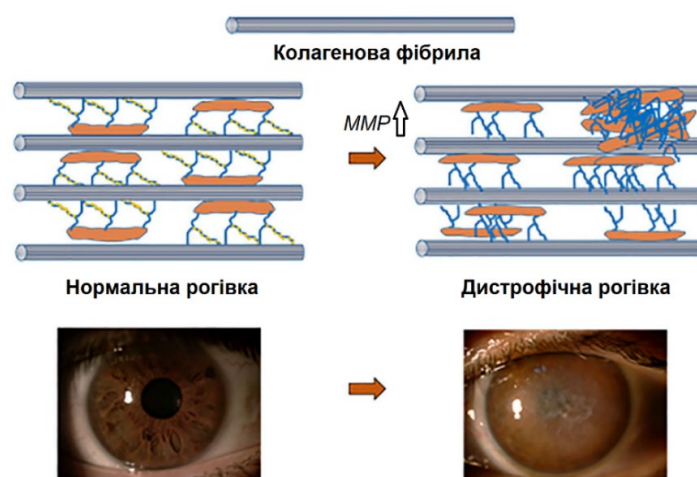


Рис. 2. Надактивація ММР призводить до руйнування зв'язків між колагеновими фібрилами, дезорганізації стромі та розвитку дистрофічних змін у рогівці (за *Kaya, 2021*).

Хронічне запалення, ангиогенез/неоваскуляризація та підсилене ремоделювання тканини рогівки є факторами, що негативно впливають на приживлення донорської рогівки при кератопластиці. Хірургічна практика показує, що хронічне запалення та неоваскуляризація є факторами, які можуть спровокувати відторгнення трансплантату після проведення операції кератопластики. Таким чином, визначення регуляторних протеїнів, які контролюють процеси за розвитку гіпоксії та запалення у пошкодженій рогівці, зокрема, HIF-1 α , VEGF і MMP, можна використовувати у діагностично-прогностичних цілях для потреб клінічної офтальмології. Крім того, ушкодження та метаболічні порушення часто призводять до розладу метаболічних процесів у тканині рогівки, серед яких чільне місце займає активація стресу ендоплазматичного ретикулуму і автофагії, що призводить до помутніння рогівки, фіброзу та утворення рубців. Оцінювання інтенсивності перебігу цих процесів доцільно проводити за допомогою імунохімічної детекції відповідних біомаркерів стресу ендоплазматичного ретикулуму (IRE-1, GRP-78, ATF6, PERK та ін.) та автофагії (LC3, beclin-1, ATG5 тощо).

Запальні процеси в кон'юнктивальній тканині супроводжуються надекспресією певних рецепторних протеїнів, які зумовлюють її тропність до вірусу SARS-CoV-2, вірусу Зіка, вірусу простого герпесу першого типу (HSV-1) та деяких інших вірусів, що робить око шляхом проникнення вірусної інфекції до організму. За розвитку запалення в епітелійних клітинах рогівки відбувається підвищення експресії молекул ACE2 – рецептору вірусу SARS-CoV-2. Показано, що експресія ACE2 в епітелійних клітинах рогівки регулюється TNF α або IL-1 β , а також посилюється за умов запалення тканин рогівки внаслідок травматизації, зокрема, за умов лужного опіку рогівки. Оскільки спайковий протеїн SARS-CoV-2 має високу спорідненість зв'язування з ACE2, індукована запаленням надекспресія цього протеїну робить рогівку потенційним шляхом проникнення вірусу до організму. Хоча зв'язок між рівнями експресії ACE2 в епітелії рогівки та інфікуванням SARS-CoV-2 все ще недостатньо вивчений, можна припустити, що зниження експресії ACE2 у пошкодженій рогівці може бути захисним механізмом, спрямованим на попередження вірусної інвазії через поверхню ока.

Рогівка є однією з найбільш щільно іннервованих структур організму (у 300-600 разів більше, ніж шкіра людини, містить близько 600 нервових терміналей на 1 мм²). Іннервація рогівки забезпечується офтальмічною гілкою трійчастого нерву. Зокрема, рогівка містить механорецептори, тому дотик до неї спричиняє безумовний рефлекс, який проявляється кліпанням. Механічні

або метаболічні впливи на передню камеру ока призводять до пошкодження нервових закінчень рогівки, чому сприяє поверхнєве розташування периферійних нервових волокон. За умов дії нейродегенеративних чинників різної природи у рогівці спостерігається порушення репаративних процесів (загоєння ран), зниження захисних властивостей та слъзовиділення, а також втрата чутливості тканини. Нейрональні порушення поверхні ока можуть викликати або посилити сухість ока, а тривала сухість у свою чергу може спричинити зміни в структурі та функції поверхневих нервових закінчень органу зору. Крім того, за пошкодження тканини рогівки зазнають впливу й клітини-супутники нейронів, які відповідають за трофічну та захисну функції щодо периферійних нервових волокон. Сателітні клітини гліального походження можуть набувати реактивного фенотипу за пошкодження, що може призводити до негативних змін, серед яких спостерігається надмірне продукування прозапальних цитокінів та активних форм кисню та азоту. Отже, актуальною є проблема визначення нейроспецифічних протеїнів як маркерів функціонального стану нейронів та клітин сателітної глії рогівки. Порушення функціонування нервів рогівки головним чином проявляється у гострому пошкодженні аксонів, що знижує пороговий потенціал іонних каналів у нервових закінченнях рогівки через вивільнення медіаторів запалення, таких як речовина P, TNF- α та IL-1 β . Під час регенерації пошкоджені нерви можуть утворювати нервові пучки та мікроневроми, що також може викликати спонтанний біль, печіння та світлобоязнь. У сателітних гліальних клітинах за умов активації підсилюється синтез нейроспецифічного протеїну GFAP, який є головним компонентом проміжних філаментів цитоскелету гліальних клітин і може слугувати біомаркером гліальної відповіді на патологічні зміни, за аналогією з тканиною центральної нервової системи. Релевантність використання GFAP як маркеру стану сателітної глії ілюструє приклад його визначення за гострої вірусної інфекції HSV-1. Встановлено, що у рогівці його рівень знижується на початкових етапах інфекційного процесу, підвищуючись на пізніх стадіях, що свідчить про те, що GFAP може відігравати важливу роль під час зараження HSV-1 у рогівці, а також бути маркером перебігу вірусного захворювання. Крім того, раніше було показано, що за цукрового діабету та хронічної гіперглікемії спостерігається дегенерація нервових закінчень рогівки. Внаслідок цього сповільнюються ранозагоювальні процеси епітеліальної тканини та знижується чутливість рогівки. Інгібування ензиму PARP-1 за гіперглікемії покращує стан інервації передньої камери ока та

запобігає надпродукуванню VEGF у рогівці внаслідок розвитку ускладнень цукрового діабету, що супроводжується гіпоксичним станом.

2. Протеомний склад слізної рідини.

Поверхня ока вкрита тонким шаром рідини, або слізною плівкою, яка забезпечує аваскулярну за нормальних умов рогівку ока поживними речовинами, сприяє поглинанню кисню, зволожує та відіграє важливу роль у заломленні світла в оці, а також здійснює антибактерійний та противірусний захист. Найближче до поверхні ока знаходиться гідрофільний глікокалікс, який складається з асоційованих із клітинами муцинів і галектинів, що продукуються епітелійними клітинами рогівки та кон'юнктиви. Слизово-водний шар містить рідину, протеїни та електроліти, що секретуються слізними залозами, а також розчинні муцини. Різноманітний склад цієї біологічної рідини має критичне значення для її надзвичайно важливої ролі в підтриманні гомеостазу поверхні ока. Слізна рідина, яка омиває рогівку і кон'юнктиву, є складною сумішшю протеїнів, ліпідів і різноманітних за своєю структурою та функціональними властивостями метаболітів. За допомогою протеомного аналізу сльози здорових людей було встановлено наявність більше ніж 3000 різних протеїнів. Наявність такого широкого спектру протеїнів у слізній рідині пояснюється широким колом клітин, які їх продукують: клітини слізної залози, рогівки та інших структур ока, нейрональні клітини, у тому числі транспорт через зоровий нерв, ексудат плазми крові. Саме тому слізна рідина дедалі частіше використовується в діагностичних цілях для виявлення метаболічних розладів, нейродегенеративних станів та моніторингу репаративних процесів за ушкодження ока. Таке широке застосування сльози є можливим завдяки її доступності насиченню різноманітними біомаркерами, що за кількістю переважають навіть плазму крові. Отримання слізної рідини є малоінвазійним процесом, що ідеально підходить для діагностики системних захворювань. Крім того, на сьогоднішній день слізну рідину можна вважати інформативним джерелом маркерів тромбозу, гіпоксії та ангіогенезу в пошкодженій тканині ока, оскільки ці процеси часто розвиваються за умов травматизації й відображають ступінь пошкодження очної поверхні.

Серед великої кількості протеїнів слізної рідини провідну роль у репаративних процесах відіграє лактоферин (Lf). Lf є поліфункціональним протеїном сімейства трансферинів. Він є найбільш масовим протеїном слізної рідини (концентрація Lf, у середньому, складає 0,63–2,9 мг/мл, що становить

25% від загальної кількості протеїнів сльози). Lf відіграє важливу роль у підтриманні функціонального стану ока. Цей протеїн володіє антимікробною активністю, модулює функціонування імунної системи, бере участь у диференціації нейронів, проявляє антиоксидантні та протизапальні властивості та чинить ранозагоювальну дію. Концентрація Lf у сльозі може знижуватися за різних патологічних станів ока, зокрема за прогресії запальних процесів за травматизації передньої камери ока. Тому визначення рівня Lf у слізній рідині за допомогою імунохімічних методів може скласти основу діагностикумів для моніторингу стану поверхні ока.

Нервова система рогівки складна і розгалужена, тому завдяки детекції протеїнів рогівки можна виявити велику кількість нервових і системних розладів організму загалом. Останніми роками розробка неінвазивних, швидких і широкодоступних методів детекції з високою роздільною здатністю та кількісного вимірювання маркерів різних патологічних станів, створила нову область офтальмології та діагностики різних нейродегенеративних станів. На сьогоднішній день у США, наприклад, розроблено неінвазійні тести по визначенню маркерів нейродегенерації та маркерів хвороби Альцгеймера та хвороби Паркінсона у слізній рідині. Дедалі більшого розповсюдження набувають діагностичні підходи по визначенню у слізній рідині таких нейроспецифічних протеїнів, як GFAP, NF, S-100, τ -протеїнів тощо як чутливих і специфічних біомаркерів патологічних станів ЦНС.

3. Експериментальний та клінічний матеріал для дослідження.

Дослідження проводять з використанням свіжої рогівки, яку отримують з лабораторних тварин. Як клінічний матеріал використовують слізу рідину пацієнтів. При проведенні експериментів з лабораторними тваринами, усіх процедур на стадії пробопідготовки та реалізації експериментальних методик слід дотримуватися правил техніки безпеки та керуватися локальними та міжнародними стандартами та директивами з біоетики. Роботи з використанням матеріалу людини мають відповідати положенням останньої редакції Гельсінської декларації й бути ухваленими етичним комітетом установи або Національною комісією з біоетики. При проведенні експериментів з лабораторними тваринами необхідно дотримуватися рекомендацій комітету з біоетики відповідно до національних і міжнародних стандартів з утримання та використання тварин. Протокол експерименту має бути затверджений локальним комітетом з біоетики і

відповідати міжнародним стандартам. Поінформована згода повинна бути отримана від кожного пацієнта або добровольця, який надає свій біологічний матеріал для наукових цілей. У дослідях з використанням лабораторних тварин керуються настановами з біоетики міжнародного комітету ARVO щодо проведення експериментів в офтальмології (<https://www.arvo.org>).

3.1. Рогівка лабораторних тварин.

Рогівку ізолюють з очного яблука тварин, яким перед операцією вводять внутрішньом'язево летальну дозу препарату-анестетику. Рогівку очищають від залишків сполучної тканини, заморожують у рідкому азоті та проводять пробопідготовку (або зберігають за температури -80°C до аналізу).

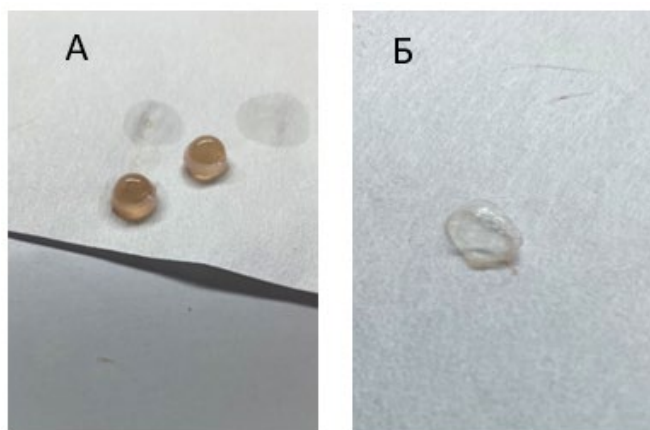


Рис. 3. Отримання рогівки щура: А – енуклеація очного яблука, Б – ізольована рогівка.

3.2. Слізна рідина пацієнтів.

Зразки сльози обережно збирають з кута ока за допомогою стерильного пластикового наконечника, прикріпленого до автоматичної піпетки. Зібрану слізну рідину центрифугують у настільній центрифугі Епендорф протягом 15 хв. за 3 тис. g / хв. при 4°C для видалення залишків полімерного фібрину та клітин, які можуть бути присутніми у зразках, взятих у пацієнтів з травмами ока. Супернатант переносять до пластикових пробірок Епендорф та зберігають за -80°C до аналізу.

4. Гомогенізація тканини рогівки та екстракція протеїнів.

Обидві рогівки, взяті від кожної тварини, зважують і ретельно розтирають у порцеляновій ступці з рідким азотом, додаючи порціями буфер

для лізису тканин та екстракції протеїнів (RIPA-буфер), що має наступний склад: 50 mM tris-HCl (pH 7,6), 0,15 M NaCl, 0,1% (m/v) SDS, 0,5% (m/v) дезоксихалат натрію, 1% (v/v) Triton X-100 і 0,03% (m/v) азид натрію, та додатково містить інгібітори протеаз та фосфатаз у кількості, рекомендованої виробником, і 1 mM EDTA. Співвідношення тканина:буфер (m/v) становить 1:5. Після гомогенізації зразки переносять до пластиковий пробірок і додатково обробляють ультразвуком для остаточної дезинтеграції тканин. Пробірки з гомогенатами ставлять на лід для екстракції протеїнів і через 3 год. повторюють процедуру ультразвукової обробки. Після цього зразки центрифугують у заздалегідь охолодженій до 4 °C центрифугі за 16 тис. g протягом 60 хв. Після центрифугування супернатанти переносять до нових пробірок Епандорф.

5. Визначення вмісту загального протеїну в слізній рідині та лізатах рогівки.

Вимірювання вмісту загального протеїну в зразках слізної рідини та лізатах рогівки необхідно для нанесення однакової кількості зразку на пластину геля при проведенні електрофорезу. Існує ціла низка колориметричних та спектрофотометричних методів кількісного визначення протеїнів у біологічних зразках.

5.1. Колориметричний метод визначення протеїну в тесті з біцинхоніною кислотою (BCA).

Метод заснований на відновленні іонів міді Cu^{2+} до іонів міді Cu^{+} при взаємодії із залишками цистеїну, цистину, триптофану, тирозину, пептидним зв'язком протеїну та утворення забарвленого комплексу Cu^{+} з біцинхоніною кислотою (2,2'-біхінолін-4,4'-дикарбонова кислота). Зміна кольору розчину зразка із зеленого на фіолетовий пропорційна концентрації протеїну, яку кількісно можна виміряти за допомогою колориметричних методів. Визначенню заважають відновлюючі речовини: цукри, аскорбінова кислота, тіолові сполуки, EDTA. Вплив речовин, що заважають вимірюванню, може бути мінімізований шляхом розведення, що забезпечує концентрацію протеїну на рівні, достатньому для проведення точних вимірювань. Оскільки інтенсивність забарвлення комплексу, що утворюється, залежить від природи протеїну, амінокислотний склад протеїнів робить внесок до результатів вимірювання.

Матеріали та реагенти:

1. BSA.
2. Комерційна тест-система BCA.

3. Робочий розчин (PP) BSA.

Обладнання:

1. Автоматичні піпетки (дозатори).
2. Спектрофотометр або мікропланшетний рідер.

Процедура вимірювання (макрометод).

А. Приготування стандартних розчини BSA. Приготувати 10 мл вихідного розчину BSA (2 мг/мл): 20 мг BSA розчиняють у 10 мл H_2O , а потім роблять серійні (5-8) розведень з діапазоном 20-2000 мкг/мл.

Б. Приготування робочого розчину (PP) BSA. Перед цим необхідно розрахувати загальний необхідний обсяг PP. Підготувати PP шляхом змішування 50 частин реагенту BSA А з 1 частиною реагенту BSA В (50:1, реагент А:В) (суміш має вигляд прозорого зеленого розчину).

В. Додають до 0,1 мл кожного стандартного розчину, досліджуваного розчину і контрольного розчину 2,0 мл реактиву PP мідно-біцинохінової кислоти та ретельно струшують. Розчини витримують при температурі 37 °С протягом 30 хв., потім охолоджують суміш до кімнатної температури протягом 10 хв. Оптичну густину стандартних розчинів і досліджуваного розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 562 нм у кварцевих кюветах, використовуючи контрольний розчин у якості розчину порівняння.

Мікрометод. Для вимірювання в мікропланшеті необхідно 200 мкл PP. Співвідношення об'ємів зразку до PP становить 1:8 або 1:20 (якщо об'єм досліджуваного зразка обмежений). Внести 25 або 10 мкл кожного стандарту розчину або досліджуваного зразка до лунки мікропланшета. До контрольних зразків необхідно додати відповідний об'єм буферного розчину (у випадку зразка) або води для стандартних розчинів BSA при побудові калібрувальної кривої. Додати 200 мкл PP до кожної лунки. Планшет накрити кришкою та інкубувати при 37 °С протягом 30 хв. Перед вимірюванням витримати планшет при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Виміряти поглинання при 562 нм на мікропланшетному рідері.

Залежність оптичної густини від концентрації протеїну має нелінійний характер, тим не менше, якщо інтервал концентрацій, що використовується для побудови калібрувального графіка невеликий, то вона наближається до лінійної. Будують залежність оптичної густини стандартних розчинів від концентрації протеїну та використовують лінійну регресію для побудови калібрувальної кривої. Використовуючи калібрувальну криву та величину

оптичної густини досліджуваного розчину, визначають концентрацію загального протеїну.

5.2. Спектрофотометричний метод.

Метод заснований на властивості ароматичних амінокислот (тирозин, триптофан і, в меншому ступені, фенілаланін), що входять до послідовності молекул протеїну, поглинати ультрафіолетове світло при довжині хвилі близько 280 нм. Зазвичай у складі біологічних зразків крім протеїнів знаходяться також молекули нуклеїнових кислот і нуклеотидів, присутність яких враховують, вимірюючи паралельно поглинання при довжині хвилі 260 нм. Для усунення впливу інтерферуючих речовин на результати аналізу слід використовувати як розчин порівняння замість води відповідний буферний розчин, (наприклад, RIPA-буфер). Точність визначення вмісту протеїну в ультрафіолетовому діапазоні знижується, якщо протеїни в розчині знаходяться у вигляді частинок, порівнянних за розміром з довжиною хвилі світла, що використовується для вимірювання (250–350 нм). Розсіювання світлового потоку призводить до збільшення оптичної густини досліджуваного розчину. При розрахунку оптичної густини досліджуваного розчину при довжині хвилі 280 нм, обумовленої розсіюванням світла, визначення проводять при довжині хвилі 320–350 нм, враховуючи цю величину в кінцевих розрахунках.

Процедура вимірювання.

У залежності від природи зразка, готується 20-100 разове розведення досліджуваного розчину (зразок лізату рогівки, слізна рідина) у воді. Наприклад, для приготування 100-разового розведення сльози 10 мкл біологічної рідини вносять до 900 мкл вони та обережно перемішують. Як контроль вимірювання беруть відповідний об'єм RIPA-буфера (для лізатів рогівки) або фізіологічного розчину (для слізної рідини). Вимірювання поглинання зразка проводять у кварцевих кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см на спектрофотометрі при довжині хвилі 260, 280 і 320 нм проти контрольного розчину. Результати вимірювання концентрації протеїну розраховують за заздалегідь побудованій калібрувальній кривій, або використовуючи емпіричні формули, зокрема, формулу Калькара:

$$C_x = (1,45 \times D_{280} - 0,74 \times D_{260}) - D_{320},$$

C_x – концентрація протеїну, мг/мл;

D_{280} , D_{260} , D_{320} – величини оптичної густини при відповідній довжині хвилі.

6. Гель-електрофорез (SDS-PAGE).

Електрофорез – це метод розділення протеїнів та інших заряджених часток, заснований на їх русі у постійному електричному полі. Зазвичай електрофорез проводять не в розчині, а в гелі, зокрема, ПААГ. В електричному полі молекули протеїнів рухаються або до аноду, або до катоду в залежності від їхнього поверхневого заряду. Швидкість руху молекул визначатиметься величиною заряду та характером середовища, в якому відбувається розділення молекул. У гелі на швидкість руху протеїнів впливає механічний опір: що більше розмір молекули, тим повільніше вона рухається. Розподілення протеїнів у ПААГ відбувається за рахунок відмінностей заряду молекул і відмінностей значень молекулярної маси, а також від конфігурації молекул. Розрізняють неденатуруючий, або нативний, ПААГ-електрофорез, при якому біологічні макромолекули, що розділяються, у процесі електрофорезу залишаються в нативному стані, і денатуруючий ПААГ-електрофорез, при якому проби попередньо денатують. При проведенні SDS-PAGE зразки прогрівають у буферному розчині, що містить сильний іонний детергент (SDS) і відновлювальний агент (зазвичай, 2-меркаптоетанол або дитіотреїтол), який порушує третинну та четвертинну структуру протеїну за рахунок порушення внутрішньомолекулярних або міжмолекулярних дисульфідних містків. Таким чином, при електрофорезі протеїнів у нативному (неденатуруючому) гелі характер розділення молекул залежить від двох факторів: заряду та розміру молекул. При електрофорезі в гелі, що містить аніонний детергент (SDS), який денатурує протеїни та надає їхнім молекулам однаковий питомий негативний заряд, рухливість протеїнів залежить від їхньої молекулярної маси, а не від заряду. Денатуровані поліпептиди мігрують в електричному полі через ПААГ від катода до анода, при цьому менші за розміром протеїни рухаються швидше і, таким чином, розділяються відповідно до молекулярної маси. Концентрація АА визначає роздільну здатність гелю: чим вище концентрація АА, тим краще роздільна здатність низькомолекулярних протеїнів. Низька концентрація АА покращує роздільну здатність для високомолекулярних протеїнів. При електрофорезі в 10% ПААГ, що містить 0,1% SDS (SDS-PAGE), для протеїнів з молекулярною масою 10–70 кДа існує лінійна залежність між логарифмом молекулярної маси та електричною рухливістю протеїнів. SDS-PAGE широко використовується для визначення молекулярної маси протеїнів та попереднього розділення протеїнів, що передують їхньому аналізу методом імуноблота. Перевагами ПААГ перед гелями іншої природи є їхня прозорість, можливість широко варіювати розміром пор гелю, механічна міцність, хімічна інертність по відношенню до речовин, що аналізуються. У разі електрофорезу протеїнів у ПААГ зазвичай використовують різні

модифікації методу Леммлі. Система, що використовується в цьому протоколі, з двома гелями різного складу дозволяє отримати більш високу роздільну здатність протеїнів різної молекулярної маси за рахунок створення градієнта рН на межі між гелями для концентрування та розділення. Чутливість методу SDS-PAGE по Леммлі обернено пропорційна молекулярній масі протеїну. Наприклад, в інтервалі 10-20 кДа вдається розділити поліпептиди, що відрізняються всього на 0,1 кДа (різниця всього в один амінокислотний залишок). Важливою умовою надійності визначення молекулярної маси є оптимальне навантаження протеїну на гель. При забарвленні Coomassie Blue R250 оптимальне вміст протеїну в плямі має знаходитися в межах 0,1-1 мкг. В іншому випадку протеїни в гелі сформують широкі плями, що ускладнить визначення їхньої електрофоретичної рухливості.

Процедура проведення.

1. *Підготовка проб.* Зразки слізної рідини або лізатів рогівки, в яких було попередньо визначено концентрацію загального протеїну, змішують з буфером для нанесення (буфер Леммлі), що має наступний склад: 62,5 мМ Tris-HCl (рН 6,8), 0,1% (*m/v*) SDS, 10% (*v/v*) 2-меркаптоетанол, 10% (*v/v*) гліцерол 0,001% (*m/v*) бромфеноловий синій («свідок»). У залежності від концентрації протеїну в зразках, співвідношення об'ємів, в якому змішують їх з буфером Леммлі може становити від 2:1 до 1:5 (зразок:буфер). Після змішування біологічної проби з буфером для нанесення її ретельно перемішують за допомогою вортекса, прогрівають 5 хв. на хітері або водяній бані при 95 °С для сольобілізації та відновлення протеїнів, і знов перемішують. Після охолодження до кімнатної температури зразок готовий до нанесення на пластину ПААГ. Зразки у суміші з буфером Леммлі можна зберігати тривалий час за – 20 ... – 80 °С, прогріваючи кожний раз перед аналізом.

2. *Приготування гелей.* Для проведення SDS-PAGE використовують камери для вертикального гель-електрофорезу різних виробників, зокрема, BioRad (США) (рис. 4).

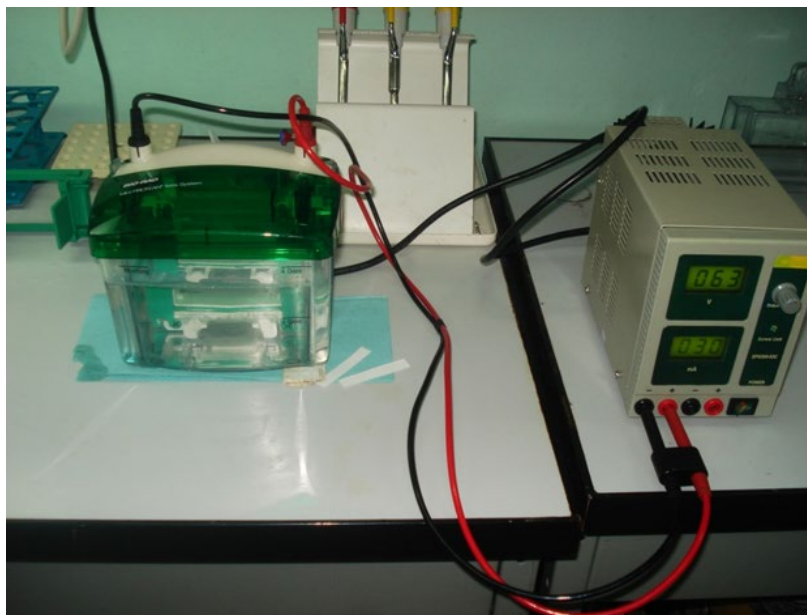


Рис. 4. Камера для проведення гел-електрофорезу протеїнів та джерело живлення у роботі.

Знежирити поверхню скелець етиловим спиртом. Зібрати «сендвіч» зі звичайної скляної пластини та скельця зі спейсерами, закріпити конструкцію вертикально у спеціальному зажимі. При правильній збірці має вийти герметична система із зазором між двома скельцями товщиною, яку визначає товщина спейсерів (1–2 мм). Далі готують суміш для формування геля для розділення (табл. 1).

Таблиця 1. Співвідношення компонентів для приготування геля для розділення (на 10 мл розчину мономерів).

Стокові розчини	Кінцева концентрація акриламід у гелі, %					
	5	6	7,5	10	12,5	15
30% AA/0,8% б-AA, мл	1,666	2,0	2,5	3,33	4,16	5,0
1 M Tris-HCl, pH 8,8, мл	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
10% SDS, мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Дистильована вода mQ, мл	4,384	4,05	3,55	2,72	1,89	1,05
10% ПСА, мл	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ТЕМЕД, мл	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008

Примітка: усього 10 мл, що достатньо для приготування двох гелів для електрофорезу в системі BioRad Mini-PROTEAN.

Каталізатор та ініціатор (ПСА і ТЕМЕД) додають останніми, після чого розчин ретельно, але обережно, перемішують, не допускаючи утворення пухирів. Приготовлену суміш негайно заливають у зазор між скельцями, закріпленими вертикально в зажимах у штативі. Заливати слід на 1,5–2 мм нижче за край скла, аби залишився простір для заливки геля для концентрування. На поверхню гелю наносять 50% розчин ізопропанолу або воду шаром не менше 5мм (полімеризація акриламід гальмується за присутності кисню) і залишити гелю для полімеризації не менше ніж на 15-20 хв. Після полімеризації й утворення гелю, спирт або воду зливають, ретельно

промивають поверхню гелю, видаляють залишки води фільтрувальним папером і готують суміш реактивів для формування геля для концентрування (табл. 2).

Таблиця 2. Співвідношення компонентів для приготування геля для концентрування (на 2 і 3 мл розчину мономерів).

Стокові розчини	Об'єм геля, мл	
	2	3
30% AA/0,8% б-AA, <i>мл</i>	0,33	0,5
1 M Tris-HCl, pH 6,8, <i>мл</i>	0,25	0,38
10% SDS, <i>мл</i>	0,02	0,03
Дистильована вода mQ, <i>мл</i>	1,4	2,1
10% ПСА, <i>мл</i>	0,02	0,03
ТЕМЕД, <i>мл</i>	0,004	0,005

Перед заливкою суміші компонентів гелю в зазор між скельцями необхідно вставити гребінку (не повністю) для формування геля для концентрування. Залити суміш мономерів, вставити повністю гребінець і залишити для полімеризації. Через 40-60 хв. гребінку витягають і промивають лунки шприцом.

3. *Проведення електрофорезу.* Після приготування системи гелей кармани геля для концентрування заповнюють катодним електродним буфером, що має наступний склад: 25 мМ трис-HCl (pH 8,3), 0,192 М гліцин та 0,1% (*m/v*) SDS. За допомогою автоматичної піпетки-дозатора або мікрошприця до лунок геля вносять попередньо термічно оброблені зразки. Об'єм зразків не повинен перевищувати 3/4 від об'єма лунки для запобігання перетікання зразків між сусідніми карманами. Зазвичай, на гель наносять зразки в об'ємі, що містить 25, 50 або 100 мкг протеїну. Як правило, одну з доріжок залишають для маркерів молекулярної маси (суміші протеїнів з відомими масами). Після цього катодну камеру із зібраними скельцями, що містять гелі з нанесеними пробами, переносять до анодної. Як анодний буфер використовують буферний розчин такого самого складу, що й електродний, без додавання SDS (одноразово використаний катодний буфер можна використовувати як анодний). Закривають кришку камери з електродами, які підключають до джерела живлення та вмикають струм. Протеїни в системі міні-гелей зазвичай концентрують при постійному струмі 14-18 мА (напруга 30-35 В). Після досягнення фронту бромфенолового синього межі між гелями струм збільшують до 28-32 мА при напрузі 85-110 В до досягнення «свідком» нижньої межі гелю для розділення (нижче за барвник, що рухається фронтом, протеїнів немає). Струм вимикають, електродні буфери зливають, розбирають «сендвіч» та обережно виймають гель.

4. *Маніпуляції з гелями.* У залежності від мети проведення електрофорезу гель або забарвлюють для візуалізації протеїнів, що розділилися у ньому, або використовують для переносу на мембрану з подальшим проведенням імуноблот-аналізу. У першому випадку протеїни, що розділилися у гелі, фіксують, занурюючи гель до водного 5% розчину ТХО на 60 хв. при обережному похитуванні. Далі для візуалізації поліпептидних зон після проведення електрофорезу гель забарвлюють у розчині барвника, що має наступний склад: 1,5% (*m/v*) Coomassі R-250 (або його аналог, наприклад барвник Blau-R), 25% (*v/v*) етанол, 10% оцтова кислота. Для додаткової фіксації протеїнів до барвника рекомендовано додавати формальдегід (5%). Знебарвлення геля проводять у тому ж розчині кислотного-спиртового розчину, що не містить барвника. Далі гель поміщають між двома целофановими плівками і сканують для отримання цифрового зображення (рис. 5).

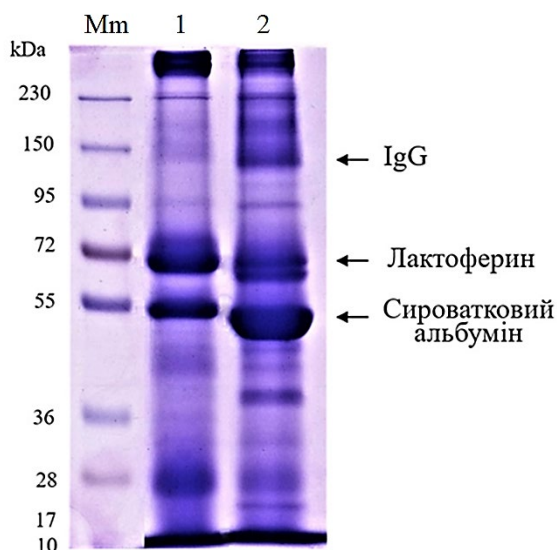


Рис. 5. SDS-PAGE протеїнів слізної рідини пацієнтів 1 і 2 (Mm – маркери молекулярної маси). Результати власних досліджень.

Молекулярну масу протеїнів у гелі визначають, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням забарвлених протеїнів-маркерів з відомою молекулярною масою (наприклад, Pre-stained Page Ruler, 10-230 кДа).

Гелі, що підлягають подальшому використанню в імуноблот-аналізі, після завершення електрофорезу витримують 10-15 хв. у трансфер-буфері для вестерн-блоту.

7. Імуноблот-аналіз.

Імуноблот (*англ.* western blot) є різновидом твердофазного імуноензимного аналізу, який застосовується для специфічного визначення протеїнів у лізатах клітин та тканин або іншому біологічному матеріалі,

попередньо розділених за допомогою гель-електрофорезу та перенесених на мембрану («промокання», від. *англ.* blotting). Для трансферу протеїнів з гелю в електричному полі найчастіше використовують PVDF або нітроцелюлозну мембрану з наступною інкубацією з певними антитілами та візуалізацією імунореактивних поліпептидних зон з використанням хромогенного субстрату або методу ECL. На сьогоднішній день на ринку існує багато комерційних компаній, що спеціалізуються на виробництві антитіл (як моноклональних, так і поліклональних) до десятків тисяч різних протеїнів. Висока чутливість імуноблоту дозволяє виявляти малі кількості протеїнів, що робить його незамінним для аналізу протеїнів з низькою експресією та виявлення тонких змін у рівні їхньої експресії. Специфічність методу, що досягається за рахунок комбінації гель-електрофорезу та подальшого використання специфічних взаємодій антиген-антитіло, забезпечує селективне виявлення цільових протеїнів навіть у складних сумішах, таких як лізати тканин, зокрема, рогівки, та слізної рідини. Завдяки універсальності вестерн-блоту, його можна застосовувати для аналізу експресії протеїнів, міжпротеїнових взаємодій і посттрансляційних модифікацій. Крім того, він надає напівкількісні або кількісні дані про рівні протеїнів у тканині або іншому біологічному матеріалі. Ще однією перевагою є можливість зберігання та повторного використання вестерн-блотів для подальшого аналізу чи підтвердження результатів та зручність документування блотограм. Найбільш розповсюдженим протоколом проведення імуноблотингу є методика, розроблена Towbin та ін.

7.1. Протокол проведення.

1. Перенос протеїнів (електроблот). Щоб зробити протеїни лізатів рогівки або слізної рідини, що були попередньо розділені за допомогою SDS-PAGE, доступними для зв'язування з антитілами та їхньої подальшої детекції, їх переносять на мембрану, виготовлену з нітроцелюлози або PVDF, в електричному полі. Як буфер для переносу (трансфер-буфер) використовують розчин наступного складу: 25 мМ tris-HCl (pH 8,3), 0,192 М гліцин, 20% (v/v) метанол (як електродний буфер для SDS-PAGE, так і трансфер-буфер, не потребують доведення рН, якщо вони готувалися з точно зважених наважок реактивів відповідної якості). Перед проведенням електроблоту вирізають мембрану, що за розмірами має відповідати периметру гелю. При цьому вирізану PVDF мембрану замочують у метанолі, а нітроцелюлозну мембрану – в трансфер-буфері на 20-30 хв. Для аналізу протеїнів з високою або середньою молекулярною масою використовують мембрани з діаметром пор 0,45 мкм, низькомолекулярних поліпептидів – 0,2 мкм. Мембрана накладається поверх гелю, а поверх та під неї кладуть стопку фільтрувального паперу на спеціальну паролонову губку, також попередньо

зволожених у буфері для переносу. При накладанні мембрани та формуванні «сендвічу» з фільтрувального паперу їх слід ретельно накатувати спеціальним роліком або скляною паличкою, щоб не допустити появи пухирів повітря між ними. Далі усю стопку зажимають у спеціальній касеті, поміщають до трансблотеру, заповненого буфером для переносу та підключають електричний струм (рис. 6). Напруга при переносі складає 35–45 В при силі струму 200–230 мА, тривалість переносу – 90–120 хв. (чим більше концентрація РAAG, тим більшою має бути напруга та час переносу). Протеїни переміщуються з гелю на мембрану із збереженням свого розташування після розділення за розмірами в ході SDS-PAGE. Внаслідок переносу протеїни утримуються у тонкому поверхневому шарі мембрани через її властивості неспецифічно зв'язувати протеїни. Після завершення переносу прилад вимикають, витягують касету, розбирають «сендвіч», мембрану промивають у PBST. Загальну ефективність перенесення протеїнів з гелю на мембрану можна перевірити фарбуванням мембрани кислим розчином барвника Ронсеау S, який має відносно високу чутливість, добре розчинний у воді та оборотно зв'язується з протеїнами, що спрощує подальше відмивання мембрани. Трансфер-буфер може бути використаний багаторазово, при кожному наступному аналізі до нього додають порцію свіжого буферу.

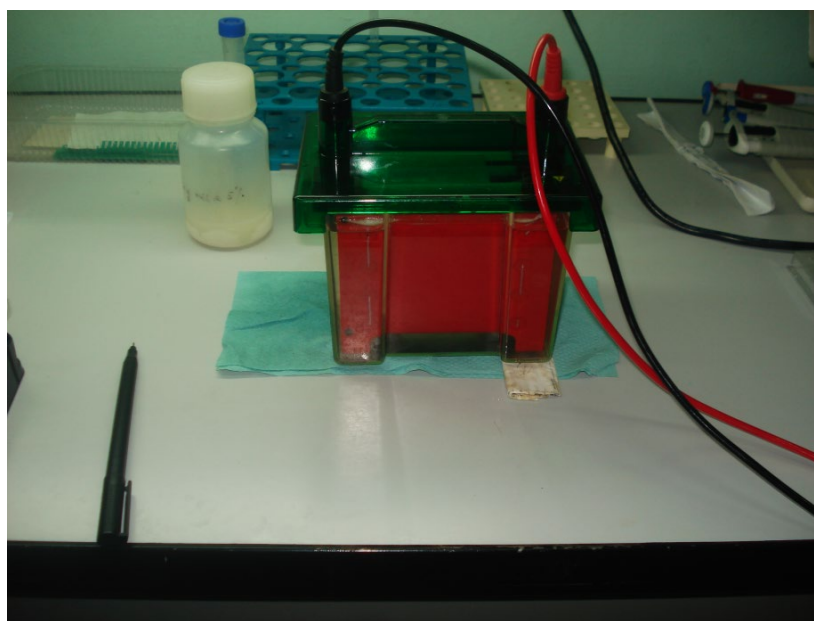


Рис. 6. Камера для проведення імуноблот-аналізу протеїнів у роботі.

2. Блокування мембрани. Нітроцелюлозна та PVDF-мембрани є сильними сорбентами протеїнів, тому перед їх інкубацією з антитілами проводиться процедура блокування – оброблення мембрани розчином імунологічно інертного протеїну, який зв'язується з вільними сайтами на

поверхні носія і попереджає (блокує) неспецифічну сорбцію антитіл. Для приготування блокувального розчину використовують знежирене молоко (skim milk) або BSA (3–5% розчини в PBST). Блокування рекомендовано проводити в термостаті при 37 °С протягом 60-90 хв. при легкому похитуванні. У разі недостатньо заблокованої мембрани після проявлення блотів можливо поява темно-забарвленого тла, яке погіршить контрастність імунореактивних зон та ускладнить їх аналіз внаслідок зменшення співвідношення «сигнал/шум».

3. Інкубація з антитілами. Після блокування мембрану інкубують з антитілами до цільового протеїну, використовуючи розчин антитіл у PBST (0,5–5 мкг/мл або розведених згідно з рекомендаціями виробника), що додатково містить 1–3% протеїнів знежиреного молока або BSA. Найкращий результат дає інкубація носія з первинними антитілами протягом 15–18 год. (залишають на ніч) при 4 °С. Після інкубації мембрану відмивають від антитіл, що сорбувалися неспецифічно, у 5-6 змінах PBST на шейкері. Після промивки мембрани інкубують протягом 90-120 хв. при 37 °С зі вторинними антивидовими антитілами, кон'югованими з ензиматичною міткою (пероксидаза хрому, лужна фосфатаза) або зв'язаними з біотином, які розводять у PBST згідно з рекомендаціями виробника (зазвичай діапазон розведення складає 1:3000–1:10000). Вторинні антитіла мають назву відповідно до їхніх цільових властивостей, а саме: “anti-rabbit”, “anti-mouse”, “anti-goat”, “anti-rat” та ін. Антитіла одержують з тваринного джерела на імуноглобулін G певного виду тварин – продуцентів первинних антитіл. Наприклад, антикролячі вторинні антитіла будуть зв'язуватися з первинними антитілами, отриманими з кролів, але не інших кролів. Антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, є найбільш поширеними вторинними антитілами. Ензиматична мітка в даному випадку сприяє взаємодії продуктів реакції з хемілюмінесцентним агентом, при цьому продукт реакції продукує люмінесцентне випромінювання, інтенсивність якого пропорційна кількості протеїну. Після інкубування мембрани зі вторинними антитілами її відмивають від неспецифічно сорбованих кон'югатів у 5-6 змінах PBST і проводять детекцію імунореактивних зон, здійснюючи кольорову реакцію або проявляючи блот за допомогою методу ECL. На сьогоднішній день на ринку є комерційно доступні первинні антитіла, вже зв'язані з ензиматичною міткою (наприклад, anti-actin HRP-conjugated antibodies), що дозволяє скоротити інкубування блотів до однієї стадії.

4. Проявлення блоту. Проявлення блотів методом ECL проводиться в темній кімнаті (фотолабораторії) за слабого червоного світла ліхтаря. Для розвинення хемілюмінесценції мембрану обробляють розчином наступного складу: 0,1 М трис-HCl (pH 8,5), 0,25 М розчин люмінолу в ДМСО, 0,9 мМ

розчин кумарової кислоти в ДМСО та 0,0035% H_2O_2 . Залишки розчину видаляють промакуванням, мембрану покривають прозорою плівкою та накривають листом світлочутливої плівки. Принцип засвічування є аналогічним авторадіографії: фоточутливий шар плівки засвічується квантами хемілюмінісценції у місці зв'язування антитіл з цільовими протеїнами (рис. 7). Час експозиції залежить від інтенсивності сигналу хемілюмінісценції й може тривати від 1 с. до 15 хв. (у випадку детекції мінорних протеїнів системи клітинного сигналювання та інших регуляторних протеїнів). Для розвинення забарвлення плівку обробляють у розчині проявника до появи смуг імунореактивних зон на блоті, після чого зображення фіксують і ретельно промивають водою. Проявник та фіксаж є комерційно доступними у вигляді стокових розчинів. Метод ECL характеризується високою чутливістю по відношенню до детекції протеїну ($10^{-9} - 10^{-12}$ г). У лабораторіях, в яких імуноблот-аналіз є рутинним методом, для фіксації зображення часто використовують автоматичні хемілюмінісцентні аналізатори.

Більш швидким і дешевшим, але менш чутливим способом проявлення комплексів антиген-антитіло в імуноблот-аналізі є використання речовин-хромогенів (ДАБ або 4-хлорнафтол), що дають кольорову реакцію після оброблення ними мембрани в присутності субстрату ензиму-мітки без використання спеціальної світлочутливої плівки. Однак, чутливість колориметричних методів розвинення імунозабарвлення є на декілька порядків меншою, ніж чутливість проявлення блотів за допомогою ECL, тому такий спосіб застосовують для детекції протеїнів, що містяться в зразках у відносно великій кількості (мажорні протеїни). Зокрема, дешевшим, але менш чутливим підходом, є проявлення блотів з використанням H_2O_2 (0,01%) і ДАБ (0,05%), розчинених у 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4). При цьому реакція пероксидного радикалу з ДАБ дає темно-коричневий продукт, який забарвлює зону, що відповідає локалізації комплексу антиген-антитіло.

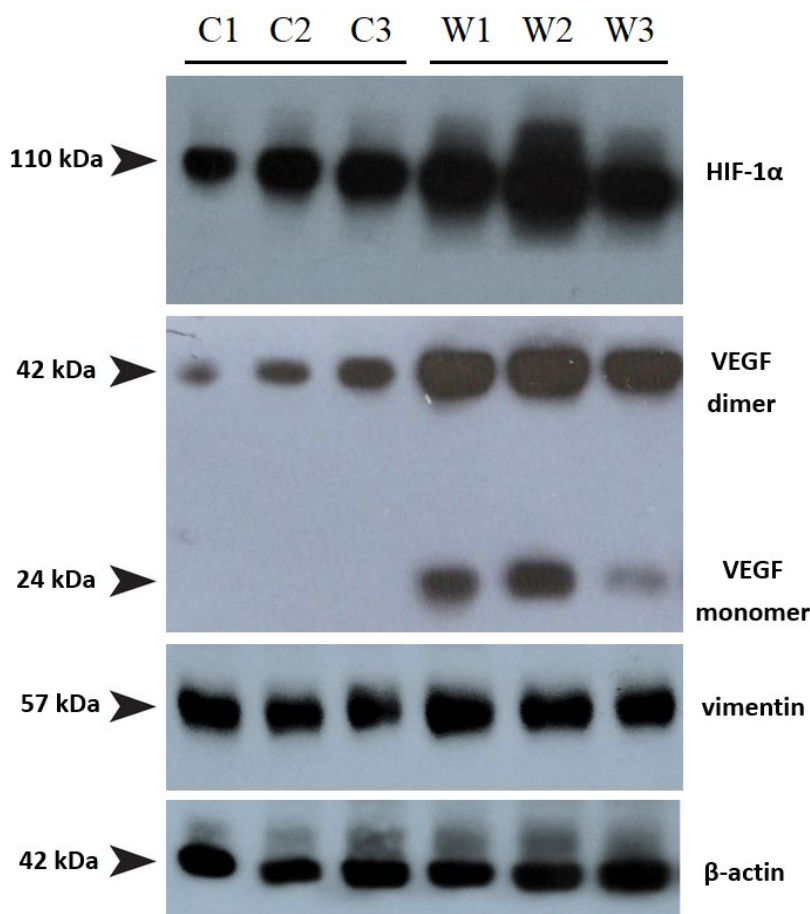


Рис. 7. Блотограми деяких цитоскелетних та регуляторних протеїнів у лізатах рогівки щура, проявлені за допомогою методу ECL (результати власних досліджень).

Після проявлення плівки або мембрани висушують потоком повітря, сканують для отримання цифрового зображення та проводять денситометричний аналіз.

7.2. Кількісне оброблення даних.

Напівкількісний аналіз отриманих результатів проводять денситометрично, використовуючи програмне забезпечення, зокрема, пакет програм TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США). Приблизну величину молекулярної маси досліджуваного протеїну визначають, порівнюючи пофарбовані бенди з положенням трансблот маркерів на тій самій мембрані. Обов'язковою умовою коректного обчислення рівня протеїну інтересу є співвідношення інтенсивності його імунореактивності з цією величиною для одного зі структурних протеїнів, таких як актин або тубулін, експресія яких вважається константною та не змінюють між експериментами (контроль нанесення, або loading control). Отже, питома кількість цільового протеїну

визначається як співвідношення імунозабарвлення власно зони цього протеїну та кількості контрольного протеїну в зразку. Нормування рівня протеїну є важливим етапом при обробці даних імуноблоту, оскільки він забезпечує корекцію кількості загального протеїну на мембрані у разі помилки або неповного перенесення.

На рисунку 8 наведено інтерфейс денситометричної програми, яка дозволяє обраховувати рівень протеїну як функцію площі його імунореактивної смуги на блотограмі. Рівень протеїну виражається у відносних одиницях (або *англ.* arbitrary units, a.u.).

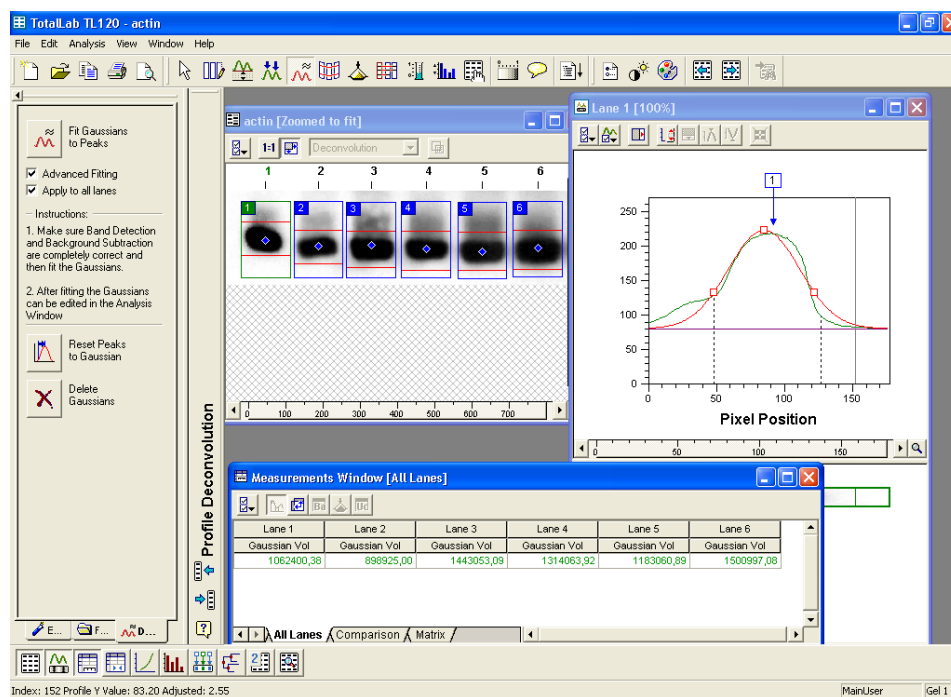


Рис. 8. Приклад роботи денситометричної програми.

Узагальнення.

Імуноблот-аналіз як надійний та ефективний метод специфічного визначення протеїнів може бути широко застосований для якісного та кількісного аналізу низки біомаркерів патологічних станів у слізній рідині та тканині рогівки. Використання імуноблоту в офтальмологічній практиці може бути корисним для діагностики різних захворювань ока, спричинених, зокрема, травмами, опіками, вірусним інфікуванням, хірургічними втручаннями тощо, які супроводжуються розвитком хронічних запальних процесів та неоваскуляризацією. Аналіз особливостей протеому рогівки експериментальних тварин з використанням імуноблоту є потужним інформативним методом, вартим до застосування у доклінічних випробуваннях нових лікарських препаратів. Запропоновані методичні рекомендації дають практичні настанови та визначають головні вимоги до процедури імуноблот-аналізу протеїнів слізної рідини та лізатів рогівки.

Методичні вказівки охоплюють увесь цикл аналітичного процесу: від особливостей пробопідготовки біологічного матеріалу, отримання зразків для аналізу та визначення вмісту загального протеїну до проведення гель-електрофорезу (SDS-PAGE) і постановки власно імуноблотингу (рис. 9). Описані методичні аспекти містять теоретичний матеріал та значною мірою базуються особистому досвіді укладачів, але не є вичерпними.

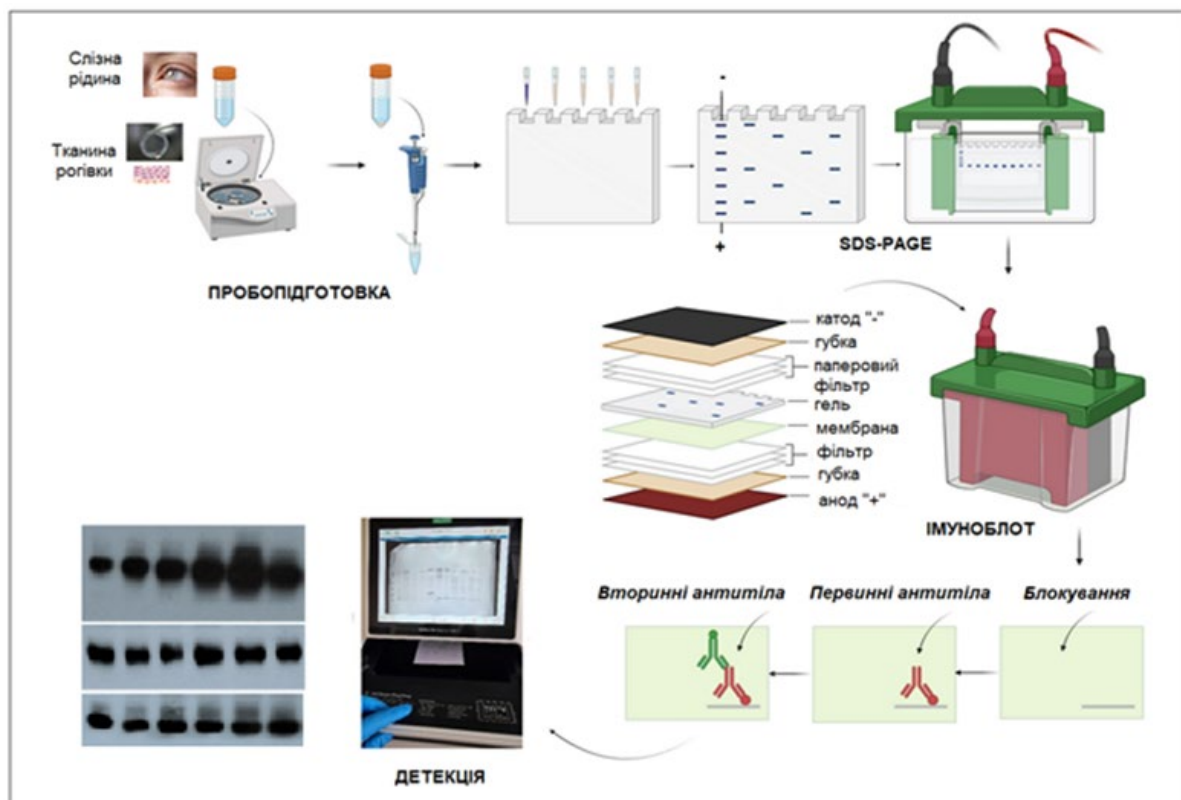


Рис. 9. Схема-узагальнення проведення імуноблот-аналізу протеїнів.

Перелік рекомендованої літератури

Жупан Б.Б., Лурін І.А., Медведовська Н.В., Храмов І.І. Перспективи прогнозування віддалених результатів лікування у пацієнтів з бойовою травмою органу зору. *Офтальмологічний журнал*. 2023; 512(3): 34-37.

[https://ua.ozhurnal.com/files/pdf/J.ophtalmol.\(Ukraine\)2023-3-6ukr.pdf](https://ua.ozhurnal.com/files/pdf/J.ophtalmol.(Ukraine)2023-3-6ukr.pdf)

Запорожан В.М., Аряєв М.Л. Біоетика та біобезпека (підручник). К.: Здоров'я, 2013. - 456 с.

Alegria-Schaffer A. Western blotting using chemiluminescent substrates. *Methods Enzymol*. 2014; 541: 251-259.

Bruszel B., Tóth-Molnár E., Janáky T., Szabó Z. Sources of variance in human tear proteomic samples: statistical evaluation, quality control, normalization, and biological insight. *Int. J. Mol. Sci*. 2024; 25(3):1559.

Di Zazzo A., Gaudenzi D., Yin J., Coassin M., Fernandes M., Dana R., Bonini S. Corneal angiogenic privilege and its failure. *Exp. Eye Res*. 2021; 204:108457.

Gaal O., Medgyesi G.A., Vereczkey L. Electrophoresis in the separation of biological macromolecules. Wiley & Sons (1980).

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-685.

Ma JYW., Sze Y.H., Bian J.F., Lam T.C. Critical role of mass spectrometry proteomics in tear biomarker discovery for multifactorial ocular diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2021;47(5):83.

Moon C.E., Kim C.H., Jung J.H., Cho Y.J., Choi K.Y., Han K., Seo K.Y., Lee H.K., Ji Y.W. Integrated analysis of transcriptome and proteome of the human cornea and aqueous humor reveal novel biomarkers for corneal endothelial cell dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(20):15354.

Pavlova O.S., Bilous V.L., Korsia V.V., Stepanenko S.P., Parkhomenko Yu.M., Tykhomyrov A.O. Changes in the levels of neurospecific proteins and indices of apoptosis in the rat cornea at chronic ethanol consumption: protective effects of thiamine administration. *Neurophysiology*. 2022; 54(1–2): 25-36.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150(1): 76-85.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1979; 76(9): 4350-4354.

Tykhomyrov A., Yusova O., Kapustianenko L., Bilous V., Drobotko T., Gavryliak I., Greben N., Ağca C.A.. Production of anti-lactoferrin antibodies and their application in analysis of the tear fluid in health and corneal injuries. *Biotechnologia Acta*. 2022; 15(5): 31-40.

Zhao G, Chen H, Song Z, Yin H, Xu Y, Chen M. Glial fibrillary acidic protein expression during HSV-1 infection in mouse cornea. *APMIS*. 2014;122(2):128-135.

ДЛЯ НОТАТОК

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.