

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДУ ВЕСТЕРН-БЛОТИНГУ НА ОСНОВІ МОДИФІКАЦІЇ ПОЛІВІНІЛІДЕНФТОРИДНОЇ ОПОРНОЇ МЕМБРАНИ

Лугова К.В., Бєлих І.А.

***Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут», м. Харків***

Вестерн-блотинг (англ. *Western blot*) – модифікований метод блотингу, який широко використовується для виявлення специфічного білка у складних сумішах, екстрагованих зі зразків крові або тканин. Даний протеомний спосіб застосовується для кількісного і напівкількісного аналізу у біохімії, молекулярній біології, імунологічній діагностиці, зокрема фармацевтичній біотехнології [1].

У ході літературного аналізу було з'ясовано, що техніка вестерн-блотингу включає шість основних етапів: (1) підготовка зразків, (2) використання геле-електрофорезу для розділення білків зразка, (3) перенесення білків на мембрану, (4) блокування, (5) інкубація антитіл, (6) детектування та візуалізація білків. Після етапу електрофорезу відбувається переміщення сепарованих білків на мембрану, які бувають двох типів: нітроцелюлозна (НЦ) та полівініліденфторидна (ПВДФ). НЦ мембрана використовується завдяки високій спорідненості до білка та простоті роботи з нею, але значним недоліком є те, що після тривалого застосування така мембрана стає крихкою, втрачаючи механічні та хімічні характеристики, і стає непридатною для репробацій. У свою чергу, гідрофобна ПВДФ мембрана залишається механічно справною для подальших репробацій з можливістю очищення від антитіл, зберігаючи білкові плями [1].

На основі патентного пошуку було запропоновано удосконалення пористої гідрофобної мембрани з полівініліденфториду на основі покриття зшитим кополімером акриламідом з метилен-біс-акриламідом, що у результаті стає високогідрофільною. При модифікації показника покриття кополімеру було досягнуто задовільної ефективності блотингу. Хоча рівень зв'язування білка знижувався, але продуктивність вестерн-блотингу зростала до значень проміжних між НЦ і удосконаленою гідрофобною ПВДФ-мембраною. Шляхом змочування реагентом та анаеробним ультрафіолетовим випромінюванням мембрани було досягнуто високого показника зв'язування білка та низький рівень фонові флуоресценції, що демонструє покращене виявлення зразків навіть при низьких концентраціях білків [2].

Таким чином, на основі літературного пошуку було запропоновано вдосконалене технологічне впровадження у метод вестерн-блотингу, що дозволить покращити виявлення зразків, мінімізуючи їх витрати, а також поширити метод у фармацевтичній біотехнологічній промисловості.

Література:

1. Mahmood T. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting / T. Mahmood, P.C. Yang // North American Journal of Medical Sciences. – 2012. – V. 4. – № 9. – P. 429–434.
2. Peters A. Patent EP 2302386B1. G01N33/54393. Western blot immunoassay using hydrophilic, high protein binding, low fluorescence, blotting membrane // [A. Peters, P. Goddard, J. Charkoudian et al.] – Appl. No.: 10190559.4; filing: 17.08.2009; publication: 09.04.2014, bulletin 2014/15. – 28 p.