

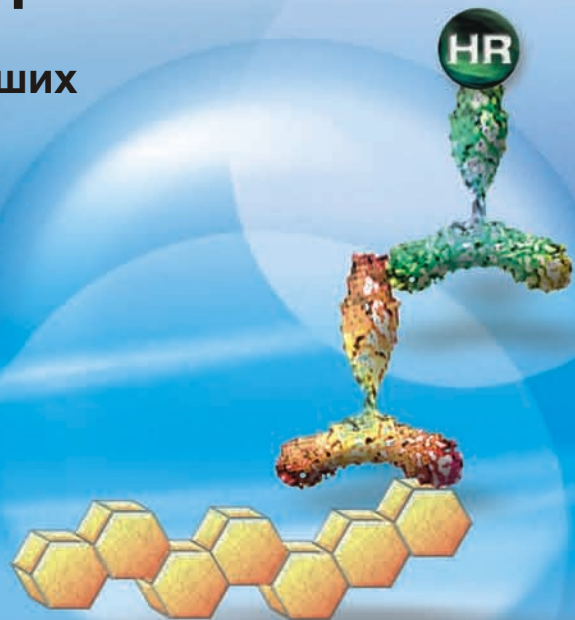


Whatman®

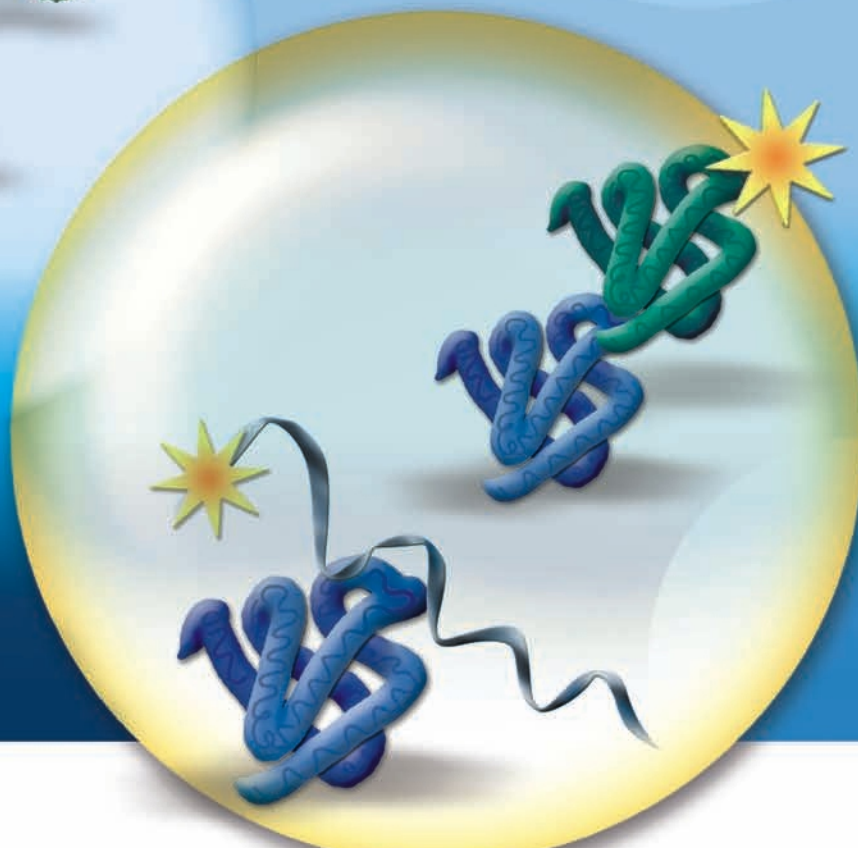
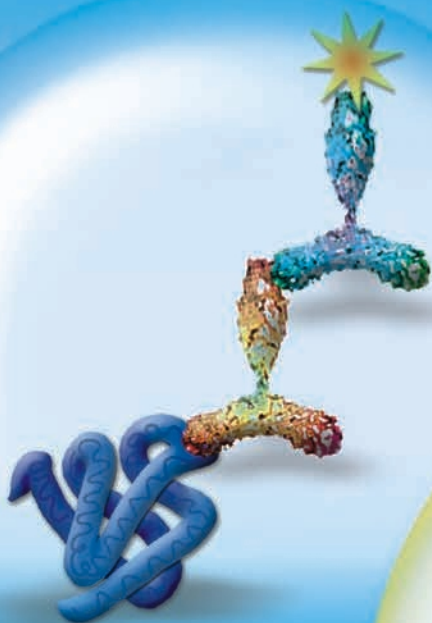
Нитроцеллюлозные мембраны Protran®

Превосходные мембраны для новейших методов исследования белков

Proteomics



Glycomics



Protran® — самые популярные мембраны для блоттинга во всем мире

“Protran” -- нитроцеллюлозные мембраны, наиболее часто используемые для переноса при вестерн, саузерн и нозерн-блоттинге. Все методы блоттинга разработаны с использованием нитроцеллюлозных мембран и именно этот тип считается стандартным.

Нитроцеллюлоза производится частичным нитрованием природного биополимера целлюлозы (рис. 1). Нитрование — необходимый процесс при производстве микропористой мембраны, обладающей всеми необходимыми для блоттинга характеристиками.

Нитроцеллюлозные мембраны “Protran” производства Ватман производятся из избранного сырья, прошедшего аттестацию — чистой 100% нитроцеллюлозы, и обладают высочайшей связывающей способностью и превосходными рабочими характеристиками при определении биомолекул.

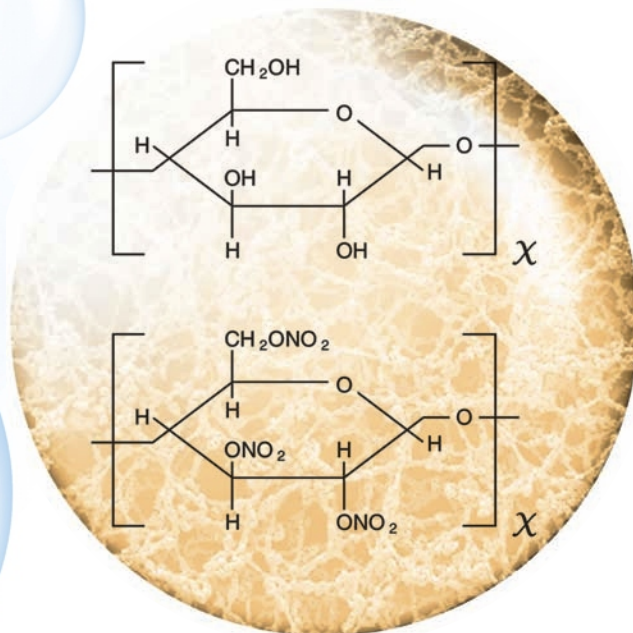


Рис 1: химическое строение нитроцеллюлозы

(а) целлюлоза, (b) после нитрования; степень замещения гидроксильных групп варьирует от 1.9 до 2.4.

Мембраны “Protran”® характеризуются исключительной механической прочностью

Параметры производственного процесса и качество сырья оказывают очень сильное влияние на механические свойства нитроцеллюлозных мембран.

Механическая стабильность мембраны исключительно важна для ее рабочих качеств; ее можно оценить по прочности на растяжение. во время такого испытания полоска мембраны растягивается с постоянно возрастающей силой.

Результаты испытания мембран всех лидирующих производителей очевидно доказывают, что мембраны “Protran” обладают самой высокой прочностью на разрыв из всех нитроцеллюлозных мембран (рис. 2). Кроме того, механическая прочность этих мембран остается неизменной от серии к серии. Вот почему нитроцеллюлозные мембраны “Protran” подходят для самых разнообразных методик и позволяют получить достоверные результаты.

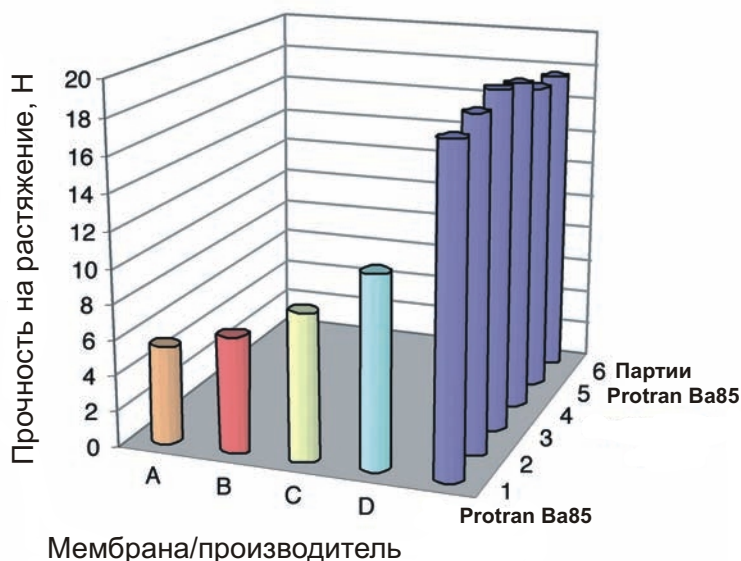


Рис. 2: Механическая прочность нитроцеллюлозных мембран

Нитроцеллюлозные мембраны разных производителей/поставщиков с порами 0,45 мкм разрезали на полоски 15 x 100 мм. Силу натяжения измеряли с помощью автоматического аппарата для регистрации натяжения и давления согласно DIN 53 112, части 1). Указанные данные представляют собой среднее от четырех независимых измерений.

Толщина мембран: A = 130 мкм, B = 130 мкм, C = 160 мкм D (смешанные эфиры) = 160 мкм, Protran BA85 = 125 мкм.

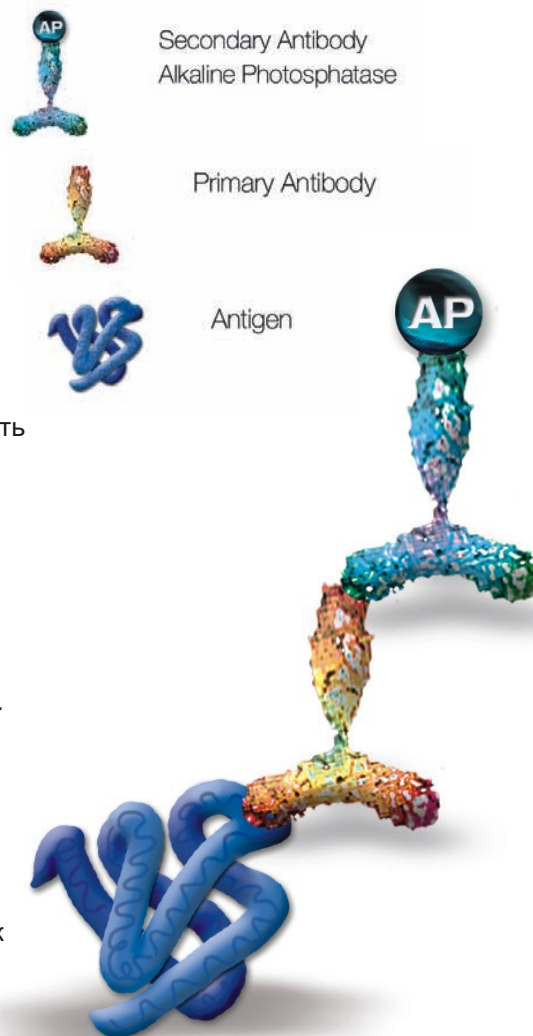
В постгеномную эру все большее значение приобретают исследования белков.

Нитроцеллюлозная мембрана "Protran"— универсальная подложка для блоттинга при изучении биомолекул, таких, как нуклеиновые кислоты и белки. Мембраны "Protran" обладают уникальными свойствами, которые делают их лучшими мембранами для исследовательской работы, особенно для опытов с белками.

Мембраны "Protran" позволяют сохранять белки годами без потери их свойств

Значительным преимуществом мембран "Protran", производящихся из патентованных материалов, является исключительно долгая сохранность нанесенных на них белков, доказанная испытаниями. Опытным путем установлено, что белки, нанесенные на мембрану, сохраняют способность к молекулярному распознаванию в течение 5 лет (рис. 3), благодаря чему эти мембраны считаются промышленным стандартом для блоттинга белков. С помощью мембран "Protran" выполнены миллионы блотов. Кроме того, Ватман предлагает различные крупнопористые нитроцеллюлозные мембраны, уже более 20 лет использующиеся для производства диагностических средств и доказавшие свою надежность. Длительная стабильность белков без потери свойств является необходимым условием для производства готовых тест-систем, например, тестов на беременность. Это даст преимущество и исследователям -- они смогут увеличить срок хранения своих блотов.

Таким образом, длительное сохранение стабильности белков, нанесенных на мембраны "Protran", дает уникальные преимущества как для крупномасштабных проектов в протеомике, так и для разработки коммерческой продукции.



Полоски

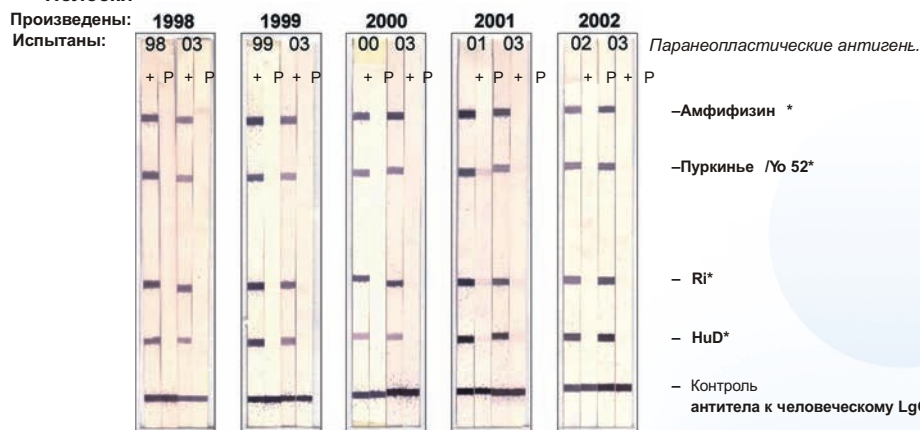


Рис. 3: Испытание стабильности паранеопластических аутоантигенов, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране Protran® BA83

Эксперимент длился 5 лет (с 1998 до 2002 г.). Антигены в 20 мМоль трис-НСI, 160 мМоль глицина (рН 8.6) наносили на мембрану. Полоски мембран высушивали, герметично упаковывали в пластиковые пакетики с влагопоглотителем и хранили в в темном месте при 2-8°C. Для анализа мембранные полоски инкубировали с человеческой сывороткой и промывали. Содержащиеся в сыворотке антитела, связавшиеся с антигенами, выявляли с помощью антител к человеческому IgG, конъюгированных с щелочной фосфатазой и p-нитрофенилфосфатом в качестве субстрата.

Четыре полосы, показанные в каждой рамке, получены при анализе одной и той же серии.

+ результат, полученный со смесью сывороток, реагирующих со всеми четырьмя антигенами

- результат, полученный с отрицательной сывороткой

*Амфифизин, Yo 52, Ri, HuD -- ядерные белки, присутствующие в нервных клетках, способные вызывать аутоиммунные заболевания с паранеопластическими симптомами.

Их наличие может быть связано с различными типами рака (легких, яичника, молочной железы).

(данные любезно предоставлены проф. Силигом с сотрудниками, Карсруэ, Германия, www.laborseelig.de)

Мембраны "Protran" превосходят для исследования углеводов

Нитроцеллюлозные мембраны "Protran" -- не только превосходная основа для вестерн-блоттинга. После расцвета геномики и протеомики начинают развиваться другие области исследования, вызывающие все больший интерес.

Самое последнее направление с суффиксом "-омика" -- гликомика, или исследование углеводов. В процессе расшифровки генома человека было открыто более 50000 белков, играющих роль в посттрансляционных модификациях, необходимых для точной "подстройки" реакций обмена веществ. К хорошо известным модификациям белков относится гликозилирование, создающее необходимую третичную структуру и обеспечивающее правильную локализацию белковой молекулы в клетке.

В последнее время исследователи получают все больше и больше данных о взаимодействиях белков посредством распознавания олигосахаридных остатков. Один из подходов к поиску новых белков, узнающих углеводы в протеоме, и к картированию структур, узнающих углеводы в гликоме, состоит в использовании олигосахаридных микрочипов [1]. На рис. 4 показано высокочувствительное определение углеводов с помощью нитроцеллюлозных мембран "Protran".

Количественный эксперимент с использованием иммунного окрашивания очевидно свидетельствует о более чем 10-кратном повышении интенсивности сигнала, соответствующего олигосахаридам (НГЛ*), на нитроцеллюлозной мембране "Protran".

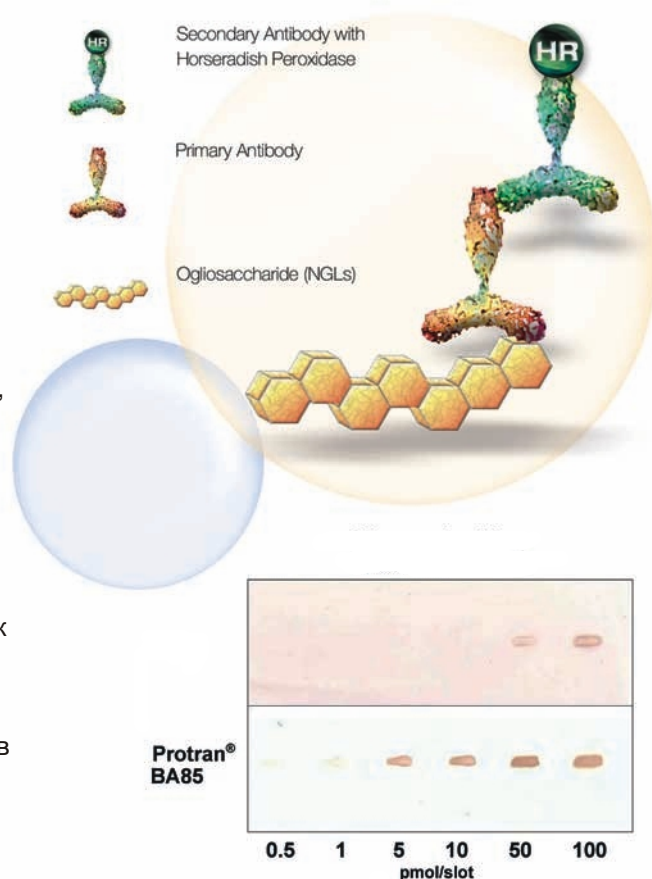


Рис. 4: иммунологический метод обнаружения олигосахаридов, иммобилизованных на мембране Protran® Ba85

Олигосахарид НГЛ* кислотного полимера из 16 звеньев – производного хондроитинсульфата С (CSC 16-мер) фиксировали смесью хлороформа/метанола/воды (в объемном соотношении 25:25:8).

Указанные количества наносились на мембраны Protran BA85 и мембраны из поливинилиденфторида (ПВДФ) через 2-мм прорези. Для анализа мембраны инкубировали с анти-CS (моноклональные антитела CS-56) с последующей промывкой. Связавшиеся антитела выявляли с помощью антител к IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена и 3'-диаминобензидином в качестве субстрата ("DAB-FAST").

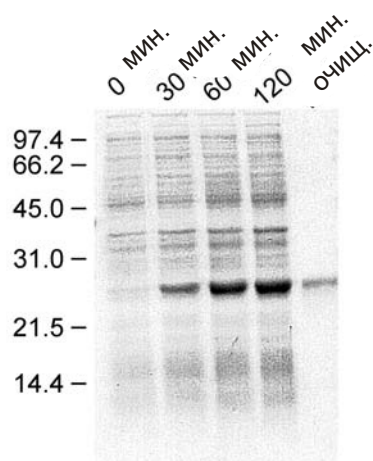
Неогликолипиды (НГЛ) можно приготовить путем восстановительного аминирования редуцирующих олигосахаридов с аминлипидами. Такая технология позволяет получить из гликопротеидов и полисахаридов олигосахаридные зонды, связанные с липидами, особенно хорошо подходящие для создания подборки олигосахаридов.

(Метод описан в [1].)

Мембрана "Protran" позволяет достичь высочайшей чувствительности при изучении взаимодействий белков

Ключевую роль в точной регуловке реакций обмена веществ играют регуляторные белки, способные узнавать нуклеотидные или аминокислотные последовательности. Нанесение белковых проб на мембрану и использование флуоресцентных зондов позволяет проанализировать сигналы от взаимодействия белок-белок (рис. 6) или белок-ДНК (рис. 6) с высокой чувствительностью обнаружения.

a. ЦРБ E. coli



b. Связывание Cy5.5 αРНП E. coli

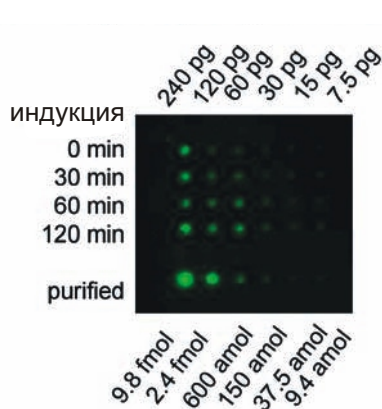
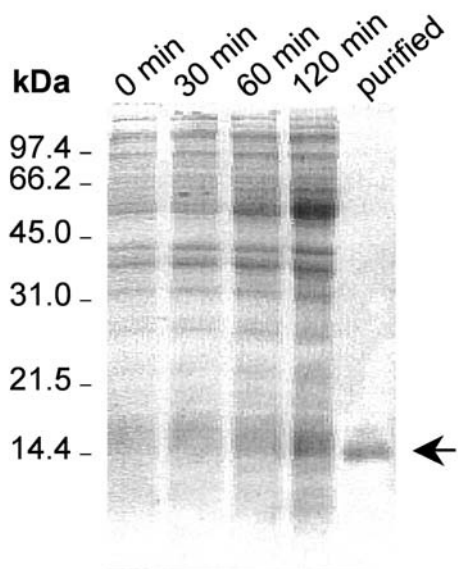


Рис. 5: SDS PAGE анализ и флуоресцентное обнаружение белковых взаимодействий на мембране Protran® Ba83

(a) Неочищенные экстракты в неиндуцированных и индуцированных ИПТГ в течение 30, 60 и 120 мин. образцах цАМФ-рецепторного белка (ЦРБ) E. coli, а также очищенный Гис-меченый ЦРБ анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.

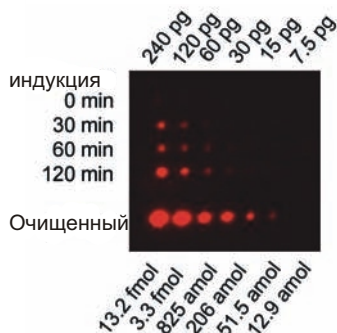
(b) Микрочипы ЦРБ готовили из этого же неочищенного экстракта или очищенных белков в указанных количествах. Общее количество белка выражено в пг, количество очищенного ЦРБ выражено в фМоль и аМоль. Экстракты наносили на нитроцеллюлозную мембрану Protran BA83. Реакции связывания проводили в присутствии 5 мМоль цАМФ с РНК-полимеразой E. coli, меченой Cy5.5. Связывание белок-белок определяли после инкубации с соответствующим белком, меченным Cy5.5, в фосфатном буфере с помощью тепловизионной системы Odyssey (LI-COR). (данные см. на рис. 6)

a. ArgR *B. stearothermophilus*

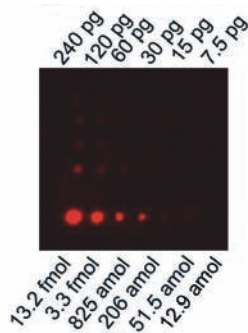


Связывание с IRD-800

b. 76 bp DNA



c. 56 bp DNA



При исследовании связывания белок-белок использовали цАМФ-рецепторный белок *E. coli* (ЦРБ); его наносили на нитроцеллюлозную мембрану "Protran" и инкубировали с α -субъединицей РНК-полимеразы *E. coli*, меченой Су5.5. При нанесении на мембрану очищенного ЦРБ сигнал обнаруживался уже при концентрации белка 150 аМоль (рис 5b).

При исследовании связывания белок-ДНК с использованием ДНК-зондов, меченых IRD-80, белок обнаруживался уже в концентрации до 12 амоль. Последовательно очищенный белок-аргининовый репрессор (ArgR) наносили на нитроцеллюлозную мембрану "Protran" и инкубировали с двумя разными укороченными производными области промотора-оператора PargCo (рис. 6 b, c).

Линейное возрастание флуоресценции измеряли в диапазоне, охватывающем более двух порядков (между 3,3 фМоль и 12,9 аМоль очищенного белка ArgR).

Можно было определить даже более высокое сродство исследуемого репрессорного белка к двойному ДНК-зонду с двойным аргининовым боксом (рис. 6 b) по сравнению с зондом с одиночным боксом (рис. 6 c).

Приведенные данные подтверждают выдающиеся качества нитроцеллюлозных мембран "Protran" при молекулярно-биологических исследованиях. Преимущества иммобилизации биомолекул на нитроцеллюлозе очевидны.

Нековалентная иммобилизация на нитроцеллюлозе позволяет избежать изменений биомолекул в результате взаимодействий с химически активированными или способными к ковалентному связыванию поверхностями, ведущим к потере способности к узнаванию. Механическая прочность мембран "Protran" в сочетании с длительным сохранением стабильности и связывающей способности белков имеют важнейшее значение для чувствительности определения и получения достоверных результатов.

"Что касается выбора нитроцеллюлозных мембран, согласно испытаниям, наилучшими являются мембраны Schleicher & Schuell* (наивысшая связывающая способность, наивысшее соотношение, сигнал: фоновые помехи)..." [3]. *[сейчас Whatman]

Все, что относилось к первому опыту блоттинга на нитроцеллюлозе, сохранило свое значение и сегодня. Это высокоточный метод.

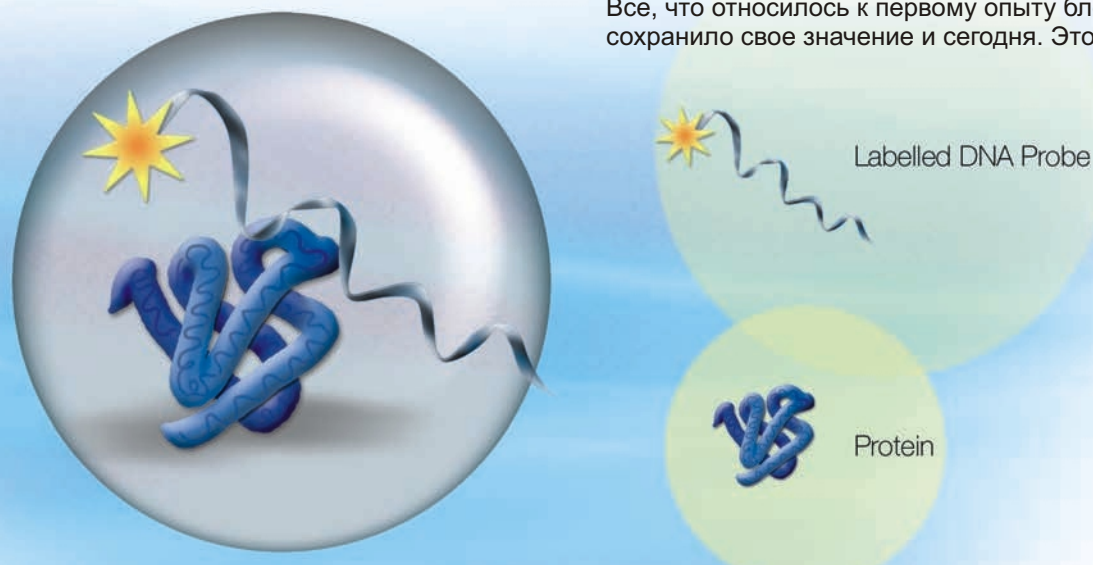


Рис. 6: Рис. 6: SDS PAGE анализ и флуоресцентное обнаружение взаимодействий белок-ДНК на мембране Protran® Va83

(a) неочищенные экстракты неиндуцированных и индуцированных ИПТГ в течение 30, 60 и 120 мин. проб аргининового репрессора (ArgR) *B. stearothermophilus* и очищенный ArgR, меченный Гис, анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле.
 (b, c) Микрочипы ArgR готовили из того же неочищенного экстракта или из очищенных белков в указанных количествах. Общее количество белка выражено в пг, количество очищенного ArgR в фМоль и аМоль. Экстракты наносили на нитроцеллюлозную мембрану Protran VA83. Реакции связывания проводили с ДНК-зондом длиной 76 п.о., меченым IRD-800, представляющим собой область PargCo целиком (содержащую оператор с двумя аргининовыми боксами) или с ДНК-зондом длиной 56 п.о., меченым IRD-800, представляющим собой укороченную область PargCo (содержащую оператор с одиночным аргининовым боксом). Связывание ДНК-белок определяли после инкубации в ДНК-связывающем буфере с ДНК-зондом, меченым IRDye 800 с помощью тепловизионной системы Odyssees (LI-COR).

ТЕХНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ**Мембраны "Protran" из 100% нитроцеллюлозы**

ПРИМЕНЕНИЕ	Вестерн, Саузерн, Нозерн-блоттинг	
СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ		
* поры: 0.45 мкм	80 мкг/см ²	
* поры: 0.2 мкм	90 мкг/см ²	
* поры: 0.1 мкм	110 мкг/см ²	
МЕТОДЫ ПЕРЕНОСА:		
Полусухой блоттинг	++	
Танк-блоттинг	++	
Вакуумный блоттинг	++	
Капиллярный блоттинг	++	
Щелочной метод	Не рекомендуется	
ИММОБИЛИЗАЦИЯ:		
Сушка	белки	
Поперечное сшивание УФ	ДНК/РНК	
Термообработка (80оС)	ДНК/РНК	
МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ:		
Колориметрический	++	
** Хемилюминесцентный	++	
Изотопный	++	
Флуоресцентный	белки	

* Мембраны "Protran" производятся с порами разных размеров для оптимального соответствия различным методикам.

Мембраны Protran BA85 с порами 0,45 мкм считаются общим стандартом для большинства лабораторных методик исследования белков и нуклеиновых кислот.

Мембраны Protran BA83 с порами 0,2 мкм задерживают молекулы массой менее 20 кДа. BA79 мембрана выбора для меньших молекул массой ниже 7 кДа.

** При работе с нитроцеллюлозными мембранами "Protran" возможны различные методы обнаружения. Для хемилюминесцентных методик мы рекомендуем системы на основе пероксидазы хрена.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Описание	Поры, мкм	Размер (мм)	Шт/уп.	Кат. №
Protran BA85, круглые	0.45 мкм	Ø 82	50	10401116
"	0.45 мкм	Ø132	25	10401124
Protran BA85, листы	0.45 мкм	200 x 200	5	10402680
"	0.45 мкм	200 x 200	25	10401191
"	0.45 мкм	300 x 600	5	10401180
Protran BA85, рулон	0.45 мкм	200 x 3 м	1	10401197
"	0.45 мкм	300 x 3 м	1	10401196
Protran BA83, круглые	0.2 мкм	Ø82	50	10401316
Protran BA83, листы	0.2 мкм	200 x 200	5	10402452
"	0.2 мкм	200 x 200	25	10401391
"	0.2 мкм	300 x 600	5	10401380
Protran BA83, рулон	0.2 мкм	200 x 3 м	1	10402495
"	0.2 мкм	300 x 3 м	1	10401396
Protran BA79, листы	0.1 мкм	200 x 200	5	10402062
"	0.1 мкм	200 x 200	25	10402091
"	0.1 мкм	300 x 600	5	10402080
Protran BA79, рулон	0.1 мкм	300 x 3 м	1	10402096
Дополнительная продукция	Толщина	Размер (мм)	Шт/уп.	Кат. №
Бумага для блоттинга 3мм, листы	0.34 мм	200 x 200	100	3030-801
"	0.34 мм	460 x 570	100	3030-917
Бумага для блоттинга 17 Chr, листы	0.92 мм	460 x 570	25	3017-915
Бумага для блоттинга GB004, листы	1.00 мм	460 x 570	100	10427926
Бумага для блоттинга GB005, листы	1.50 мм	580 x 580	25	10426994

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Fukui S., Feizi T., Galustian C., Lawson A. M. and W. Chai. Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nature Biotechnology* 2002, Vol. 20, 1011-1017
- [2] Snaryan M., Lecocq M., Guivel L., Arnaud M.-C., Ghochikyan A., and V. Sakanyan. Dissecting DNA-protein and protein-protein interactions involved in bacterial transcriptional regulation by a sensitive protein array method combining a near-infrared fluorescence detection. *Proteomics* 2003, 3, 647-657.
- [3] Bjerrum O. J. and N. H. Heegaard (eds.). *CRC Handbook of Immunoblotting of Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. 1, 105.

По запросу предоставляются другие форматы!

Ватман предлагает полный ассортимент мембран для блоттинга.

Нитроцеллюлозная мембрана повышенной прочности "Optitran", нейлоновые мембраны "Nytran" и мембраны из ПВДФ "Westran" -- высокоэффективные мембраны для исследования нуклеиновых кислот и белков.