

УДК 616-092.6

DOI 10.17802/2306-1278-2026-15-3-77-92

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОКРАШИВАНИЯ КОНСТИТУТИВНЫХ БЕЛКОВ И ОБЩЕГО БЕЛКА КАК ДВУХ ПОДХОДОВ К НОРМАЛИЗАЦИИ СИГНАЛА ПРИ ИММУНОБЛОТТИНГЕ БЕЛКОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

А.И. Лазебная, В.Е. Маркова, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Наиболее высокой чувствительностью при окрашивании общего белка в лизате культур эндотелиальных клеток и гомогенате кровеносных сосудов имеют красители Acid Black 1 и Fast Green FCF, позволяющие детектировать ≥ 1 мкг белка).
- При оценке содержания конститутивных белков в лизатах культур эндотелиальных клеток наиболее высокой чувствительностью обладает окрашивание антителами к β -актину (детектирующее $\geq 1-2$ мкг белка), ТВР ($\geq 2-4$ мкг белка) и PCNA (≥ 4 мкг белка).
- При нормализации специфичного сигнала от антител целесообразно применять окрашивание на общий белок при коэффициенте вариации $\leq 20\%$ (для лизата культур эндотелиальных клеток) или $\leq 25\%$ (для гомогената кровеносных сосудов).

Цель

Провести сравнение объективности окрашивания конститутивных белков и общего белка как двух методик для нормализации сигнала при иммуноблоттинге белков эндотелиальных клеток (ЭК) и кровеносных сосудов.

Материалы и методы

В бис-трис-гель для электрофореза вносили серийные разведения лизата культур ЭК или гомогената кровеносных сосудов (1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг белка). Окрашивание конститутивных белков ЭК (CD31/PECAM1, β -актина, β -тубулина, GAPDH, ТВР, PCNA, гистона H3 и COX4) детектировали с использованием вторичных антител, конъюгированных с флюорофорами 680RD и 800CW (флюоресцентная детекция) либо с пероксидазой хрена (хемилюминесцентная детекция). Визуализацию общего белка проводили при помощи красителей Acid Black 1, Fast Green FCF, Понсо S, Конго красного, нигрозина, красителя Revert 700 и 2,2,2-трихлорэтанола.

Результаты

При окрашивании общего белка из лизата культур ЭК или гомогената кровеносных сосудов на мембранах из поливинилиденфторида и нитроцеллюлозы наиболее высокую чувствительность продемонстрировали краситель Acid Black 1 и Fast Green FCF (позволявшие детектировать ≥ 1 мкг белка), которые были выбраны для последующего сравнения. При анализе экспрессии конститутивных белков ЭК и кровеносных сосудов наиболее высокая чувствительность была выявлена при окрашивании антителами к β -актину ($\geq 1-2$ мкг белка), ТВР ($\geq 2-4$ мкг белка) и PCNA (≥ 4 мкг белка). Чувствительность окрашивания общего белка превысила чувствительность окрашивания антителами к β -актину и ТВР (за счет более высокой интенсивности полос). Сплошной анализ результатов окрашивания общего белка выявил максимальный и медианный коэффициент вариации при анализе лизата культур ЭК в $\approx 20\%$ и $\approx 12\%$ соответственно, при анализе гомогената кровеносных сосудов – в $\approx 40\%$ и $\approx 17\%$.

Заключение

Наиболее чувствительным красителем для окрашивания общего белка в лизате культур ЭК и гомогенате кровеносных сосудов является Acid Black 1, цитоплазматическим конститутивным белком – β -актин, ядерным конститутивным белком – ТВР. При нормализации специфичного сигнала от антител целесообразно применять окрашивание на общий белок при коэффициенте вариации $\leq 20\%$ (для лизата культур ЭК) или $\leq 25\%$ (для гомогената кровеносных сосудов).

Для корреспонденции: Антон Геннадьевич Кутихин, kytiag@ketcardio.ru; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Anton G. Kutikhin, kytiag@ketcardio.ru; address: 6, blvd. named after academician L.S. Barbarash, Kemerovo, Russian Federation, 650002

Ключевые слова Иммуноблоттинг • Эндотелиальные клетки • Кровеносные сосуды • Нормализация • Конститутивные белки • В-актин • ТАТА-связывающий белок

Поступила в редакцию: 31.03.2026; поступила после доработки: 23.04.2026; принята к печати: 08.05.2026

COMPARISON OF HOUSEKEEPING PROTEIN AND TOTAL PROTEIN NORMALIZATION IN WESTERN BLOTTING ANALYSIS OF ENDOTHELIAL CELL LYSATE AND VASCULAR HOMOGENATE

A.I. Lazebnaya, V.E. Markova, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", blvd. named after academician L.S. Barbarash, 6, Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- Acid Black 1 and Fast Green FCF are the most sensitive dyes for total protein staining in endothelial cell lysate or vascular homogenate, detecting as low as ≥ 1 μg protein.
- Staining with antibodies to β -actin, TBP, and PCNA has the highest sensitivity in endothelial cell lysate, detecting as low as ≥ 1 – 2 μg protein, ≥ 2 – 4 μg protein, and ≥ 4 μg protein, respectively.
- Total protein staining can be employed for the signal normalization in Western blotting of endothelial cell lysate or vascular homogenate if coefficient of variation is $\leq 20\%$ (in case of endothelial cell lysate) or $\leq 25\%$ (in case of vascular homogenate).

Aim To compare the sensitivity of housekeeping proteins and total protein staining for the signal normalisation during Western blotting of endothelial cell (EC) lysate and vascular homogenate.

Methods Serial dilutions of EC lysate or vascular homogenate (1, 2, 4, 8, 16, and 32 μg protein) were loaded into bis-tris polyacrylamide gel and stained for EC housekeeping proteins: platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31/PECAM1), β -actin, β -tubulin, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TATA-binding protein (TBP), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), histone H3, and cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4). Housekeeping protein expression was detected using secondary antibodies conjugated with 680RD and 800CW fluorophores or horseradish peroxidase. Total protein staining was performed using Acid Black 1, Fast Green FCF, Ponceau S, Congo Red, nigrosine, Revert 700, and 2,2,2-trichloroethanol.

Results Acid Black 1 and Fast Green FCF were the most sensitive (≥ 1 μg protein) dyes for total protein staining in EC lysate or vascular homogenate on polyvinylidene fluoride or nitrocellulose membranes. Among the housekeeping proteins of EC lysate and vascular homogenate, the highest sensitivity was detected for β -actin (≥ 1 – 2 μg protein), TBP (≥ 2 – 4 μg protein), and PCNA (≥ 4 μg protein). Total protein staining was more sensitive than β -actin or TBP staining. Total protein staining of EC protein lysate showed maximum and median coefficient of variation of $\approx 20\%$ and $\approx 12\%$ for the EC lysate and $\approx 40\%$ and $\approx 17\%$ for vascular homogenate.

Conclusion The most sensitive dye for total protein staining in EC lysate and vascular homogenate is Acid Black 1, the most sensitive cytoplasmic housekeeping protein is β -actin, and the most sensitive nuclear housekeeping protein is TATA-binding protein (TBP). For the respective normalization, total protein staining can be employed if coefficient of variation is $\leq 20\%$ (for EC lysate) or $\leq 25\%$ (for vascular homogenate).

Keywords Western blotting • Endothelial cells • Blood vessels • Normalization • Housekeeping proteins • Beta-actin • TATA-binding protein

Received: 31.03.2026; received in revised form: 23.04.2026; accepted: 08.05.2026

Список сокращений

ЭК – эндотелиальные клетки

Введение

Корректная нормализация данных является необходимым условием для объективного полуколичественного анализа результатов вестерн-блоттинга (иммуноблоттинга). Основной задачей этапа нормализации является коррекция интенсивности сигнала целевого белка (белка интереса) с учетом поправки на контроль загрузки белка, что может быть выполнено посредством: 1) окрашивания мембраны из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида на общий белок (то есть визуализации всего белка, перенесенного на мембрану); 2) проведения дополнительного блоттинга с антителами к конститутивным белкам (белкам «домашнего хозяйства»), экспрессия которых не зависит от внешних условий до момента гибели клетки); 3) реблоттинга с использованием антител к конститутивным белкам (то есть повторного блота каждой мембраны после смывания антител к целевым белкам при помощи буферного раствора на основе детергентов); 4) мультиплексного блоттинга с одновременным использованием антител к конститутивным белкам (что достигается либо при помощи конъюгации вторичных антител с различными флуоресцентными метками, либо при помощи использования белков с различиями молекулярной массы не менее 30 кДа для их четкого дифференцирования при интерпретации результатов). Последующий результат при этом оценивается при помощи денситометрии (полуколичественного анализа интенсивности окрашивания белковых полос) с использованием соответствующего программного обеспечения (к примеру, ImageJ/FIJI) и подразумевает получение поправочного коэффициента для коррекции интенсивности сигнала от целевого антитела в зависимости от интенсивности соответствующего сигнала при окрашивании общего белка или от антитела к конститутивному белку. Это позволяет избежать ложноположительных или ложноотрицательных заключений, которые могут возникать вследствие различий в массе образца, загружаемого в лунки геля, неравномерного или неполного переноса белка из геля на мембрану, неполной отмывки вторичных антител, неравномерного распределения хемилуминесцентного реагента, неравномерного увеличения сигнала при изменении настроек интенсивности цвета или контрастности в процессе обработки изображений и прочих технических факторов, которые могут приводить к погрешности при оценке результатов иммуноблоттинга. От выбранного метода нормализации зависит возможность корректного сравнения результатов измерения различных образцов и, соответственно, достоверность интерпретации результатов.

В качестве конститутивных белков традиционно рассматриваются белки цитоскелета (в частности, β -актин и β -тубулин), ключевые ферменты

метаболизма (гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) или субъединицы фермента окислительного фосфорилирования цитохром-с-оксидазы (в частности, COX4)), структурные белки хроматина (к примеру, гистон H3), плейотропные транскрипционные факторы (к примеру, белок TBP, связывающийся с ТАТА-последовательностями в ДНК) или маркеры пролиферативной активности (к примеру, ядерный антиген пролиферирующих клеток PCNA). Данный подход основывается на предположении о стабильной экспрессии указанных белков вне зависимости от условий эксперимента. Однако на практике это соответствует истине далеко не всегда. Известно, что экспрессия β -актина и β -тубулина в ишемизированном миокарде существенно изменяется, в то время как экспрессия GAPDH остается стабильной [1]. При исследовании сухожилий свиней [2] и было показано, что экспрессия β -актина, β -тубулина и GAPDH между животными значительно варьирует [2]. Сравнение экспрессии данных белков в тканях колоректальной аденокарциномы и прилежащих интактных тканях также выявило повышение их экспрессии в опухолевых тканях в 1,3 – 1,7 раза при масс-спектрометрии и в 1,4 – 2,9 раза при иммуноблоттинге [3]. Таким образом, изменения экспрессии конститутивных белков под воздействием экспериментальных условий не являются редкими и потенциально делают подобную нормализацию необъективной. Кроме того, различные биологические ткани и типы клеток обладают индивидуальными структурными и функциональными особенностями, что требует дополнительного учета этого фактора при использовании конститутивных белков, в особенности метаболических (GAPDH или COX4). Все вышеперечисленное обуславливает необходимость определения оптимальных конститутивных белков при анализе гомогенатов элементов системы кровообращения (в частности, кровеносных сосудов), и лизатов культур выделенных из них клеток – к примеру, эндотелиальных клеток (ЭК). Другой проблемой является необходимость индивидуального подбора концентрации антитела к конститутивным белкам для предотвращения перенасыщения специфического сигнала и искажения результатов вследствие исходно высокой экспрессии конститутивных белков. Таким образом, нормализация на конститутивные белки имеет не только биологические, но и технические ограничения.

Альтернативой нормализации с использованием сигнала от антител к конститутивным белкам является нормализация на уровень общего (всего) белка, загруженного на мембрану из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, после его окрашивания соответствующими красителями. Данный под-

ход признан более объективным и воспроизводимым при значительной вариабельности экспрессии референсных белков, особенно в исследованиях с существенными различиями между экспериментальными условиями опытной и контрольной групп [4]. Такой метод анализа основан на оценке всего белкового содержимого в каждом образце без привязки к какому-либо отдельному белку, что позволяет снизить влияние колебаний экспрессии отдельных белков. Это достигается за счёт окрашивания мембраны специфично связывающимися с белками химическими соединениями (Acid Black 1, Fast Green FCF, Ponceau S и прочими), что обеспечивает прямую визуализацию общего белкового содержимого в каждом образце независимо от экспрессии отдельных белков [5]. В то же время нормализация на общий белок является весьма требовательной к качеству окрашивания, равномерности переноса белка с геля на мембрану и к типу мембраны – на нитроцеллюлозных мембранах белок визуализируется с более высокой чувствительностью и равномерностью [6]. Мембраны из поливинилиденфторида характеризуются большей механической прочностью и устойчивостью к многократному стриппингу, однако требуют специальной обработки для устранения аутофлюоресценции при флюоресцентной схеме детекции результатов иммуноблоттинга [6]. В одном из сравнительных исследований было показано, что мембраны из поливинилиденфторида обладают более высокой чувствительностью при детекции белков с низкой экспрессией и высокой молекулярной массой: для визуализации церулоплазмينا (~150 кДа) было достаточно 0,2 мкг белка на мембране из поливинилиденфторида против 0,8 мкг на мембране из нитроцеллюлозы [7]. В то же время мембраны из нитроцеллюлозы обеспечивали лучшее качество сигнала при работе с низкомолекулярными белками (менее 30 кДа) и невысоких количествах загружаемого белка [7]. Следует отметить, что предварительное проведение визуализации общего белка перед иммуноблоттингом может затруднять последующую детекцию специфических белков, особенно при их малом содержании в образце.

Несмотря на широкое распространение обоих приведенных подходов к нормализации специфического сигнала, остается открытым вопрос: какой из них обеспечивает большую чувствительность, линейность и воспроизводимость сигнала в лабораторной практике? Литературные данные указывают как на преимущества, так и на ограничения каждого подхода, что затрудняет выбор оптимальной стратегии для конкретных задач. В данной работе было проведено поэтапное исследование, включающее:

1. Оценку и отбор красителей для визуализации общего белка в лизате культур ЭК и гомогенате кровеносных сосудов с последующим выбором

наиболее чувствительного, линейного и воспроизводимого варианта;

2. Анализ чувствительности, линейности и воспроизводимости окрашивания лизата культур ЭК и гомогената кровеносных сосудов антителами к различным конститутивным белкам при флюоресцентной и хемиллюминесцентной детекции с дальнейшим сравнением данных параметров с таковыми при нормализации на общий белок;

3. Анализ вариабельности сигнала между различными образцами на одной мембране (с расчетом коэффициента вариации) при окрашивании лизата культур ЭК и гомогената кровеносных сосудов на общий белок на расширенной выборке экспериментальных данных.

Цель исследования – определить оптимальный метод нормализации при иммуноблоттинге путем сравнения окрашивания общего белка и конститутивных белков в лизате культур ЭК и гомогенате кровеносных сосудов с учетом чувствительности, линейности и воспроизводимости данных подходов.

Материалы и методы

Получение белковых образцов из тканей и клеточных культур

Для проведения экспериментов были использованы различные источники белка, а именно immortalized ЭК пупочной вены человека линии EA.hy 926 (гибридома первичных ЭК пупочной вены человека и линии аденокарциномы легкого человека A549), первичных ЭК пупочной вены (HUVEC, 200K-05f, Cell Applications), коронарной артерии (HCAEC, 300K-05a, Cell Applications) и внутренней грудной артерии (HITAEC, 308K-05a, Cell Applications) человека, гингивальных фибробластов, остеобластов, подкожной жировой ткани и гомогенизированной сонной артерии человека. Культивирование ЭК выполняли по ранее опубликованному протоколу [8, 9]. Клеточная культура гингивальных фибробластов была предоставлена Покровским банком стволовых клеток. Клетки высевались на чашки Петри, предварительно покрытые 0,2% раствором желатина (1.4.6., Биолот). Культивирование проводилось в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM) с концентрацией глюкозы 1 г/л (С435п, ПанЭко), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (1.1.8.1., Биолот), 1% раствора пенициллина-стрептомицина-амфотерицина В (L0010-100, Biowest) и 1% аланил-глутамин (Ф005-2/Ф005Е, ПанЭко). Первичные остеобласты человека были выделены из биоптатов эпифиза губчатой костной ткани бедренной или большеберцовой кости, полученных от пациентов в ходе эндопротезирования коленного или тазобедренного сустава. Образцы костной ткани были предоставлены Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный меди-

цинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Подробная применяемая методика получения и ведения остеобластов описана в статье [10].

Для анализа белка в образцах гомогенатов сосудов микроциркуляторного русла использовали образцы эпикардиальной, периваскулярной и подкожной жировой ткани, полученные от пациентов с ожирением и без него. Образцы промывали стерильным раствором хлорида натрия и гомогенизировали в буфере T-PER (78510, Thermo Fisher Scientific) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (78444, Thermo Fisher Scientific) с использованием прибора FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) и пробирок Lysing Matrix S (116925050-CF, MP Biomedicals). После первичного центрифугирования при $14\ 000 \times g$ в течение 10 минут надосады дополнительно центрифугировали при $200\ 000 \times g$ (Optima MAX-XR, Beckman Coulter) в течение 1 часа для удаления нерастворимых компонентов внеклеточного матрикса. Аналогичный протокол применяли при выделении белка из сонной артерии человека [11]. Таким же образом был выделен белок из атеросклеротических бляшек сонной артерии человека и прилежащих интактных артериальных сегментов [12]. Во всех случаях определение концентрации белка выполняли с использованием набора BCA Protein Assay Kit на основе 2,2-бицинониновой кислоты и сульфата меди (23227, Thermo Fisher Scientific) и спектрофотометра Multiskan Sky (51119700DP, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя.

Протокол исследования и сбор клинических образцов были одобрены Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ (протокол заседания № 5 от 10.04.2023 г.). От пациентов было получено информированное добровольное согласие на использование биоматериала в научных целях, включая публикацию полученных данных в обезличенном виде. Исследование выполнялось в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации (2013 г.).

Электрофорез белков

Образцы белкового лизата (либо по 10 мкг белка в каждом из образцов внутри одной загрузки, либо в виде серийного разведения в 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг белка) смешивали с загрузочным буфером OrangeMark (K-023, AppScience Products) при флюоресцентной схеме детекции или VioletMark (K-022, AppScience Products) при хемилюминесцентной схеме детекции в соотношении 6:1, денатурировали при 99°C в течение 5 минут (Термит, ДНК-Технология), после чего вносили в 10-луночный гель на основе бис-трис-буфера с 10%-ной

концентрацией полиакриламида (соотношение акриламида к метилен-бис-акриlamиду 37,5:1) собственного изготовления толщиной 1,5 мм. В качестве маркера молекулярных масс для иммуноблоттинга с флюоресцентной схемой детекции использовали Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder (928-60000, LI-COR Biosciences), для иммуноблоттинга с хемилюминесцентной схемой детекции – EasySee II (TransGen-DM211-01, Transgen Biotech). Разделение белков проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при 250 В в течение 40 минут с использованием буфера для электрофоретического разделения белков на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты G-RUN MES (K-021, AppScience Products), антиоксиданта G-NOOX (K-027, AppScience Products) и вертикальной системы для электрофореза WIX-easyPRO4 Mini Easy (10110001, WIX Technologies). Перенос белков осуществляли с использованием нитроцеллюлозных (IB23001, Thermo Fisher Scientific) и поливинилиденфторидных (IB24001, Thermo Fisher Scientific) мембран и прибора iBlot 2 Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя в стандартном режиме переноса для белков от 30 до 150 кДа (P0 – 20 В в течение 1 минуты, 23 В в течение 4 минут, 25 В в течение 2 минут).

Иммуноблоттинг

После переноса белков с геля мембраны инкубировали в растворе Block'n'Boost! (K-028, AppScience Products) в течение 1 часа для предотвращения неспецифического связывания. Иммуноблоттинг выполняли с использованием антител мыши к белку CD31/PECAM1 (SLM-10825M, Sunlong Biotech), β -актину (SLM-33036M, Sunlong Biotech), β -тубулину (SLM-33034M, Sunlong Biotech), GAPDH (SLM-33033M, Sunlong Biotech), TBP (SLM-33227M, Sunlong Biotech), PCNA (SLM-2006M, Sunlong Biotech), гистону H3 (SLM-33042M, Sunlong Biotech) и COX4 (SLM-33037M, Sunlong Biotech) в разведении 1:1000. Данные белки «домашнего хозяйства» (housekeeping proteins) были выбраны на основании анализа литературы [1-3], а также на основании рекомендаций соответствующих производителей, расположенных на их официальных сайтах (Abcam, Thermo Fisher Scientific, Novus Biologicals, LI-COR Biosciences, Bio-Rad). Белок CD31/PECAM1 был выбран вследствие сочетания высокого базового уровня конститутивной экспрессии в ЭК и специфичности для ЭК на основании проведенных ранее экспериментов [8]; следует отметить, что он не относится к белкам «домашнего хозяйства», в том числе и вышеуказанными источниками литературы, в классическом определении данного понятия.

Для флуоресцентной детекции использовали вторичные антитела козла против мыши, конъюгированные с флюорофорами 680RD (926-68070, LI-COR Biosciences) или 800CW (926-32210, LI-COR Biosciences) в разведении 1:1000. Хемилюминесцентную детекцию проводили с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Fisher Scientific). Инкубацию с антителами проводили с использованием раствора Block'n'Boost! (K-028, AppScience Products), карточек iBind Flex (SLF2010, Thermo Fisher Scientific) и прибора iBind Flex Western Device (SLF2000, Thermo Fisher Scientific) в течение 3 часов в соответствии с протоколом производителя. Визуализацию флуоресцентного и хемилюминесцентного сигнала осуществляли с помощью системы Odyssey XF (LI-COR Biosciences). Для визуализации флюорофора 680RD использовали канал с длиной волны 700 нм (возбуждение – 685 нм, испускание – 730 нм, красное свечение), для визуализации флюорофора 800CW – канал с длиной волны 800 нм (возбуждение – 785 нм, испускание – 830 нм, зеленое свечение).

Окрашивание мембран на общий белок

Сразу после переноса белка на мембраны из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, а также после проведения иммуноблоттинга и визуализации сигнала мембраны инкубировали с различными красителями для оценки содержания общего белка. Мембраны окрашивали в 0,1% растворе Fast Green FCF (SRL-60339-5, Sisco Research Laboratories) и 0,1% растворе Acid Black 1 (A2097, Tokyo Chemical Industry) в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации мембраны отмывали в бидистиллированной воде в течение 10 минут. При окрашивании Ponceau S (6226-79-5, HiMedia) мембраны инкубировали в 0,1% растворе красителя в течение 10 минут и быстро (не более 5 секунд) отмывали в бидистиллированной воде. При окрашивании Конго красным мембраны предварительно активировали в метаноле (8.07.00035, Химреактивснаб) в течение 5 минут, инкубировали с 0,1% раствором красителя (100472, ЛенРеактив) при комнатной температуре в течение 15 минут и отмывали в бидистиллированной воде до полной прозрачности, в растворе хлорида натрия (1 моль/л) для удаления избытка красителя и снова в бидистиллированной воде в течение 2 минут. При окрашивании нигрозином 0,1% раствором нигрозина (8005-03-6, Химреактивснаб) мембраны предварительно промывали в воде (5 минут), инкубировали с красителем в течение 15 минут при комнатной температуре, отмывали до прозрачности, инкубировали в 1% растворе уксусной кислоты (14-3, ЭКОС-1) в течение 5 минут и вновь отмывали в бидистиллированной воде в течение 2 минут. Дополнительно

использовали коммерческий набор Revert 700 Total Protein Stain Kit (926-11016, LI-COR Biosciences) в соответствии с инструкцией производителя.

В качестве альтернативного метода применяли визуализацию белка по безокрасочной технологии на основе 2,2,2-трихлорэтанола (T819396, Shanghai Macklin Biochemical Technology), который добавляли в состав полиакриламидного геля в концентрации 2% до полимеризации акриламида. После проведения электрофореза гель подвергали ультрафиолетовой экспозиции в течение 5 минут с использованием гель-документирующей системы XR+ (Bio-Rad). Далее белок переносили на мембраны из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида без дополнительного окрашивания. Визуализацию общего белка также проводили с использованием гель-документирующей системы XR+ (Bio-Rad) и экрана для визуализации полиакриламидных гелей в ультрафиолетовом свете по безокрасочной технологии (12003028, Bio-Rad).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Для оценки линейности использовали анализ линейной регрессии с вычислением коэффициента детерминации (R^2). Дополнительно применяли Runs test для проверки отклонения данных от прямолинейной зависимости. Для оценки вариабельности специфичного сигнала использовали коэффициент вариации (CV) с расчетом 0-го перцентиля (минимальное значение), 10-го, 25-го, 50-го (медианы), 75-го, 90-го и 100-го (максимальное значение) перцентилей.

Результаты

В рамках данного исследования была проведена серия экспериментов, направленных на определение наиболее объективного подхода к нормализации данных иммуноблоттинга. На первом этапе исследования было проведено сравнение пяти красителей – Acid Black 1 (Амидо черный 10В), Fast Green FCF (зеленый прочный), Ponceau S (Понсо S), Congo Red (Конго красный), нигрозина и запатентованного компанией LI-COR Biosciences красителя Revert 700 – на мембранах из поливинилиденфторида и нитроцеллюлозы после переноса белка с полиакриламидного геля. Целью данного этапа было определить универсальный краситель с наиболее высокой чувствительностью и воспроизводимостью независимо от типа мембраны. Наиболее высокую интенсивность при окрашивании одинаковой массы белка лизата культур ЭК (10 мкг) на обоих типах мембран продемонстрировали Acid Black 1 и Fast Green FCF, при окрашивании которыми белковые полосы равномерно визуализировались по всему диапазону молекулярных

масс с минимальными артефактами (рис. 1). При этом интенсивность окрашивания Fast Green FCF была ниже, чем Acid Black 1 (особенно на мембране из поливинилиденфторида, рис. 1). Окрашивание Конго красным перенесенных на мембрану из нитроцеллюлозы белков показало более высокую контрастность при окрашивании белков с высокой экспрессией, однако существенно более низкую контрастность при окрашивании белков с низкой экспрессией (рис. 1). Окрашивание нигрозином и

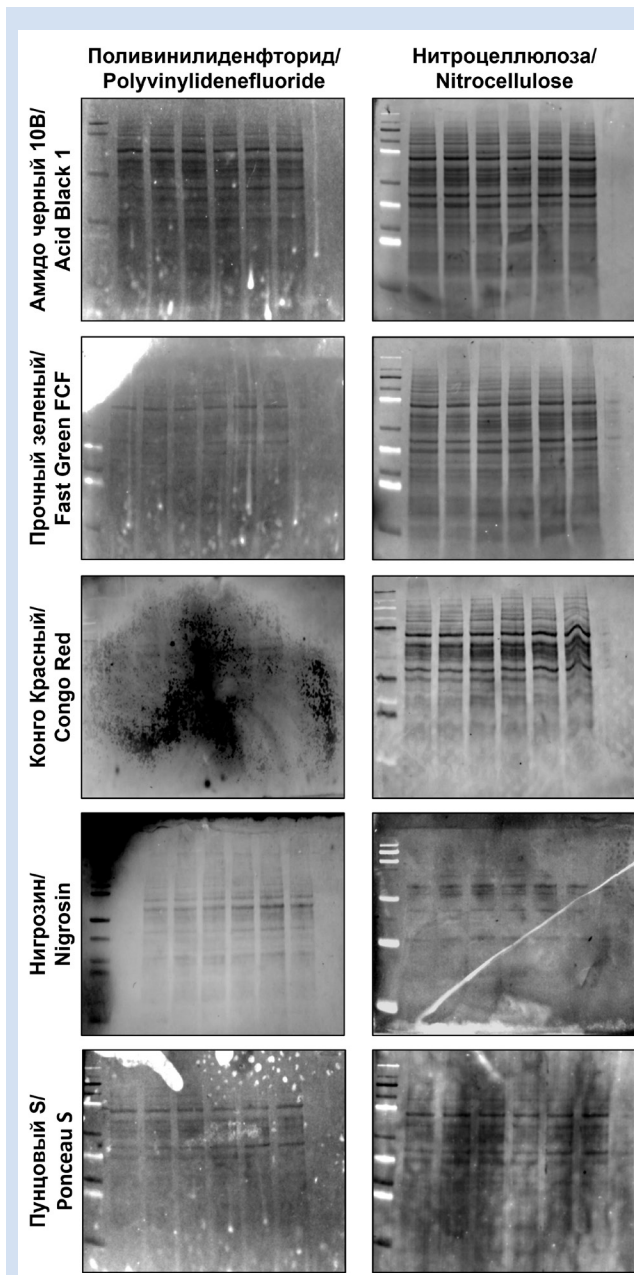


Рисунок 1. Окрашивание общего белка, перенесенного на мембраны из поливинилиденфторида (слева) или нитроцеллюлозы (справа), с использованием пяти различных красителей – Acid Black 1, Fast Green FCF, Конго красное, Понсо S и нигрозина. Загрузка белка: 10 мкг лизата иммортализованных ЭК пупочной вены человека EA.hy 926 на лунку

Figure 1. Total staining of proteins transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (left) or nitrocellulose membranes (right) using five different dyes: Acid Black 1, Fast Green FCF, Congo Red, Ponceau S, and nigrosin. Protein loading: 10 μ g of EA.hy 926 immortalized human umbilical vein endothelial cell lysate per well

Понсо S не показало удовлетворительных результатов даже при окрашивании перенесенных на мембрану из нитроцеллюлозы белков (рис. 1). Следует отметить, что окрашивание перенесенных на мембрану из поливинилиденфторида белков не привело даже к удовлетворительным результатам при окрашивании всеми красителями, за исключением Acid Black 1 (рис. 1). В то же время при окрашивании мембран из нитроцеллюлозы достаточное для полуколичественного анализа качество наблюдалось после использования Acid Black 1, Fast Green FCF и Конго красного (рис. 1). На основании этих результатов Acid Black 1 и Fast Green FCF были выбраны в качестве наиболее чувствительных и универсальных красителей для визуализации общего белка в дальнейших экспериментах.

Далее было проведено сравнение чувствительности, линейности и воспроизводимости окрашивания общего белка лизата культур ЭК при его градиентной загрузке (1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг) на мембраны из поливинилиденфторида и нитроцеллюлозы. Для этого были использованы отобранные на первом этапе исследования Acid Black 1 и Fast Green FCF, а также запатентованный компанией LI-COR Biosciences краситель Revert 700. Как и на первом этапе исследования, на обоих типах мембран Acid Black 1 и Fast Green FCF обладали высокой чувствительностью и интенсивностью окрашивания белковых полос, которые детектировались даже при загрузке 1 мкг белка, при этом интенсивность окрашивания белковых полос по

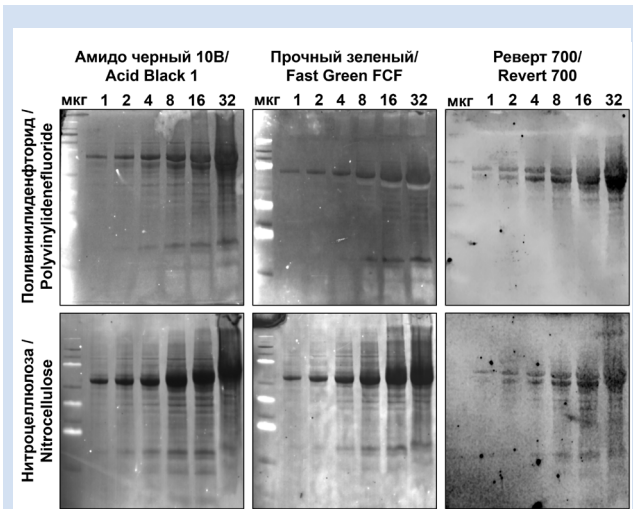


Рисунок 2. Окрашивание общего белка, перенесенного на мембраны из поливинилиденфторида (сверху) или нитроцеллюлозы (снизу), с использованием красителей Acid Black 1, Fast Green FCF и Revert 700. Загрузка белка слева направо путем последовательного двукратного разбавления: 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг лизата иммортализованных ЭК пупочной вены человека EA.hy 926 на лунку

Figure 2. Total staining of proteins transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (top) or nitrocellulose membranes (bottom) using Acid Black 1, Fast Green FCF, and Revert 700 dyes. Protein loading from left to right by serial twofold dilution: 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μ g of EA.hy 926 immortalized human umbilical vein endothelial cell lysate per well

всему их диапазону при окрашивании Acid Black 1 была существенно выше, чем Fast Green FCF (рис. 2). Как и на первом этапе исследования, окрашивание перенесенных на мембрану из нитроцеллюлозы белков показало существенно более высокую интенсивность и контрастность в сравнении с мембранами из поливинилиденфторида (рис. 2). Окрашивание белка Revert 700 показало удовлетворительный результат при использовании мембран из поливинилиденфторида (с меньшей интенсивностью окрашивания малых концентраций белка и большей интенсивностью окрашивания высоких концентраций белка), однако продемонстрировало существенно меньшую чувствительность и линейность при применении мембран из нитроцеллюлозы (рис. 2).

Для оценки возможности устранения самой процедуры окрашивания общего белка была применена добавление 2% 2,2,2-трихлорэтанола в полиакриламидный гель до его полимеризации с последующей детекцией белка по безокрасочной технологии после ультрафиолетовой экспозиции. Несмотря на возможность детекции даже 2-4 мкг белка в полиакриламидном геле, после переноса на мембрану удовлетворительной чувствительности для детекции белка добиться не удалось, что исключает возможность использования данной технологии вместо окрашивания классическими белковыми красителями типа Acid Black 1 или Fast Green FCF (рис. 3). На основании проведенных экспери-

ментов в качестве наиболее чувствительного красителя для детекции общего белка был выбран Acid Black 1, а в качестве приоритетного материала для изготовления мембран – нитроцеллюлоза (рис. 3). Кроме того, важным преимуществом мембран из нитроцеллюлозы перед мембранами из поливинилиденфторида является их применимость для флюоресцентной детекции при иммуноблоттинге (мембраны из поливинилиденфторида требуют для этого специальной обработки).

На втором этапе исследования было проведено сравнение чувствительности, линейности и воспроизводимости окрашивания различных конститутивных белков ЭК при флюоресцентной двухканальной и хемилюминесцентной (одноканальной) схемам детекции. Для оценки линейности и воспроизводимости детекции специфичного сигнала было использовано последовательное двукратное разведение белка (1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг) и применены коэффициент детерминации (R^2) и коэффициент вариации. Для улучшения качества денситометрического анализа все изображения окрашенных флюоресцентно мечеными антителами мембран были дополнительно переведены в градации серого, поскольку в исходных цветных изображениях визуализация белковых полос низкой интенсивности может быть затруднительна.

Детекция красного флюорофора 680RD на канале с длиной волны 700 нм (возбуждение – 685 нм, испускание – 730 нм) продемонстрировала меньшую чувствительность в сравнении с детекцией зеленого флюорофора 800CW на канале с длиной волны 800 нм (возбуждение – 785 нм, испускание – 830 нм, рис. 4). Использование красного флюорофора 680RD не позволяло детектировать менее 4 мкг белка при использовании любого из конститутивных белков в качестве маркера (рис. 4). В то же время использование зеленого флюорофора 800CW позволяло детектировать 1 мкг белка при окрашивании антителами к β -актину, TBP, PCNA и COX4 и 2 мкг белка при окрашивании антителами к CD31/PECAM1 (рис. 4). Во всех 8 случаях чувствительность зеленого флюорофора 800CW была выше, чем красного флюорофора 680RD (рис. 4). Наиболее высокая чувствительность (возможность минимальной детекции 1 мкг белка и убедительной детекции 2 мкг белка) была продемонстрирована при окрашивании антителами к β -актину, TBP и COX4, в то время как при окрашивании антителами к PCNA минимальная детекция была возможна при 2 мкг белка, а отчетливая – при 4 мкг (рис. 4). При сравнении флюоресцентной детекции с использованием зеленого флюорофора 800CW и хемилюминесцентной детекции была выявлена сопоставимая чувствительность обеих указанных схем (в двух случаях более высокой чувствительностью обладала детекция зеленого флюорофора 800CW, в

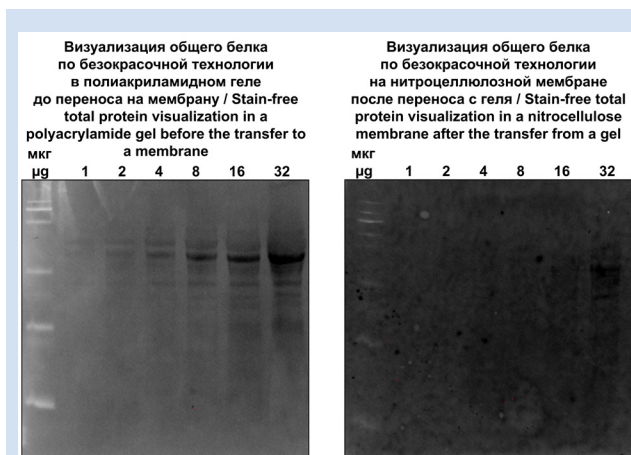


Рисунок 3. Визуализация общего белка до переноса на мембрану из нитроцеллюлозы (в полиакриламидном геле, слева) и после переноса на мембрану из нитроцеллюлозы (справа) по безокрасочной технологии при добавлении 2% 2,2,2-трихлорэтанола в полиакриламидный гель до его полимеризации. Загрузка белка слева направо путем последовательного двукратного разбавления: 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг лизата иммортализованных ЭК пупочной вены человека EA.hy 926 на лунку

Figure 3. Total protein visualization before the transfer to a nitrocellulose membrane (in the polyacrylamide gel, left) and after the transfer to a nitrocellulose membrane (right) using a stain-free technology with the addition of 2% 2,2,2-trichloroethanol to the polyacrylamide gel before polymerization. Protein loading from left to right by serial twofold dilution: 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μ g of EA.hy 926 immortalized human umbilical vein endothelial cell lysate per well

четырёх – хемилюминесцентная детекция, рис. 4). В частности, хемилюминесцентная схема детекции позволяла детектировать 1 мкг белка при окрашивании антителами к CD31/PECAM1, β -актину, β -тубулину и TBP (рис. 4). Наиболее высокий коэффициент детерминации регистрировался при окрашивании антителами к TBP (0,975 при флюоресцентной схеме детекции с зеленым флюорофором 800CW и 0,979 при хемилюминесцентной схеме детекции), PCNA (0,926 и 0,974 соответственно), GAPDH (0,942 и 0,993 соответственно), β -актину (0,828 и 0,983 соответственно) и COX4 (0,945 и 0,857 соответственно, рис. 4). Следует отметить, что для PCNA, β -актина и COX4 высокая линейность также наблюдалась и при флюоресцентной схеме детекции с красным флюорофором 680RD (0,903, 0,920 и 0,964 соответственно, рис. 4). Наименьшую чувствительность продемонстрировали β -тубулин и гистон H3 (детектируемые даже с использованием зеленого флюорофора 800CW лишь при загрузке 16 мкг белка), хотя применение хеми-

люминесцентной схемы детекции позволяло детектировать гистон H3 при загрузке 4 мкг белка (рис. 4). Использование антител к наиболее часто используемому для нормализации конститутивному белку (GAPDH) показало неоднозначные результаты с его минимальной детекцией при загрузке 4 мкг белка и убедительной детекцией при загрузке 8 мкг белка в сочетании с высокой интенсивностью при более высокой загрузке в отличие от CD31, β -тубулина и COX4 (рис. 4). В то же время использование антител к эндотелиальному маркеру CD31/PECAM1 не показало убедительных результатов при иммуноблоттинге с флюоресцентной схемой детекции, хотя и может быть использовано при анализе лизата культур ЭК по данным более ранних исследований нашей группы, а также по результатам иммуноблоттинга с хемилюминесцентной схемой детекции (где он детектировался даже при загрузке 1 мкг белка, рис. 4). Сопоставив показатели чувствительности и линейности, а также принимая во внимание необходимость выбора цитоплазматического, ядерного и митохон-

дриального конститутивных белков для различных экспериментальных нужд, можно сделать вывод о целесообразности использования в этом качестве β -актина, TBP (с опциональной заменой на PCNA) и COX4. В то же время чувствительность окрашивания общего белка превысила чувствительность окрашивания антителами к β -актину и TBP (за счет более высокой интенсивности полос, рис. 2 и рис. 4).

На последнем этапе исследования был проведен расчет коэффициента вариации при анализе окрашивания общего белка, загруженного на мембраны из нитроцеллюлозы в семи независимых экспериментах, ранее выполненных в нашей лаборатории с лизатами ЭК и гомогенатами кровеносных сосудов (всего 81 мембрана). Данный сплошной анализ генеральной совокупности был выполнен с целью определения порогового значения для принятия решения о выборе подхода к нормализации специфического сигнала (окрашивание на общий белок и окрашивание антителами к конститутивным белкам) в реальной лаборатор-

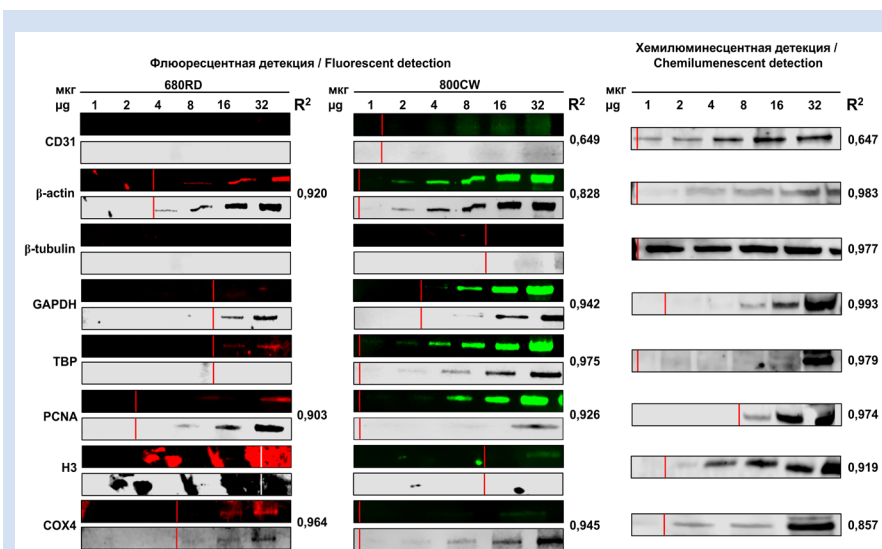


Рисунок 4. Визуализация трансмембранных (CD31/PECAM1), цитоплазматических (β -актин, β -тубулин, GAPDH), ядерных (TBP, PCNA, гистон H3) и митохондриальных (COX4) конститутивных белков при иммуноблоттинге. Загрузка белка слева направо путем последовательного двукратного разбавления: 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мкг лизата иммортализованных ЭК пупочной вены человека EA.hy 926 на лунку. Слева: иммуноблоттинг с флюоресцентной двухканальной схемой детекции (флюорофор 680RD на красном канале, флюорофор 800CW на зелёном канале). Справа: иммуноблоттинг с хемилюминесцентной схемой детекции. Флюоресцентные изображения представлены в исходном цвете и дополнительно переведены в градации серого для проведения денситометрического анализа. Красной линией на изображениях отмечена минимальная концентрация белка, при которой визуализируется минимально различимая белковая полоса. Для каждого конститутивного белка рассчитан коэффициент детерминации (R^2), отражающий линейность сигнала

Figure 4. Visualization of transmembrane (CD31/PECAM1), cytoplasmic (β -actin, β -tubulin, GAPDH), nuclear (TBP, PCNA, histone H3), and mitochondrial (COX4) housekeeping proteins by immunoblotting. Protein loading from left to right by serial twofold dilution: 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μ g of EA.hy 926 immortalized human umbilical vein endothelial cell lysate per well. Left: immunoblotting with a two-channel fluorescence detection scheme (680RD fluorophore in the red channel and 800CW fluorophore in the green channel). Right: immunoblotting with a chemiluminescence detection scheme. Fluorescence images are shown in their original colors and additionally converted to grayscale for densitometric analysis. The red line in the images indicates the minimum protein concentration at which a minimally distinguishable protein band is visualized. For each housekeeping protein, the coefficient of determination (R^2), reflecting signal linearity, was calculated

ной практике. Такой подход позволил включить в исследование различные источники белка – гомогенаты жировой ткани, интактной сонной артерии человека, атеросклеротических бляшек и интактных прилежащих сегментов сонной артерии человека, лизат первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии и пупочной вены человека, лизат гингивальных фибробластов и остеобластов (таблица). В каждом эксперименте рассчитывали значения коэффициента вариации по отдельным мембранам, после чего определяли медианное значение для всего массива данных, что позволило оценить вариабельность внутри каждого из семи выполненных экспериментов (таблица). Медиана (50-й перцентиль) коэффициента вариации, 75-й и 90-й перцентиль коэффициента вариации по всем мембранам (n = 81) составили 16,5% (при диапазоне медианных значений между экспериментами от 13,25% до 23,68%), 22,24% от 16,10% до 31,57%)

и 30,50% (от 17,52% до 36,78%, таблица). Это указывает на умеренную и приемлемую вариабельность общего белка в большинстве проведенных экспериментов и позволяет рекомендовать значение коэффициента вариации в 25% (приблизительно соответствующее 75-му перцентиллю, таблица). При этом для гомогенатов кровеносных сосудов 75-й перцентиль коэффициента вариации составил 23,76% (от 18,88% от 31,57%), что также позволяет использовать значение коэффициента вариации в 25% в качестве порогового (таблица). В то же время для лизатов клеточных культур максимальное значение коэффициента вариации составило 20,22%, что позволяет рекомендовать для данного вида биоматериала пороговое значение коэффициента вариации в 20% (таблица). При превышении этого значения предпочтительнее использовать нормализацию на конститутивные белки (в случае анализа цитоплазматических белков – на β -актин,

Анализ вариабельности уровня общего белка (детектированного при окрашивании Fast Green FCF), выделенного из различного биоматериала, в семи независимых экспериментах (четыре эксперимента с гомогенатами кровеносных сосудов и трех экспериментах с лизатами культур ЭК)

Analysis of variability in total protein levels, detected by Fast Green FCF staining, isolated from different biological materials in seven independent experiments: four experiments with blood vessel homogenates and three experiments with EC culture lysates

№	Тип образцов / Sample type	Кол-во мембран / Number of membranes	CVmin (%)	10% CV	25% CV	50% CV	75% CV	90% CV	CVmax (%)
1	Гомогенат жировой ткани (эпикардальная, периваскулярная, подкожная) человека / Homogenate of human epicardial, perivascular, or subcutaneous adipose tissue	29	8,53	8,97	11,89	15,19	18,88	23,96	32,86
2	Гомогенат жировой ткани (эпикардальная, подкожная) человека / Homogenate of human epicardial, perivascular, or subcutaneous adipose tissue	23	10,10	10,58	16,71	21,87	28,3	33,43	39,41
3	Гомогенат интактной сонной артерии человека / Homogenate of intact human carotid artery	7	7,37	7,37	11,47	13,25	20,23	30,54	30,54
4	Гомогенат атеросклеротических бляшек и интактных прилежащих сегментов сонной артерии человека / Homogenate of human atherosclerotic plaque and adjacent intact carotid artery	5	12,06	12,06	16,53	23,68	31,57	36,78	36,78
Совокупные значения по всем экспериментам с гомогенатами кровеносных сосудов / Total values for all experiments with vascular homogenates		64	7,37	9,32	12,96	16,92	23,76	32,11	39,41
5	Лизат первичных ЭК коронарной и внутренней грудной артерии человека / Lysate of primary human coronary artery and internal thoracic artery endothelial cells	7	5,23	5,23	11,22	15,10	16,10	17,52	17,52
6	Лизат первичных ЭК пупочной вены человека / Lysate of primary human umbilical vein endothelial cells	4	11,89	11,89	12,31	14,51	17,44	18,09	18,09
7	Лизат гингивальных фибробластов и остеобластов / Lysate of gingival fibroblasts and osteoblasts	6	10,98	10,98	11,81	14,75	19,95	20,22	20,22
Совокупные значения по всем экспериментам с лизатами клеточных культур / Total values for all experiments with endothelial cell lysates		17	5,23	9,83	11,99	15,1	17,33	19,94	20,22
Совокупные значения по всем экспериментам / Total values for all experiments with vascular homogenates and endothelial cell lysates		81	5,23	9,49	12,42	16,50	22,24	30,50	39,41

Примечание: ЭК – эндотелиальные клетки; CV – коэффициент вариации.
Note: CV – coefficient of variation.

ядерных белков – на ТВР, митохондриальных белков – на СОХ4).

Обсуждение

Выбор подходящего метода нормализации специфического сигнала при иммуноблоттинге является ключевым этапом для обеспечения достоверности и воспроизводимости последующего полуколичественного анализа белков. На практике наиболее часто применяются два подхода: использование конститутивных белков и нормализация на общий белок (совокупность всех белков в образце, окрашенных непосредственно на мембране). Несмотря на широкое распространение обоих методов, в литературе нет единогласного или консенсусного мнения относительно их универсальности, и в ряде работ подчеркивается необходимость адаптации стратегии нормализации под конкретные экспериментальные условия [13–15]. При этом производители химических реактивов для иммуноблоттинга (в том числе антител) рекомендуют использование нормализации на общий белок (total protein normalization / total protein staining) в качестве приоритетного метода коррекции сигнала, в то время как в академическом сообществе более стандартным способом этого является использование антител к конститутивным белкам (в первую очередь GAPDH) [16–18]. Тем не менее, в последние годы наблюдается тенденция к более широкой рекомендации использования окрашивания на общий белок как способа нормализации [19–24]. В контексте нормализации специфического сигнала иммуноблоттинг с флюоресцентной схемой детекции имеет определенные преимущества, поскольку позволяет одновременно анализировать содержание двух белков (к примеру, белка интереса с использованием более чувствительного флюорофора 800CW на зеленом канале и конститутивного белка с использованием менее чувствительного флюорофора 680RD на красном канале), требует использования мембран из нитроцеллюлозы для исключения фонового свечения (дополнительным преимуществом чего является более высокая интенсивность и контрастность при окрашивании на общий белок) [25], а также позволяет последующую количественную оценку сигнала вследствие линейности интенсивности свечения флюоресцентных меток в сравнении с нелинейной реакцией фермента и субстрата при хемилюминесцентной схеме детекции [26–28]. Следует отметить, что фоновое свечение при флюоресцентной съемке возможно исключить также и на мембранах из поливинилиденфторида, однако это требует специальной обработки, увеличивающей стоимость соответствующего анализа [29]. Тем не менее, качество полуколичественного анализа в таком случае не уступает таковому при использовании мембран из нитроцеллюлозы [29].

Наиболее классическими красителями для окрашивания общего белка в полиакриламидных гелях являются бриллиантовый синий Кумасси (G-250 и R-250) и нитрат серебра, однако протокол окрашивания красителями Кумасси несовместим с мембранами из нитроцеллюлозы (требуя для окрашивания также уксусной кислоты в сочетании с метанолом или этанолом, растворяющих нитроцеллюлозу) [30]. Окрашивание нитратом серебра или специфическими гелевыми красителями (к примеру, чувствительным красителем ProteOrange от российской компании LumiProbe) также несовместимо с окрашиванием белка на мембранах, что требует использования альтернативных красителей. К таким красителям можно отнести использованные в данной работе Acid Black 1, Fast Green FCF, Конго красный, Понсо S, нигрозин (индийские чернила), коллоидное серебро и коллоидное золото, семейство красителей SYPRO и целый ряд запатентованных коммерческих красителей (Revert 700 от компании LI-COR Biosciences), Pierce Reversible Protein Stain Kit и MemCode Reversible Protein Stain Kit (Thermo Fisher Scientific), TotalStainQ и AzureRed Fluorescent Total Protein Stain (Azure Biosystems), а также другие. Различные исследования показывают более высокую эффективность использования тех или иных красителей (к примеру, Понсо S [31–34], Конго красного [35, 36], Acid Black 1 [37], различных коммерческих красителей [38–40]), использования безокрасочной технологии для детекции белка на мембранах [41–44], а также указывают на преимущества окрашивания общего белка различными красителями в сравнении с окрашиванием антителами к конститутивным белкам [45–47].

В рамках данной работы был проведен поэтапный анализ для выбора наиболее объективного метода нормализации, начиная с оценки чувствительности, линейности и воспроизводимости различных красителей. Наиболее чувствительным из белковых красителей был Acid Black 1, обеспечивающий линейную визуализацию ≥ 1 мкг общего белка на мембранах из нитроцеллюлозы и поливинилиденфторида с наименьшим фоновым окрашиванием. В качестве варианта резерва для мембран из нитроцеллюлозы (но не поливинилиденфторида) может быть использован Fast Green FCF, обладающий сопоставимой, хотя и меньшей чувствительностью и высокой линейностью. Отдельный интерес представляла оценка безокрасочной технологии детекции белка при помощи 2,2,2-трихлорэтанола, широко позиционируемая как быстрая и удобная альтернатива классическим методам окрашивания. Несмотря на качественную визуализацию белка на геле до его переноса на мембрану, результаты его визуализации непосредственно на мембране из нитроцеллюлозы оказались неудовлетворительными. Таким образом, данный метод может быть реко-

мендован для визуализации белка при анализе результатов электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (не требующего переноса белка с геля мембрану), однако не может быть рекомендован для анализа результатов иммуноблоттинга.

Анализ чувствительности, линейности и воспроизводимости окрашивания антителами к конститутивным белкам ЭК показал значительную вариабельность данных параметров. Наибольшей чувствительностью среди цитоплазматических белков обладал β -актин, среди ядерных белков – ТВР и PCNA, среди митохондриальных – COX4. Наиболее часто используемый для нормализации при иммуноблоттинге конститутивный белок (GAPDH) показал приемлемую линейность и интенсивность при высоких концентрациях белка, но обладал меньшей чувствительностью. В качестве универсальной метрики для выбора способа нормализации специфичного сигнала при иммуноблоттинге предлагается использовать коэффициент вариации (к примеру, по аналогии с иммуноферментным анализом).

С учетом того, что максимальный коэффициент вариации при сплошном анализе лабораторной практики окрашивания лизатов культур ЭК на общий белок при помощи Fast Green FCF составил $\approx 20\%$, а медиана – $\approx 12\%$, в данном случае окрашивание на общий белок можно предположить в качестве метода выбора. В то же время при анализе окрашивания гомогенатов кровеносных сосудов на общий белок максимальный и медианный коэффициент вариации составил $\approx 40\%$ и $\approx 17\%$ соответственно, что предполагает повышение допустимого порогового значения коэффициента вариации до 25% (то есть до значения, приблизительно соответствующего 75-му перцентилю в реальной лабораторной практике) с учетом объективно более сложного разделения белков в данном виде образцов. При превышении коэффициента вариации в 20% (для лизатов культур ЭК) и в 25% (для гомогенатов кровеносных сосудов) следует использовать окрашивание антителами к конститутивным белкам (β -актину, ТВР либо COX4). Другие исследования предлагают использовать в качестве порогового на порядок или по меньшей мере кратно более низкий коэффициент вариации (2–5% [48] либо 7–8% [49]), однако в реальной практике флюоресцентного иммуноблоттинга рутинное получение таких значений при проведении денситометрии объективно представляется маловероятным (даже минимальное значение коэффициента вариации при полуколичественном анализе окрашивания на общий белок составляло 5,23%). При этом значения коэффициента вариации менее 5% были получены именно при окрашивании на общий белок, в то время как коэффициент вариации при использовании консти-

тутивных белков составлял до 20% [48] или даже 50% [49]. Следует отметить, что при помощи высокопроизводительной протеомики предпринимаются попытки поиска новых конститутивных белков для иммуноблоттинга с меньшей вариабельностью между различными биологическими тканями, клеточными популяциями и образцами (в частности, в качестве нового конститутивного белка был предложен DJ-1), однако данные конститутивные белки не получили широкого распространения [50, 51].

Сравнивая примененную в данной статье методологию с результатами проведенных ранее исследований, стоит выделить использование коэффициента детерминации (R^2) в качестве метрики контроля качества и коэффициента вариации (CV) как метрики для оценки эффективности метода нормализации специфичного сигнала [52]. С учетом повсеместной распространенности иммуноблоттинга и многообразия анализируемых биологических тканей и клеточных популяций, вероятно, целесообразной является оценка коэффициента вариации различных конститутивных белков в отдельных тканях или типах клеток [53–55], однако сравнение с нормализацией на общий белок в любом случае является необходимым для разработки объективной методологии коррекции специфичного сигнала. В качестве ограничения исследования следует отметить зависимость чувствительности флюорофоров 680RD и 800CW от особенностей различных каналов детекции, конструкции различных систем детекции и условий конкретной съёмки, несмотря на исходно заданные и определенные свойства самих флюорофоров как химических соединений.

Заключение

На основании проведенного исследования можно заключить, что наиболее чувствительным красителем для окрашивания общего белка в лизате культурах ЭК и гомогенате кровеносных сосудов является Acid Black 1, наиболее чувствительным цитоплазматическим конститутивным белком – β -актин, наиболее чувствительным ядерным конститутивным белком – ТВР. При нормализации специфичного сигнала от антител целесообразно применять окрашивание на общий белок при значениях коэффициента вариации $\leq 20\%$ (для лизата культур ЭК) или $\leq 25\%$ (для гомогената кровеносных сосудов), при превышении этих значений следует применять окрашивание антителами к β -актину или ТВР.

Конфликт интересов

В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин является научным редактором журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 «Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-со-

судистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты», <https://gisnauka.ru/nioktr/detail/5O90V6DKTDEZ3L37R544GP18>.

Информация об авторах

Лазебная Анастасия Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Маркова Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Author Information Form

Lazebnaya Anastasia I., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Markova Victoria E., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Kutikhin Anton G., PhD, MD, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

MVE – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

LAI – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

KAG – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

MVE – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

LAI – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Q, Han W, Ma C, Wang T, Zhong J. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously. *Electrophoresis*. 2023;44(9–10):854–863; doi: 10.1002/elps.202200222.
2. Rajalekshmi R, Rai V, Agrawal DK. 14-3-3ζ: an optimal housekeeping protein for western blot analysis in swine rotator cuff tendon studies. *Mol Cell Biochem*. 2025;480(7):4355–4363; doi: 10.1007/s11010-025-05255-6.
3. Hu X, Du S, Yu J, Yang X, Yang C, Zhou D, Wang Q, Qin S, Yan X, He L, Han D, Wan C. Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better 'housekeeper'. *Oncotarget*. 2016;7(41):66679–66688; doi: 10.18632/oncotarget.11439.
4. Maloy A, Alexander S, Andreas A, Nyunoya T, Chandra D. Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Anal Biochem*. 2022;654:114840; doi: 10.1016/j.ab.2022.114840.
5. Westerberg LJ, Dedic B, Näslund E, Thorell A, Spalding KL. Superior normalization using total protein for western blot analysis of human adipocytes. *PLoS One*. 2025;20(7):e0328136; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328136>.
6. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods*. 2006;38(4):283–293; doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007.
7. Xiang Y, Zheng Y, Liu S, Liu G, Li Z, Dong W. Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Sci Rep*. 2021;11(1):12022; doi: 10.1038/s41598-021-91521-8.
8. Шишкова Д.К., Сеницкая А.В., Сеницкий М.Ю., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Маркова В.Е., Кутихин А.Г. Случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре первичных ЭК пупочной вены человека. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2022;11(3):97–114. doi: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114.
9. Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г. Анализ внутреннего пути апоптоза в эндотелиальных клетках под

- воздействием кальций-фосфатных бионов. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020. Т. 5. № 3. С. 50–58; doi: 10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58.
10. Kostina D, Lobov A, Klausen P, Karelkin V, Tikhilov R, Bozhkova S, Sereda A, Ryumina N, Erukashvily N, Malashicheva A. Isolation of human osteoblast cells capable for mineralization and synthesizing bone-related proteins in vitro from adult bone. *Cells*. 2022;11:3356; doi: 10.3390/cells11213356.
11. Antonova LV, Sevostianova VV, Silnikov VN, Krivkina EO, Velikanova EA, Mironov AV, Shabaev AR, Senokosova EA, Khanova MY, Glushkova TV, Akentieva TN, Sinitskaya AV, Markova VE, Shishkova DK, Lobov AA, Repkin EA, Stepanov AD, Kutikhin AG, Barbarash LS. Comparison of the patency and regenerative potential of biodegradable vascular prostheses of different polymer compositions in an ovine model. *Int J Mol Sci*. 2023;24:8540; doi: 10.3390/ijms24108540.
12. Kanonykina A, Velikanova E, Markova V, Bogdanov L, Shishkova D, Shabaev A, Sinitsky M, Sinitskaya A, Poddubnyak A, Lazebnaya A, Stepanov A, Tyurina A, Lobov A, Zainullina B, Yuzhalin A, Kutikhin A. Citrullination accompanies the development of carotid atherosclerotic plaques. *Curr Med Chem*. 2024; doi: 10.2174/0109298673327175240929222308.
13. Parkin GM, Udawela M, Gibbons A, Dean B. Beta-actin does not show the characteristics of a reference protein in human cortex. *Electrophoresis*. 2019;40(2):247–253. doi: 10.1002/elps.201800328.
14. Vigelsø A, Dybboe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW, Guadalupe Grau A. GAPDH and beta-actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2015;118(3):386–394. doi: 10.1152/jappphysiol.00840.2014.
15. Yang M, Yan J, Wu A, Zhao W, Qin J, Pogwizd SM, Wu X, Yuan S, Ai X. Alterations of housekeeping proteins in human aged and diseased hearts. *Pflugers Arch*. 2021;473(3):351–362. doi: 10.1007/s00424-021-02538-x.
16. Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, Li Z, Wang Z, Zhang C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Anal Biochem*. 2012;423(1):15–22. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.012.
17. Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci*. 2013;92(13): 747751. doi: 10.1016/j.lfs.2013.02.014.
18. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. An overview of technical considerations for Western blot applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(1):4–25. doi: 10.1111/sms.12702.
19. Moritz CP. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics*. 2017;17(20). doi: 10.1002/pmic.201600189.
20. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020;593:113608. doi: 10.1016/j.ab.2020.113608.
21. Butler TAJ, Paul JW, Chan EC, Smith R, Tolosa JM. Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures. *Biomed Res Int*. 2019;2019:5214821. doi: 10.1155/2019/5214821.
22. Fosang AJ, Colbran RJ. Transparency Is the Key to Quality. *J Biol Chem*. 2015;290(50):29692–29694. doi: 10.1074/jbc.E115.000002.
23. Faden F, Eschen-Lippold L, Dissmeyer N. Normalized Quantitative Western Blotting Based on Standardized Fluorescent Labeling. *Methods Mol Biol*. 2016;1450:247–258. doi: 10.1007/978-1-4939-3759-2_20.
24. Kshirsagar S, Islam MA, Reddy AP, Reddy PH. Resolving the current controversy of use and reuse of housekeeping proteins in ageing research: Focus on saving people's tax dollars. *Ageing Res Rev*. 2024;100:102437. doi: 10.1016/j.arr.2024.102437.
25. Eaton SL, Hurtado ML, Oldknow KJ, Graham LC, Marchant TW, Gillingwater TH, Farquharson C, Wishart TM. A guide to modern quantitative fluorescent western blotting with troubleshooting strategies. *J Vis Exp*. 2014;93:e52099. doi: 10.3791/52099.
26. Janes KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Science Signaling*. 2015;8(371):rs2. doi: 10.1126/scisignal.2005966.
27. Barkovits K, Pfeiffer K, Eggers B, Marcus K. Protein Quantification Using the "Rapid Western Blot" Approach. *Methods Mol Biol*. 2021;2228:29–39. doi: 10.1007/978-1-0716-1024-4_3.
28. Cui Y. Optimization of blocking conditions for fluorescent Western blot. *Analytical Biochemistry*. 2020;593:113598. doi: 10.1016/j.ab.2020.113598.
29. Park J, Mabuchi M, Sharma A. Multiplexed Fluorescent Immunodetection Using Low Autofluorescence Immobilon®-FL Membrane. *Methods Mol Biol*. 2015;1314:195–205. doi: 10.1007/978-1-4939-2718-0_22.
30. Goldman A, Harper S, Speicher DW. Detection of Proteins on Blot Membranes. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016;86:10.8.1–10.8.11. doi: 10.1002/cpps.15.
31. Thacker JS, Yeung DH, Staines WR, Mielke JG. Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem*. 2016;496:76–78. doi: 10.1016/j.ab.2015.11.022.
32. Wang Q, Han W, Ma C, Wang T, Zhong J. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously. *Electrophoresis*. 2023;44(9-10):854–863. doi: 10.1002/elps.202200222.
33. Lallier SW, Hill CL, Nichols DP, Reynolds SD. Protein Abundance Determination: An Optimized Western Blot Workflow. *Ann Clin Lab Sci*. 2019;49(4):507–512.
34. Sander H, Wallace S, Plouse R, Tiwari S, Gomes AV. Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Anal Biochem*. 2019;575:44–53. doi: 10.1016/j.ab.2019.03.010.
35. Wang JL, Zhao L, Li MQ, Chen WG, Xu CJ. A sensitive and reversible staining of proteins on blot membranes. *Anal Biochem*. 2020;592:113579. doi: 10.1016/j.ab.2020.113579.
36. Wang JL, Li MQ, Zhang JJ, Xu CJ. Total protein staining with Congo red as an alternative loading control for western blot analysis. *Biotech Histochem*. 2022;97(6):404–414. doi: 10.1080/10520295.2021.2008008.
37. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler JJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):250–254. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.003.
38. Zeng L, Guo J, Xu HB, Huang R, Shao W, Yang L, Wang M, Chen J, Xie P. Direct Blue 71 staining as a destaining-free alternative loading control method for Western blotting. *Electrophoresis*. 2013;34(15):2234–2239. doi: 10.1002/elps.201300140.
39. Moritz CP, Marz SX, Reiss R, Schulenburg T, Friauf E. Epicocconone staining: a powerful loading control for Western blots. *Proteomics*. 2014;14(2-3):162–168. doi: 10.1002/pmic.201300089.
40. Kirshner ZZ, Gibbs RB. Use of the REVERT() total protein stain as a loading control demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different gonadal hormone states. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;473:156–165. doi: 10.1016/j.mce.2018.01.015.
41. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal Biochem*. 2013;440(2):186–188. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.027.
42. Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem*. 2012;430(2):108–110. doi: 10.1016/j.ab.2012.08.015.
43. Neris RLS, Dobles AMC, Gomes AV. Western Blotting Using In-Gel Protein Labeling as a Normalization Control: Advantages of Stain-Free Technology. *Methods Mol Biol*. 2021;2261:443–456. doi: 10.1007/978-1-0716-1186-9_28.
44. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2013;433(2):105–111. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.010.
45. Nie X, Li C, Hu S, Xue F, Kang YJ, Zhang W. An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochem Biophys Res*. 2017;12:108–113. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.09.001.
46. Bettencourt JW, McLaury AR, Limberg AK, Vargas-Hernandez JS, Bayram B, Owen AR, Berry DJ, Sanchez-Sotelo J, Morrey ME, van Wijnen AJ, Abdel MP. Total Protein Staining is Superior to Classical or Tissue-Specific Protein Staining for Standardization of Protein Biomarkers in Heterogeneous

Tissue Samples. *Gene Rep.* 2020;19:100641. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100641.

47. Huang YT, van der Hoorn D, Ledahawsky LM, Motyl AAL, Jordan CY, Gillingwater TH, Groen EJM. Robust Comparison of Protein Levels Across Tissues and Throughout Development Using Standardized Quantitative Western Blotting. *J Vis Exp.* 2019;(146). doi: 10.3791/59438

48. Eaton SL, Roche SL, Llavero Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, Wishart TM. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One.* 2013;8(8):e72457. doi: 10.1371/journal.pone.0072457.

49. Diller T, Thompson J, Steer B. Biological validation of a novel process and product for quantitating western blots. *J Biotechnol.* 2021;326:52–60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.12.012.

50. Wiśniewski JR, Mann MJ. A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting. *J Proteome Res.* 2016;15(7):2321–2326. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00403.

51. Lee HG, Jo J, Hong HH, Kim KK, Park JK, Cho SJ, Park C. State-of-the-art housekeeping proteins for quantitative western blotting: Revisiting the first draft of the human proteome. *Proteomics.* 2016;16(13):1863–1867. doi: 10.1002/pmic.201500344.

52. Maestri A, Ehrenborg E, Werngren O, Olin M, Hagberg CE, Pedrelli M, Parini P. Titration-WB: A methodology for accurate quantitative protein determination overcoming reproducibility errors. *PLoS One.* 2025;20(6):e0325052. doi: 10.1371/journal.pone.0325052.

53. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014;2014:361590; doi: 10.1155/2014/361590.

54. Taylor SC, Rosselli-Murai LK, Crobeddu B, Plante I. A critical path to producing high quality, reproducible data from quantitative western blot experiments. *Sci Rep.* 2022;12(1):17599. doi: 10.1038/s41598-022-22294-x.

55. Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques.* 2022;73(1):58–69. doi: 10.2144/btn-2022-0003.

REFERENCES

1. Wang Q, Han W, Ma C, Wang T, Zhong J. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously. *Electrophoresis.* 2023;44(9–10):854–863; doi: 10.1002/elps.202200222.

2. Rajalekshmi R, Rai V, Agrawal DK. 14-3-3 ζ : an optimal housekeeping protein for western blot analysis in swine rotator cuff tendon studies. *Mol Cell Biochem.* 2025;480(7):4355–4363; doi: 10.1007/s11010-025-05255-6.

3. Hu X, Du S, Yu J, Yang X, Yang C, Zhou D, Wang Q, Qin S, Yan X, He L, Han D, Wan C. Common housekeeping proteins are upregulated in colorectal adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma, making the total protein a better 'housekeeper'. *Oncotarget.* 2016;7(41):66679–66688; doi: 10.18632/oncotarget.11439.

4. Maloy A, Alexander S, Andreas A, Nyunoya T, Chandra D. Stain-Free total-protein normalization enhances the reproducibility of Western blot data. *Anal Biochem.* 2022;654:114840; doi: 10.1016/j.ab.2022.114840.

5. Westerberg LJ, Dedic B, Näslund E, Thorell A, Spalding KL. Superior normalization using total protein for western blot analysis of human adipocytes. *PLoS One.* 2025;20(7):e0328136; https://doi: 10.1371/journal.pone.0328136.

6. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods.* 2006;38(4):283–293; doi: 10.1016/j.jymeth.2005.11.007.

7. Xiang Y, Zheng Y, Liu S, Liu G, Li Z, Dong W. Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Sci Rep.* 2021;11(1):12022; doi: 10.1038/s41598-021-91521-8.

8. Shishkova D.K., Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Markova V.E., Kutikhin A.G. Spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in human primary umbilical vein endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases = Kompleksnyye problemy serdečno-sosudistykh zabolevanij.* 2022. Vol. 11. № 3. P. 97–114. doi: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114.

9. Markova V.E., Shishkova D.K., Kutikhin A.G. Analysis of intrinsic apoptosis in endothelial cells exposed to calcium phosphate bins. *Fundamental and Clinical Medicine = Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina.* 2020. Vol. 5. № 3. P. 50–58; doi: 10.23946/2500-0764-2020-5-3-50-58.

10. Kostina D, Lobov A, Klausen P, Karelkin V, Tikhilov R, Bozhkova S, Sereda A, Ryumina N, Erukashvily N, Malashicheva A. Isolation of human osteoblast cells capable for mineralization and synthesizing bone-related proteins in vitro from adult bone. *Cells.* 2022;11:3356; doi: 10.3390/cells11213356.

11. Antonova LV, Sevostianova VV, Silnikov VN, Krivkina EO, Velikanova EA, Mironov AV, Shabaev AR, Senokosova EA, Khanova MY, Glushkova TV, Akentieva TN, Sinitskaya AV, Markova VE, Shishkova DK, Lobov AA, Repkin EA, Stepanov AD, Kutikhin AG, Barbarash LS. Comparison of the patency and regenerative potential of biodegradable vascular prostheses of different polymer compositions in an ovine model. *Int J Mol Sci.* 2023;24:8540; doi: 10.3390/ijms24108540.

12. Kanonykina A, Velikanova E, Markova V, Bogdanov L, Shishkova D, Shabaev A, Sinitsky M, Sinitskaya A, Poddubnyak

A, Lazebnaya A, Stepanov A, Tyurina A, Lobov A, Zainullina B, Yuzhalin A, Kutikhin A. Citrullination accompanies the development of carotid atherosclerotic plaques. *Curr Med Chem.* 2024; doi: 10.2174/0109298673327175240929222308.

13. Parkin GM, Udawela M, Gibbons A, Dean B. Beta-actin does not show the characteristics of a reference protein in human cortex. *Electrophoresis.* 2019;40(2):247–253. doi: 10.1002/elps.201800328.

14. Vigelsø A, Dybboe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW, Guadalupe Grau A. GAPDH and beta-actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2015;118(3):386–394. doi: 10.1152/jappphysiol.00840.2014.

15. Yang M, Yan J, Wu A, Zhao W, Qin J, Pogwizd SM, Wu X, Yuan S, Ai X. Alterations of housekeeping proteins in human aged and diseased hearts. *Pflugers Arch.* 2021;473(3):351–362. doi: 10.1007/s00424-021-02538-x.

16. Wu Y, Wu M, He G, Zhang X, Li W, Gao Y, Li Z, Wang Z, Zhang C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Anal Biochem.* 2012;423(1):15–22. doi: 10.1016/j.ab.2012.01.012.

17. Li R, Shen Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci.* 2013;92(13): 747751. doi: 10.1016/j.lfs.2013.02.014.

18. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports.* 2017;27(1):4–25. doi: 10.1111/sms.12702.

19. Moritz CP. Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots. *Proteomics.* 2017;17(20). doi: 10.1002/pmic.201600189.

20. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem.* 2020;593:113608. doi: 10.1016/j.ab.2020.113608.

21. Butler TAJ, Paul JW, Chan EC, Smith R, Tolosa JM. Misleading Westerns: Common Quantification Mistakes in Western Blot Densitometry and Proposed Corrective Measures. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5214821. doi: 10.1155/2019/5214821.

22. Fosang AJ, Colbran RJ. Transparency Is the Key to Quality. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29692–29694. doi: 10.1074/jbc.E115.000002.

23. Faden F, Eschen-Lippold L, Dissmeyer N. Normalized Quantitative Western Blotting Based on Standardized Fluorescent Labeling. *Methods Mol Biol.* 2016;1450:247–258. doi: 10.1007/978-1-4939-3759-2_20.

24. Kshirsagar S, Islam MA, Reddy AP, Reddy PH. Resolving the current controversy of use and reuse of housekeeping proteins in ageing research: Focus on saving people's tax dollars. *Ageing Res Rev.* 2024;100:102437. doi: 10.1016/j.arr.2024.102437.

25. Eaton SL, Hurtado ML, Oldknow KJ, Graham LC, Marchant TW, Gillingwater TH, Farquharson C, Wishart TM. A guide to modern quantitative fluorescent western blotting

- with troubleshooting strategies. *J Vis Exp*. 2014;93:e52099. doi: 10.3791/52099.
26. Janes KA. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting. *Science Signaling*. 2015;8(371):rs2. doi: 10.1126/scisignal.2005966.
27. Barkovits K, Pfeiffer K, Eggers B, Marcus K. Protein Quantification Using the "Rapid Western Blot" Approach. *Methods Mol Biol*. 2021;2228:29–39. doi: 10.1007/978-1-0716-1024-4_3.
28. Cui Y. Optimization of blocking conditions for fluorescent Western blot. *Analytical Biochemistry*. 2020;593:113598. doi: 10.1016/j.ab.2020.113598.
29. Park J, Mabuchi M, Sharma A. Multiplexed Fluorescent Immunodetection Using Low Autofluorescence Immobilon®-FL Membrane. *Methods Mol Biol*. 2015;1314:195–205. doi: 10.1007/978-1-4939-2718-0_22.
30. Goldman A, Harper S, Speicher DW. Detection of Proteins on Blot Membranes. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016;86:10.8.1–10.8.11. doi: 10.1002/cpps.15.
31. Thacker JS, Yeung DH, Staines WR, Mielke JG. Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem*. 2016;496:76–78. doi: 10.1016/j.ab.2015.11.022.
32. Wang Q, Han W, Ma C, Wang T, Zhong J. Western blot normalization: Time to choose a proper loading control seriously. *Electrophoresis*. 2023;44(9-10):854–863. doi: 10.1002/elps.202200222.
33. Lallier SW, Hill CL, Nichols DP, Reynolds SD. Protein Abundance Determination: An Optimized Western Blot Workflow. *Ann Clin Lab Sci*. 2019;49(4):507–512.
34. Sander H, Wallace S, Plouse R, Tiwari S, Gomes AV, Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Anal Biochem*. 2019;575:44–53. doi: 10.1016/j.ab.2019.03.010.
35. Wang JL, Zhao L, Li MQ, Chen WG, Xu CJ. A sensitive and reversible staining of proteins on blot membranes. *Anal Biochem*. 2020;592:113579. doi: 10.1016/j.ab.2020.113579.
36. Wang JL, Li MQ, Zhang JJ, Xu CJ. Total protein staining with Congo red as an alternative loading control for western blot analysis. *Biotech Histochem*. 2022;97(6):404–414. doi: 10.1080/10520295.2021.2008008.
37. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):250–254. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.003.
38. Zeng L, Guo J, Xu HB, Huang R, Shao W, Yang L, Wang M, Chen J, Xie P. Direct Blue 71 staining as a destaining-free alternative loading control method for Western blotting. *Electrophoresis*. 2013;34(15):2234–2239. doi: 10.1002/elps.201300140.
39. Moritz CP, Marz SX, Reiss R, Schulenburg T, Friauf E. Epicocconone staining: a powerful loading control for Western blots. *Proteomics*. 2014;14(2-3):162–168. doi: 10.1002/pmic.201300089.
40. Kirshner ZZ, Gibbs RB. Use of the REVERT() total protein stain as a loading control demonstrates significant benefits over the use of housekeeping proteins when analyzing brain homogenates by Western blot: An analysis of samples representing different gonadal hormone states. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;473:156–165. doi: 10.1016/j.mce.2018.01.015.
41. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal Biochem*. 2013;440(2):186–188. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.027.
42. Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem*. 2012;430(2):108–110. doi: 10.1016/j.ab.2012.08.015.
43. Neris RLS, Dobles AMC, Gomes AV. Western Blotting Using In-Gel Protein Labeling as a Normalization Control: Advantages of Stain-Free Technology. *Methods Mol Biol*. 2021;2261:443–456. doi: 10.1007/978-1-0716-1186-9_28.
44. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2013;433(2):105–111. doi: 10.1016/j.ab.2012.10.010.
45. Nie X, Li C, Hu S, Xue F, Kang YJ, Zhang W. An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochem Biophys Rep*. 2017;12:108–113. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.09.001.
46. Bettencourt JW, McLaury AR, Limberg AK, Vargas-Hernandez JS, Bayram B, Owen AR, Berry DJ, Sanchez-Sotelo J, Morrey ME, van Wijnen AJ, Abdel MP. Total Protein Staining is Superior to Classical or Tissue-Specific Protein Staining for Standardization of Protein Biomarkers in Heterogeneous Tissue Samples. *Gene Rep*. 2020;19:100641. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100641.
47. Huang YT, van der Hoorn D, Ledahawsky LM, Motyl AAL, Jordan CY, Gillingwater TH, Groen EJM. Robust Comparison of Protein Levels Across Tissues and Throughout Development Using Standardized Quantitative Western Blotting. *J Vis Exp*. 2019;(146). doi: 10.3791/59438
48. Eaton SL, Roche SL, Llavero Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, Wishart TM. Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One*. 2013;8(8):e72457. doi: 10.1371/journal.pone.0072457.
49. Diller T, Thompson J, Steer B. Biological validation of a novel process and product for quantitating western blots. *J Biotechnol*. 2021;326:52–60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.12.012.
50. Wiśniewski JR, Mann MJ. A Proteomics Approach to the Protein Normalization Problem: Selection of Unvarying Proteins for MS-Based Proteomics and Western Blotting. *J Proteome Res*. 2016;15(7):2321–2326. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00403.
51. Lee HG, Jo J, Hong HH, Kim KK, Park JK, Cho SJ, Park C. State-of-the-art housekeeping proteins for quantitative western blotting: Revisiting the first draft of the human proteome. *Proteomics*. 2016;16(13):1863–1867. doi: 10.1002/pmic.201500344.
52. Maestri A, Ehrenborg E, Werngren O, Olin M, Hagberg CE, Pedrelli M, Parini P. Titration-WB: A methodology for accurate quantitative protein determination overcoming reproducibility errors. *PLoS One*. 2025;20(6):e0325052. doi: 10.1371/journal.pone.0325052.
53. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014;2014:361590; doi: 10.1155/2014/361590.
54. Taylor SC, Rosselli-Murai LK, Crobeddu B, Plante I. A critical path to producing high quality, reproducible data from quantitative western blot experiments. *Sci Rep*. 2022;12(1):17599. doi: 10.1038/s41598-022-22294-x.
55. Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*. 2022;73(1):58–69. doi: 10.2144/btn-2022-0003.

Для цитирования: Лазебная А.И., Маркова В.Е., Кутихин А.Г. Сравнительная оценка окрашивания конститутивных белков и общего белка как двух подходов к нормализации сигнала при иммуноблоттинге белков эндотелиальных клеток и кровеносных сосудов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2026;15(3): 77-92. DOI: 10.17802/2306-1278-2026-15-3-77-92

To cite: Lazebnaya A.I., Markova V.E., Kutikhin A.G. Comparison of housekeeping protein and total protein normalization in western blotting analysis of endothelial cell lysate and vascular homogenate. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2026;15(3): 77-92. DOI: 10.17802/2306-1278-2026-15-3-77-92