

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2026

Костюкова Е.В., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Кружалов Н.А.,
Солотнова С.О., Стрельникова Е.А.



https://elibrary.ru/ftuzzx

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И ЯДЕРНОЙ ФРАКЦИЙ ГОМОГЕНАТА КЛЕТОК ЛИНИИ HEPG2 И ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ,
390026, Рязань, Россия

Введение. Определение внутриклеточной локализации белка необходимо для понимания функций клетки в норме и при патологии. Существующие методы фракционирования, такие как дифференциальное центрифугирование или коммерческие наборы, часто имеют недостатки: длительность, риск повреждения органелл, перекрестную контаминацию фракций и потерю лабильных белков. В связи с этим разработка новых, быстрых и эффективных методов получения чистых ядерных и цитоплазматических фракций остается актуальной задачей.

Цель исследования – разработать быстрый, доступный и эффективный способ разделения ядерной и цитоплазматической фракций из клеток и тканей для последующего анализа белков.

Материал и методы. Исследование проводили на ткани головного мозга крыс линии Wistar и клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Ткань мозга гомогенизировали в охлажденном гомогенизаторе Поттера. Выделение фракций проводили по двухэтапному протоколу: сначала клетки лизировали буфером NP-40 для получения цитоплазматической фракции, а затем осадок, содержащий ядра, лизировали буфером RIPA. Качество гомогенизации оценивали с помощью микроскопии после окрашивания по Романовскому-Гимзе, а фракционирования по флуоресцентной микроскопии с DAPI и вестерн-блот анализа с маркерами фракций (ламинин B1 для ядра и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФДГ) для цитоплазмы).

Результаты и обсуждение. Показано, что проведенная гомогенизация позволяет получить гомогенную суспензию клеток с интактными ядрами. Флуоресцентная микроскопия подтвердила отсутствие ядерного материала в цитоплазматической фракции и сохранность ядер в ядерной фракции. Данные вестерн-блота продемонстрировали высокую специфичность фракций: в ядерной фракции детектировался только Ламинин B1, а в цитоплазматической – только ГАФДГ, что свидетельствует о минимальной перекрестной контаминации. Разработанный метод, основанный на последовательном использовании детергентов NP-40 и RIPA, является быстрым, воспроизводимым и позволяет эффективно разделять субклеточные компартменты без этапа отмывания ядер, минимизируя потери белка.

Заключение. Предложен быстрый и эффективный метод получения чистых ядерных и цитоплазматических фракций из клеточных культур и тканей. Высокая степень очистки, подтвержденная независимыми методами (вестерн-блот, флуоресцентная микроскопия с DAPI), позволяет рекомендовать данный протокол для широкого использования в лабораторной практике, в частности, для изучения транслокации белков, например, транскрипционных факторов.

Ключевые слова: фракции клеток; вестерн-блот; гомогенаты; центрифугирование

Для цитирования: Костюкова Е.В., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Кружалов Н.А., Солотнова С.О., Стрельникова Е.А. Способ получения цитоплазматической и ядерной фракций гомогената клеток линии HEPG2 и ткани головного мозга для биохимических анализов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2026; 71 (2): 139-145
DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-2-139-145
EDN: FTUZZX

Для корреспонденции: Абаленихина Юлия Владимировна, д-р мед. наук, проф. кафедры биологической химии; e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила	23.11.2025
Принята к печати	16.01.2026
Опубликовано	01.02.2026

Kostyukova E.V., Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Kruzhlov N.A., Solotnova S.O.,
Strelnikova E.A.

A METHOD FOR OBTAINING CYTOPLASMIC AND NUCLEAR FRACTIONS FROM HEPG2 CELL LINE AND BRAIN TISSUE HOMOGENATES FOR BIOCHEMICAL ANALYSES

Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, Ministry of Health of the Russian Federation, 390026,
Ryazan, Russia

Introduction. Determining the intracellular localization of a protein is essential for understanding cellular functions under normal and pathological conditions. Existing fractionation methods, such as differential centrifugation or commercial kits, often suffer from drawbacks: they are time-consuming, carry a risk of organelle damage, cross-contamination between fractions, and loss of labile proteins. Therefore, the development of new, rapid, and efficient methods for obtaining pure nuclear and cytoplasmic fractions remains a relevant task.

Aim. To develop a rapid, accessible, and effective method for separating nuclear and cytoplasmic fractions from cells and tissues for subsequent protein analysis.

Material and methods. The study was performed on brain tissue from Wistar rats and human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Brain tissue was homogenized in a chilled Potter homogenizer. Fraction isolation was carried out using a two-step protocol: cells were first lysed with NP-40 buffer to obtain the cytoplasmic fraction, and then the pellet containing nuclei was lysed with RIPA buffer.

The quality of homogenization was assessed by microscopy after Romanowsky-Giemsa staining, and the quality of fractionation was assessed by fluorescence microscopy with DAPI and by western blot analysis using fraction markers (Lamin B1 for the nucleus and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for the cytoplasm).

Results and discussion. It was shown that the performed homogenization yields a homogeneous cell suspension with intact nuclei. Fluorescence microscopy confirmed the absence of nuclear material in the cytoplasmic fraction and the integrity of nuclei in the nuclear fraction. Western blot data demonstrated high specificity of the fractions: Lamin B1 was detected only in the nuclear fraction, and GAPDH only in the cytoplasmic fraction, indicating minimal cross-contamination. The developed method, based on the sequential use of NP-40 and RIPA detergents, is rapid, reproducible, and allows for effective separation of subcellular compartments without a nuclear washing step, minimizing protein loss.

Conclusion. A rapid and efficient method for obtaining pure nuclear and cytoplasmic fractions from cell cultures and tissues has been proposed. The high degree of purification, confirmed by independent methods (western blot, DAPI fluorescence microscopy), allows us to recommend this protocol for widespread use in laboratory practice, particularly for studying protein translocation, e.g., of transcription factors.

Key words: cell fractions; western blot; homogenates; centrifugation

For citation: Kostyukova E.V., Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Kruzhalov N.A., Solotnova S.O., Strelnikova E.A. A method for obtaining cytoplasmic and nuclear fractions from HEPG2 cell line and brain tissue homogenates for biochemical analyses. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2026; 71 (2): 139-145 (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-2-139-145>

EDN: FTUZZX

For correspondence: Abalenikhina Yu.V., Dr.Sc.Med., Associate Professor, Department of Biological Chemistry; e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Information about authors:

Kostyukova E.V., <https://orcid.org/0009-0001-1596-6815>;

Abalenikhina Yu. V., <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>;

Shchulkin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;

Kruzhalov N.A., <https://orcid.org/0009-0005-1129-7975>;

Solotnova S.O., <https://orcid.org/0009-0001-5328-0566>;

Strelnikova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3370-1095>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.11.2025

Accepted 16.01.2026

Published 01.02.2026

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность поиска и совершенствования методов фракционирования белков на цитоплазматическую и ядерную фракции обусловлена необходимостью определения внутриклеточной локализации белка для понимания жизнедеятельности клетки в норме и при патологии в фундаментальных исследованиях. Цитоплазма и ядро являются ключевыми компартментами клетки, так как выполняют различные функции, а контролируемое перемещение сигнальных белков между ними служит основным механизмом регуляции биохимических процессов: ответ на внешние сигналы, транскрипция генов, клеточное деление, апоптоз и др. Следовательно, изучение динамического распределения важно в самых разных областях – от фундаментальных исследований сигнальных путей, например, Nf-kB, Nrf-2, CAR, PXR и др., активация которых характеризуется транслокацией в ядро [1, 2], до прикладной медицины, где аномальная локализация онкобелков или вирусных антигенов служит диагностическим и прогностическим маркером при онкологических и инфекционных заболеваниях [3].

От правильности биохимической методологии разделения клеточных структур и получения чистого осадка будут зависеть дальнейшие результаты исследования.

В настоящее время наиболее популярным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей и разделения ядерной и цитоплазматической фракций клеток является метод дифференциального центрифугирования (субклеточного фракционирования).

Дифференциальное центрифугирование основано на разной скорости осаждения отдельных частиц под действием центробежной силы. Быстрота разделения каждого из компонентов клетки зависит от размера и формы каждого элемента [4]. Для более четкого разделения клеток и приготовления чистого препарата проводят несколько последовательных циклов центрифугирования. Минусом метода является то, что приходится тратить время на получение градиента плотности раствора. Кроме того, во время выделения частиц можно повредить их структуру, а также, отмывание субклеточных частиц (ресуспендирование их в среде и последующее повторное центрифугирование) может приводить к потере некоторых содержащихся в них веществ, которые под действием сил диффузии переходят в раствор. В связи с этим иногда бывает трудно понять, какие из малых молекул действительно являются элементами исследуемых структур, а какие просто были адсорбированы их поверхностью в процессе выделения.

Использование коммерческих наборов обеспечивает эффективную экстракцию мембранных белков из клеток и тканей млекопитающих. Инструкции наборов характеризуются многостадийностью процесса. Экстрагированный белок пригоден для различных последующих применений, включая электрофорез, вестерн-блот, ИФА и анализ активности ферментов [5].

Для приготовления клеточных лизатов часто используют детергент тритон-X100, который разрушает

цитоплазматическую и митохондриальную мембраны, но малоэффективен в отношении ядерной. На этом основан метод применения тритона- X100 для удаления цитоплазматического содержимого [6].

Имеются данные, что тритон-X100 способен снижать электрофоретическую подвижность белков [7], а следовательно, неудобен, например, для анализа методом вестерн-блот.

Несмотря на доступность вышеперечисленных методов, постоянная необходимость в совершенствовании этой методологии вызвана некоторыми методическими особенностями: перекрестная контаминация фракций, агрессивный или неправильно подобранный лизис может привести к повреждению ядерной мембраны и, следовательно, получению общего лизата клеток, что может сделать количественный анализ некорректным. Не менее важной задачей является сохранение лабильных белковых комплексов и посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, которые легко разрушаются при недостаточно щадящих условиях выделения. Современные исследования часто требуют работы с малым количеством материала, поэтому необходим поиск новых методов.

Таким образом, из вышесказанного следует, что поиск и разработка новых методов получения соответствующих субклеточных фракций – ядро и цитоплазма, обогащенных исследуемыми белками для исследования функционирования транскрипционных факторов, переходящих из цитоплазматической в ядерную фракцию, являются актуальным вопросом фундаментальной науки.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – разработать быстрый, доступный и эффективный способ разделения ядерной и цитоплазматической фракций клеток и тканей для определения уровня белка в клетках (на примере ткани головного мозга крыс Wistar и клеточной линии HepG2).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на индивидуальных клетках, выделенных из ткани головного мозга крыс линии Wistar, и клетках линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 (закуплена в ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург).

Гомогенизация ткани. Для извлечения цитоплазматических/ядерных белков из образцов тканей на первом этапе получали отдельные клетки из ткани головного мозга крыс Wistar. Для этого навеску ткани головного мозга помещали в предварительно охлажденный гомогенизатор типа Potter-Elvehjem с фосфатным буфером в соотношении с тканью 1:1 (60 мг ткани : 60 мкл буфера). Гомогенизацию производили при температуре +4 °C путем 8-ми плавных нажатий пестиком без прокручиваний, во избежание разрушения цитоплазматических и ядерных мембран клетки. Также параллельно была проведена гомогенизация на гомогенизаторе D1AX 900 («Heidolph», Германия) при 26 000 об/мин в фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) на холоде в соотношении 1:10 в течение 1 минуты.

Полученные гомогенаты ткани центрифугировали при температуре +4 °C, скорости 700 g в течение 10 минут, чтобы крупные фрагменты ткани осели на дно, но при этом ядра остались в супернатанте, который пред-

ставлял собой фракцию неразрушенных клеток [8].

Оценка состояния клеток головного мозга методом Романовского-Гимзы. Аликвоту гомогената (50 мкл) наносили на предметное стекло и готовили мазок. Препараты фиксировали в метаноле (ХимМед, Россия) в течение 5 минут и высушивали на воздухе. Окрашивание проводили стандартным методом: рабочий раствор краситель Романовского-Гимзы, разведенный в буфере, pH 6,8–7,2, в соотношении 1:10 («Медикс», Россия) наносили на мазок на 15–20 минут. После осторожного промывания дистиллированной водой и высушивания препараты анализировали под световым микроскопом [9]. Для каждого образца анализировали не менее 5 полей зрения. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа («Olympus», Япония) с цифровой цветной камерой (CCD 5 МПикс) на персональном компьютере DeltaPix InSight.

Подсчет количества клеток. Количество клеток оценивали с помощью счетчика клеток C100 (RWD Life Science, Китай).

Выделение ядерной и цитоплазматической фракций из клеток. К суспензии клеток добавляли мягкий неионный детергент эфир полиоксиэтилена нонил-фенола (NP40 «Servicebio», Китай). Полученный лизат центрифугировали при 1000g в течение 10 минут (AvantiJXN-3, Beckmancoulter, США). Затем супернатант, представляющий собой цитоплазматическую фракцию, переносили в эппендорфы и использовали для анализа. Для выделения ядерной фракции продолжали работу с осадком. К преципитату добавляли буфер RIPA (RIPA Lysis Buffer – RadioImmunoPrecipitation Assay «Servicebio», Китай). Его основные компоненты включают 50 mM Трис-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA-2Na, 1 % Triton X-100, 1 % дезоксихолевой кислоты натрия и 0,1 % SDS. Буферы NP40 и RIPA добавляли из расчета 10⁷ клеток : 100 мкл буфера, инкубация проводилась в течение 30 минут при температуре +4 °C при постоянном перемешивании. Далее центрифугировали для осаждения дебриса при 700g в течение 10 минут (AvantiJXN-3, Beckmancoulter, США). Надосадочную жидкость, являющуюся ядерной фракцией, использовали для анализа.

Культивирование клеток линии HepG2. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning», США) при 37 °C и 5 % содержании CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 mM), 10 % фетальной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства «Sigma Aldrich», Германия) до появления монослоя (5 суток). По достижении клетками HepG2 90 % конфлюентности монослоя, убрали кондиционированную среду, трижды промывали раствором фосфатного буфера (ПанЭко, Россия) и снимали с лунок. Клетки откручивали при температуре +4 °C на скорости 3000 g в течение 10 минут, удаляли фосфатный буфер и проводили выделения ядер и цитоплазмы по схеме, описанной выше и представленной на рис. 1.

Анализ перекрестной контаминации ядерных и цитоплазматических фракций с использованием флуоресцентной микроскопии DAPI. Чистоту выделенных фракций оценивали путем окрашивания ядерной и

цитоплазматической фракций клеток синим флуоресцентным красителем DAPI («Sigma-Aldrich», США) на наличие/отсутствие ядер клеток. Раствор красителя готовили путем разведения порошка DAPI в PBS в отношении 1:5000.

К ядерному осадку до разрушения мембраны и цитоплазматической фракции гомогената добавляли раствор красителя и инкубировали 3 минуты в темноте. Полученную суспензию ядер наносили на предметное стекло и проводили микроскопирование. Визуализацию ядер выполняли с помощью инвертированного микроскопа.

Анализ белков-маркеров клеточных фракций для контроля качества гомогената. Чистоту выделенных фракций проверяли путем обнаружения маркерных белков методом вестерн-блот. В нашем случае, маркерными белками для ядер является ламинин B1 [10], для цитоплазмы – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (ГАФД).

Вестерн-блот анализ проводили по стандартному протоколу. Электрофорез белков проводили в 7,5 % полиакриламидных гелях, приготовленных с использованием набора TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США). Перед электрофорезом образцы клеточного лизата смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол («Bio-Rad», США), в соотношении 1:3 (образец:буфер) и денатурировали в течение 10 минут при 70 °С. На гель наносили 20 мкг белка, после чего электрофорез проводили при постоянном напряжении 100 В в течение 90 минут. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size «Bio-Rad», США) с использованием системы для полусухого трансблоттинга Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США). Условия переноса составляли 25 В и 1,3 А в течение 10 минут. Для блокирования неспецифических сайтов связывания мембрану инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в блокирующем буфере, содержащем 1% раствор EveryBlot Blocking Buffer («Bio-Rad», США) и 0,1 % Tween-20 («Sigma», Германия). Детекцию целевых белков проводили с использованием специфичных моноклональных мышиных антител – ламинин B1 и GAPDH («Affinity», Китай) в разведении 1:1000. После отмывки мембраны инкубировали с вторичными кроличьими антителами против мышиных IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), в разведении 1:4000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Сигнал визуализиро-

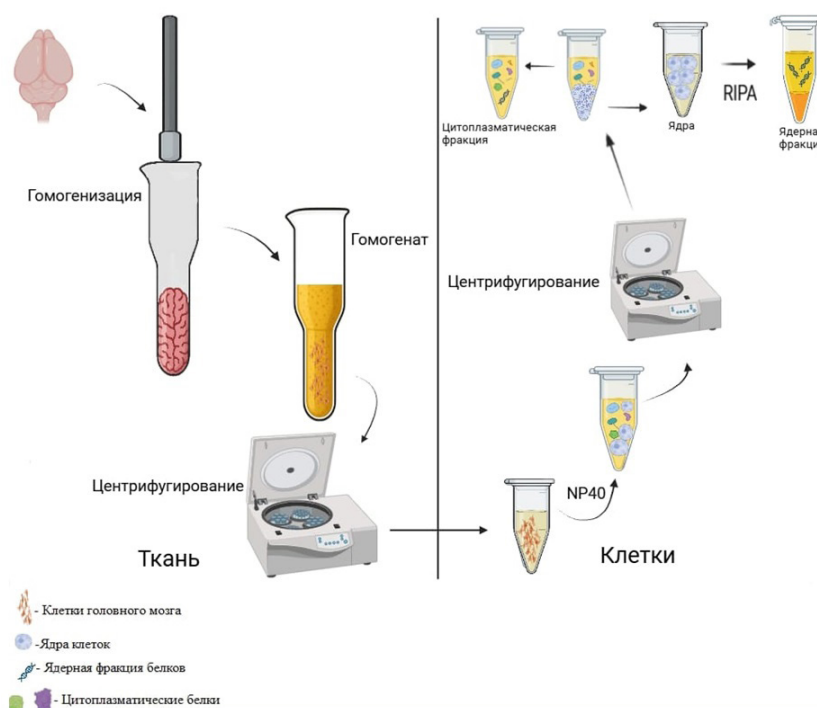


Рис. 1. Схема получения гомогената клеток головного мозга и выделения цитоплазматической и ядерной фракций белков клеток (выполнено с помощью BioRender).

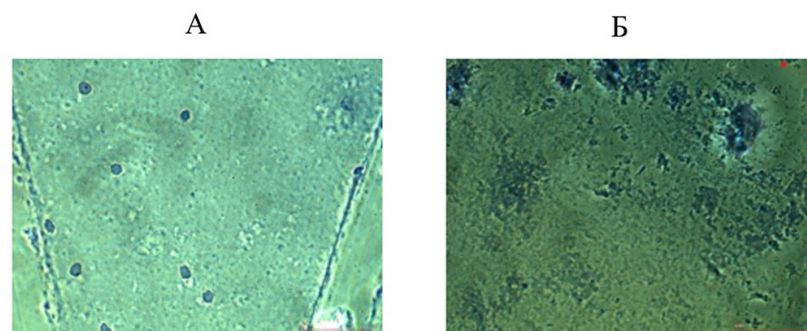


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изображение гомогенатов ткани после окрашивания по Романовскому-Гимзе. А - гомогенаты ткани головного мозга крыс Wistar, обработанные с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem; Б - гомогенаты ткани головного мозга крыс Wistar, обработанные в гомогенизаторе D1AX 900; световая микроскопия («Olympus», Япония). Ув. ×40.

вали с помощью хемилюминесцентного субстрата и регистрировали на системе ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США). Количественный анализ интенсивности полос проводили методом денситометрии с использованием программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Молекулярные массы исследуемых белков подтверждали с помощью маркеров молекулярной массы Precision Plus Protein Standards Dual Color («Bio-Rad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитологический анализ гомогенатов тканей головного мозга крыс, окрашенных по Романовскому-Гимзе, выявил существенные

различия в эффективности двух методов гомогенизации. Гомогенаты, полученные с помощью гомогенизатора Potter-Elvehjem, характеризовались более однородной структурой: в поле зрения преобладали свободные ядра с хорошо сохранившейся мембраной и четкой структурой хроматина, цитоплазматические обломки и минимальное количество интактных клеток (рис. 2, А). Напротив, в образцах, обработанных в автоматическом гомогенизаторе DIAХ 900, наблюдалась значительная гетерогенность с наличием как разрушенных клеток, так и большого количества неизмененных клеток и крупных тканевых агрегатов (рис. 2, Б).

Метод окраски по Романовскому-Гимзе является наглядным методом для оценки качества гомогенизации. Полученные данные демонстрируют, что условия гомогенизатора Potter-Elvehjem обеспечивают более воспроизводимое и полное разрушение ткани за счет стандартизированной и более интенсивной механической обработки. Это приводит к получению гомогената, более пригодного для последующего фракционирования и выделения субклеточных компонентов.

Первым этапом валидации разработанного протокола стала оценка морфологической целостности и чистоты полученных фракций с помощью флуоресцентного красителя DAPI, специфичного к ДНК. DAPI является специфичным, высокофлуоресцентным красителем, который прочно связывается с участками ДНК, богатыми аденином и тиминном. Краситель часто используется для окрашивания ядер живых и фиксированных клеток, а также срезов тканей [11–14].

Как показано на рис. 3, анализ подтвердил высокую эффективность разделения. В цитоплазматической фракции (рис. 3, А) полностью отсутствовали какие-либо DAPI-положительные структуры, следовательно, процедура лизиса и центрифугирования не привела к контаминации цитоплазматической фракции ядерным материалом. Отсутствие видимых клеточных структур, дебриса и цитоплазматических загрязнений свидетельствовало о том, что начальное центрифугирование при 1000g после лизиса NP-40 эффективно осаждала ядра, оставив цитоплазматические компоненты в супернатанте. Таким образом, микроскопический анализ подтвердил, что на данном этапе протокол позволяет получить чистую цитоплазматическую фракцию, свободную от ядер.

В ядерной фракции (рис. 3, Б) было зафиксировано наличие интактных, морфологически сохранных ядер, что визуализировалось в виде ярких, четко очерченных сферических образований с интенсивным синим свечением при использовании гомогенизатора Potter-Elvehjem, но при использовании DIAХ 900 был получен общий гомогенат с разрушенными ядрами (рис. 3, В).

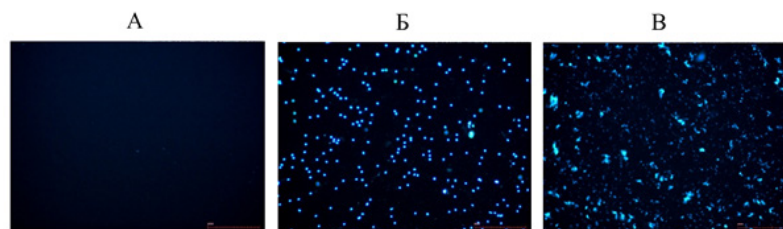


Рис. 3. Окрашивание цитоплазматической и ядерной фракции гомогенатов ткани головного мозга крыс Wistar синим флуоресцентным красителем DAPI. А – цитоплазматическая фракция гомогената, полученная с помощью Potter-Elvehjem; Б – ядерная фракция гомогената, полученная с помощью Potter-Elvehjem; В – гомогенат, полученный с помощью DIAХ 900; флуоресцентная микроскопия («Olympus», Япония). Ув. $\times 20$.

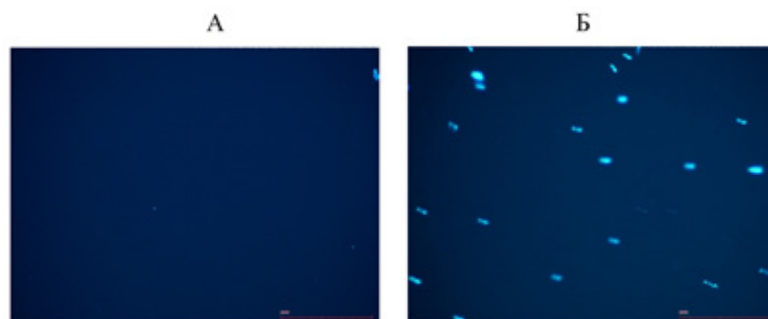


Рис. 4. Окрашивание гомогената клеток HepG2 синим флуоресцентным красителем DAPI. А – цитоплазматическая фракция гомогената; Б – ядерная фракция гомогената, полученная с помощью Potter-Elvehjem; флуоресцентная микроскопия («Olympus», Япония). Ув. $\times 40$.

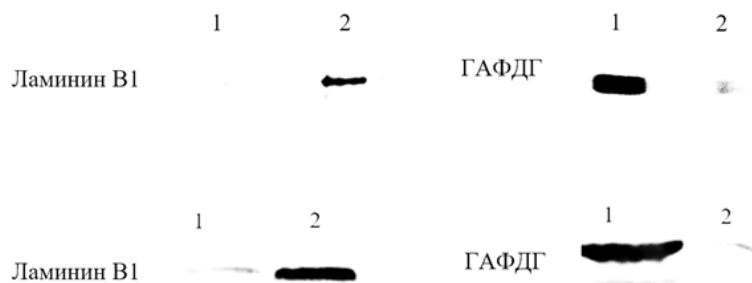


Рис. 5. Вестерн-блот анализ маркерных белков ядерной и цитоплазматической фракций гомогената клеток мозга и HepG2. 1 – цитоплазма, 2 – ядро.

Для леток линии HepG2 был выполнен аналогичный тест и получен такой же результат (рис. 4). Цитоплазматическая фракция была свободная от ядер (рис. 4, А), а ядерная фракция богата целыми ядерными структурами в гомогенате, полученным с помощью Potter-Elvehjem (рис. 4, Б).

Далее для подтверждения полученных результатов проводили вестерн-блот анализ маркерных белков для подтверждения специфичности фракционирования. Проводили детекцию специфичных маркерных белков: ламинина В1 для ядерной фракции и ГАФДГ для цитоплазматической. Ламинин В1 представляет собой структурный белок и является компонентом ядерной оболочки, он играет важную роль в формировании структуры ядра, регулировании распределения хроматина и обеспечении экспрессии генов, репликации и репарации ДНК [15].

Результаты, представленные на рис. 5, демонстрируют высокую специфичность разработанного метода, как для клеток ткани головного мозга, так и для клеточной линии: в ядерной фракции был однозначно детектирован белок ламинин В1 (~66 кДа), в то время как сигнал от цитоплазматического маркера ГАФДГ (~37 кДа) отсутствовал.

В цитоплазматической фракции наблюдалась обратная картина: интенсивная полоса, соответствующая ГАФДГ, при отсутствии сигнала от ламинина B1.

По результатам анализа было получено, что в ядерной фракции гомогената присутствует ламинин B1 и отсутствует ГАФДГ, а в цитоплазматической – присутствует ГАФДГ, отсутствует ламинин B1, что свидетельствует о чистоте выделенных фракций клеточного лизата и адекватности разработанного метода.

Предлагаемый способ разделения цитоплазматической и ядерной фракций клеток линии НерG2 является быстрым и удобным способом разделения цитоплазматической и ядерной фракций суспензии клеток линии НерG2 с целью проведения дальнейших биохимических анализов.

Данные результаты доказывают адекватность методики. Отсутствие перекрестного загрязнения фракций свидетельствует о том, что буфер NP-40 эффективно лизирует плазматическую мембрану, оставляя ядерную оболочку интактной, а последующее использование буфера RIPA позволяет эффективно экстрагировать белки уже из изолированных ядер.

Разработанный двухэтапный протокол, основанный на последовательном использовании детергентов NP-40 и RIPA в сочетании с дифференциальным центрифугированием, показал себя как высокоэффективный метод для субклеточного фракционирования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка надежных и воспроизводимых методов субклеточного фракционирования остается актуальной задачей в клеточной биологии, поскольку точность определения локализации белка напрямую влияет на интерпретацию его функции. Настоящее исследование было посвящено оптимизации протокола для быстрого и эффективного разделения ядерной и цитоплазматической фракций.

В качестве основных реагентов использовались буферы NP-40 и RIPA. Буфер для лизиса NP-40 является солубилизирующим агентом, используемым для приготовления клеточных экстрактов для иммунологических анализов и методов блоттинга и является одним из самых популярных буферов для лизиса [10]. NP-40 может в основном разрушить клеточную мембрану, но разрушение ядерной мембраны слабое [16]. Буфер RIPA воздействует на ядерную мембрану.

Полученные результаты однозначно свидетельствуют об эффективности разработанной методики, основанной на применении буферов NP-40 и RIPA. Комбинация двух независимых методов валидации (флуоресцентной микроскопии и вестерн-блот) предоставляет подтверждение чистоты изолированных фракций. Микроскопия доказала отсутствие физического (ядерного) загрязнения в цитоплазматической фракции, а вестерн-блот подтвердил это на биохимическом уровне, продемонстрировав специфичность распределения маркерных белков.

Использование мягкого неионного детергента NP-40 для селективного лизиса плазматической мембраны позволило высвободить цитоплазматические белки, не повреждая более прочную ядерную оболочку. Последующее центрифугирование при низкой скорости (700 g) эффективно осадит интактные ядра. Важно отметить,

что отмывание осадка ядер, которое часто приводит к потере материала, в данном протоколе было исключено, что минимизировало потенциальные потери ядерных белков.

Разработанный метод является удобным инструментом для фундаментальных и клинических работ. Быстрота и простота способа разделения ядерных и цитоплазматических белков делают его удобным для исследований, требующих анализа большого количества образцов одновременно, например, при изучении временной динамики транслокации белков (например, транскрипционных факторов NF-κB, STAT, Nrf-2 и др.) из цитоплазмы в ядро в ответ на различные стимулы в фундаментальных исследованиях [17, 18]. Важно отметить, что предложенный метод имеет ключевое клиническое значение для онкологии, так как позволяет уточнить диагностику, прогноз и понять механизмы специфической субклеточной локализации белков-маркеров [19]. Так, например, ядерная локализация TFPI-2 служит высокоспецифичным диагностическим признаком светлоклеточного рака яичников [20], а отдельный анализ ядерного и цитоплазматического пулов белка MTA1 при раке толстой кишки позволяет точнее оценивать агрессивность опухоли и потенциал дифференцировки [21], в то время как выявление гипоксия-индуцируемого фактора HIF-1α в ядре при трижды негативном раке молочной железы подтверждает его активную роль в регуляции генов выживания и коррелирует с неблагоприятными клиническими параметрами [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный метод является быстрым, доступным и высокоэффективным инструментом для получения чистых ядерных и цитоплазматических фракций из клеточных линий и тканей. Высокая степень очистки, подтвержденная контролем маркерных белков, позволяет рекомендовать данный протокол для широкого использования в лабораторной практике для последующих биохимических анализов.



ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-4, 6-7, 9-16, 20-22 СМ. REFERENCES)

- Градинарь М.М. Нейропротекторная роль гликопротеина-P и его функционирование при экспериментальном паркинсоническом синдроме. Дис. ... канд. мед. наук. Рязань; 2024.
- Введение в клеточную биологию: Учебник для вузов. 4-е изд., перераб. и доп. Ю.С. Ченцов. М.: ИКЦ «Академкнига»; 2004.
- Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Сеидкулиева А.А., Завьялова О.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro*. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2022; 30 (3):296-304. DOI: 10.17816/PAVLOVJ105574.
- Шабардина Л.В., Рябова Ю.В., Батенева В.А., Минигалиева И.А. Изменения митохондрий, опосредованные воздействием загрязнителей среды обитания. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2025; 33 (2):291-302. DOI: 10.17816/PAVLOVJ626297.
- Рубцов В.А., Парыгина М.Н., Мозговой С.И., Шиманская А.Г., Маркелова М.В., Поморгайло Е.Г. и др. ARID1A как маркер предраковых изменений слизистой оболочки желудка. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2025; 13(1):5-14. DOI: 10.23888/HMJ20251315-14.



REFERENCES

- Li Y., Chen Y., Tao Y., Xu J., Chen M. RhoA protein is generally distributed in the nuclei of cancer cells. *Oncol. Rep.* 2010; 24(4):1005-9. DOI: 10.3892/or.2010.1005.
- Weeks S.E., Metge B.J., Samant R.S. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression. *Cell Mol. Life Sci.* 2019; 76(22):4511-24. DOI: 10.1007/s00018-019-03231-0.
- Wang X., Li S. Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1846(1):13-25. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.03.006.
- Liao P.C., Bergamini C., Fato R., Pon L.A., Pallotti F. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 2020; 155:3-31. DOI: 10.1016/bs.mcb.2019.10.002.
- Gradinar' M.M. The neuroprotective role of glycoprotein-P and its functioning in experimental Parkinson's syndrome. Diss. ... Ryazan'; 2024. (in Russian)
- Qin Y., Zhou Y., Wang K., Gu J., Xiong Z., Zhang W. et al. *In situ* isolation of nuclei or nuclear proteins from adherent cells: a simple, effective method with less cytoplasmic contamination. *Biol. Res.* 2023; 56(1):18. DOI: 10.1186/s40659-023-00429-2.
- Hamana K., Iwai K. Effects of triton X-100 on gel electrophoresis and gel chromatography of histones. Possible binding to helical regions. *J. Biochem.* 1976; 79(1):125-9. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131039.
- Introduction to Cell Biology: Textbook for Universities. Yu.S. Chentsov. 4th ed., revised and expanded. Moscow: Akademkniga; 2004. (in Russian)
- Giemsa G. Eine Vereinfachung und Vervollkommenung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Centralbl f Bakt etc : magazin.* 1904; 37: 308-11.
- Fan Z., Beresford P.J., Zhang D., Xu Z., Novina C.D., Yoshida A. et al. Cleaving the oxidative repair protein ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat. Immunol.* 2003; 4:145-53. DOI: 10.1038/ni885.
- Barcellona M. L., Cardiel G. and Gratton E. Time-resolved fluorescence of dapi in solution and bound to polydeoxynucleotides. *Biochemical and biophysical research communications.* 1990; 170(1): 270-80.
- Otto F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods Cell Biol.* 1990; 33:105-10. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60516-6.
- Tarnowski B.L., Spinale F.G., & Nicholson, J. H. (1991). DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotechnic & Histochemistry.* 1991; 66(6):296-302. DOI: 10.3109/10520299109109990.
- Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* 1995; 70(5):220-33. DOI: 10.3109/10520299509108199.
- Garvalov B.K., Muhammad S., Dobrova G. Lamin B1 in cancer and aging. *Aging (Albany NY).* 2019; 11(18):7336-8. DOI: 10.18632/aging.102306.
- Galvis A.E., Fisher H.E., Camerini D. NP-40 fractionation and nucleic acid extraction in mammalian cells. *Bio. Protoc.* 2017; 7(20):e2584. DOI: 10.21769/BioProtoc.2584.
- Abalenikhina Yu.V., Erokhina P.D., Seidkuliyeva A.A., Zav'yalova O.A., Shchul'kin A.V., Yakusheva E.N. Intracellular location and function of nuclear factor of erythroid origin 2 (Nrf2) in modeling oxidative stress *in vitro*. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akad. I.P. Pavlova.* 2022; 30 (3):296-304. DOI: 10.17816/PAVLOVJ105574. (in Russian)
- Shabardina L.V., Ryabova Y.V., Bateneva V.A., Minigalieva I.A. Mitochondrial alterations mediated by exposure to environmental pollutants. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akad. I.P. Pavlova.* 2025; 33(2):291-302. DOI: 10.17816/PAVLOVJ626297. (in Russian)
- Rubtsov V.A., Parygina M.N., Mozgovoy S.I., Shimanskaya A.G., Markelova M.V., Pomorgaylo E.G. et al. ARID1A as a marker of precancerous changes in the gastric mucosa. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium).* 2025; 13 (1):5-14. DOI: 10.23888/HMJ20251315-14. (in Russian)
- Ota Y., Koizume S., Nakamura Y., Yoshihara M., Takahashi T., Sato S. et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is specifically expressed in ovarian clear cell carcinoma tissues in the nucleus, cytoplasm and extracellular matrix. *Oncol. Rep.* 2021; 45(3):1023-32. DOI: 10.3892/or.2021.7944.
- Chen M., Liu Z., Zheng K., Hu C., Peng P. The potential mechanism of HIF-1 α and CD147 in the development of triple-negative breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2024; 103(23):e38434. DOI: 10.1097/MD.00000000000038434.
- Liu J., Xu D., Wang H., Zhang Y., Chang Y., Zhang J. et al. The subcellular distribution and function of MTA1 in cancer differentiation. *Oncotarget.* 2014; 5(13):5153-64. DOI: 10.18632/oncotarget.2095.



BUTTERBUR БЕЛОКОПЫТНИК



Профилактика приступов мигрени



Снижение воспалительных процессов



Помощь при аллергическом рините



АО «ЭКОЛАБ»
 142530, Московская обл., г.о. Павлово-Посадский,
 г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
 ИНН 5035025076, ОГРН 1035007106958



Покупайте на маркетплейсах

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА
 НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ