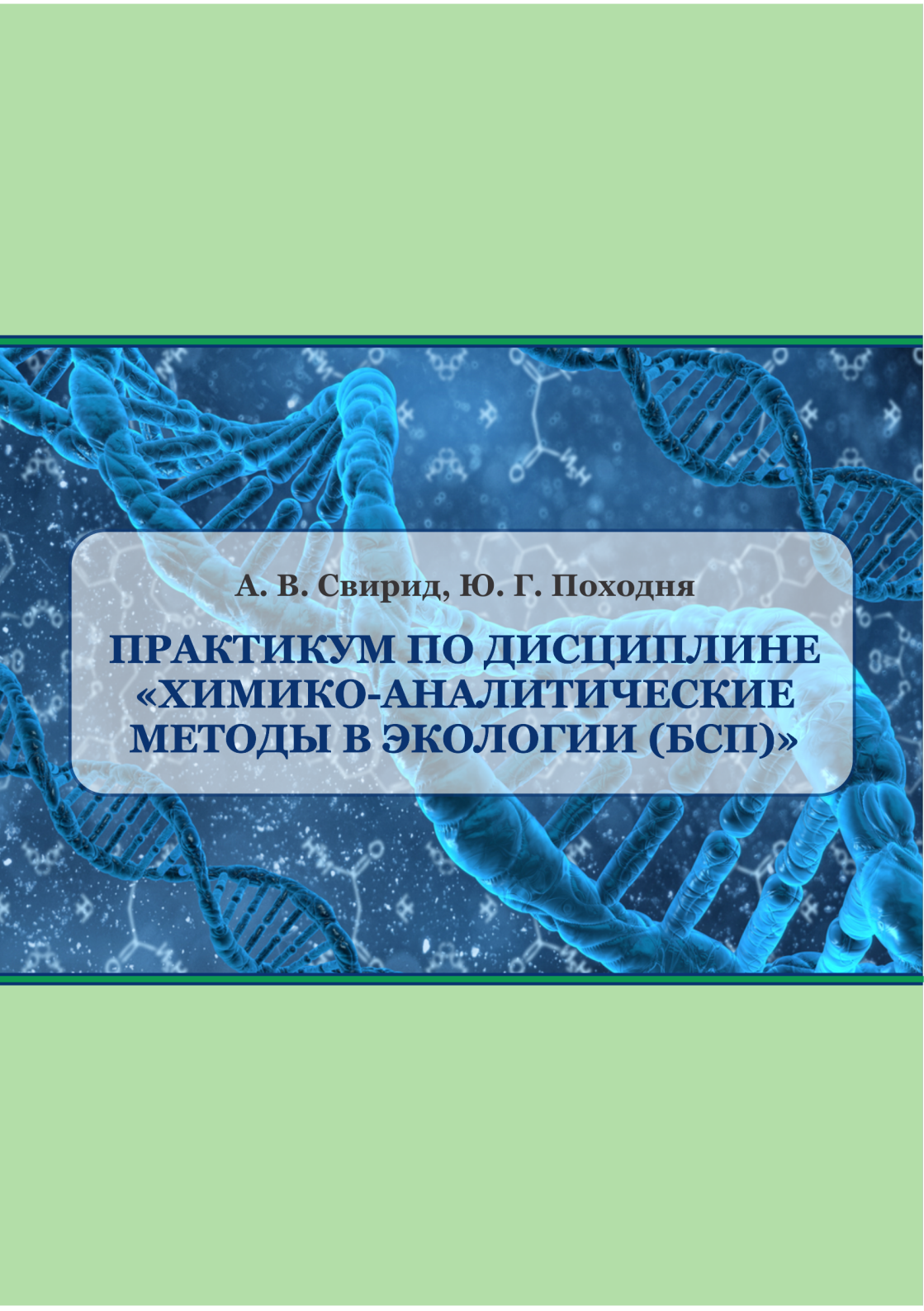




А. В. Свирид, Ю. Г. Походня

**ПРАКТИКУМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ
«ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИИ (БСП)»**



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

А. В. Свирид, Ю. Г. Походня

ПРАКТИКУМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИИ (БСП)»

Учебно-методическое пособие

Минск
«ИВЦ Минфина»
2018

УДК 543.2(075.8)
ББК 24.4
С24

Р е ц е н з е н т ы:

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси *М. А. Кисель*;
кандидат химических наук, ведущий химик учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» *А. А. Агабалаев*

Свирид, А. В.

С24 Практикум по дисциплине «Химико-аналитические методы в экологии (БСП)» : учебно-методическое пособие / А. В. Свирид, Ю. Г. Походня. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 76 с.
ISBN 978-985-7205-07-3.

В пособии рассматриваются современные методы анализа для решения задач медико-биологических исследований. В каждой лабораторной работе поставлена цель, приводится краткая литературная справка и контрольные вопросы для закрепления теоретического раздела. Включены конкретные задания с указанием необходимых материалов, хода выполнения работы и формы отчетности.

Предназначается студентам факультета экологической медицины специальностей «Медицинская экология» и «Медико-биологическое дело» для закрепления лекционного материала по дисциплине и получения навыков в экспериментальной работе.

**УДК 543.2(075.8)
ББК 24.4**

ISBN 978-985-7205-07-3

© Свирид А. В., Походня Ю. Г., 2018
© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

МЕТОДИКА ПОДГОТОВКИ РАСТВОРОВ И МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ.....5

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИЙ *E. COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ОСАЖДЕНИЯ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ16

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ЧИСТОТЫ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК.....27

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ33

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОМУ КЛОНИРОВАНИЮ ГЕНОВ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ *E. COLI* DH5A ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, ПОЛУЧЕННОЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЛИГИРОВАНИЯ ГЕНА *TVXAS1 H. SAPIENS* В ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР pUC18.....46

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БЕЛКОВ. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА (TXAS) ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *E. COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СОРБЕНТЕ NI-NTA СЕФАРОЗА.....53

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *IN VITRO*: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА ВЫЯВЛЕНИЕ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ *H. SAPIENS* САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИ МЕЧЕННОЙ БИОТИНОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА СТРЕПТАВИДИН-HRP64

УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Выполнение работ знакомит студента с основами химико-аналитических методов и методик, используемых в экологии, дополняет и закрепляет теоретический материал наиболее сложных разделов изучаемой дисциплины.

В начале работы излагается теоретический материал, далее следует описание реакции или процессов, ожидаемый результат и практическое значение.

Перед выполнением работы необходимо внимательно ознакомиться с методикой ее проведения и предположить ожидаемый результат, вытекающий из теоретического обоснования химизма реакции или процесса.

Выполняемую работу обязательно записать в тетрадь с указанием номера, названия, цели работы, принципа метода, химизма происходящих реакций или процессов, схемы исследования и полученных результатов. По итогам работы необходимо оформить полученные данные и сделать вывод.

Контрольные вопросы, приведенные в учебном пособии к каждой лабораторной работе, охватывают минимум знаний, необходимых для защиты выполненной и оформленной работы.

Лабораторная работа № 1. МЕТОДИКА ПОДГОТОВКИ РАСТВОРОВ И МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Цель работы: ознакомить студентов с основными принципами и методами подготовки растворов для работы в аналитической лаборатории. Освоить расчет основных концентраций растворенных веществ в приготавливаемых растворах, решить предлагаемые примеры задач и ознакомиться с основным оснащением аналитической лаборатории.

Понятие «растворы» включает истинные растворы и коллоидные растворы. Различие между ними заключается, прежде всего, в размерах частиц и однородности систем.

Истинные растворы – это термодинамически устойчивые однофазные, однородные гомогенные системы, состоящие из двух или большего числа компонентов с размером частиц на уровне 10^{-10} – 10^{-9} м.

Компонентами, составляющими раствор, являются растворитель и растворенные вещества. Растворителем условно принято считать компонент, агрегатное состояние которого не изменяется при образовании раствора, и который содержится в большем количестве. Растворители могут быть жидкими или твердыми, а растворяемые вещества – находиться в любом из трех агрегатных состояний.

Взвешивание навесок для приготовления растворов

Для приготовления многих растворов, применяемых в лабораторной практике, требуется взвешивание реактивов с точностью до 0,01 г. Этому требованию удовлетворяют лабораторные весы. Однако для приготовления растворов с низкой молярной концентрацией реагентов или малых количеств раствора применяются аналитические весы с дискретностью до 0,0001 г, смонтированные на устойчивой подставке из камня и заключенные в застекленный шкаф с дверцами.

Взвешивание «X» г реактива:

- включить весы;
- установить на весы пустую емкость;
- установить весы на «0»;
- насыпать реактива до «X» г;
- выключить весы.

Содержание данного вещества в единице массы или объема раствора называется концентрацией раствора. На практике наиболее часто пользуются следующими способами выражения концентрации:

1. *Массовая доля* ω – отношение массы данного компонента в растворе к общей массе этого раствора. Массовая доля может быть выраже-

на в долях единицы, процентах (%), промилле (тысячная часть процента – ‰) и в миллионных долях (млн^{-1}). Массовая доля данного компонента, выраженная в процентах, показывает, сколько граммов данного компонента содержится в 100 г раствора.

2. *Массовая концентрация* – отношение массы компонента, содержащегося в растворе, к объему этого раствора. Единицы измерения массовой концентрации – кг/м^3 , г/л .

3. *Титр T* – число граммов растворенного вещества в 1 мл раствора. Единицы измерения титра – г/мл , кг/см^3 .

4. *Молярная концентрация C* – отношение количества вещества (в молях), содержащегося в растворе, к объему раствора. Единицы измерения – моль/м^3 , (моль/л). Раствор, имеющий концентрацию 1 моль/л, обозначают 1 М, а 0,5 моль/л – 0,5 М.

5. *Молярная концентрация эквивалентов $C_{\text{эк}}$* (нормальная концентрация) – это отношение количества вещества эквивалентов (моль) к объему раствора (л). Единица измерения нормальной концентрации моль/л. Например, $C_{\text{эк}}(\text{KOH}) = 1 \text{ моль/л}$, $C_{\text{эк}}(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ моль/л}$, $C_{\text{эк}}(1/3 \text{AlCl}_3) = 1 \text{ моль/л}$. Раствор, в 1 л которого содержится 1 моль вещества эквивалентов, называют нормальным и обозначают 1 н.

6. *Моляльность b* – это отношение количества растворенного вещества (в молях) к массе m растворителя. Единица измерения моляльности – моль/кг. Например, $b(\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}) = 2 \text{ моль/кг}$.

7. *Молярная доля* – отношение числа молей растворенного вещества к общему числу молей вещества и растворителя. Молярная доля может быть выражена в долях единицы, процентах (%), промилле (‰) и в миллионных долях (млн^{-1}).

Приготовление растворов

Для приготовления растворов определенной концентрации и точного измерения объемов применяют мерную посуду: мерные колбы, пипетки и бюретки.

Мерные колбы – тонкостенные плоскодонные сосуды с длинным узким горлом, на котором нанесена метка в виде кольцевой черты. На каждой колбе обозначены ее емкость и температура, при которой эта емкость измерена. Колба должна плотно закрываться пробкой.

Пипетки используют для отбора определенного объема пробы жидкости.

Бюретки применяют при титровании, для измерения точных объемов и т. д.

Для менее точного измерения объемов жидкости используют *мерные цилиндры и мензурки*.

В современной аналитической лаборатории для работы с небольшими объемами растворов применяют *автоматические пипеточные дозаторы*, которые являются дозаторами поршневого типа. Принцип их работы основан на воздушном вытеснении жидкости. Дозирование происходит за счет перемещения поршня в измерительном цилиндре. При этом поршень или уменьшает объем воздуха под ним, или увеличивает. Если наконечник дозатора помещен в жидкость, то при увеличении объема между жидкостью и поршнем жидкость будет стремиться заполнить освободившийся под поршнем объем. Когда необходимо сбросить забранную жидкость из дозатора, поршень двигается в направлении наконечника и уменьшает объем воздуха между жидкостью и поршнем, таким образом жидкость вытесняется воздухом из наконечника полностью. Поршень приводится в движение путем нажатия на шток.

Автоматические пипеточные дозаторы разделяются на два вида:

- с постоянным (фиксированным);
- с переменным объемами дозирования.

Если ограничители хода поршня жестко зафиксированы, то такой дозатор позволяет дозировать только один фиксированный объем. Дозаторы с переменным объемом дозирования имеют шкалу объемов, на которой устанавливается требуемое значение.

Современные дозаторы могут быть как механическими, так и электронными. Если поршень приводится в движение рукой лаборанта, то такие дозаторы называются *механическими*. Но сегодня все большую популярность приобретают дозаторы со встроенным в ручку микродвигателем, который и управляет движением поршня. Такие дозаторы называются *электронными*.

В механических дозаторах предусмотрено два основных метода дозирования: *прямое* и *обратное*. Все другие методы являются производными от основных и реализованы только в электронных дозаторах.

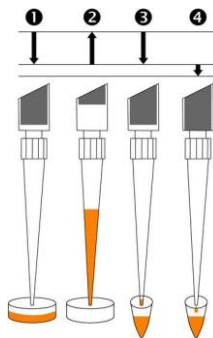


Рис. 1.1. Прямое дозирование механическим дозатором

При прямом дозировании (рис. 1.1) набранная в пипетку жидкость сбрасывается полностью. Иногда в наконечнике могут оставаться мелкие (средние) капли дозируемой жидкости, то есть доза не полностью сбрасывается из пипетки. Это может существенно повлиять на результат исследований, особенно распадаются небольшие объемы жидкости (менее 10 мкл). Поэтому такой вариант дозатора в основном подходит для работы с водными растворами, содержащими небольшие концентрации протеинов или детергентов. Предварительная промывка наконечника непосредственно перед дозированием позволяет улучшить результаты.

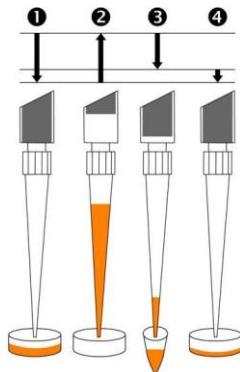


Рис. 1.2. Обратное дозирование механическим дозатором

Обратное дозирование (рис. 1.2) позволяет исключить недостаток метода прямого дозирования, связанного с остатками жидкости в наконечнике, и обеспечивает наилучшие результаты при работе с вязкими и пенящимися жидкостями, а также при дозировании микрообъемов. В наконечник набирается объем жидкости, несколько больший по сравнению с требуемым, после чего происходит дозирование «нижнего» объема жидкости. При этом погрешность, связанная с образованием пены или мениска, нивелируется образованием в наконечнике остаточного объема жидкости, который затем просто сбрасывается.

Одноканальные механические дозаторы с постоянным объемом используются для работы с постоянными объемами жидкости для часто повторяющихся рутинных операций, к примеру, это может быть подготовка проб для биохимических исследований в аналитической лаборатории. Наиболее распространенными сочетаниями требуемых объемов в биохимии являются 10 мкл и 1000 мкл, 100 мкл и 1000 мкл, а также 5 мкл и 500 мкл. Дозаторы с постоянным объемом дозирования являются недорогими устройствами и оптимально отвечают соотношению цена/качество.

Одноканальные дозаторы с переменным объемом способны решать более широкий круг задач и являются универсальным средством дозирования. Это их делает более дорогостоящими устройствами по сравнению с дозаторами, имеющими постоянный объем. Типичными диапазонами объемов являются диапазоны от 0,5 до 10 мкл, от 5,0 до 50 мкл, от 50 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл, от 1 до 5 мл. Дозатор с переменным объемом дозирования может заменить собой набор дозаторов с постоянными объемами, но производительность лаборатории в таком случае может значительно снизиться.

Многоканальные модели механических дозаторов могут осуществлять дозирование в интервалах, аналогичных интервалам одноканальных устройств в общем диапазоне от 0,5 до 5000 мкл. Стандартами являются 4-, 8- и 12-канальные дозаторы. Если необходимо совершить меньшее количество дозирования, то наконечники одеваются только на требуемое число носиков дозатора. Такие дозаторы призваны повышать производительность лабораторий за счет увеличения скорости прободозирования исследуемых жидкостей. Существуют многоканальные механические дозаторы как с фиксированным объемом дозирования, так и с переменным.

Для многократового дозирования жидкостей из одних и тех же бутылей (флаконов) используются *диспенсеры*, которые представляют собой дозирующее устройство, надевающееся на горлышко бутылки. Такие дозаторы работают по принципу забора жидкости из бутылки, на которой он помещен. Они широко применяются в биохимических исследованиях для дозирования одного и того же реагента при крупных сериях идентичных экспериментов. Как и на обычном механическом дозаторе на диспенсере имеется градуированная шкала с фиксацией выбранного объема. Диспенсеры также разделяются на две подгруппы: с фиксированным и изменяющимся объемами.

Измерение pH и буферные растворы

Буферные растворы (англ. buffer, от buff — смягчать удар) — растворы с определенной устойчивой концентрацией водородных ионов. pH буферных растворов мало изменяется при прибавлении к ним небольших количеств сильного основания или сильной кислоты, а также при разбавлении и концентрировании.

Емкость кислотно-основного буферного раствора соответствует числу эквивалентов сильной кислоты или сильного основания, которое необходимо добавить к 1 л раствора, чтобы изменить его pH на единицу. Буферная емкость возрастает при увеличении начальных концентраций его компонентов и максимальна при их равенстве. Буферные свойства проявляются очень слабо, если концентрация одного компонента в 10 раз и более отличается от концентрации другого. Поэтому буферный раствор

часто готовят смешением растворов равной концентрации обоих компонентов, либо прибавлением к раствору одного компонента соответствующего количества реагента, приводящего к образованию равной концентрации сопряженной формы.

Интервал рН (равный обычно $pK_a \pm 1$), в котором данная буферная система может поддерживать постоянное значение рН, называют областью буферирования. В справочной литературе имеются подробные рецепты приготовления кислотно-основных буферных растворов для различных значений рН. Некоторые, наиболее часто используемые в практике вещества для приготовления буферных растворов, представлены в табл. 1.1.

рН-метр – прибор для измерения водородного показателя, характеризующего активность ионов водорода в растворах, воде, пищевой продукции и сырье, объектах окружающей среды и производственных системах непрерывного контроля технологических процессов, в том числе в агрессивных средах. Действие рН-метра основано на измерении величины ЭДС электродной системы, которая пропорциональна активности ионов водорода в растворе — рН. Измерительная схема по сути представляет собой вольтметр, проградуированный непосредственно в единицах рН для конкретной электродной системы (обычно измерительный электрод — стеклянный, вспомогательный — хлорсеребряный).

Фильтрация растворов

Отделение твердых частиц от жидкости при помощи фильтровальной перегородки является сложным процессом. Для такого отделения нет необходимости применять перегородку с порами, средний размер которых меньше среднего размера твердых частиц.

В зависимости от размера удаляемых частиц и цели фильтрования различают следующие методы фильтрования:

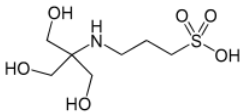
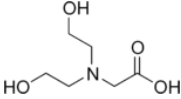
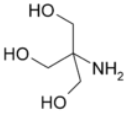
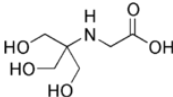
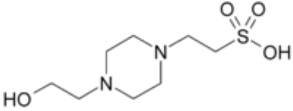
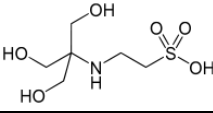
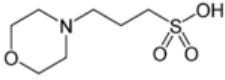
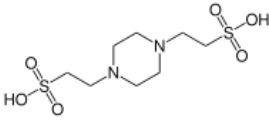
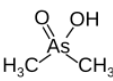
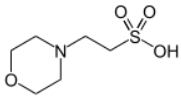
1. *Грубая фильтрация* – для отделения частиц размером 50 мкм и более.

2. *Тонкая фильтрация* обеспечивает удаление частиц размером 1–50 мкм.

3. *Стерильная фильтрация* (микрофильтрация) применяется для удаления частиц и микробов размеров 5–0,05 мкм. В этой разновидности иногда выделяют ультрафильтрацию для удаления пирогенов и других частиц размером 0,1–0,001 мкм.

Таблица 1.1

Вещества для приготовления буферных растворов

Название	Химическая формула	pK _a при 25 °C	Молекулярная масса
TAPS		8,43	243,3
Bicine		8,35	163,2
Tris		8,06	121,14
Tricine		8,05	179,2
HEPES		7,48	238,3
TES		7,40	229,20
MOPS		7,20	209,3
PIPES		6,76	302,4
Cacodylate		6,27	138,0
MES		6,15	195,2

Фильтрация происходит по двум механизмам:

- за счет образования осадка, так как твердые частицы почти не проникают внутрь пор и остаются на поверхности перегородки (шламовый тип фильтрации);

- за счет закупоривания пор (закупорочный тип фильтрации); при этом осадок почти не образуется, так как частицы задерживаются внутри пор.

На практике эти два типа фильтрации сочетаются (смешанный тип фильтрации).

Факторы, влияющие на объем фильтрата и, следовательно, на скорость фильтрации разделяются на:

- гидродинамические;
- физико-химические.

Гидродинамические факторы – это пористость фильтрующей перегородки, площадь ее поверхности, разность давлений по обе стороны перегородки и другие факторы.

Движение жидкости через пористую фильтрующую перегородку имеет в основном ламинарный характер. Если допустить, что капилляры перегородки имеют круглое сечение и одинаковую длину, то зависимость объема фильтрата от различных факторов подчиняется закону Пуазейля:

$$Q = F \cdot z \cdot \pi \cdot r \cdot \Delta P \cdot \tau / 8 \cdot \eta \cdot l \cdot \alpha,$$

где F – поверхность фильтра, м^2 ;

z – число капилляров на 1 м^2 ;

r – средний радиус капилляров, м ;

ΔP – разность давлений по обе стороны фильтрующей перегородки (или перепад давлений на концах капилляров), н/м^2 ;

τ – длительность фильтрации, сек ;

η – абсолютная вязкость жидкой фазы в $\text{н/с} \cdot \text{м}^2$;

l – средняя длина капилляров, м^2 ;

α – поправочный коэффициент на кривизну капилляров;

Q – объем фильтрата, м^3 .

Иначе, объем профильтрованной жидкости прямо пропорционален поверхности фильтра (F), пористости (r, z), перепаду давлений (ΔP), длительности фильтрации (τ) и обратно пропорционален вязкости жидкости, толщине фильтрующей перегородки и кривизне капилляров. Из уравнения Пуазейля выводится уравнение скорости фильтрации (V), которая определяется количеством жидкости, прошедшей через единицу поверхности за единицу времени:

$$V = Q / F \cdot \tau.$$

После преобразования уравнения Пуазейля оно приобретает вид:

$$V = \Delta P/R_{\text{осадка}} + R_{\text{перегородки}},$$

где R – сопротивление движению жидкости. Из этого уравнения следует ряд практических рекомендаций для рационального проведения процесса фильтрации. А именно, для увеличения разности давлений над и под перегородкой создают либо повышенное давление над фильтрующей перегородкой, либо разрежение под ней.

Физико-химические факторы – это степень коагуляции или пептизации взвешенных частиц; содержание в твердой фазе смолистых, коллоидных примесей; влияние двойного электрического слоя, возникающего на границе твердой и жидкой фаз; наличие сольватной оболочки вокруг твердых частиц и т. д. Влияние физико-химических факторов, тесно связанных с поверхностными явлениями на границе раздела фаз, становится заметно при небольших размерах твердых частиц.

Все аппараты для фильтрации называются фильтрами; основная рабочая часть их – фильтровальные перегородки.

В условиях лаборатории для проведения вакуумного фильтрации обычно собирают устройство, состоящее из фарфоровой воронки Бюхнера (в которую укладывается фильтр-вкладыш), фильтра-воронки Шотта с вплавленным фильтром из пористого стекла или же тигля Гуча, устанавливаемых на колбу Бунзена. К трубке-отводу колбы подключается вакуумный насос, обычно водоструйный. Если это необходимо, между насосом и приемником устанавливается предохранительная склянка/устройство.

Техника фильтрации на таком устройстве следующая. Смочив фильтрующий элемент дистиллированной водой, включить вакуумный насос и проверить, хорошо ли прилажен фильтр (в случае со сменными фильтрами) — если фильтр уложен хорошо, слышится спокойный шумящий звук, если же фильтр уложен неплотно и происходит подсос воздуха — слышится свистящий звук. Края неплотно положенного фильтра прижимают пальцем к сетчатой перегородке до тех пор, пока свистящий звук не сменится спокойным шумом.

После этого, не выключая насоса, в воронку до половины ее высоты наливают жидкость, подлежащую фильтрации. В емкости-приемнике (колбе Бунзена или иной) создается разрежение, и жидкость из воронки под влиянием атмосферного давления протекает в колбу. Новые порции жидкости добавляют в воронку периодически. Процесс продолжают до тех пор, пока с конца воронки не перестанет капать фильтрат. Тогда выключают насос (предварительно закрыв кран между ним и колбой), воронку вынимают.

При фильтровании под вакуумом нужно следить, чтобы фильтрат не слишком заполнял колбу и не поднимался до уровня отростка, соединенного с насосом. Иначе фильтрат будет втягиваться в насос и нарушится правильный ход работы. Поэтому, по мере накопления фильтрата, колбу отсоединяют от насоса, удаляют из нее фильтрат и снова присоединяют

Реже, для фильтрования небольших объемов жидкости, используются фильтры в виде насадок на шприц с типом соединения Luer-Lock.

Практическая часть

Задача № 1

Сколько грамм гидроксида калия надо взять для приготовления 500 мл 2,8 М раствора?

Задача № 2

Рассчитайте необходимый pH исходного раствора 0,5 М Tris/HCl (при комнатной температуре 22 °C) для приготовления 50 mM Tris-HCl pH 7,4, который будет использоваться при температуре 4 °C, если известно, что pH буферов на основе Tris увеличивается на 0,028 ед. при уменьшении температуры на 1 °C и уменьшается на 0,05 ед. pH при разбавлении в 10 раз.

Задача № 3

Рассчитать необходимый объем реактивов для приготовления ресуспендирующего буфера для бактериальных клеток.

Исходные реактивы:

1. 1M Tris/HCl pH 7,4.
2. 50 % глицерин.
3. 20 % CHAPS.
4. 4M NaCl.
5. 100 mM PMSF.

Состав ресуспендирующего буфера: 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 20 % глицерин, 0,2 % CHAPS, 0,5 mM PMSF. Необходимый объем буфера – 300 мл.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение молярности (молярной концентрации).
2. Почему для приготовления растворов с заданной молярностью используют мерную посуду?
3. Что такое диспенсер и для чего он чаще всего применяется в лаборатории?
4. Для каких растворов подходит техника прямого дозирования, а для каких обратного?

5. Дайте определение буферной емкости раствора, в каком диапазоне рН она максимальна?

6. Какова зависимость буферной емкости раствора от концентрации его компонентов?

7. На основе какого/каких веществ из описанных в лабораторной работе можно приготовить буферный раствор с рН 5,5? Поясните свой выбор.

8. Назовите и охарактеризуйте основные методы фильтрации.

9. Для чего применяется стерильная фильтрация? В чем ее принципиальное отличие от других методов?

10. За счет изменения каких параметров можно повысить скорость фильтрации?

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Освоить расчет концентраций растворенных веществ вготавливаемых растворах, решить предлагаемые примеры задач и ознакомиться с основным оснащением аналитической лаборатории.

Рекомендуемая литература

1. Пузаков С. А. Химия. М.: Медицина, 1995–2006. 640 с.

2. Ленский А. С. Введение в бионеорганическую и биофизическую химию. М.: Высшая школа, 1989. 256 с.

3. Суворов А. В., Никольский А. Б. Вопросы и задачи по общей химии. СПб.: Химиздат, 2002. 304с.

4. И. К. Цитович. Курс аналитической химии. СПб.: Изд-во «Лань», 2004. 496 с.

5. В. П. Васильев. Аналитическая химия. Ч. 1 и 2. М.: Высшая школа, 1989.

6. Досон, Р. Справочник биохимика. М. : Мир, 1991. 539 с.

7. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Минск, 2000. 463 с.

8. Фильтрация // Химическая энциклопедия / гл. ред. Н. С. Зефиоров. М.: Советская энциклопедия, 1998. Т. 5. 717 с.

Лабораторная работа № 2. ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК ИЗ БАКТЕРИЙ *E. COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ОСАЖДЕНИЯ И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Цель работы: ознакомить студентов с методами выделения и очистки ДНК с использованием различных подходов к разрушению биологического материала и обогащению итоговой смеси нуклеиновыми кислотами. Выделить плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* с использованием методов осаждения и твердофазной экстракции.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот – это первый шаг в большинстве молекулярно-биологических исследований и во всех методиках, связанных с рекомбинантными ДНК.

В большинстве случаев, задачей методов выделения нуклеиновых кислот является получение очищенных нуклеиновых кислот из различных источников с целью проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Качество и чистота нуклеиновых кислот относятся к наиболее важным факторам ПЦР анализа.

ПЦР — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

Для того, чтобы получить высокоочищенные нуклеиновые кислоты, не содержащие ингибирующих примесей, необходимо использовать наиболее подходящие методы выделения. Возможные примеси, которые могут ингибировать проведение анализа с использованием ПЦР, перечислены в табл. 2.1. Для того, чтобы избежать появления ложноотрицательного результата вследствие присутствия в образце ингибиторов ПЦР, рекомендуется проводить контрольные эксперименты для анализа ингибиторов ПЦР.

Таблица 2.1

Некоторые ингибиторы ПЦР

Ингибитор	Концентрация ингибитора
SDS	> 0,005 %
Фенол	> 0,2 %
Этанол	> 1 %
Изопропанол	> 1 %
Ацетат натрия	> 5 mM
Хлористый натрий	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Гемоглобин	> 1 мг/мл
Гепарин	> 0,15 МЕ/мл
Мочевина	> 20 mM
Компоненты реакционной смеси	> 15 %

Для выделения нуклеиновых кислот из биологических материалов необходимо провести лизис клеток, инактивацию клеточных нуклеаз и отделение искоемых нуклеиновых кислот от клеточной массы. Часто идеальная процедура лизиса является компромиссом нескольких методик. Она должна быть достаточно жесткой, чтобы разрушить структуры сложного исходного материала (например, тканей), и при этом достаточно деликатной, чтобы оставить в неприкосновенности целевые нуклеиновые кислоты. Обычная процедура лизиса включает:

- Механическое разрушение (например, измельчение, гипотонический лизис).
- Химическую обработку (например, лизис с помощью детергентов, хаотропных агентов, или тиоловое восстановление).
- Ферментативное расщепление белков (например, с помощью протеиназы К).

Процессы разрушения клеточных мембран и инактивации внутриклеточных нуклеаз могут быть совмещены. Например, один раствор может содержать детергенты для растворения клеточной мембраны и хаотропные соли для инактивации внутриклеточных ферментов. После лизиса клеток и инактивации нуклеаз, клеточная масса может быть легко удалена с помощью фильтрации или осаждения.

Методы очистки

Методики очистки нуклеиновых кислот из клеточных экстрактов обычно являются комбинацией двух или более методов:

- выделение/осаждение;
- хроматография;
- центрифугирование;
- аффинное разделение.

Выделение/осаждение

Экстракция растворителями часто используется для удаления примесей из нуклеиновых кислот. Например, комбинация растворителей: фенол – хлороформ часто используется для удаления белков. Осаждение изопропанолом или этанолом обычно применяется для концентрирования нуклеиновых кислот.

Этанол гораздо менее полярен, чем вода. Таким образом, при его добавлении в раствор, взаимодействие отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК с положительными ионами в растворе усиливается из-за разрушения сольватных оболочек, образованным диполями молекул воды.

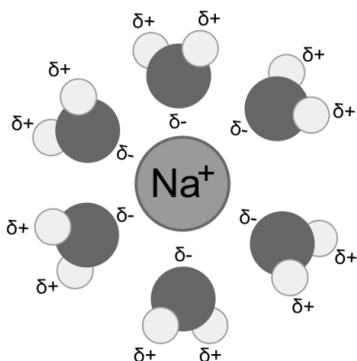


Рис. 2.1. Принцип образования сольватных оболочек молекулами воды

При определенной концентрации спирта в растворе (обычно около 64 %) электрохимическое взаимодействие между ионами становится достаточным для образования ионных связей и ДНК преципитирует. Обычно в качестве положительных ионов служат K^+ , Na^+ , NH_4^+ или Li^+ .

Вместо этанола можно использовать изопропанол, одного его объема достаточно для преципитации, эффективность преципитации выше, но тем не менее, образуемый осадок обычно сохнет дольше.

ДНК сначала преципитируют (осаждают), часто для увеличения эффективности преципитации растворов охлаждают на льду или в морозильнике. В результате ДНК и соли, которые образуют с ней ионные связи, преципитируют из раствора. Суспензию осаждают с помощью центрифугирования в микроцентрифуге с коэффициентом свободного падения $\sim 12000 g$, оставляя осадок ДНК.

Если содержание целевых нуклеиновых кислот небольшое, то к смеси может быть добавлен инертный носитель (такой, как гликоген), чтобы увеличить эффективность преципитации. Другие методы осажде-

ния нуклеиновых кислот включают селективную преципитацию с использованием высоких концентраций солей («высаливание»), либо осаждение белков с использованием переменного pH.

Хроматография

Хроматографические методики могут использовать различные технологии разделения, такие как гель-фильтрация, ионообменная хроматография, селективная адсорбция, либо аффинное связывание. Гель-фильтрация использует свойство молекулярного сита, которым обладают пористые частицы геля. Матрикс с определенным размером пор позволяет молекулам меньшего размера проникать в поры под действием диффузии, в то время как молекулы большего размера минуют поры и элюируются в свободном объеме. Таким образом, молекулы элюируются в порядке уменьшения их размера.

Ионообменная хроматография, – еще один метод, который использует электростатическое взаимодействие между целевыми молекулами и функциональными группами носителя в хроматографической колонке.

Нуклеиновые кислоты (имеющие высокий отрицательный заряд, линейные полианионы) могут быть элюированы с ионообменной колонки с помощью простого солевого буфера.

В адсорбционной хроматографии нуклеиновые кислоты селективно адсорбируются на кремниевом или стеклянном носителе в присутствии определенных солей (например, хаотропных солей), в то время как другие биологические молекулы не способны к такой адсорбции. В этом случае слабые солевые растворы или вода способны элюировать нуклеиновые кислоты, в результате чего получают образцы, которые могут быть непосредственно использованы в дальнейших процедурах.

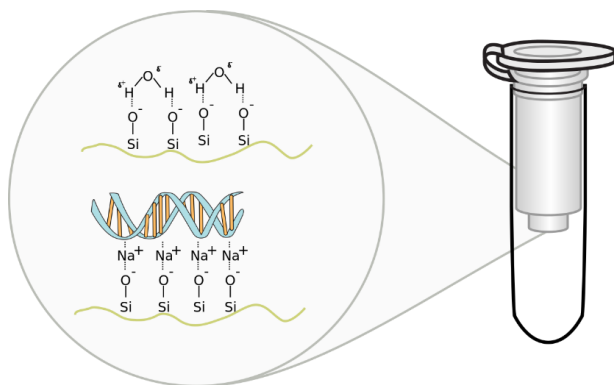


Рис. 2.2. Принцип адсорбции молекул ДНК на Si носителе

Принцип адсорбции на носителе основан на том, что хаотропные агенты (гуанидина тиоционат, гуанидина гидрохлорид) денатурируют биомолекулы, разрушая их гидратную оболочку, что позволяет положительно заряженным ионам образовать солевые мостики между отрицательно заряженной ДНК и отрицательно заряженной поверхностью Si при высокой концентрации соли. ДНК дальше очищается промывкой раствором с высоким содержанием соли и этанолом и элюируется буфером с низким содержанием соли. ДНК адсорбируется на носителе, а молекулы-загрязнители проходят сквозь него.

Центрифугирование

Селективное центрифугирование является мощным методом, используемым для очистки. Например, ультрацентрифугирование в самодиффундирующих градиентах хлористого цезия при больших ускорениях уже давно используется для очистки плазмид. Часто центрифугирование комбинируют с каким-либо другим методом.

Например, колоночная хроматография при вращении, которая объединяет гель-фильтрацию и центрифугирование для очистки ДНК, или РНК от низкомолекулярных примесей (солей, нуклеотидов и пр.), для смены буфера или для селекции по размеру.

Некоторые методики совмещают селективную адсорбцию на хроматографическом матриксе с центрифужным элюированием для селективной очистки какого-то одного типа нуклеиновых кислот.

Аффинное разделение

В последние годы все больше методик очистки объединяют аффинную иммобилизацию нуклеиновых кислот с магнитным разделением. Например, poly (A) + мРНК может быть привязана к магнитным частицам, покрытым стрептавидином, с помощью меченных биотином олигонуклеотидов (oligo (dT)), после чего комплекс частиц может быть удален из раствора (как и несвязанные примеси) с помощью магнита. Твердофазная техника упрощает очистку нуклеиновых кислот, так как способна заменить несколько этапов (центрифугирования, экстракции органическими растворителями и фазового разделения) одним быстрым этапом магнитного разделения.

Выделение плазмидной ДНК

Разрушения бактерий для последующего выделения биологически активной ДНК можно добиться разными способами.

- Механическими. При этом происходят многочисленные разрывы ДНК.

- У многих бактерий наступает лизис после добавления анионного детергента додецилсульфата (или лаурилсульфата). В частности, так можно разрушить бактерии кишечной группы, пневмококки и гемофильные бактерии. Додецилсульфат не только разрушает клетки, но и денатурирует некоторые белки. Однако затем он должен быть полностью удален из лизата (что и достигается при последующих обработках), так как его примесь мешает многим дальнейшим применениям полученной ДНК.

- Некоторые грамположительные бактерии нельзя разрушить только додецилсульфатом или другими поверхностно-активными веществами. Вначале нужно удалить клеточную стенку и затем применить тот или иной детергент. Для разрушения клеточной стенки чаще всего применяют лизоцим. При концентрациях, которые чаще всего применяются для разрушения бактериальных клеток (50–500 мкг/мл), функции лизоцима сводятся к разрушению клеточной стенки, в результате чего образуются хрупкие протопласты, легко разрушаемые детергентами. При больших концентрациях лизоцим может, видимо, влиять на связь ДНК с цитоплазматической мембраной и даже связываться с ДНК, осаждая ее. Кроме лизоцима, для той же цели употребляют проназу. Проназа способствует более полному гидролизу белка и поэтому лучшей последующей депротеинизации ДНК.

При разрушении бактерий в лизате в числе прочих ферментов появляются дезоксирибонуклеазы. Они, если действие их чем-либо не блокировано, могут тут же разрушить ДНК. Обычно от них защищаются, добавляя вещества, которые связывают ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНКаз.

Вещества, связывающие ионы магния (ЭДТА, цитрат), которые добавляют при лизисе клеток для инактивации дезоксирибонуклеаз и предохранения выделяющейся ДНК, подавляют поглощение ДНК компетентными клетками. Додецилсульфат и дезоксихолат также подавляют трансформацию. Лизоцим и проназа, остающиеся в лизате, сами могут лизировать компетентные клетки. В ряде случаев от нежелательных примесей, мешающих трансформации, можно избавиться за счет его разведения.

Для депротеинизации лизата при выделении ДНК используют обработку фенолом, который осаждает додецилсульфат и инактивирует все белки, в том числе и дезоксирибонуклеазы.

- ЭДТА – разрыхляет наружную мембрану, ингибирует нуклеазы;
- лизоцим – разрушает клеточную стенку;
- SDS – разрушает цитоплазматическую мембрану, денатурирует белки, ингибирует нуклеазы.

Существуют различные методики лизиса:

Лизис кипячением [Holmes, Quigley, 1981] и лизис щелочью [Birnbom, Doly, 1979] отличаются высокой эффективностью и в случае

малых плазмид (≤ 10 kb) дают выход 2–3 мг/л. Лизис под действием SDS [Godson, Vapnek, 1973] сравнительно более мягкий и им следует пользоваться в случае больших плазмид (≥ 10 kb).

Очистка ДНК. В этих методах очистки так или иначе используют два основных различия между ДНК *Escherichia coli* и плазмидной ДНК:

1) хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид, обычно используемых в качестве векторов;

2) основная масса ДНК *E. coli* выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Поэтому большинство методов очистки включают осаждения, при которых из препарата удаляются преимущественно длинные цепи ДНК *E. coli*, случайно захваченные обломки лизированных клеток. Методики эти основаны также на использовании свойств кольцевой замкнутой ДНК. Каждая из комплементарных цепей плазмидной ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, поэтому цепи нельзя отделить друг от друга (не разорвав одну из них) в тех условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в ДНК, например при нагревании или при выдерживании в умеренно щелочных растворах (до pH 12,5). При охлаждении или возвращении к нейтральному pH замкнутые кольцевые молекулы вновь принимают нативную конформацию, тогда как ДНК *E. coli* остается денатурированной.

Плазмидная ДНК ведет себя отлично от ДНК *E. coli* также и при равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий краситель в насыщающей концентрации, например *бромистый этидий*. Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и поэтому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью. Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантной ДНК для многих целей оказалось уже необязательным проводить очистку больших количеств плазмидной ДНК до такой степени, чтобы препарат был гомогенным.

Например, расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл).

Описанные методики можно успешно использовать для выделения разнообразных плазмид из различных штаммов бактерий. Следовательно, чем меньше плазида, тем лучше достигаемые результаты. С увеличением молекулярной массы плазмиды ее свойства становятся все ближе к

свойствам ДНК хозяина. Выделение плазмид, размер которых превышает 25 kb, сильно затрудняется и выход оказывается невысоким. Однако все плазмиды, обычно используемые при клонировании, относительно невелики и приведенные методы дают хорошие результаты.

Практическая часть

Задание: провести выделение плазмидной ДНК из бактерий *E. coli* с использованием методов осаждения и твердофазной экстракции.

Материалы, оборудование и реактивы: дозаторы автоматические одноканальные со сменными наконечниками, наконечники различных объемов, пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, стеклянные стаканы, вихревой смеситель, весы, рН-метр, настольная центрифуга, микроцентрифужные колонки, дистиллированная вода, гидроксид натрия, додецил сульфат натрия (ДДС-Na, SDS), 1 М Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 М ЭДТА (pH 8,0), РНКазы А (10 мг/мл), субтилизин (щелочная протеаза, 25 мг/мл), гуанидина гидрохлорид, ацетат калия, ледяная уксусная кислота, 96 % этиловый спирт, изопропиловый спирт.

Ход работы

Приготовление буферов и растворов

1. 0,5 М ЭДТА, pH 8,0: для приготовления 100 мл раствора к 75 мл дистиллированной воды добавить 14,6 г соли ЭДТА. Тщательно растворить соль, параллельно доводя pH раствора до 8,0 используя HCl. Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой.

2. 1 М Tris-HCl, pH 7,5: для приготовления 100 мл раствора в 80 мл дистиллированной воды растворяют 12,1 г Tris основного и доводят pH раствора до 7,5 используя HCl. Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой.

3. Ресуспенсирующий раствор: для приготовления 100 мл раствора к дистиллированной воде добавляют 5 мл 1 М Tris-HCl, pH 7,5, 2 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0 и 1 мл РНКазы А.

4. Лизисный раствор: для приготовления 100 мл раствора в дистиллированной воде растворяют 0,8 г NaOH и 0,29 г SDS.

5. Нейтрализующий раствор: для приготовления 100 мл раствора в 50 мл дистиллированной воды растворяют 39,15 г гуанидина гидрохлорида, 7,45 г ацетата калия и аккуратно приливают 11,48 мл ледяной уксусной кислоты. Итоговый pH раствора должен быть ~ 4,2. Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой.

6. Промывочный раствор: для приготовления 100 мл раствора в 40 мл дистиллированной воды растворяют 0,63 г ацетата калия, 1,81 мл

1 М Tris-HCl, pH 7.5, 8,8 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8.0. Затем к получившемуся раствору добавляют 60 мл 96 % этилового спирта.

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток

1. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток методом щелочного лизиса с осаждением изопропиловым спиртом

1.1. Центрифугировать 1–10 мл ночной культуры 5 мин, 10000 g (уравновесить пробирки чистой водой).

1.2. Ресуспендировать клетки с 250 мкл ресуспендирующего раствора (хранится в холодильнике).

1.3. *Разрушение клеток:* добавить 250 мкл лизисного раствора, перемешать 4 раза.

1.4. Добавить 10 мкл щелочной протеазы (выдается преподавателем), перемешать 4 раза. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

1.5. Добавить 350 мкл нейтрализующего раствора, перемешать 4 раза.

1.6. *Осаждение «обломков»* клеток: центрифугировать 10 мин, 14000 g.

1.7. Подготовить чистые эппендорфы, пронумеровать.

1.8. Перенести супернатант в эппендорфы.

1.9. *Осаждение ДНК:* добавить к образцу равный объем изопропанола и выдержать его при комнатной температуре 45 мин.

1.10. Центрифугировать 15 мин, 14000 g.

1.11. Аккуратно удалить надосадок, не повредив образовавшийся осадок.

1.12. *Промывка:* Перемешать осадок в 750 мкл 70 % этилового спирта.

1.13. Центрифугировать 1 мин, 14000 g.

1.14. Аккуратно удалить надосадок, не повредив образовавшийся осадок.

1.15. Повторить пункты 1.12–1.14.

1.16. Растворить осадок в 50 мкл дистиллированной воды.

Плазмидная ДНК хранится при –20 °С.

2. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток методом щелочного лизиса с использованием твердофазной экстракции

2.1. Центрифугировать 1–10 мл ночной культуры 5 мин, 10000 g (уравновесить пробирки чистой водой).

2.2. Ресуспендировать клетки с 250 мкл ресуспендирующего раствора (хранится в холодильнике).

2.3. *Разрушение клеток:* добавить 250 мкл лизисного раствора, перемешать 4 раза.

2.4. Добавить 10 мкл щелочной протеазы, перемешать 4 раза. Инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

2.5. Добавить 350 мкл нейтрализующего раствора, перемешать 4 раза.

2.6. *Осаждение «обломков» клеток*: центрифугировать 10 мин, 14000 g.

2.7. Подготовить чистые микроцентрифужные колонки с 2 мл приемниками, пронумеровать.

2.8. Перенести супернатант в колонки с приемниками.

2.9. Центрифугировать 1 мин, 14000 g, очистить приемник.

2.10. *Промывка сорбента*: Добавить 750 мкл промывочного раствора. Центрифугировать 1 мин, 14000 g, очистить приемник.

2.11. Повторить пункт 10, но с 250 мкл промывочного раствора.

2.12. Центрифугировать колонки с пустым приемником 2 мин, 14000 g (удаление спирта).

2.13. Переместить колонки в чистые эппендорфы.

2.14. *Элюция*: нанести на колонки 50 мкл дистиллированной воды или буфера с pH 8.0. Центрифугировать 1 мин, 14000 g.

Плазмидная ДНК хранится при -20°C .

Контрольные вопросы

1. Для чего применяется выделение и очистка нуклеиновых кислот?

2. Назовите основное применение выделенной и очищенной из биологического образца ДНК.

3. Как влияет чистота препарата нуклеиновых кислот на проведение ПЦР?

4. Каков механизм преципитации ДНК при ее осаждении спиртами?

5. Для чего применяется центрифугирование при выделении нуклеиновых кислот?

6. Объясните основной принцип адсорбции молекул ДНК на Si носителе.

7. Какова роль додецилсульфата натрия при выделении ДНК бактерий?

8. Для разрушения каких бактерий недостаточно применения детергента?

9. За счет чего при выделении достигается отделение плазмидной ДНК клетки бактерии от геномной?

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Выделить плазмидную ДНК из бактерий *E. coli* DH5 α с использованием методов осаждения и твердофазной экстракции, сравнить трудоемкость и времязатраты применения данных методов.

Рекомендуемая литература

1. *Досон Р.* Справочник биохимика. М. : Мир, 1991. 539 с.
2. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Минск, 2000. 463 с.
3. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование (Методы генетической инженерии). Москва: «Мир», 1984.
4. *Sambrook J. F., Russell D. W.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vol 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
5. *Johnston J. R.* Molecular genetics of yeast: a practical approach. IRL Press , Oxford Univ. Press, Oxford, England, 1994.
6. *Celis J. E. (ed)* Cell biology: a laboratory handbook, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1997.

Лабораторная работа № 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И ЧИСТОТЫ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Цель работы: ознакомить студентов со спектрофотометрическим методом определения чистоты препарата нуклеиновых кислот и количественного содержания нуклеиновых кислот в образце. Определить концентрацию и охарактеризовать чистоту плазмидной ДНК выделенной в ходе лабораторной работы 2.

Макромолекулы поглощают свет. Длины волн, при которых происходит поглощение, и степень поглощения зависят от структуры и от окружения макромолекулы, потому спектроскопия поглощения, или *абсорбционная спектроскопия*, может служить полезным инструментом для характеристики макромолекул. Когда свет встречается с молекулой, он может либо рассеиваться (изменять направление своего распространения), либо поглощаться (его энергия передается молекуле). Если произошло поглощение электромагнитной энергии света, о молекуле говорят, что она перешла в возбужденное состояние.

Зависимость вероятности поглощения от длины волны называется *спектром поглощения*. Любая молекула поглощает свет в достаточно широкой области длин волн. Однако при данной длине волны в спектре обычно преобладает поглощение химических групп только одного типа. Эти группы называют *хромофорами*. Хромофоры, входящие в состав белков и нуклеиновых кислот, поглощают свет только при длинах волн, меньших чем 300 нм. Использование воды в качестве растворителя автоматически ограничивает спектральные измерения областью длин волн, больших, чем 170 нм. Ниже этого предельного значения поглощение даже очень тонких (< 1 мкм) водных пленок так велико, что регистрация на его фоне какого бы то ни было вклада от макромолекул требует особой высокой точности.

Хромофорами белков являются пептидные группы $O=C-N-H$ и боковые группы аминокислотных остатков. Кроме того, некоторые белки содержат дополнительные хромофоры: например, атомы меди или железа, железосерные кластеры, ретиналь в родопсине, флавины и т. п. Полоса поглощения пептидной группы наблюдается при 210–220 нм, но является слабой. Для боковых групп большинства аминокислот максимумы поглощения лежат в той же области, что и поглощение пептидной группы.

Зарегистрировать их поглощение в белках почти невозможно, поэтому белки поглощают при 280 нм только из-за присутствия в их молекулах остатков тирозина, триптофана и фенилаланина. Поглощение ароматических боковых групп этих остатков имеет максимумы при длинах волн около 280 нм. Поглощение Trp значительно сильнее, чем Phe и Tyr, однако он редко присутствует в белках в больших количествах в отличие от Tyr, вклад которого в поглощение белков также оказывается весьма значительным. Поглощение Phe гораздо меньше и обнаружить его присутствие в белках, содержащих другие ароматические аминокислоты, оптическими методами почти невозможно.

Хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые и пиримидиновые основания. Электронная структура пуринов и пиримидинов гораздо сложнее, чем белковых хромофорных групп. Поэтому кажущиеся простыми полосы поглощения полинуклеотидов в действительности являются результатами наложения нескольких разных полос.

Полосы поглощения отдельных хромофоров типичной нуклеиновой кислоты сливаются и дают простую на вид полосу с максимумом при 260 нм (рис. 3.1).

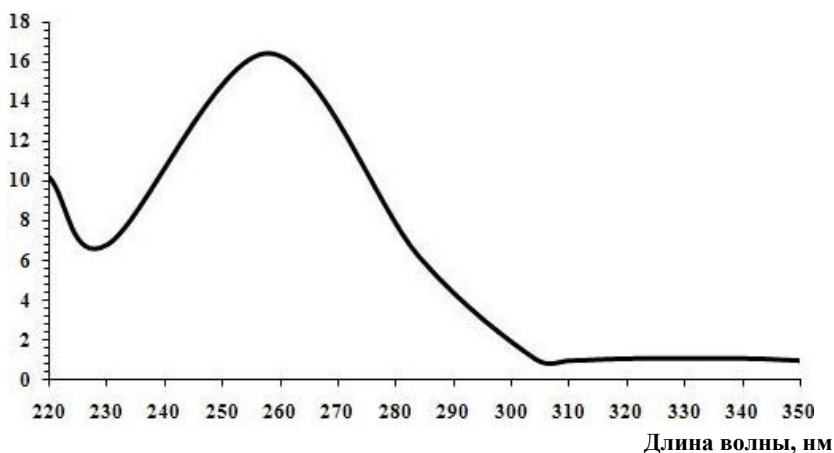


Рис. 3.1. Спектр поглощения ДНК

Определение концентрации ДНК в растворе

Метод определения концентрации нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) в растворе основан на существовании у ДНК и РНК максимума поглощения при длине волны 260 нм. Это означает, что в растворах нуклеиновых кислот максимальная фотометрическая абсорбция наблюдается при 260 нм и прямо коррелирует с концентрацией ДНК или РНК.

При помощи закона Бугера — Ламберта — Бера возможно соотнести концентрация молекул, поглощающих излучение с количеством по-

глощенного света. На длине волны 260 нм средний коэффициент экстинкции для двуцепочечной ДНК составляет $0,020 \text{ (нг/мкл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$, для одноцепочечной ДНК $0,027 \text{ (нг/мкл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$, для одноцепочечной РНК $0,025 \text{ (нг/мкл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и для коротких одноцепочечных олигонуклеотидов коэффициент экстинкции зависит от длины и соотношения азотистых оснований (около $0,030 \text{ (нг/мкл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Отсюда оптическая плотность (англ. OD, optical density), равная 1, соответствует концентрации двуцепочечной ДНК около 50 мкг/мл. Спектрофотометрический способ определения концентрации нуклеиновых кислот применяется при концентрациях до 2 OD.

Таким образом концентрация НК в растворе равна:

$$C[\text{нг/мкл}] = A_{260} \times K$$

Таблица 3.1

Коэффициенты пересчета (K) для разных видов нуклеиновых кислот

Тип НК	K (для изм. р-ра) [нг/мкл]
dsDNA	50
ssDNA	37*
ssRNA	40

* – для олигонуклеотидов коэффициент сильно зависит от состава

Определение чистоты препарата ДНК или РНК

Отношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (260 нм/280 нм) показывает чистоту препарата ДНК или РНК. Препарат считается чистым, если отношение значений 260 нм/280 нм приблизительно равно 1,8 для ДНК и 2,0 для РНК. В случае меньших значений показателя 260 нм/280 нм препарат содержит большое количество примесей белка, фенола или иных контаминирующих агентов, имеющих значительное поглощение при 280 нм.

Другим показателем чистоты препарата ДНК или РНК является отношение значений поглощения 260 нм/230 нм. В случае чистого препарата это соотношение обычно равно 1,8–2,2. Меньшие значения коэффициента 260 нм/230 нм свидетельствуют о загрязнении препарата компонентами, которые остаются после процедуры выделения ДНК или РНК (хаотропные соли, примеси углеводной природы).

Загрязнение хаотропными солями и низкое значение коэффициента A_{260}/A_{230}

Технология silica мембран для очистки РНК или ДНК основана на способности хаотропных солей разрушать сольватную оболочку вокруг нуклеиновых кислот. Две наиболее часто используемые хаотропные соли – это гуанидина гидрохлорид (GuHCl) и гуанидина тиоцианат

(GuSCN). В растворе они оба имеют один и тот же катион гуанидина, но разные анионы. Эти анионы не только ответственны за их различное поведение в отношении нуклеиновых кислот, но и за различные спектры поглощения в УФ-области. GuHCl лишь минимально поглощает при < 220 нм, даже при концентрации 1 М, в то время как GuSCN уже показывает значительное поглощение < 240 нм (1 мМ; рис. 3.2) и даже < 260 нм (1 М).

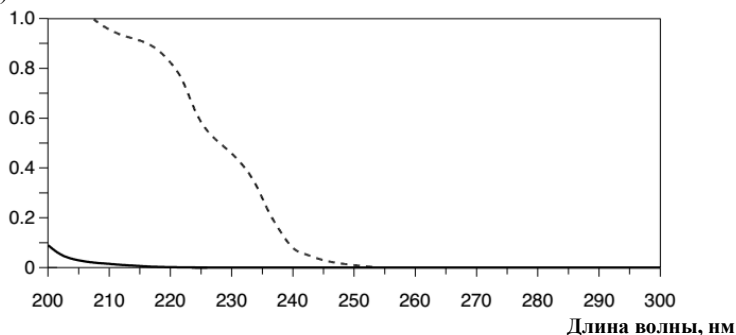


Рис. 3.2. Спектр поглощения GuHCl (сплошная линия) и GuSCN (прерывистая линия)

Если ДНК загрязнена хаотропными солями, то поглощение на 230 нм может иметь огромное влияние на отношение чистоты A_{260}/A_{230} . Загрязнение GuSCN может понизить коэффициент, по сравнению с идеальным значением ($> 2,0$), вплоть до 1,5 или даже ниже 1,0. GuHCl, с другой стороны, является невидимым на этой длине волны и не изменяет соотношение вообще. Этот эффект, однако, обнаруживается только с малыми количествами ДНК. Технические достижения в области УФ-спектроскопии позволили измерять эти небольшие количества ДНК в небольших объемах, таким образом, поднимая вопрос о том, что ДНК может быть слишком «грязной». Тем не менее эта проблема обычно не затрагивает образцы с высокой концентрацией ДНК, поскольку собственное поглощение при 230 нм маскирует вклад любого из этих загрязнителей.

Концентрация загрязняющей хаотропной соли находится, как правило, в диапазоне от 100 мкМ до 1 мМ, и не оказывает никакого отрицательного влияния на последующие ферментативные реакции, например, ПЦР, рестрикцию или лигирование. На рис. 3.3 показано ингибирование ПЦР в реальном времени GuSCN и GuHCl – отрицательное влияние хаотропных солей на ПЦР начинается приблизительно в 100 раз более высокой концентрации (40 мМ). Кроме того, отчетливо видно, что не только GuSCN, но и спектрофотометрически «невидимый» GuHCl может быть причиной ингибирования ПЦР.

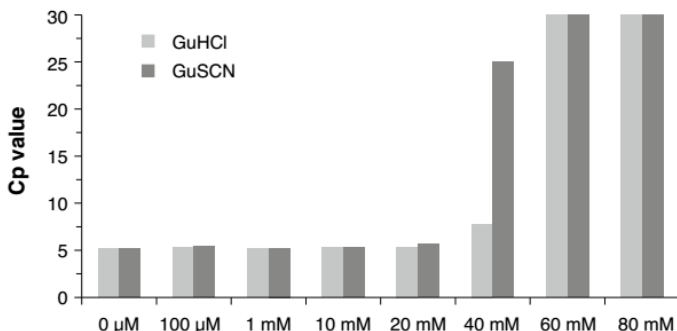


Рис. 3.3. Ингибирование ПЦР в реальном времени GuHCl (светло серый) и GuSCN (темно серый)

Различная степень загрязнения хаотропными солями наблюдается всегда (как GuSCN, так и GuHCl). Свести к минимуму этот эффект можно только особо тщательной промывкой образца. Это, однако, не является необходимым, так как конечная концентрация хаотропной соли в элюате слишком мала, чтобы оказывать отрицательный эффект на последующие операции с ДНК. Таким образом, неидеальное соотношение A_{260}/A_{230} в большинстве случаев можно просто игнорировать.

Практическая часть

Задание: провести спектрофотометрическое определение концентрации и чистоты препарата плазмидной ДНК из бактерий *E. coli.*, выделенной с использованием методов осаждения и твердофазной экстракции.

Материалы, оборудование и реактивы: Спектрофотометр Solar CM2203, дозаторы автоматические, одноканальные со сменными накопечниками, наконечники различных объемов, пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, дистиллированная вода, растворы ДНК.

Ход работы

1. Для спектрофотометрического определения концентрации ДНК образец нуклеиновой кислоты развести 1:50 деионизированной водой (или любым подходящим буфером, таким, например, как буфер TE), перенести в кварцевую спектрофотометрическую кювету.

2. Произвести замер спектра поглощения на спектрофотометре Solar CM2203 относительно чистой деионизированной воды (или соответствующего буфера) при $\lambda = 220\text{--}350$ нм.

3. Концентрация нуклеиновой кислоты в образце рассчитывается по формуле: $C[\text{нг/мкл}] = A_{260} \times Df \times K$, где A_{260} – оптическая плотность образца при $\lambda = 260$ нм; Df – фактор разведения; K – коэффициент пересчета

та (табл. 3.1). Точность измерения концентрации нуклеиновой кислоты падает при слишком больших и при слишком маленьких значениях A_{260} .

4. Заполнить таблицу:

Шифр образца	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	[C], нг/мкл
х.1 (осаждение)						
х.2 (ТФЭ)						

5. Сделать выводы о различиях методов выделения ДНК: какой метод позволил получить большее количество ДНК? Какие загрязнители, на ваш взгляд, присутствуют в образцах? С чем, на ваш взгляд, это связано?

Контрольные вопросы

1. На чем основано спектрофотометрическое определение макромолекул?
2. Назовите максимумы поглощения нуклеиновых кислот и белков.
3. Какой химический смысл имеют отношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} ? Каковы их пороговые значения?
4. Какие загрязнители могут понижать A_{260}/A_{280} ?
5. Какие загрязнители могут понижать A_{260}/A_{230} ?
6. Какими спектральными характеристиками обладают хаотропные соли гуанидина?
7. В каком диапазоне длин волн записывается спектр ДНК?
8. Как влияет загрязнение хаотропными солями на проведение ПЦР?

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Определить концентрацию и охарактеризовать чистоту плазмидной ДНК из бактерий *E. coli* DH5a, выделенной ранее.

Рекомендуемая литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование (Методы генетической инженерии). Москва: «Мир», 1984.
2. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. М.: Мир, 2002.
3. Sambrook J. F., Russell D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vol 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
4. Johnston J. R. Molecular genetics of yeast: a practical approach. IRL Press, Oxford Univ. Press, Oxford, England, 1994.
5. Celis J. E. (ed) Cell biology: a laboratory handbook, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1997.

Лабораторная работа № 4. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Цель работы: ознакомить студентов с методами электрофоретического разделения и анализа ДНК и белков с использованием различных видов гелей. Провести электрофоретическое исследование плазмидной ДНК в агарозном геле для ее качественной идентификации.

Электрофоретические методы являются эффективным инструментом исследования биополимеров различной природы. Принцип электрофореза основан на способности заряженных макромолекул мигрировать под действием внешнего электрического поля. Подвижность молекул существенно зависит от массы, заряда этих частиц, от их конформации и других физических свойств. Первая часть слова «электро» относится к электричеству, а вторая часть слова «форез» происходит от греческого «*phoros*», что означает переносить. Таким образом, электрофорез в гелях – это метод, при котором молекулы перемещаются через пространство геля под воздействием электрического тока. Движущей силой электрофореза является напряжение, прикладываемое к электродам на каждом конце геля. Свойства молекул определяют, насколько быстро электрическое поле может перемещать их через желеобразную среду.

Важные биологические макромолекулы (например, аминокислоты, пептиды, белки, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты) обладают ионизируемыми группами, и при любом заданном pH, существуют в растворе как электрически заряженные частицы, либо как катионы (+), либо как анионы (–). В зависимости от природы заряда среды, заряженные частицы будут мигрировать либо к катоду, либо к аноду. Например, когда электрическое поле прилагается к гелю при нейтральном pH, отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК способствуют ее перемещению в сторону анода.

С помощью гель-электрофореза можно определить длину и чистоту биологических макромолекул. Способность макромолекул разделяться в гелях зависит от двух факторов: массы молекулы и ее заряда. При нанесении биологических макромолекул на гель, оба этих фактора начинают действовать одновременно. Электрический заряд от одного электрода отталкивает молекулы, а в это время другой электрод притягивает эти молекулы. При этом гель, создавая силу трения, действует как «молекулярное сито», разделяя молекулы в зависимости от их размера. В ходе

электрофореза макромолекулы проходят через поры геля, и скорость их движения в электрическом поле зависит от следующих параметров:

- силы электрического поля;
- размера и формы молекул;
- относительной гидрофобности образцов;
- температуры и ионной силы буфера, в котором находится гель и движутся молекулы.

Процесс разделения заряженных молекул в гель-электрофорезе можно описать простыми уравнениями. Когда к электродам прикладывается напряжение, создается градиент потенциала E , что может быть выражено уравнением:

$$E = U/d, \quad (1)$$

где U – прикладываемое напряжение, измеряемое в вольтах, d – расстояние между электродами в сантиметрах.

Когда создается градиент потенциала E , на заряженной молекуле образуется сила F , что выражается уравнением:

$$F = E \times q, \quad (2)$$

где q – заряд на поверхности молекулы в кулонах. Эта сила, измеряемая в ньютонах, перемещает заряженную молекулу к электроду.

Существует также трение, которое создает сопротивление и замедляет движение заряженных молекул в геле. Эта сила трения является функцией от следующих параметров:

- гидродинамического размера молекулы (гидродинамический размер может меняться в зависимости от того, насколько сильно макромолекула взаимодействует с растворителем);
- формы молекулы;
- размера пор среды, в которой происходит электрофорез;
- вязкости буфера.

Скорость движения U заряженной молекулы в электрическом поле является функцией градиента потенциала, заряда и силы трения молекулы и может быть выражена уравнением:

$$U = E \times q / f, \quad (3)$$

где f – это коэффициент трения.

Электрофоретическая скорость M любого иона может быть определена скоростью иона, разделенной на градиент потенциала:

$$M = U / E, \quad (4)$$

В дополнение, из уравнения (3) видно, что электрофоретическая скорость M может быть также выражена следующей формулой:

$$M = q / f, \quad (5)$$

Когда создается разница потенциалов, молекулы с различным суммарным зарядом начинают разделяться в соответствии с различной электрофоретической подвижностью. Электрофоретическая подвижность — очень важная характеристика заряженной молекулы или частицы. Даже если заряд молекул будет одинаковый, они будут разделяться, если их размер разный, так как они будут испытывать воздействие различной по величине силы трения.

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле — стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности. При разделении в агарозном геле полосы ДНК можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем — бромистым этидием. Это позволяет, просматривая гель в ультрафиолетовом свете, идентифицировать ДНК в очень низких концентрациях. Благодаря своей высокой чувствительности, технической простоте и доступности электрофоретические методы получили очень широкое распространение.

Рассмотрим факторы, которые могут влиять на электрофоретическую подвижность ДНК и на способность молекул делиться в агарозных гелях:

1. Линейная двухцепочечная ДНК перемещается через матрикс геля со скоростью, которая обратно пропорциональна десятичному логарифму ее молекулярной массы (табл. 4.1):

$$M \propto 1/\log(M_w). \quad (6)$$

Таблица 4.1

Сравнение молекулярной массы и скорости миграции

Молекулярная масса, Да (M_w)	$\log(M_w)$	$1/\log(M_w)$
100 000	5,0	0,20
50 000	4,7	0,21
10 000	4,0	0,25
5 000	3,7	0,27
1 000	3,0	0,33

2. Ток в растворе между электродами создается в основном за счет ионов буфера и, в небольшой степени, за счет ионов анализируемого вещества. Соотношение между током I , напряжением U и сопротивлением R выражается как в законе Ома:

$$R = U / I. \quad (7)$$

Это уравнение показывает, что при заданном сопротивлении R можно ускорить электрофоретическое разделение путем увеличения подаваемого напряжения U , что приведет к соответствующему увеличению тока I . Пройденное расстояние будет пропорционально величине тока и времени. Однако повышение напряжения U и соответствующее увеличение тока I может стать причиной одной из серьезных проблем для разных видов электрофореза: это приводит к существенному увеличению образования тепла. Это может быть проиллюстрировано следующим уравнением, в котором мощность W (измеряется в ваттах), генерируемая в процессе электрофореза, равна произведению сопротивления и квадрата тока:

$$W = I^2 \times R. \quad (8)$$

Так как основная часть мощности, производимая в процессе электрофореза, растрчивается в виде тепла, могут возникать следующие нежелательные эффекты:

- расширение зоны разделяемого образца, что вызвано возросшей скоростью диффузии ионов исследуемого образца и буфера;
- перемешивание разделенных образцов в результате образования конвекционных токов;
- термическая нестабильность образцов, которые более чувствительны к нагреванию (например, денатурация ДНК);
- снижение сопротивления среды, вызванное уменьшением вязкости буфера.

3. Фрагменты ДНК перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК и концентрацией геля существует прямая зависимость, описанная уравнением:

$$\log(M) \propto 1/[\text{gel}]. \quad (9)$$

Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Область эффективного разделения молекул ДНК в зависимости от концентрации агарозы

Количество агарозы в геле, %	Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, тпн
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

Агароза – это природный коллоид, выделяемый или из агара или непосредственно из содержащих агар морских водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~ 12 000 Да), образованным повторяющимся элементом – агаробиозой, которая в свою очередь состоит из чередующихся элементов: галактозы и 3,6-ангидрогалактозы. Однако существует мнение, что такое представление о структуре агарозы слишком упрощено. На самом деле агарозная фракция неоднородна и содержит как высокозаряженные, так и нейтральные молекулы агарозы. Агар и агароза – не синонимы, а различные агарозные препараты, которые могут отличаться друг от друга по своим физико-химическим свойствам.

Агароза характеризуется хорошей гелеобразующей способностью; она относительно биологически инертна и поэтому удобна в качестве матрицы. Однако агароза очень хрупка и легко разрушается при манипуляциях с ней. Разделение в агарозных гелях происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать и распространяться в стороны – это обусловлено большим размером пор. Получают агарозные гели в результате растворения сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением раствора до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор заливается на подложку и после остывания формируется прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого зависит от концентрации агарозы.

4. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевая неповрежденная, кольцевая с односторонним разрывом и линейная, движутся в агарозном геле с разными скоростями. Чаще всего линейная форма мигрирует медленнее всех. Суперспирализованная ДНК обычно мигрирует наиболее быстро.

5. На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В отсутствие ионов, электропроводность минимальна, и перемещение ДНК происходит медленно, если вообще происходит. В буфере с высокой ионной силой наблюдается высокая электропроводность, но образуется значительное количество тепла, что, в свою очередь, может привести к расплавлению геля и денатурации ДНК. Для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК используют несколько буферов, которые содержат EDTA (pH 8,0) и Трис-ацетат (ТАЕ), Трис-борат (ТВЕ), или Трис-фосфат (ТРЕ) в концентрации 50 мМ (pH 7,5 – 7,8). Как правило, буферы для электрофореза готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

При проведении гель-электрофореза ДНК, неотъемлемыми компонентами эксперимента являются маркерная ДНК и буфер для нанесения образца. Маркерная ДНК – это набор определенных известных сегментов

ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК. Поэтому маркерная ДНК известного размера наносится на дорожки геля с левого или правого края. Перед нанесением образцов ДНК на агарозный гель, их смешивают с буфером для нанесения содержащим воду, краситель, глицерин и иногда фиколл. Буфер для нанесения используется для трех целей:

- увеличения плотности образца для обеспечения попадания ДНК в лунку;
- добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения;
- добавления к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на лидирующих позициях и на предсказуемое расстояние.

После проведения электрофоретического разделения, важным этапом дальнейшего исследования является визуализация образцов ДНК в геле. Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем (бромистым этидием). Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм).

Предостережение! Бромистый этидий – сильный мутаген! Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках!

Электрофорез белков

Выделяют следующие основные типы белкового электрофореза:

- зональный электрофорез – проводится при постоянном значении pH буферного раствора. Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле;
- изотахофорез – заряженные ионы сначала разделяются в соответствии с величинами их заряда и подвижности, а затем перемещаются в электрическом поле с одинаковыми и постоянными скоростями;
- изоэлектрическое фокусирование – характеризуется тем, что в среде для электрофореза создается плавный градиент pH и белки останавливаются в зоне, где значение pH равно их изоэлектрической точке (pI);
- иммуноэлектрофорез – сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции «антиген – антитело»; и этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

В зависимости от цели проведения испытаний можно выделить аналитический электрофорез, используемый для анализа состава смеси малого количества белковых молекул, и препаративный электрофорез, направленный на получения значительного количества чистых белков.

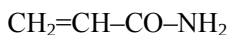
По степени денатурации разделяемых белков различают электрофорез нативный и в денатурирующих условиях. В отличие от нативного электрофореза, электрофорез в денатурирующих условиях предполагает применение химических реагентов, разрушающих пространственную структуру разделяемых белков.

По направлению фракционирования выделяют электрофорез, при котором белки движутся в одном направлении, и двумерный электрофорез, при котором сначала проводят разделение в одном направлении, а затем – в направлении, перпендикулярном первому. Двумерный электрофорез позволяет резко увеличить разрешающую способность при разделии смесей, состоящих из большого количества разных белков.

Электрофорез белков проводится, как правило, в каком-либо пористом (полимерном) носителе: крахмальном, агарозном или полиакриламидном геле, на целлюлозных или нитроцеллюлозных пластинах и т. д. Идеальный носитель должен резко снижать конвекцию, быть простым в приготовлении, иметь высокую теплопроводность (при низкой теплопроводности трудно охлаждать систему), обладать низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью в отношении веществ, подвергаемых электрофорезу, не иметь заряда на поверхности частиц, чтобы не вызывать эндоэлектроосмос. Если разделяемые белки заряжены отрицательно, то при электрофорезе они должны двигаться к аноду (+), однако эндоэлектроосмос «тянет» их в другую сторону, к катоду (–), мешая электрофоретическому разделению.

В настоящее время наиболее часто для разделения белков используют метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), который представляет собой инертный матрикс с высоким и контролируемым числом поперечных сшивок. Варьируя размеры гелевых пор можно фракционировать белки, существенно отличающиеся по молекулярной массе (от нескольких десятков тысяч до сотен тысяч дальтон). Он позволяет осуществлять тонкое фракционирование смесей белков, отличающихся по заряду и молекулярной массе.

ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида (создающего линейную «основу») и N,N'-метиленбисакриламида (служащего для поперечных «сшивок» линейных цепей).



Акриламид



N,N'-метиленбисакриламида

Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50 % можно задать определенную пористость геля. Так, диаметр пор в геле, содержащем 7,5 %

акриламида, равен 5 нм, а 30 % акриламида – 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу разделяемых веществ и форму их молекул (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Выбор концентрации акриламида при разном диапазоне молекулярных масс исследуемых белков

Размер белка, кДа	Концентрация акриламида, %
36–205	5
24–205	7,5
14–205	10
14–66	12,5
10–45	15

В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В то же время ПААГ не содержит ионизируемых групп.

Для сополимеризации ПААГ нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы – источники свободных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компонентов: персульфата аммония и ТЕМЕДа.

В полиакриламидном геле можно проводить как нативный электрофорез, так и электрофорез в денатурирующих условиях.

Нативный электрофорез в ПААГ служит для разделения не подвергнутых денатурации белков (то есть белков в нативном состоянии), в том числе – в случаях, когда необходимо сохранить ферментативную или любую другую функциональную активность белков. Электрофоретическая подвижность белка в нативном состоянии зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от пространственной конфигурации полипептидной цепи. Для установления строгой количественной корреляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных.

В случае, когда требуется фракционировать белки исключительно по молекулярной массе, применяют ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях. Такая система была разработана У. К. Лэммли. Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси, им достигается очень четкое разделение зон, но активность ферментов полностью или в значительной мере может быть утрачена из-за их денатурации. Денатурирующие условия достигаются путем обработки пробы трехкратным избытком додецилсульфата натрия (синоним – лаурилсуль-

фат натрия), сокращенно – ДСН. Чаще данное вещество обозначают SDS – от английского «sodium dodecyl sulfate». Анион SDS несет отрицательный заряд. Благодаря гидрофобным взаимодействиям анионы SDS сорбируются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным зарядом, значительно превышающим собственный заряд белковой молекулы. С большинством белков SDS связывается примерно одинаково – в соотношении 1,4 мг SDS на 1мг белка. Так как в присутствии SDS соотношение «размер/заряд» становится практически одинаковым для любого белка, деление происходит исключительно по молекулярной массе. Для полной денатурации белки, имеющие S-S-связи, до применения SDS обрабатывают β-меркаптоэтанолом, имеющим сильный неприятный запах, поэтому работы проводят под тягой. В качестве альтернативы β-меркаптоэтанолу используют дитиотреитол, его требуется в 2 раза меньше, он менее летучий и не обладает столь специфическим запахом. Это дает возможность определить число и массу субъединиц в белках-мультимерах.

После электрофореза белки проявляются. Может быть проведено обнаружение либо всех белков, например, красителем Кумасси, либо серебрением, а может только белков с определенной ферментативной активностью – получение энзимограммы. Иногда делят белки, заранее меченные хромофором (например, флуорескамином), и обнаруживают их по флуоресценции в УФ-области спектра с помощью специального оборудования. Используют также и радиоактивную метку (радиоактивным углеродом или йодом). Регистрацию полос в этом случае проводят методом авторадииграфии с помощью рентгеновской пленки.

В настоящее время самым удобным и широко используемым является краситель кумасси синий, или бриллиантовый синий («Coomassie brilliant blue», выпускаемый в двух модификациях: R-250 и G-250. Обе модификации кумасси плохо растворимы в воде и разбавленных кислотах, причем G-250 растворяется еще хуже, чем R-250. Более полному растворению способствует добавление в раствор кумасси метанола, изопропанола или других спиртов. По сравнению с другими красителями, кумасси синий имеет следующие преимущества:

- у него очень высокая чувствительность (для R-250 0,3–1,0 мкг, для G-250 – около 10 нг белка в полосе) и в большинстве случаев вполне подходит исследователям;
- зависимость интенсивности окраски от концентрации белка остается линейной в более широком диапазоне концентраций;
- кумасси значительно дешевле и удобнее в использовании, чем другие красители.

Размер белка оценивают по подвижности маркерных белков, молекулярная масса которых известна (табл. 4.4).

Таблица 4.4

Молекулярные массы полипептидов, используемых в качестве маркеров

Полипептид	Молекулярная масса, кДа
Тяжелая цепь миозина из мышц кролика	212
β' -субъединица РНК-полимеразы <i>E.coli</i>	165
В-галактозидаза <i>E.coli</i>	130
Фосфорилаза <i>B</i>	97,4
Бычий сывороточный альбумин	68
Глутаматдегидрогеназа из печени быка	53
Яичный альбумин	45
Лактатдегидрогеназа из сердца свиньи	36
Карбоангидраза	31
Ингибитор трипсина из сои	21,5
Лизоцим яичного белка	14,5
Цитохром <i>C</i>	11,7

Для удобства электрофоретическую подвижность представляют в относительных единицах – в значениях величины R_f , рассчитываемых путем деления длины пути, пройденного за время электрофореза данным белком, к длине пути, пройденного лидирующим красителем (бромфеноловым синим). Измерив длину пути, пройденного при электрофорезе лидирующим красителем и каждым из маркеров, рассчитывают значения их R_f . Затем, зная молекулярные массы маркеров, строят экспериментальную зависимость $\lg M_w$ от R_f . Если пористость геля выбрана правильно, то такая зависимость будет линейной. Рассчитав R_f для интересующего нас белка, по графику находят для него величину $\lg M_w$ и рассчитывают M_w .

Одним из наиболее широко распространенных видов гель-электрофореза белков является диск-электрофорез. Диск-электрофорез получил свое название от двух английских слов: *discontinuity* (неоднородный, прерывистый) и *discoïd* (дискообразный). Первое указывает на неоднородность электрофоретической среды, применяемой в этом методе. Второе описывает случайный признак – дискообразную форму зон разделенных белков в условиях, выбранных первооткрывателями метода. При диск-электрофорезе создают скачкообразные изменения концентрации (и, следовательно, пористости) геля, pH, градиента напряжения.

Вертикальный диск-электрофорез предполагает использование двух, а иногда и трех наслаиваемых друг на друга слоя геля:

1. Стартовый гель (sample-гель) – присутствует не всегда. Он располагается сверху, содержит пробу и краситель, который будет показывать движение электрофоретического фронта. Стартовый гель предотвращает смешивание раствора пробы с электродным буфером.

2. Концентрирующий гель – крупнопористый гель. Размер его пор ограничивает диффузию, но не обеспечивает гелю свойства молекулярного сита по отношению к разделяемым белкам. Этот гель нужен для электрохимического концентрирования белков пробы: концентрирующий гель собирает смесь белков перед переходом в разделяющий гель в одну узкую полосу.

3. Разделяющий – нижний мелкопористый гель, в котором происходит электрофоретическое и молекулярно-ситовое разделение компонентов пробы.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию электрофорез. От чего зависит подвижность молекул при электрофоретическом разделении?

2. Какую информацию о биологических молекулах можно получить с помощью гель-электрофореза? Поясните на примерах.

3. Чем определяется скорость миграции ДНК через агарозный гель?

4. Как производят визуализацию ДНК в агарозном геле?

5. Что лежит в основе электрофоретического метода исследования белков?

6. Какие параметры влияют на фракционирование смесей белков в геле и почему?

7. Как можно избежать влияния нежелательных параметров на фракционирование белков в геле?

8. От чего зависит концентрация электрофоретического геля при разделении белков?

9. Как производят визуализацию белков в геле?

10. Что такое маркерные белки и для чего они используются при электрофоретическом фракционировании белков?

Практическая часть

Задание: провести исследование плазмидной ДНК из бактерий *E. coli* с использованием электрофореза в агарозном геле.

Материалы, оборудование и реактивы: пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, наконечники различных объемов, пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, стеклянные стаканы, вихревой смеситель, весы, рН-метр, трансиллюминатор, агароза для ДНК электрофореза, ДНК маркер, Трис/HCl, 0,5 М ЭДТА (рН 8,0), борная кислота, бромфеноловый синий, фикоколл, глицерин, этидиум бромид, дистиллированная вода.

Ход работы

Приготовление буферов и растворов

1. 0,5 М раствор ЭДТА, pH 8,0: для приготовления 10 мл раствора к 5 мл дистиллированной воды добавить 1,46 г соли ЭДТА. Тщательно растворить соль в воде и довести pH до 8,0 используя HCl, довести объем раствора до 10 мл дистиллированной водой.

2. Буфер 10×TBE: для приготовления 500 мл буфера в 450 мл дистиллированной воды растворить 54 г Трис/HCl и 25,5 г борной кислоты, добавить к раствору 20 мл 0,5 М ЭДТА и довести объем буфера до 500 мл водой. Хранить при комнатной температуре.

3. Буфер для внесения проб: смешать 7 мл дистиллированной воды, 60 мл глицерина, 33 мл 150 мМ Трис/HCl, pH 7,6, и растворить в этой смеси 250 мг бромфенолового синего, 250 мг фикола. Хранить при комнатной температуре.

4. Раствор бромистого этидия: растворить в 100 мл дистиллированной воды 1 г бромистого этидия. Хранить при 4 °C в темноте.

Электрофоретическое исследование плазмидной ДНК

1. *Приготовление агарозного геля.*

1.1. Добавить 0,5 г порошка агарозы в 50 мл однократного TBE.

1.2. Агарозу растворить в буфере, нагревая до кипения в бане с кипящей водой или в микроволновой печи. Необходимо убедиться, что раствор стал однородным, и что в нем не осталось твердых частиц агарозы. Вынимать из микроволновой печи осторожно – может резко вскипеть!

1.3. Охладить раствор до 50 °C и добавить бромистый этидий. В этом случае не надо окрашивать гель после проведения электрофореза.

1.4. Залить гель в планшет. Лунки для образцов делают с помощью погруженной в расплавленный гель гребенки из тефлона. Гребенку устанавливают таким образом, чтобы кончики зубьев находились примерно в 0,5 мм от основания геля.

1.5. После того как гель полностью затвердеет (через 10–15 мин при комнатной температуре), осторожно удалить гребенку и поместите гель в камеру для электрофореза.

1.6. В камеру залить электрофорезный однократный TBE буфер так, чтобы слой буфера над гелем был около 1 мм.

2. *Подготовка образца для электрофореза.*

2.1. Смешать 5 мкл буфера для внесения проб с 15 мкл пробы ДНК. Тщательно перемешать.

2.2. Осторожно внести подготовленные образцы в лунки с помощью автоматической микропипетки. Буфер для нанесения проб позволит проследить за ходом электрофореза.

2.3. В одну из лунок внести ДНК маркер.

3. Проведение электрофореза.

3.1. Подсоединить электроды к источнику напряжения. ДНК движется от отрицательно заряженного (катод) к положительно заряженному (анод) электроду. Напряженность электрического поля при разделении в агарозных гелях должно составлять 1–8 В/см (напряжение 60–80 В на источнике питания для данной электрофорезной камеры).

3.2. Когда краситель пройдет $\frac{3}{4}$ длины агарозной пластинки, включить ток и поместить гель на стекло трансиллюминатора. **Будьте осторожны!** Гель хрупок и легко соскальзывает с пластинки.

3.3. Зафиксировать наблюдаемое свечение полос ДНК на электрограмме в тетради.

3.4. Сравнить подвижность образца с подвижностью молекулярных маркеров и определить наличие плазмиды, ее чистоту и приблизительно оценить ее количество.

Предостережение! Работая с УФ-излучением необходимо предохранять глаза и кожу от ожогов. Одевайте очки!

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Определить наличие плазмиды в образце, сравнить подвижность образца с подвижностью молекулярных маркеров, установить чистоту и приблизительно оценить количество плазмидной ДНК.

Рекомендуемая литература

1. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 1989. Chapter 6.

2. Westermeyer R. Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation. VCH, Weinheim, 1997.

3. Гааль Э., Медьешин Г., Верецки Л. Электрофорез в разделении биологических молекул. М. : Мир, 1982. 446 с.

4. Досон Р. Справочник биохимика. М. : Мир, 1991. 539 с.

5. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.

5. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование: практическое пособие. М. : Наука, 1981. 288 с.

6. Камышиников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. Минск, 2000. 463 с.

Лабораторная работа № 5. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К МОЛЕКУЛЯРНОМУ КЛОНИРОВАНИЮ ГЕНОВ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ. ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ *E. COLI* DH5A ПЛАЗМИДНОЙ ДНК, ПОЛУЧЕННОЙ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЛИГИРОВАНИЯ ГЕНА *TBXAS1 H. SAPIENS* В ПЛАЗМИДНЫЙ ВЕКТОР pUC18

Цель работы: ознакомить студентов с методами введения рекомбинантных молекул ДНК в клетки путем трансформации и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды; провести трансформацию бактерий *E. coli* DH5a плазмидной ДНК, полученной в результате лигирования гена *TBXAS1 H. sapiens* в плазмидный вектор pUC18.

Принципы молекулярного клонирования генов

В основе молекулярного клонирования генов лежит встраивание нужного фрагмента ДНК (вставки) в молекулу ДНК (вектор), которая способна реплицироваться в клетке-хозяине. Такое встраивание осуществляется *in vitro*, а затем образовавшиеся рекомбинантные молекулы ДНК вводятся в клетки.

На первом этапе готовят фрагменты ДНК (вставки), пригодные для последующего лигирования с векторной молекулой. Вектором может быть ДНК плазмиды, фага или вируса. Следующий этап состоит в самом лигировании. Далее рекомбинантные молекулы вводят в клетки, где они амплифицируются путем репликации. После выделения рекомбинантной ДНК проводят их анализ.

Прямой способ получения вставок состоит в расщеплении амплифицированной ПЦР хромосомной ДНК с помощью рестрицирующей эндонуклеазы. Встраивание фрагментов ДНК в векторные молекулы облегчается, если эти сегменты и вектор имеют одинаковые липкие концы, поэтому ДНК вектора расщепляют той же рестриктазой, что и хромосомную ДНК (или образующую такие же липкие концы). После того, как получены вектор и вставка, приступают к конструированию рекомбинантных ДНК. Липкие концы вектора и вставки соединяют с помощью ДНК-лигазы (рис. 5.1). Кроме того, возможно лигирование и тупыми концами, однако оно менее эффективно и необходимо контролировать правильность ориентацию вставки в плазмиде, что невозможно без секвенирования.

Сконструированные рекомбинантные молекулы ДНК вводят в клетки путем трансформации. Трансформированные клетки высевают на селективную агаризованную среду таким образом, чтобы они были

полностью изолированы друг от друга. Только в этом случае каждый клон будет представлен клетками, содержащими определенный тип рекомбинантной ДНК. Дальнейший анализ полученных рекомбинантных молекул производят с помощью электрофоретического метода, позволяющего определить наличие вставки и ее размер, а также секвенированием для подтверждения последовательности вставки.

Клонирование фрагментов хромосомной ДНК в плазмидных векторах включает следующие этапы:

- выделение плазмидной ДНК и ее рестрикция (получение вектора);
- выделение хромосомной ДНК (РНК → кДНК), ПЦР амплификация интересующего участка и ее рестрикция (получение вставок);
- лигирование плазмидной ДНК с фрагментами хромосомной ДНК;
- трансформация бактерий полученной лигирующей смесью;
- анализ рекомбинантных клонов ДНК.

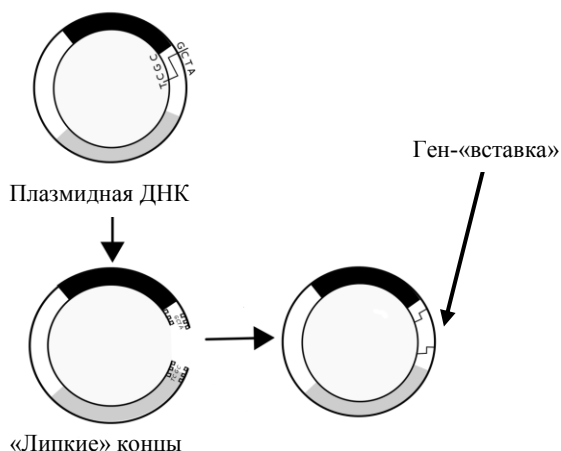


Рис. 5.1. Конструирование рекомбинантной ДНК

Рестрикция ДНК

Рестриктазы (рестриktionные эндонуклеазы) – это ферменты, «узнающие» определенные последовательности в двуцепочечной ДНК и расщепляющие молекулу ДНК в этих сайтах. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток. Сайты узнавания и рестрикции состоят обычно из 4–6 нуклеотидов и обладают осью симметрии 2-го порядка. Многие ферменты рестрикции производят разрыв не точно по оси симметрии, а в точках двух цепей ДНК, отстающих друг от друга на несколько нуклеотидов. В результате такого разрыва образуются фрагменты ДНК с выступающими «липкими» концами. Каждый такой конец мо-

жет взаимодействовать с любым другим концом, комплементарным ему, образуя водородные связи с азотистыми основаниями противоположной цепи ДНК. Таким образом, любые молекулы ДНК, содержащие сайты рестрикции, можно соединять с другими молекулами и в результате получать рекомбинантные молекулы.

Лигирование ДНК

Лигирование фрагментов ДНК осуществляется ферментом ДНК-лигазой (чаще всего лигазой фага Т4), которая катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними 3' -ОН и 5'-фосфатным концами ДНК. Фермент используется для сшивания молекул ДНК с совместимыми липкими концами, а также для сшивания двуцепочечных молекул ДНК с тупыми концами друг с другом или синтетическими линкерами.

Трансформация бактериальных клеток

В основе большинства методов трансформации бактерий лежит обработка клеток 0,1М хлористым кальцием, что приводит к увеличению эффективности поглощения ими ДНК. Выход трансформантов в большинстве случаев составляет 10^5 – 10^8 на 1 мкг интактной ДНК pBR322.

Химическая компетентность клеток достигается за счет применения двухвалентных ионов для облегчения адгезии отрицательно заряженных молекул ДНК и отрицательно заряженной клеточной стенки *E.coli*. Кроме того, показано, что ионы Mg^{2+} нарушают связь мембранных белков с липополисахаридами клеточной стенки грамотрицательных бактерий, облегчая тем самым транспорт ДНК внутрь клетки. После этого клетки подвергаются тепловому шоку, что приводит к нарушению структуры мембраны и проникновению ДНК в клетку.

Компетентные клетки также можно получить с помощью электропорации – клетки кратковременно подвергаются воздействию электрического поля с напряженностью 10–20 кВ/см, что в свою очередь создает отверстия в клеточной мембране, через которые в нее может проникнуть плазмидная ДНК. После электрического шока поры закрываются клеточными механизмами репарации мембраны.

После проникновения плазмидной ДНК в бактериальную клетку происходит ее репликация и начинается экспрессия плазмидных генов, в том числе и маркеров устойчивости к лекарственным препаратам. В результате этого трансформанты приобретают устойчивость к антибиотику и появляется возможность селективировать их на среде с антибиотиком.

Бело-голубой скрининг трансформантов

Бело-голубой скрининг позволяет удобно и быстро определять наличие рекомбинантного вектора в бактериях в экспериментах по моле-

кулярному клонированию. Клетки, растят на агаризованной среде не только с антибиотиком, устойчивость к которому несет вектор, но и в присутствии X-Gal. Клетки трансформированные рекомбинантной ДНК, будут образовывать неокрашенные колонии, в то время, как трансформированные исходным вектором, будут образовывать голубые колонии. Для применения этого метода необходимо использовать подходящее сочетание вектора и штамма клетки-хозяина.

β -галактозидаза – белок, кодируемый *lacZ* геном *lac* оперона и активируется в виде гомотетрамера. Мутантная форма β -галактозидазы, полученная из M15 штамма *E. Coli*, имеет делецию с 11 по 41 положение, таким образом, образовавшийся ω -пептид не способен образовывать тетрамеры и не активен. Тем не менее, фермент может снова стать активным в присутствии своего N-концевого фрагмента – α -пептида. Этот феномен был назван α -комплиментацией (рис. 5.2).

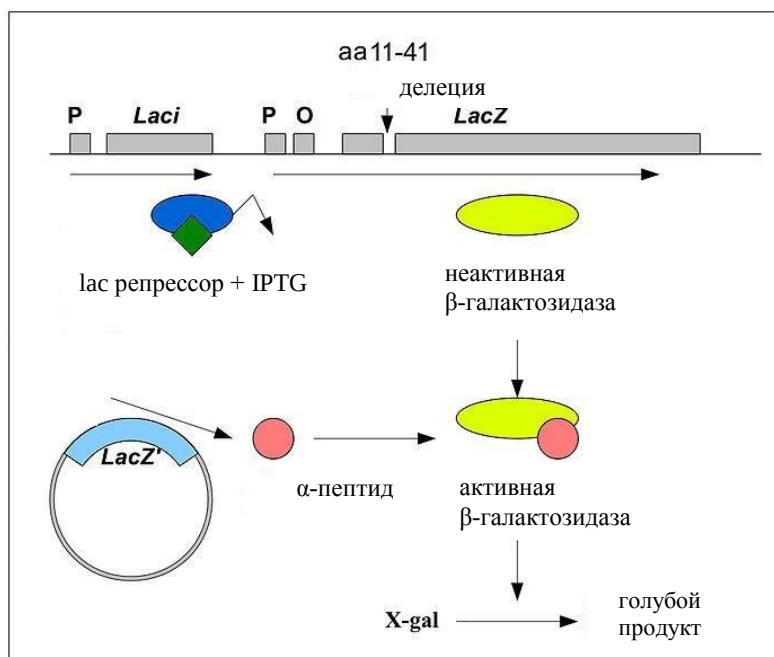


Рис. 5.2. Механизм образования активной β -галактозидазы

Во время скрининга используются клетки *E. coli* с делецией в *LacZ* (генотип *lacZ* Δ M15), синтезирующие ω -пептид, в то время как плаزمид несет последовательность *lacZ* α , кодирующую первых 59 аминокислот β -галактозидазы (α -пептид). По отдельности эти элементы не функцио-

нальны, но при их коэкспрессии (при трансформации клеток с генотипом lacZΔM15 плазмидой с lacZα) образуется активная β-галактозидаза.

Метод бело-голубого скрининга работает по принципу нарушения процесса α-комплиментации. Вектор несет MCS (полилинкер, короткий фрагмент ДНК с большим количеством сайтов рестрикции) внутри гена lacZα. Встраивание клонируемой последовательности внутрь последовательности lacZα происходит за счет рестрикции полилинкера, тем самым разрушая исходный ген и отменяя экспрессию α-пептида. Таким образом, клетки, содержащие плазмиды со вставкой, не продуцируют активную β-галактозидазу.

Наличие клеток с активной β-галактозидазой можно детектировать X-gal, бесцветным аналогом лактозы, который расщепляется β-галактозидазой до 5-бромо-4-хлороиндоксила, который потом димеризуется и окисляется, образуя ярко-голубой нерастворимый пигмент 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго (рис. 5.3). Этот процесс окрашивает клетки в голубой цвет. Колонии голубого цвета – несут исходный вектор, белые плазмиду со вставкой.

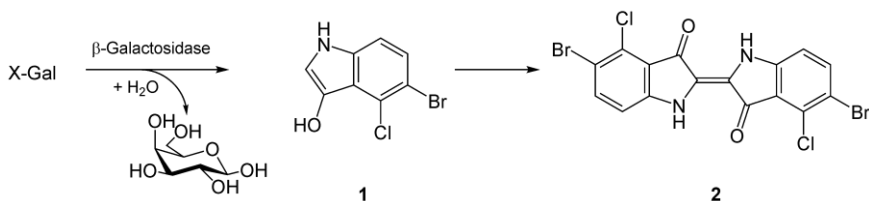


Рис. 5.3. Расщепление X-gal β-галактозидазой с образованием окрашенного продукта

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте этапы клонирования хромосомной ДНК в плазмидный вектор.
2. Что такое рестриктаза? Что такое «липкие» 5'- концы?
3. Зачем необходимо лигирование гена-«вставки» с вектором?
4. Опишите принцип, лежащий в основе приготовления химически компетентных клеток, пригодных для трансформации.
5. Каким образом селективируют бактерии несущие плазмиду?
6. На каком принципе основан бело-голубой скрининг трансформантов несущих плазмиду с геном-«вставкой»?

Рекомендуемая литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
2. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. М.: Мир, 1984.
3. Новое в клонировании ДНК. Методы / под ред. Д. Гловера М.: Мир, 1989.
4. Sambrook J. F., Russell D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vol 1–3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
5. Johnston J. R. Molecular genetics of yeast: a practical approach. IRL Press, Oxford Univ. Press, Oxford, England, 1994.
6. Celis J. E. (ed.) Cell biology: a laboratory handbook, 2nd ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1997.
7. Современная микробиология: прокариоты / под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. Т. 2.

Практическая часть

Задание: провести трансформацию бактерий *E.coli* DH5a плазмидной ДНК, полученной в результате лигирования гена TBXAS1 *H. sapiens* в плазмидный вектор pUC18 и осуществить бело-голубой скрининг трансформантов.

Материалы, оборудование и реактивы: ламинарный шкаф, спиртовая горелка, дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, стерильные наконечники различных объемов, стерильные пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, весы, термостат, X-Gal, IPTG, агаризованная LB-среда, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, 100 мг/мл раствор ампициллина, стерильная дистиллированная вода.

Ход работы

Приготовление буферов и растворов

1. Раствор X-Gal: для приготовления 1 мл раствора растворить 20 мг X-Gal в ДМФ.
2. 100 мМ раствор IPTG: для приготовления 10 мл раствора в 10 мл стерильной воды растворить 238 мг IPTG.
3. 5хКСМ буфер: для приготовления 5 мл раствора 2,5 мл 1М раствора KCl, 0,75 мл 1М CaCl₂, 1,25 мл 1М MgCl₂ и 0,5 мл стерильной дистиллированной воды.

1. **Приготовление агаризованной LB-среды с IPTG и X-Gal и ампициллином:**

- 1) охладить 50 мл агаризованной LB-среду;
- 2) добавить 50 мкл 100 мг/мл раствора ампициллина;
- 3) добавить 500 мкл раствора X-Gal и 500 мкл раствора IPTG;
- 4) разлить среду по чашкам, дождаться пока они застынут (~30 мин).

2. Трансформация бактериальных клеток:

- 1) приготовить раствор ДНК: 20 мкл 5х KCM раствора, 1 мкл раствора плазмидной ДНК (pUC18_TBXAS1), стерильной H₂O – 80 мкл;
- 2) раствор выдержать на льду;
- 3) добавить 100 мкл компетентных клеток к раствору ДНК, и выдержать на льду 20 мин;
- 4) выдержать при комнатной температуре 10 мин;
- 5) добавить 1 мл LB среды и инкубировать в шейкере при 37 °C в течении часа;
- 6) высеять 50 мкл культуры на LB агаризованную среду с антибиотиком;
- 7) поместить чашки Петри в термостат на ночь при 37 °C.

Отметьте количество и цвет колоний трансформантов на выданных преподавателем чашках Петри.

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Лабораторная работа № 6. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И ОЧИСТКЕ БЕЛКОВ. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА (TXAS) ИЗ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *E. COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА СОРБЕНТЕ NI-NTA СЕФАРОЗА

Цель работы: ознакомить студентов с методами разрушения бактериальных клеток и выделения из лизата *E. coli* нужного рекомбинантного белка – тромбосансинтазы *H. sapiens*. Изучить основные принципы аффинной хроматографии белков, провести выделение и очистку рекомбинантной тромбосансинтазы с использованием металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе.

Основные подходы к выделению белков

Важнейшим этапом для изучения строения и функциональных свойств белков является их индивидуальное выделение и очистка. Технические приемы, используемые для этого, очень многообразны и быстро совершенствуются. Особенно обострилась потребность в эффективных методах разделения белков с развитием генно-инженерных способов их получения. Получение чистых химических индивидуальных белков включает в себя как удаление небелковых примесей, так и разделение между собой собственно белковых компонентов.

Белки очень чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи). Поэтому обычные методы органической химии, применяемые для выделения того или иного вещества из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.), в данном случае неприемлемы. Белки в этих условиях подвергаются денатурации, то есть теряют некоторые существенные природные (нативные) свойства, в частности растворимость, биологическую активность.

Для предотвращения тепловой денатурации выделение белка проводят при низкой температуре, обычно при 4 °С. Необходимо также избегать крайних значений pH. Белки легко денатурируют при низких pH из-за протонирования отрицательно заряженных в нормальных условиях карбоксильных групп и возникающего вследствие этого резкого преобладания положительных зарядов, которое благоприятствует разворачиванию компактной структуры. В щелочной среде при pH 10 и выше утрачиваются положительные заряды, обусловленные протонированием аминокрупп лизина, и опять-таки наступает декомпенсация зарядов на поверхности,

дестабилизирующая глобулу. Одновременно фенольные гидроксилы тех остатков тирозина, которые были скрыты внутри глобулы, получив отрицательный заряд, стремятся выйти на поверхность, что также способствует денатурации белка. В еще более щелочных растворах происходят реакции, необратимо повреждающие белок, – отщепление серы от остатков цистеина и цистина, β -элиминирование фосфатных остатков в фосфопротеинах, отщепление полисахаридных цепей, присоединенных к остаткам серина в гликопротеинах. Образующиеся в результате этих реакций остатки неопредельной аминокислоты, дегидроаланина, присоединяются к близлежащим ϵ -аминогруппам лизина с образованием так называемого лизиноаланина – соединения, присутствие которого в кислотном гидролизате белка свидетельствует о глубоком повреждении его структуры.

При выделении белков из органов и тканей животных, микроорганизмов и растений начальным этапом является разрушение клеточной структуры. Способы разрушения клеток можно разделить на следующие группы:

1. *Мягкое воздействие*, которое включает лизис клеток с помощью осмотического шока, разрушение под действием ферментов (лизоцима и др.), химическую солюбилизацию (например, экстракция толуолом дрожжей, при которой частично растворяется клеточная стенка), гомогенизацию вручную.

2. *Воздействие средней силы*, при котором используют лопастной гомогенизатор или растирание с абразивом (песком, стеклянными шариками).

3. *Сильное воздействие* с помощью пресса, ультразвука или шаровой мельницы.

Следующим этапом выделения белков является их экстракция из биологического материала. Выбор раствора для экстракции зависит от особенностей белка. Для растворимого белка используют буферные растворы. Обычно объем раствора в 2–3 раза превышает объем ткани. После экстракции белка массу центрифугируют при 10000–20000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Смесь до центрифугирования называют «гомогенатом». Жидкая фаза после осаждения нерастворимого материала (надосадочная жидкость или супернатант) носит название «экстракт» или «лизат».

Экстракция белков, связанных с клеточной мембраной, представляет особую проблему. Решением такой задачи может быть выделение таких комплексов с использованием детергентов, в состав которых входят липофильные (алифатические или ароматические) цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка и вытесняющие его из комплекса с нормальной мембраной. Из детергентов наиболее широко применяются дезоксихолат, CHAPS, додецилсульфат натрия (ионогенные

детергенты), тритон X-100, эмульген 913 и другие неионогенные детергенты. Тритон – это торговое название целой серии в большинстве своем неионных детергентов на основе полиэтиленгликоля.

Для того чтобы внутриклеточные ферменты, содержащиеся в клеточных компартментах, не расщепляли нужный белок, используют буферные системы и ингибиторы протеаз.

Если из экстракта, содержащего значительную часть исследуемого белка, удалены частицы и небелковый материал, можно приступать к очистке белка.

Основные методы очистки белков

Процедура очистки белка, как правило, состоит из ряда этапов обогащения. При этом приходится проверять эффективность обогащения после каждого этапа. Метод очистки считается эффективным только в том случае, если специфическая активность на единицу веса всего белка увеличивается. Чистоту белкового препарата можно оценить по ряду критериев:

1. Способность к кристаллизации.
2. Гомогенность при ультрацентрифугировании или электрофорезе.
3. Однозначность данных по N- и C-концевому анализу.
4. По специфическому электронному спектру поглощения, если белок его имеет.

Для очистки белков используют различия в их свойствах, например:

1. *Растворимость*. Различная растворимость белка позволяет проводить избирательное осаждение нужного протеина с последующим растворением осадка в меньшем объеме. Так, фракционирование солями основывается на избирательном разделении белков вследствие их различной растворимости в растворах солей. Соль подбирается в соответствии со следующими требованиями: она должна обладать достаточной растворимостью, которая не меняется значительно в зависимости от температуры, при добавлении соли не должен заметно меняться pH раствора, она легко отделяется от белка и не оказывает денатурирующего действия. Наиболее часто употребляемой солью для фракционирования белков является сульфат аммония.

Еще одним методом очистки, основанным на различной растворимости белков, является осаждение протеинов органическими растворителями. Чаще всего используют такие растворители как этанол и ацетон, реже – изопропанол, метанол, диоксан. Основной механизм процесса: по мере возрастания концентрации органического растворителя снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул протеина. Происходит снижение растворимости белка до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение.

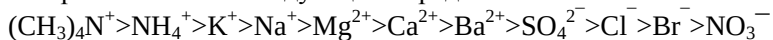
2. *Молекулярная масса.* Разделение белков по молекулярной массе проводят с помощью методов молекулярных сит, которые включают гель-фильтрацию, электрофорез, а также метод ультрацентрифугирования в градиенте концентрации хлористого цезия.

3. *Адсорбируемость определенными веществами.* Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых различных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко используются для очистки белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Важнейшими адсорбентами белков являются ионообменники и разнообразные аффинные сорбенты.

Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике.

Наиболее эффективной очистки белков можно достичь методом аффинной хроматографии, которая основывается на специфическом взаимодействии молекул друг с другом, например, взаимодействии антитела с антигеном, лиганда с рецептором, субстрата с ферментом и так далее.

Хранение очищенных белков обычно проводят при низкой температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в смеси с 25 % глицерином, 15 % полиэтиленгликолем или 20–30 % глюкозой. Выбор вещества для хранения белков осуществляется с учетом сохранения активности препарата. Так, глюкоза и полиэтиленгликоль хорошо стабилизируют препараты инвертазы, но имеют денатурирующий эффект на лизоцим. Очень хорошими стабилизаторами являются ионы соли, которые по положительному эффекту могут быть расположены в следующем порядке:



Сильно разбавленные растворы белков обычно не стабильны. Если необходимо длительно работать с разбавленными растворами белка (стандарты в иммунохимическом анализе), то следует добавлять в раствор 1 % раствор альбумина.

Аффинная хроматография

Способы разделения белков, основанные на различиях в их физико-химических свойствах, не могут быть высокоспецифичными. Гораздо перспективнее препаративные методы, которые базируются на функциональных различиях белков. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная аффинная хроматография, широко используются для разделения белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Множество белков, включая ферменты, их ингибиторы, транспортные белки, иммуноглобулины, регуля-

торные белки, токсины, рецепторы способны избирательно связывать те или иные лиганды (субстраты, коферменты, аллостерические эффекторы, антигены). Такое связывание по существу своему весьма специфично, однако это свойство позволяет выделять тот или иной белок из множества других. На использовании функционально обусловленной способности белков обратимо связываться с соответствующими лигандами основан метод аффинной, или биоспецифичной хроматографии. Таким образом, если использовать аффинную хроматографию на начальных этапах очистки белка, то можно получать достаточно хорошо очищенный препарат практически за одну стадию.

Аффинная хроматография является наиболее специфичной по своей природе и поэтому самым высокоэффективным видом хроматографии, которые известны на сегодняшний момент. Аффинная хроматография включает две специфические стадии – «аффинную адсорбцию» и «аффинную элюцию». Параметры сорбции определяются состоянием максимального взаимодействия молекул друг с другом. Условия элюции определяются причинами разрушения взаимодействия между молекулами. После адсорбции фермент может быть элюирован либо неспецифическим образом, например, повышением концентрации соли, либо специфическим в результате замещения белка лигандом из раствора. Хотя и существуют некоторые готовые нерастворимые материалы, имитирующие субстрат или настоящие субстраты (крахмал для амилаз, хитин для хитиназ и т. д.), но чаще аффинные адсорбенты необходимо синтезировать. Лигандов может быть много (субстраты и квазисубстраты, ингибиторы и их аналоги), поэтому фирмы-производители пошли по пути изготовления носителя с реакционными группами, к которым затем присоединяют необходимый лиганд.

Основные требования к аффинной адсорбции:

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.
2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду.
3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы сопутствующие белки не могли связаться с адсорбентом.
4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях хроматографии и в процессе регенерации адсорбента.

В технологии рекомбинантных белков широко используют метод аффинной хроматографии, основанный на способности последовательно нескольких остатков гистидинов взаимодействовать с ионами двухвалентных металлов, чаще всего никелем и кобальтом.

Методом кассетного мутагенеза или используя специально сконструированные плазмиды, в белок вводится последовательность гисти-

динов (как минимум 4–6) присоединяемых к N- или C-концу полипептидной цепочки. Кластер гистидинов способен взаимодействовать с ионами двухвалентных металлов, образуя хелатные связи. Особенностью таких связей является то, что в отличие от других типов взаимодействий, они не чувствительны к большим концентрациям обычных солей, детергентам, к изменению pH среды. А это, в свою очередь, обеспечивает возможность использовать метал-хелатные матрицы для сорбции белков без предварительной обработки на любой из стадий: после лизиса клеток, после сульфат-аммонийного высаливания, после ионообменной хроматографии. Разрушить хелатные связи, образовавшиеся при взаимодействии сорбента с молекулами белка, можно сильными хелатирующими реагентами, например, ЭДТА, или имидазолом. Еще одной немаловажной особенностью этих сорбентов является то, что ионы металлов на них фиксированы не ковалентными связями, а тоже хелатными. Растворимые соли металлов добавляют к ковалентно пришитой на агарозе нитрилтриуксусную или иминодиуксусную кислоту, с остатками которых ионы никеля или кобальта образуют соответственно четыре или три хелатные связи. Поэтому одной из стадий регенерации сорбента является обработка его большой концентрацией ЭДТА и удаление центров связывания белка.

Сорбция образца на сорбент может быть проведена либо внесением сорбента непосредственно в раствор (batch процедура), либо путем нанесения образца на колонку уже наполненную сорбентом и уравновешенную буфером. Предпочтительно использовать второй вариант, если позволяют условия.

Аффинные метки

Tag (англ. метка, ярлык) – последовательность аминокислот, способная прочно и высокоспецифично связываться с аффинной матрицей, которая выступает в качестве неподвижной фазы в аффинной хроматографии. В некоторых случаях, если это необходимо, присоединение Tag может модифицировать свойства молекулы.

Фьюжн-белок (гибридный белок, составной белок; англ. fusion protein) – белок, полученный объединением двух или более генов, изначально кодировавших отдельные белки. Трансляция гибридного гена приводит к синтезу белка, который может сочетать некоторые функциональные свойства обоих исходных белков. Часто фьюжн-белки используют для повышения растворимости целевого белка во время экспрессии и выделения белка, затем дополнительную часть белка отщепляют высокоспецифичными протеазами, например, тромбином, фактором Ха или вирусными протеазами. Иногда фьюжн-белками называют продукт экс-

прессии гена белка, в который была встроена последовательность нуклеотидов, кодирующая Tag.

В качестве первых аффинных Tag использовались крупные белковые молекулы, например, протеин А и LacZ Tag, область применения которых сводилась к очистке белков, экспрессированных и выделенных из *E.coli*.

Протеин А стафилококка состоит из 280 аминокислотных остатков и, благодаря своему размеру и протеолитической стабильности, может повышать растворимость и/или экспрессию гетерологичных белков. Фьюжн белки с протеином А могут быть очищены методом аффинной хроматографии на IgG сефарозе и элюированы в буфере с низким значением pH. Но крупный размер Tag и элюирование при низких значениях pH могут нарушать функциональную активность очищаемого белка. Кроме того, связывание IgG с фьюжн-белками усложняет иммунологический анализ, и, таким образом, такие макромолекулы с протеином А непригодны для использования в качестве иммунологических реагентов.

LacZ – протеолитически стабильный протеин, состоящий из 1024 аминокислотных остатков, который также может быть использован в качестве аффинного Tag для повышения экспрессии фьюжн-протеинов *E.coli*. Так как LacZ иммунологически относительно нейтрален, он может быть использован для синтеза антител к интересующему белку, но, опять же, из-за своего очень большого размера и предрасположенности к образованию в растворе гомотетрамеров, LacZ аффинный Tag может изменять функциональную активность очищенного фьюжн-протеина. Еще одним недостатком использования LacZ Tag является большая склонность LacZ фьюжн-белков к агрегации.

Хотя протеин А и LacZ в настоящее время иногда еще используются в качестве аффинных Tag, за последнее время было создано много новых аффинных Tag, позволяющих улучшить использование этих оригинальных фьюжн-белковых партнеров.

Полигистидин является универсальным аффинным Tag, легко взаимодействующим с иммобилизованным переходным ионом металла (рис. 6.1). Для очистки полигистидиновых фьюжн-белков могут быть использованы иммобилизованные на матрице ионы Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и Fe^{3+} . Из всех приведенных ионов чаще всего используют ионы никеля и кобальта. Относительно малый размер и заряд полигистидиновых Tag редко влияет на функцию белков, а элюирование в градиенте имидазола позволяет в мягких условиях элюировать белок с колонки. Очистка гиперэкспрессированных полигистидиновых фьюжн-белков может обеспечить получение относительно чистого белка в одну стадию (степень очистки до 80 % и более).

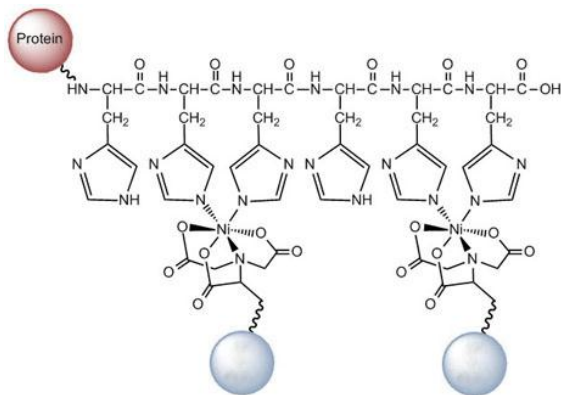


Рис. 6.1. Взаимодействие аффинного Tag с иммобилизованным на хроматографическом сорбенте переходным ионом металла

Контрольные вопросы

1. Каковы основные физико-химические требования к методам выделения белков?
2. Какие способы разрушения клеток при выделении белков существуют? Дайте их характеристику.
3. Из каких этапов состоит процедура очистки белка? Каковы особенности этапа экстракции белков из биологического материала?
4. При каких условиях метод обогащения белка считают эффективным?
5. Какие различия в свойствах белков используют при их очистке, и каким образом?
6. Как хранятся очищенные белки? От чего зависит стабильность белков?
7. Что такое аффинная хроматография? Каковы основные принципы аффинной хроматографии?
8. Каковы основные требования к аффинной адсорбции?
9. Каковы основные особенности металл-хелатных сорбентов?
10. Что такое фьюжн-белки и Tag, для чего они используются?
11. Приведите примеры аффинных Tag и дайте их характеристику.
12. Какой Tag является наиболее часто используемым? Опишите его основные свойства и преимущества.

Практическая часть

Задание: Провести разрушение бактериальных клеток *E. coli* и выделить из лизата рекомбинантную тромбоксансинтазу человека (TXAS). Используя аффинную хроматографию с сорбентом Ni-NTA выделить и очистить рекомбинантный белок TXAS.

Материалы, оборудование и реактивы: дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, наконечники различных объемов, пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, стеклянные стаканы, вихревой смеситель, весы, pH-метр, скоростная центрифуга с охлаждением, ледяная баня, Трис/HCl, хлорид натрия, ЭДТА, изопропанол, PMSF, лизоцим, ДНКаза, глицерин, эмульген 913, имидазол, хроматографический сорбент Ni-NTA, колонка хроматографическая BioRad с нижним адаптером, дистиллированная вода.

Ход работы

Приготовление буферов и растворов

1. Лизис-буфер: для приготовления 100 мл буфера в 60 мл дистиллированной воды растворить 0,605 г Трис/HCl, 0,565 г NaCl и 0,03 г ЭДТА, 20 мл глицерина, pH раствора довести до 8,0 используя насыщенный раствор HCl. Добавить к буферу дистиллированную воду до объема 100 мл.

2. Раствор ингибитора PMSF: растворить в 1 мл изопропанола 10 мг сухого порошка PMSF.

3. Раствор лизоцима: приготовить 3 мл раствора лизоцима в 20 mM Трис/HCl, pH 8,0, с конечной концентрацией фермента 100 мг/мл.

4. Раствор ДНКазы: приготовить 3 мл раствора ДНКазы в 150 mM NaCl, с конечной концентрацией фермента 1 мг/мл. Для хранения к раствору добавить 0,5 мл глицерина.

5. 50 mM буфер Трис/HCl, pH 8,0: для приготовления 100 мл буфера к 74 мл дистиллированной воды добавить 5 мл раствора 1 M Трис/HCl, pH 8,0, 1 мл эмульгена 913, 20 мл глицерина. Тщательно перемешать раствор.

6. 0,2 M раствор имидазола: для приготовления 50 мл раствора к 40 мл 50 mM буфера Трис/HCl, pH 8,0 из п. 5 добавить 0,34 г соли имидазола ($M_r = 68,08$ г/моль). Тщательно растворить соль, довести объем раствора до 50 мл буфером.

1. Разрушение бактериальных клеток *E. coli* и выделение TXAS

1.1. К осажденной из объема 5 мл культуре клеток BL21(DE3) (выдается преподавателем!) добавить 0,3 мл лизис-буфера. Тщательно ресуспензировать осадок!

1.2. Добавить к суспензии 50 мкл раствора ингибитора протеаз PMSF и хорошо перемешать.

1.3. Добавить в пробирку 0,3 мл раствора лизоцима, перемешать и проинкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре и периодическом перемешивании. На этой стадии идет разрушение клеточной мембраны и вытекание содержимого клетки в буфер. Раствор становится вязкообразным.

1.4. Добавить в раствор 0,3 мл раствора ДНКазы, и при периодическом перемешивании проинкубировать содержимое пробирки при комнатной температуре 20–30 мин (можно погреть в руках). На этой стадии происходит деградация молекул ДНК под действием фермента.

1.5. Когда суспензия из вязкой превратится в текучую жидкость, центрифугировать пробирку с содержимым при 11 000 об/мин в течение 30 мин и температуре 4 °С.

1.6. Супернатант с использованием полуавтоматического дозатора отобрать в чистую пробирку, осадок выбросить. Супернатант содержит смесь выделенных из бактериальных клеток белков (в том числе и тромбоксансинтазу человека) и будет использоваться для дальнейшего выделения и очистки необходимого белка.

Процедура разрушения клеток масштабируется в зависимости от массы осажденных клеток.

2. Очистка рекомбинантной TXAS

2.1. Приготовление хроматографической колонки.

2.1.1. В хроматографическую колонку (BioRad) с нижним адаптером (фильтром) внести 2 мл 50 мМ буфера Трис/HCl. После прохождения буфера через колонку и удаления воздуха из адаптера закрыть слив, не давая колонке (фильтру) просохнуть.

2.1.2. В колонку с закрытым сливом внести 4 мл хорошо перемешенной суспензии сорбента Ni-NTA в консерванте. Через 2–3 мин, после начала осаждения гранул сорбента и разделения жидкой и твердой фаз, в колонке открыть слив и удалить консервант. При этом происходит интенсивное осаждение сорбента и процесс, который принято называть «набивкой колонки». Слив необходимо закрыть, когда над поверхностью сорбента останется 1–2 мм жидкости. Колонка не должна просыхать!

2.1.3. Необходимо «уравновесить колонку»: пропустить через сорбент 12–20 мл 50 мМ буфера Трис/HCl, pH 8,0. Это позволит отмыть Ni-NTA от консерванта и привести колонку в пригодное для выделения белка состояние. При закрытом сливе по стенке колонки небольшими порциями внести уравновешивающий буфер. Затем открыть слив и пропустить буфер через сорбент. Слив закрыть, когда над поверхностью сорбента останется 1–2 мм жидкости. Колонка не должна просыхать!

2.2. Выделение и очистка рекомбинантного белка.

2.2.1. Раствор, содержащий белок TXAS, по стенке колонки небольшими порциями нанести на уравновешенный аффинный сорбент.

2.2.2. После нанесения всего объема раствора на колонку, ее нужно промыть 12–20 мл 50 mM буфера Трис/HCl, pH 8,0, чтобы смыть неспецифически сорбированные на Ni-NTA белки. При закрытом сливе по стенке колонки небольшими порциями внести буфер. Затем открыть слив и пропустить буфер через сорбент. Слив закрыть, когда над поверхностью сорбента останется 1–2 мм жидкости. Колонка не должна просыхать!

2.2.3. Элюировать тромбоксансинтазу человека с сорбента 0,2 М раствором имидазола. При закрытом сливе по стенке колонки небольшими порциями внести 0,5 мл раствора имидазола. Затем открыть слив и пропустить раствор через сорбент. Слив закрыть, когда над поверхностью сорбента не останется жидкости. Повторно, по стенке колонки небольшими порциями, внести 0,5 мл раствора имидазола. Открыть слив и продолжать вносить элюирующий раствор идентичным образом до момента полного выхода белка из колонки. Белок собрать в чистую пробирку и хранить в морозильнике при –20 °C.

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе. Пробирку, содержащую белок, сдать преподавателю для хранения при –20 °C.

Рекомендуемая литература

1. Скоупс Р. Методы очистки белков. М. : Мир, 1985.
2. Коничев А. С., Севастьянова Г. А. Молекулярная биология. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 400 с.
3. Туркова Я., Степанов В. Аффинная хроматография. М., 1980. 278 с.
4. Hengen P. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli* // Trends. Biochem. Sci. 1995 Vol. 20, № 7. P. 285–286.
5. Helena B. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): A Review // Methods in Enzymology. 2009. Vol. 463. P. 439–473.

Лабораторная работа № 7. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *IN VITRO*: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НА ВЫЯВЛЕНИЕ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ Н. SAPIENS САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИ МЕЧЕННОЙ БИОТИНОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА СТРЕПТАВИДИН-HRP

Цель работы: ознакомить студентов с методами иммунохимического анализа. Изучить основные принципы проведения иммуноферментного анализа (ИФА), провести ИФА с различными концентрациями рекомбинантной тромбосансинтазы *H. Sapiens*, меченной биотином.

Принципы постановки иммунологических реакций *in vitro*

В современной биологии и медицине иммуноглобулины являются неотъемлемыми участниками исследований на клеточном и молекулярном уровнях. Их широкое применение базируется на высокой специфичности взаимодействия с антигенами, точнее, с отдельными антигенными детерминантами. Фактически с помощью антител удается обнаруживать отличия не только клеток по их поверхностным антигенам, но и отдельных молекул друг от друга. Более того, с применением иммуноглобулинов возможно выявлять присутствие конкретных клеток или молекул в анализируемых субстанциях и получать их для исследования в чистом виде. Условно говоря, даже самые современные физические и химические методы исследования клеток и сложных органических молекул проигрывают иммунологическим методам по разрешающей способности и простоте их реализации.

Отражением роли и значения иммуноглобулинов в современных научных исследованиях и биотехнологических производствах является присуждение Нобелевской премии за разработку гибридомной технологии, с помощью которой удается получать препараты высокоспецифических антител.

Наборы иммунохимических реагентов для определения антигенов называются диагностикумами. Для их создания необходимо решить задачи получения антигена, антитела, комплекса антигена или антитела с ферментом, наладить регистрацию иммунохимической реакции по активности фермента, использованного в качестве метки. Наряду с ферментами в качестве меток для антигенов используют радиоактивные и флуоресцирующие соединения: соответственно, применяются в радиоиммунном и флуоресцентно-иммунном анализе (РИА и ФИА). Предпочтение пользуется ИФА, поскольку он не требует сложной измерительной аппаратуры и применения радиоактивных соединений.

Иммунохимический анализ не ограничивается ИФА, РИА и ФИА, основанными на прямом взаимодействии антигена с антителом. Имеются методы обнаружения и количественного определения антигенов по изменению их физического состояния при взаимодействии с антителами. Так, если антиген расположен на поверхности бактериальных клеток, антитела вызывают их слипание (*агглютинацию*). На таком принципе основано определение групп крови: склеивание эритроцитов при взаимодействии поверхностных антигенов с добавленными антителами (гемагглютинация). Антитела, добавленные в определенном соотношении к раствору макромолекулярных антигенов, вызывают их *преципитацию* – образование крупных, визуально обнаруживаемых агрегатов из молекул антигена, связанных антителами. Существуют методы, основанные на реакции преципитации в гелях: при образовании иммунных комплексов Аг–Ат в геле возникают линии преципитации, по форме этих линий можно судить о числе и иммунологическом родстве антигенов. Для идентификации белков широко применяется *иммуноблоттинг*: вначале смесь белков разделяют с помощью электрофореза в геле, затем на гель накладывают нитроцеллюлозную мембрану и на нее электрофоретически переносят (подвергают электроблоттингу) разделенные белки, которые идентифицируют посредством меченых антител. Меченые антитела широко используют в исследовании локализации компонентов клеток и тканей – это методы *иммуноцито-* и *иммуногистохимии*. Клетки, меченные флуоресцирующими антителами, можно отделить от немеченых клеток – метод проточной *цитофлуориметрии*. Хроматографические колонки с сорбентом, с которым ковалентно связан антиген (или антитело), используются в *аффинной хроматографии* – выделение соответствующего антитела (или антигена) из смесей в результате образования иммунных комплексов. Еще одно применение иммунохимического анализа – *иммуносенсоры*: пьезокристалл, покрытый антигеном (антителом), в результате связывания антител (антигена) увеличивает свою массу и меняет частоту резонансных колебаний в переменном электрическом поле, что позволяет регистрировать изменение массы пьезоэлектрика порядка 10^{-12} г.

Радиоиммунологический анализ (РИА)

Эта группа реакций считается самой чувствительной и высокоточной в количественном отношении. В таких реакциях применяют радиоактивно меченые антитела или антигены. В качестве радиоактивной метки чаще всего используют хорошо связывающиеся с белками изотопы йода (I^{131} и I^{125}) для антител и изотопы водорода (H^3) и фосфора (P^{32}) для антигенов небелковой природы. Технические возможности измерения радиоактивного излучения позволяют с помощью РИА обнаруживать в моче, крови, экссудатах антигены, присутствующие в *пикограммовых* количествах и не детектируемые вследствие этого химическими методами.

Одним из примеров применения РИА могут служить методики, разработанные для тестирования аллергических состояний у человека. Метод *RAST* (от англ. radioallergosorbent test) позволяет определить наличие и количество IgE, специфичных к конкретному аллергену, в сыворотке крови. Для этого, покрытый молекулами аллергена и защищенный от неспецифического осаждения белков твердый носитель обрабатывают анализируемой сывороткой, отмывают от не провзаимодействовавших с антигеном компонентов сыворотки и наносят на него раствор меченых радиоактивным изотопом IgG, специфичных по отношению к IgE. После тщательного отмывания от не связавшихся радиоактивных антител, замеряют радиоактивность твердой фазы и делают пересчет на количество IgE.

Метод *RIST* (от англ. radioimmunosorbent test) позволяет определять общее количество иммуноглобулинов IgE независимо от их специфичности. В этом случае на твердом носителе закрепляется не антиген, а специфичные по отношению к иммуноглобулинам E иммуноглобулины G. Для такого твердого носителя определяют радиоактивность после обработки разными концентрациями меченых радиоактивным изотопом IgE и строят кривую, отражающую увеличение радиоактивности в зависимости от концентрации. Полученные значения радиоактивности служат точкой отсчета для проведения анализа. Для анализа смешивают тестируемую сыворотку крови с количеством радиоактивных антител, соответствующем 80 % насыщения твердой фазы при добавлении только меченых антител, и обрабатывают этой смесью носитель. В данном случае будет реализовываться так называемый принцип конкуренции. Меченые и немеченые IgE будут конкурировать за взаимодействие с закрепленными на носителе иммуноглобулинами G, что приведет к снижению радиоактивности носителя по сравнению с обработкой только радиоактивными антителами. Используя соответствующую калибровочную кривую, можно с высокой точностью определить количество нерадиоактивных IgE в анализируемой сыворотке.

В настоящее время существует много вариантов использования РИА, но их обычно применяют только в тех случаях, когда другие методы исследования не позволяют получить желаемый результат. Это связано с обязательным соблюдением мер безопасности, необходимых при работе с радиоактивными веществами, что и ограничивает широкое применение.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Реакции этой группы ненамного уступают в точности и разрешающей способности РИА, но зато являются безопасными. В силу этого иммуноферментный анализ в настоящее время получил наибольшее распространение. В основе этих реакций лежит применение антител (реже антигенов), конъюгированных с ферментами, которые способны обеспечить превращение неокрашенного вещества (так называемого хромогена) в окрашенное.

Наиболее часто применяемыми для таких целей ферментами являются сохраняющие активность в относительно широком диапазоне условий, доступные и дешевые ферменты из растений (пероксидаза хрена, HRP) и бактерий (щелочная фосфатаза и β -D-галактозидаза).

Субстратом для пероксидазы является перекись водорода, которая сама по себе, естественно, не может давать окрашенных продуктов реакции. Поэтому так называемые хромогенные смеси для пероксидазы, помимо H_2O_2 , в определенных концентрациях содержат собственно хромоген, который, окисляясь образующимся при распаде перекиси атомарным кислородом, будет давать окрашивание. Чаще всего в качестве хромогенов выступают вещества, продукты окисления которых имеют желтый (ортофенилендиамин, превращается в окисленную окрашенную форму с максимумом оптического поглощения при 435 нм, регистрируемую фотометрически и др.) или синий (тетраметилбензидин и др.) цвет (рис. 7.1), поскольку эти цвета проще регистрировать спектрофотометрически. Кроме того, в результате окисления некоторых веществ можно регистрировать хемилюминисценцию (люминол и др.). Недостатком применения пероксидазы является необходимость готовить субстратную смесь незадолго до применения из-за нестабильности перекиси в растворах.

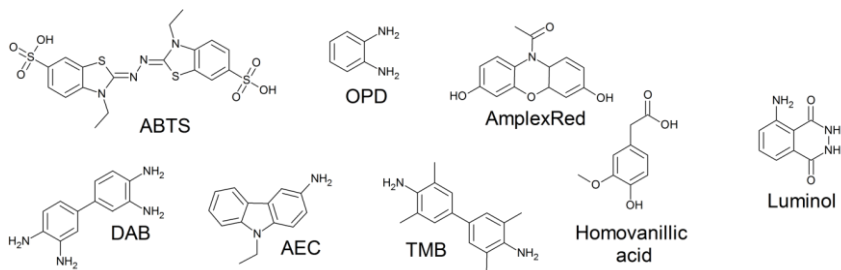


Рис. 7.1. Некоторые наиболее часто используемые субстраты HRP

Пероксидаза катализирует реакцию $AH_2 + H_2O_2 = A + 2H_2O + O$.

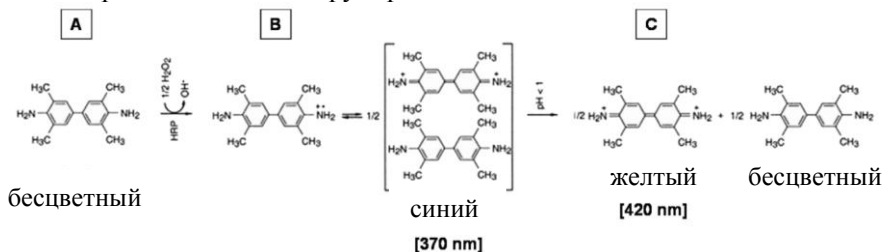
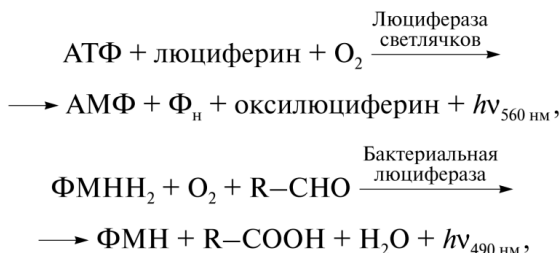


Рис. 7.2. Изменение окраски TMB под действием HRP и после остановки реакции закислением среды

Щелочная фосфатаза катализирует гидролиз фосфорных эфиров: 4-нитрофенилфосфат превращается в 4-нитрофенол, регистрируемый по оптической плотности при 405 нм; 4-метилумбеллиферилфосфат превращается в 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий с высоким квантовым выходом при 450 нм (флуоресценцию возбуждают при 365 нм).

β -Галактозидаза катализирует гидролиз лактозы с образованием глюкозы и галактозы. Если вместо природного субстрата взять 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозид, при гидролизе образуются галактоза и 4-метилумбеллиферон, регистрируемый флуориметрически.

В люциферазных реакциях детектируют биолюминесценцию:



где АТФ – аденозинтрифосфат, АМФ – аденозинмонофосфат, $\Phi_{\text{н}}$ – ортофосфат, $\Phi\text{МН}$ и $\Phi\text{МНН}_2$ – окисленный и восстановленный флавинмононуклеотид, R-CHO и R-COOH – жирный альдегид и соответствующая кислота.

Преимуществами иммуноферментного анализа являются его высокая разрешающая способность (можно обнаруживать антиген, присутствующий в *нанограммовых* количествах), возможность проведения реакций в очень небольших объемах и быстрота получения результатов. То, что интенсивность окрашивания раствора пропорциональна количеству фермента, делает ИФА не только качественным, но и высокоточным количественным методом, поскольку с помощью фотокolorиметров или спектрофотометров можно регистрировать очень небольшие различия в интенсивности окрашивания.

Особенностью ИФА является осуществление двух различных типов химических реакций: взаимодействия антиген–антитело и взаимодействия фермент–субстрат. Если оба типа реакций удастся провести в одной и той же смеси растворов, такой вариант иммуноферментных реакций относят к *гомогенному ИФА*. Если для проведения иммунологических и ферментативных реакций требуются различные условия, реакции разделяют во времени, удаляя предшествующие растворы и заменяя их на последующие. Этот вариант получил название *гетерогенного или твердофазного ИФА*. Последнее название отнюдь не случайно – именно сор-

бируя на твердой фазе образующиеся иммунные комплексы и удается эффективно менять одни растворы на другие. Хотя твердофазный ИФА требует большего количества этапов и, соответственно, является более продолжительным в постановке, точность и возможность выявления различных по своей природе антигенов сделали его наиболее распространенным. Подавляющее большинство применяемых в настоящее время методик ИФА базируются именно на нем.

В качестве твердой фазы используют инертные в химическом отношении материалы синтетического (полистирол, полипропилен, поливинилхлорид, нейлон, полиакриламид) или природного (целлюлоза и ее производные, декстраны, агароза) происхождения. В определенных вариантах ИФА твердой фазой являются стенки или дно емкостей, в которых осуществляются реакции. Если такой вариант метода является количественным, то используемый как твердая фаза материал должен быть прозрачным, что позволяет снимать показания с помощью спектрофотометров.

Одним из наиболее популярных высокоточных современных вариантов твердофазного ИФА является ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay), осуществляемый по изложенному на рис. 7.3 принципу.

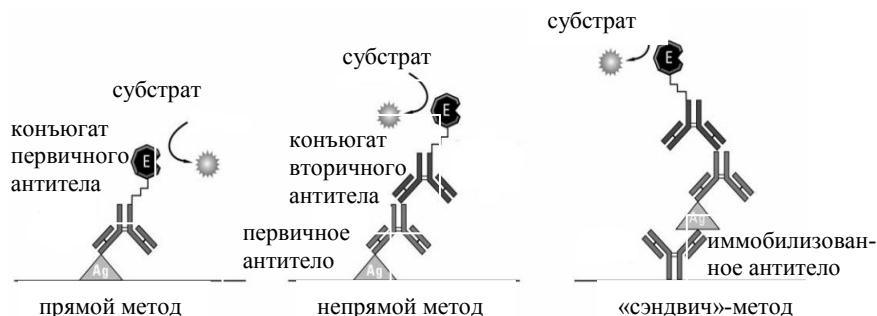


Рис. 7.3. Популярные форматы проведения ИФА

Для его постановки используются полистироловые прозрачные планшеты (микрокамеры для иммунологических реакций) с имеющими плоское дно лунками. Размеры планшетов, количество и объемы лунок могут различаться, но во всех случаях реакции ставятся в небольших (от 20 до 1000 мкл) объемах, что повышает экономичность метода. Необходимым компонентом ELISA является многоканальный автоматический спектрофотометр и ПО, позволяющее управлять работой прибора и обрабатывать полученные данные. Фирмы-поставщики таких систем также разрабатывают и поставляют все необходимые для выявления конкретных антигенов реагенты, а также инструкции по проведению всех этапов анализа.

Такой набор включает и растворы, необходимые для постановки в каждой серии опытов положительных и отрицательных контролей, нужных для подтверждения достоверности полученных результатов.

Принцип ELISA заключается в следующем: анализируемый раствор вносится в лунки планшета и выдерживается время, необходимое для сорбции антигена на стенки и дно лунки. Затем раствор удаляется, лунки промываются от несорбированных компонентов, и в лунки вносится раствор специфичных по отношению к искомому антигену антител. После отпущенного на взаимодействие антиген–антитело времени суспензия удаляется, лунки отмываются от несвязавшихся антител и заполняются суспензией конъюгированного с ферментом лиганда. В качестве лиганда чаще всего используются также иммуноглобулины, но уже специфичные к антителам, использованным на первом этапе (анти-иммуноглобулины). Через определенное время проводится отмывание от несвязавшегося лиганда и внесение субстратной смеси. По истечении рекомендованного разработчиками времени реакция останавливается добавлением соответствующих реагентов и проводится автоматическое измерение интенсивности окрашивания раствора в опытных и контрольных лунках. Полученные данные обрабатываются ПО спектрофотометра, и делается вывод о наличии и количестве искомого антигена.

Возможна классификация по типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества). Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то метод является неконкурентным. Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то метод является конкурентным.

Конкурентные твердофазные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений для них ограничен как чувствительностью регистрации ферментной метки, так и аффинностью антител, в то время, как для неконкурентных методов, при отсутствии неспецифических взаимодействий, - только чувствительностью определения фермента. Поэтому для достижения высокой чувствительности анализа конкурентным методом необходимо использовать высокоаффинные антитела.

Примером *неконкурентного* формата ИФА являются:

1. **«Сэндвич»-метод.** К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс анти-

ген–антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После второй инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунного комплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпетическая, токсоплазменная и другие инфекции.

2. Прямой ИФА. На первом этапе реакции исследуемый образец фиксируют на твердой фазе. Затем к нему добавляют конъюгат антитела с ферментом. После удаления непрореагировавших компонентов реакции проводится ферментативная реакция, интенсивность которой прямопропорциональна содержанию исследуемых антигенов в образце, что вообще говорит об их наличии в исследуемом материале.

3. Непрямой ИФА. На твердой фазе иммобилизуют антиген, после инкубации исследуемого материала и удаления несвязавшихся компонентов добавляют первичные антитела, специфичные к антигену. Затем в систему вводятся меченые ферментом антитела к иммуноглобулинам человека класса IgG, которые взаимодействуют с Fc-фрагментом IgG первичных антител. После проведения субстрат-ферментативной реакции проводят учет полученных результатов. При наличии антител уровень оптической плотности прошедшей реакции превосходит показатели отрицательных образцов. Применение универсального реагента — меченых антивидовых антител — дает возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффе́кторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий. Этот метод применяется для определения антител к вирусу гепатита С.

В случае *конкурентного* ИФА определяемые антигены или антитела конкурируют с аналогичными мечеными антигенами или антителами конъюгата за места связывания с иммуносорбентом. Анализ этого типа часто используют для определения антигенов, присутствующих в высоких концентрациях, или гормонов, имеющих только один антиген-

связывающий центр. Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата: **прямой и непрямой**.

Как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счет ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счет антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приеме лекарственных препаратов; у новорожденных такие ложноположительные реакции могут возникать за счет образования в организме ребенка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При этом, особые вещества — суперантигены — неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям. Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.

Чувствительность ИФА такова, что определение веществ в концентрациях 10^{-9} – 10^{-12} М, белка в микрограммах-нанogramмах в 1 мл — явление вполне распространенное. Подобно тому, как глаз человека регистрирует на одиночный световой квант, ИФА можно усовершенствовать так, что он с помощью каскадных систем усиления позволит обнаруживать одиночные молекулы анализируемого вещества.

Возможности увеличения чувствительности ограничиваются фоном анализируемого соединения (то есть его наличием не только в анализируемом образце, но и в используемых реактивах и растворителях), субстратной специфичностью фермента и аффинностью антител. К ограничениям ИФА относится также наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов. Еще один недостаток — ИФА не позволяет различать нативные белки и их биологически неактивные фрагменты, сохранившие антигенные детерминанты. Помехой для ИФА может быть изменение каталитической активности фермента при его конъюгировании с антигеном. Ограничением ИФА является его применимость лишь к хорошо изученным системам, где есть очищенные антигены и высокоспецифические антитела.

Высокая чувствительность в сочетании с быстротой анализа (от нескольких минут до нескольких часов), возможностью одновременного тестирования большого количества образцов и отсутствием особой необходимости предварительных операций по очистке и концентрированию анализируемого соединения в образце придают ИФА неоспори-

мые преимущества перед другими аналитическими методами. Поэтому сегодня ИФА находит широкое применение в здравоохранении, различных областях сельского хозяйства, промышленной биотехнологии, природоохранной деятельности и научно-исследовательской работе.

Контрольные вопросы

1. Назовите основное преимущество иммунологических методов исследований? За счет чего оно достигается?
2. Назовите и охарактеризуйте известные вам иммунохимические методы исследований.
3. В каких случаях сегодня применяют радиоиммунологический анализ? Чем обуславливается выбор?
4. Какой принцип лежит в основе проведения иммуноферментного анализа?
5. Перечислите возможные способы окрашивания образцов при проведении ИФА. Охарактеризуйте окраску с помощью хромогенного субстрата ТМВ.
6. Дайте характеристику методу твердофазного (гетерогенного ИФА). В чем его принципиальное отличие от гомогенного?
7. Что такое ELISA? В чем заключается принцип этого метода?
8. В чем заключается отличие конкурентных твердофазных методов иммунохимического анализа от неконкурентных?
9. Перечислите методы неконкурентного ИФА и дайте их краткое описание.
10. Какова чувствительность метода ИФА?
11. Назовите возможные ограничения в применении ИФА.

Практическая часть

Задание: провести иммуноферментный анализ с различными концентрациями рекомбинантной тромбоксансинтазы *H. sapiens* (TXAS) сайт-специфически меченного биотином с помощью конъюгата стрептавидин-HRP.

Материалы, оборудование и реактивы: дозаторы полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, наконечники различных объемов, пробирки типа эппендорф, штатив для пробирок, стеклянные стаканы, вихревой смеситель, весы, рН-метр, орбитальный шейкер, активированный полистирольный планшет, прозрачная пленка для планшетов, хлорид натрия, хлорид калия, натрия гидрофосфат, калия дигидрофосфат, соляная кислота, обезжиренное сухое молоко, конъюгат стрептавидин-HRP, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), 0,02 % раствор перекиси водорода, дистиллированная вода.

Ход работы

Приготовление буферов и растворов

1. PBS-буфер: для приготовления 100 мл буфера в 80 мл дистиллированной воды растворить 0,8 г NaCl и 20 мг KCl, 144мг Na_2HPO_4 , 24 мг KH_2PO_4 pH раствора довести до 7,4 используя насыщенный раствор HCl. Добавить к буферу дистиллированную воду до объема 100 мл.

2. MPBS-буфер: для приготовления 15 мл буфера в 15 мл PBS-буфера растворить 0,75 г обезжиренного сухого молока.

3. Раствор хромогена: смешать 150 мкл раствора TMB с 150 мкл 0,02 % раствора перекиси водорода.

1. Связывание антигена с твердой фазой.

1.1. Приготовить растворы белков в PBS-буфере:

• *K-* (цитохром b_5 *R. Norvegicus* не несущий биотиную метку): 0,5 мкл раствора белка в 100 мкл буфера;

• *TXAS_1*: 0,1 мкл раствора белка в 100 мкл буфера;

• *TXAS_1_2*: 0,5 мкл раствора белка в 100 мкл буфера.

1.2. Перенести растворы в планшет.

1.3. Заклеить планшет клейкой пленкой.

1.4. Перенести планшет в орбитальный шейкер и инкубировать при 37 °C и 250 об/мин 30 мин.

1.5. Промыть лунки планшета 3 раза 200 мкл PBS-буфера.

2. Блокирование сайтов неспецифического связывания.

2.1. Внести в лунки по 100 мкл MPBS-буфера.

2.2. Инкубировать при 37 °C и 250 об/мин 30 мин.

2.3. Промыть лунки планшета 3 раза 200 мкл PBS-буфера.

3. Связывание конъюгата стрептавидин-HRP с иммобилизованным антигеном.

3.1. Внести в лунки по 100 мкл конъюгата стрептавидин-HRP в разведении 1:10000.

3.2. Инкубировать при 37 °C и 250 об/мин 20 мин.

3.3. Промыть лунки планшета 2 раза 200 мкл PBS-буфера.

4. Добавление субстрата HRP и развитие окраски.

4.1. Внести в лунки по 100 мкл раствора хромогена.

4.2. Инкубировать при 37 °C и 250 об/мин 30 сек. *Должно наблюдаться развитие окраски синего цвета в лунках, содержащих меченный биотином антиген.*

4.3. Остановить развитие окраски добавлением 50 мкл 1М HCl в каждую лунку планшета. *Отметьте изменение цвета с синего на желтый!*

Далее интенсивность окраски можно детектировать как визуально, так и с помощью спектрофотометра на длине волны 420 нм.

Форма отчетности

Результаты каждого этапа выполнения работы и их анализ описать в отчете по лабораторной работе.

Рекомендуемая литература

1. ELISA: Theory and practice / Ed. by John R. Crowther. Humana Press Inc., 1995.
2. Antibodies. A Laboratory Manual / Ed. by E. Harlow, D. Lane. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
3. Иммунологические методы исследований / под ред. И. Лефковитса, Б. Перниса. М.: Мир, 1988.
4. Моноклональные антитела / под ред. Р. Г. Кеннет, Т. Дж. Мак-Керн, К. Б. Бехтол. М.: Медицина, 1983.
6. Неизотопные методы иммуноанализа // Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1987. Сер. Биотехнология. Т. 3.
7. Новые направления в развитии иммунологических методов анализа // Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1990. Сер. Биотехнология. Т. 24.

Учебное издание

**Свирид Андрей Васильевич,
Походня Юрий Георгиевич**

**ПРАКТИКУМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ
«ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИИ (БСП)»**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Л. М. Корневская*
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*
Технический редактор *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 19.01.2018. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 4,75. Уч.-изд. л. 3,64.
Тираж 100 экз. Заказ № 81.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.