

АБРАМОВА З.И

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Учебное пособие

Казань - 2006

УДК 577.2.08 (075.8)

Печатается по решению учебно-методической комиссии биолого-почвенного факультета КГУ

Составила:

Заведующая лабораторией биохимия нуклеиновых кислот КГУ, профессор кафедры биохимии, д.б.н. Абрамова З.И.

Научный редактор:

Зав. кафедрой биохимии КГУ, профессор, д.б.н. Ишмухаметова Д.Г.

Рецензент:

Заведующая лабораторией сигнальных систем КИББ КНЦ РАН, профессор, д.б.н. Каримова Ф.Г.

Исследование белков и нуклеиновых кислот: Учебное пособие / З.И. Абрамова.—Казань: Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, 2006.— 157 с.

В учебном пособии изложены методы биохимического и молекулярно-биологического анализа нуклеиновых кислот и белков: хроматография, электрофорез, цитофлуорометрия, центрифугирование и др. Описаны методики выделения и исследования структуры ДНК, качественного и количественного определения содержания белка. Рассмотрены вопросы постановки калибровочных опытов и их анализ.

Настоящее пособие обеспечено кратким изложением теоретических вопросов по соответствующим темам, это дает студенту возможность самостоятельно подготовиться к выполнению лабораторных работ. Работа хорошо иллюстрирована, что облегчает восприятие эксперимента и позволяет провести необходимые работы с нуклеиновыми кислотами и белками без привлечения дополнительной литературы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | | |
|------|--|----|
| | ОГЛАВЛЕНИЕ..... | 3 |
| | ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| 1 | КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ..... | 15 |
| 1.1 | Тема: Спектрофотометрия: определение концентрации белков и нуклеиновых кислот по оптической плотности, свойстве, основанном на способности азотистых оснований (нуклеиновые кислоты) и пептидных групп (белки) поглощать свет в УФ- области..... | 15 |
| | Лабораторная работа 1: Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот в биологическом материале по фосфору..... | 19 |
| | Задание 1. Определение концентрации нуклеиновых кислот в крови животных..... | 21 |
| | Задание 2: Определение концентрации нуклеиновых кислот в мышечной ткани..... | 23 |
| | Лабораторная работа 2: Определение концентрации ДНК в плазме методом флуоресцентной спектрофотометрии..... | 23 |
| | Лабораторная работа 3: Количественное определение белка в биологической жидкости | 26 |
| | Задание 1 . Биуретовая реакция на пептидную связь..... | 27 |
| | Задание 2. Определение концентрации белка с использованием биуретовой реакции..... | 28 |
| 2 | МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ..... | 30 |
| 2.1. | Тема: Гидродинамические методы для разделения органелл и макромолекул. Седиментация..... | 30 |
| | Лабораторная работа 4: Выделение лимфоцитов методом зонально-скоростного центрифугирования..... | 31 |
| 2.2. | Тема: Выделение ДНК из биологического материала фенол- хлороформным методом..... | 34 |
| | Лабораторная работа 5: Выделение хромосомной ДНК из лимфоцитов..... | 35 |
| | Лабораторная работа 6: Выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови животных..... | 41 |
| | Лабораторная работа 7:Выделение плазмидной ДНК из бактерий | 45 |
| 2.3. | Тема: Выделение индивидуальных белков..... | 53 |
| | Лабораторная работа 8: Выделение белков из мышечной ткани... | 55 |
| | Лабораторная работа 9: Реакции осаждения белков..... | 56 |
| | Задание 1. Обратимое осаждение..... | 56 |
| | Задание 2. Необратимое осаждение белков..... | 59 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3. | МЕТОДЫ АНАЛИЗА БИОПОЛИМЕРОВ..... | 62 |
| 3.1. | Тема: Хроматография белков и нуклеиновых кислот..... | 62 |
| | Лабораторная работа 10: Подбор оптимальных условий фракционирования белков при гель-фильтрации..... | 66 |
| | Задание 1. Набивка колонки..... | 67 |
| | Задание 2. Определение нулевого объёма..... | 69 |
| | Задание 3. Определение разрешающей способности хроматографической колонки..... | 70 |
| | Лабораторная работа 11: Обессоливание и смена буфера в ходе очистки белков..... | 72 |
| | Лабораторная работа 12: Определение молекулярной массы белка гель-фильтрацией через сефадекс..... | 73 |
| | Лабораторная работа 13: Гель-фильтрация нуклеиновых кислот. Разделение ДНК и РНК на сефарозе 4В..... | 74 |
| 3.2. | Тема: Электрофорез биополимеров. Оценка размеров и форм белковых молекул и нуклеиновых кислот..... | 76 |
| | Лабораторная работа 14: Характеристика структурной организации внеклеточной и хромосомной ДНК в агарозном геле | 78 |
| | Лабораторная работа 15: Определение структуры и молекулярной массы белка методом электрофореза в ПААГ с ДСН..... | 82 |
| 4. | Ферментативный анализ..... | 90 |
| 4.1. | Тема: Изучение нуклеазной активности белков-ферментов..... | 93 |
| | Лабораторная работа 16: Определение активности ДНКаз методом кислото-растворимых продуктов..... | 95 |
| | Лабораторная работа 17: Флуорометрический метод определения активности эндонуклеаз..... | 99 |
| 4.2 | Тема: Иммуноферментный анализ при определении антител к ДНК..... | 103 |
| | Лабораторная работа 18: Определение уровня АТ к нДНК в сыворотке..... | 113 |
| | СПИСОК БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ..... | 116 |
| | ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ..... | 123 |
| | ОБЩЕПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ..... | 126 |
| | СПИСОК, ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 127 |

ВВЕДЕНИЕ

Многие современные бактерии имеют почти те же размеры, форму, внутреннюю структуру и содержат те же типы структурных блоков, молекул, ферментов, что и бактерии, жившие миллионы лет назад. Хранится наследственная информация в форме ДНК, очень хрупкой биологической молекулы, которая рвется при простом перемешивании раствора, содержащего ДНК, или при втягивании его в пипетку.

Для изучения механизма реализации наследственной информации используются различные методы. Применение всех методов должно сочетаться с приемами, направленными на сохранение нативной (т.е. природной) структуры биологических молекул. Наряду с методами математики, химии, физики (включая применение меченых атомов) и биохимии (метод ферментативного анализа), используемых для изучения структуры и функции биологических соединений, были созданы специальные методы для работы с молекулярными объектами.

Важнейшие исследования 50-х годов XX столетия были связаны с выяснением молекулярной структуры ДНК и ее биологической роли. В частности, было установлено, что генетическая информация записана в цепи ДНК в виде последовательности нуклеотидных остатков, содержащих по одному из четырех азотистых основания: аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц) и тимин (Т). Открытия Э. Чаргаффа (1950 г.) о том, что количества аденина было всегда равно количеству тимина, а гуанина - цитозину, послужило ключом к разгадке структуры ДНК.

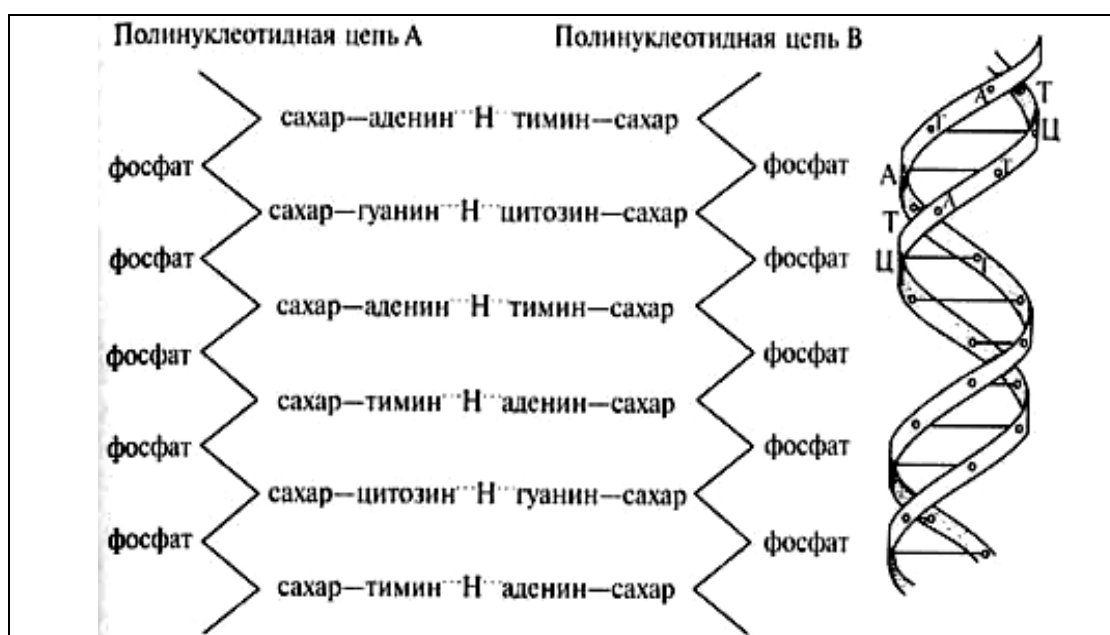


Рис.1. Схема двуспиральной структуры ДНК.

В 1953 году Дж. Уотсон и Ф. Крик предположили, что молекула ДНК состоит не из одной цепи, а из двух параллельных цепей, обвивающих друг друга (рис.1). Самое интересное в этой структуре - не спиральная конформация, а отношение комплементарности (взаимодополнительности) между двумя цепями: соответствие аденина одной цепи тимину в другой, а против гуанина всегда стоит цитозин.

Почему эти пары?. Дело в том, что именно в этих комбинациях основания хорошо «подходят» друг другу: аденин точно соединяется двумя водородными связями с тимином, гуанин с цитозином - тремя водородными связями (рис.2). И что особенно важно обе пары А-Т и Г-Ц образуют «перекладины» (расстояния между гликозидными связями) одинаковой длины (0,185 нм), формируя четкий винтовой каркас (рис.1).

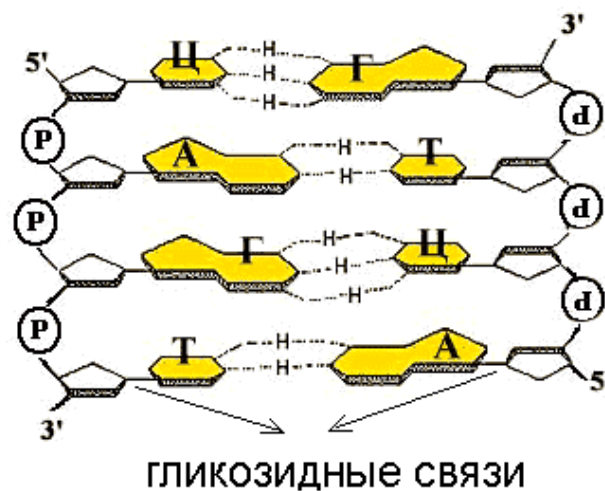


Рис.2. Схема вторичной структуры ДНК

Предложенная Дж. Уотсоном и Ф. Криком модель строения ДНК сразу позволила понять принцип удвоения ДНК: две комплементарные цепи разъединяются, каждая служит матрицей для синтеза новой цепи. Эта схема была названа полуконсервативной, поскольку в каждой из дочерних молекул сохранялась («консервировалась») в неизменном виде одна из материнских молекул. Но возможны еще две модели: модель консервативной репликации, когда обе вновь синтезированные молекулы могут находиться в дочерней молекуле, и дисперсионный способ репликации, который означает наличие перемежающихся материнских и вновь синтезированных участков на каждой из цепей образованных молекул ДНК. Какая из моделей соответствует действительности? Это можно было доказать только экспериментально. Однако придумать такой эксперимент, который позволил бы четко различить способ репликации - было не так легко. При всех трех способах репликации дочерняя цепь ДНК состоит из равных количеств материнской и вновь

синтезированной ДНК. Различно только распределение материнской ДНК по дочерним молекулам.

Для выяснения вопроса о характере расхождения новосинтезированных цепей ДНК по дочерним молекулам Мэтт Мезельсон и Фрэнк Сталь в 1958 г. поставили необыкновенно изящный опыт и для этого разработали метод равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl) (Meselson, Stahl, 1958).

Молекулы CsCl при центрифугировании не осаждаются, но их концентрация возрастает по направлению ко дну центрифужной пробирки, т.е. создается градиент плотности соли, причем в верхней части пробирки плотность соли падает, а по направлению ко дну пробирки возрастает. Если раствор CsCl содержит ДНК, плотность которой равна плотности исходного раствора, то в процессе установления градиента среды ДНК, находившаяся в верхней части пробирки, где плотность среды ниже, чем ее

собственная, начинает «тонуть», двигаясь ко дну, и останавливается там, где плотность ДНК совпадает с плотностью среды. В этом случае ДНК разделяется по удельной плотности.

Суть эксперимента Мезельсона и Сталя в том, что можно изменить плотность молекул ДНК в процессе ее синтеза. Дело в том, что в природной ДНК основания ДНК: цитозин и тимин содержат два атома «легкого» азота, а гуанин и аденин – четыре атома «легкого» азота (^{14}N – изотоп азота, атомный вес которого равен 14). Если бактерии *E. coli* выращивать на протяжении нескольких поколений на питательной среде, содержащей «тяжелый» изотоп азота (^{15}N - атомный вес которого равен 15), то вся ДНК станет "тяжелой" (рис.3,а), так как основания включают «тяжелый» изотоп азота (^{15}N) в свой состав.

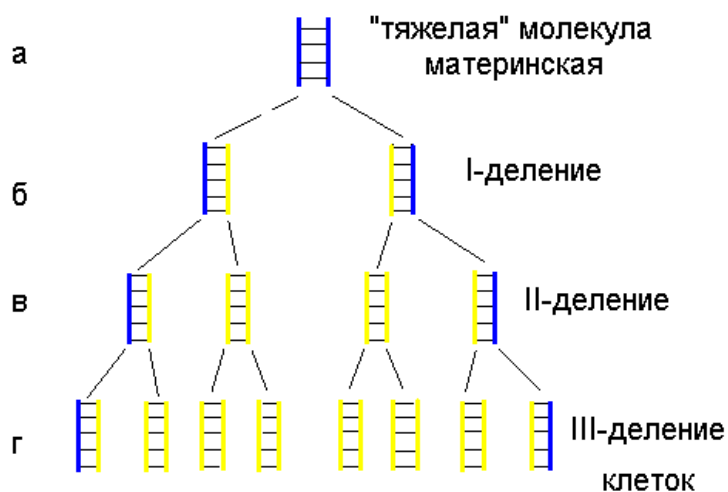


Рис. 3. Схема распределения новосинтезированной ДНК по клеткам в процессе деления бактерий.

Если эти бактерии быстро отмыть от ^{15}N и перенести на питательную среду с «легким» азотом ^{14}N с тем, чтобы вновь синтезированные цепи были «легкими», то после первого деления клеток ДНК каждой клетки будет состоять из одной «тяжёлой», содержащей изотоп ^{15}N и одной «лёгкой», содержащей изотоп ^{14}N , цепи (рис.3,б). После второго деления половина клеток будет иметь ДНК, состоящую только из «лёгких» цепей, а вторая половина клеток будет иметь ДНК, содержащую одну «лёгкую» и одну «тяжёлую» цепь (рис.3,в). После третьего деления только четвертая часть клеток будет содержать одну «тяжёлую» и одну «лёгкую» цепь (рис.3, г) и т.д.

Через различные промежутки времени из бактерий выделяли ДНК и центрифугировали в градиенте плотности CsCl . Для нулевого поколения (рис.3,а) была получена единственная полоса, соответствующая ^{15}N -ДНК, которая располагалась ближе ко дну пробирки. После кратковременного роста, в течение которого число клеток удваивалось, в градиенте появлялась другая более легкая полоса. Плотность ее соответствовала гибридной молекуле ДНК, которая содержит равное количество ^{14}N и ^{15}N (рис.4,А; 1-деление; полоса - $^{14}\text{N}, ^{15}\text{N}$). По-видимому, цепи были вновь синтезированными. Это тот результат, которого следовало ожидать исходя из полуконсервативного механизма репликации ДНК.

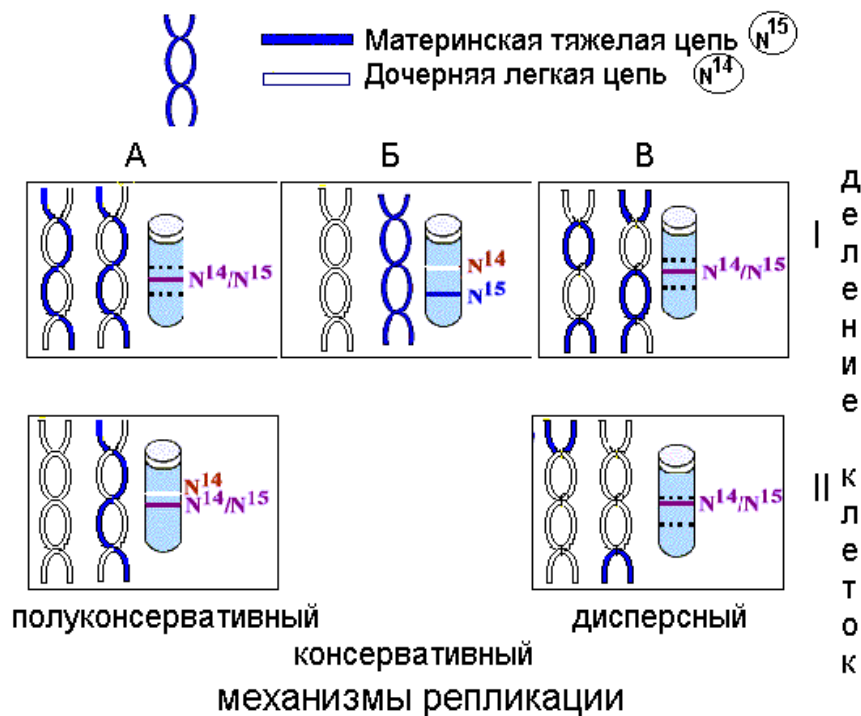


Рис.4. Схема доказательства полуконсервативного характера репликации ДНК методом равновесного центрифугирования.

По-видимому, цепи были вновь синтезированными. Это тот результат, которого следовало ожидать исходя из полуконсервативного механизма репликации ДНК. После завершения двух циклов деления бактерий в градиенте обнаружили две полосы ДНК разной плотности. Одна из этих полос соответствовала гибридной ДНК, содержащей ^{14}N и ^{15}N (рис.4,А; II-деление; полоса- $^{14}\text{N},^{15}\text{N}$), вторая полоса соответствовала ДНК, содержащей обе цепи с ^{14}N (рис.4,А; II-деление; полоса- ^{14}N), что подтвердило полуконсервативный характер репликации ДНК.

Для того чтобы на одной молекуле ДНК могла синтезироваться вторая молекула, ДНК должна разделиться на две цепи, т.е. деспирализоваться и расплестись. Однако расплестись гигантской молекуле, состоящей из многих миллионов пар нуклеотидов, образующих миллионы витков спирали не так просто. Например, для того, чтобы хромосома *E.coli* могла реплицироваться за 20 мин, вся молекула ДНК должна раскручиваться со скоростью 300 оборотов в секунду, т.е. скорость вращения нитей должна составлять тысячи оборотов в минуту, при этом ДНК должна не просто расплестись, но и одновременно синтезировать новые цепи. Нетрудно представить себе нереальность этого процесса. Это возможно только в том случае, если вновь синтезированные цепи молекул ДНК реплицируются частями (рис.5).

Прерывистый синтез одной из дочерних цепей ДНК был доказан Рейджи Оказаки (Okazaki, 1971). Он специально разработал два новых метода исследования: (1) первый метод- метод импульсного мечения и (2) второй - метод центрифугирования в щелочном градиенте сахарозы.

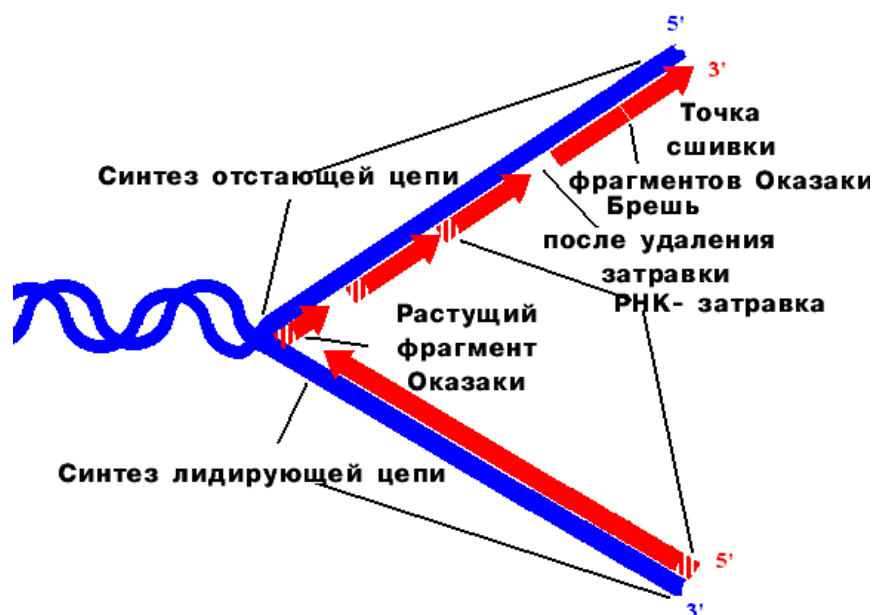


Рис. 5. Схема работы репликативной вилки.

До Р. Оказаки импульсную метку (^3H -тимидин) давали в культуральную среду и быстро начинали отмывать клетки, минимальное время подачи метки было 5 мин. Р. Оказаки использовал несколько вариантов времени подачи метки и, кроме того, после добавления

меченого тимидина давал 1000-кратный избыток «холодного» (немеченого) тимидина. Таким образом, метка включалась только в течение очень короткого времени.

Суть центрифугирования в щелочном градиенте сахарозы заключалась в следующем: сахароза разводится на щелочи, и в щелочной среде ДНК денатурирует, т.е. в щелочной среде в нативной (без разрывов) ДНК рвутся водородные связи и ДНК распадается на две длинные одноцепочечные цепи. Если в молекуле ДНК есть ники (единичные разрывы в сахарофосфатном остове), то ДНК распадается на фрагменты по количеству ников. Например, если в одной цепи молекулы ДНК есть ник, то в щелочной среде образуется три фрагмента (рис.6): во-первых, длинная одна цепь и, во-вторых, два коротких фрагмента.

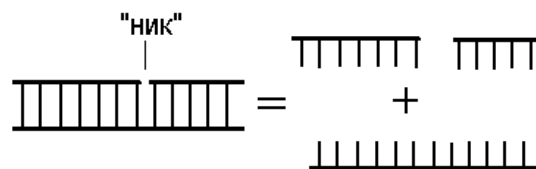


Рис. 6. Схема денатурации ДНК в щелочном растворе.

Все фрагменты различаются по размеру и, значит, по скорости осаждения (седиментации) при центрифугировании. Коэффициент седиментации или константа Сведберга (s), отражает скорость осаждения молекул и их компонентов при центрифугировании и зависит только от их размера, конформации и молекулярного веса. Скорость седиментации измеряется в единицах Сведберга ($1S = 1 \times 10^{-13}$ с) (Т. Боуэн, 1973), поэтому продукты гидролиза можно выявить при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы, разделяющем молекулы по молекулярному весу и определить их размер в единицах Сведберга (S).

Р. Оказаки предположил, что если синтез ДНК идет короткими фрагментами, то короткие фрагменты должны сшиваться. Сшиваются они ферментом лигазой. ДНК-лигаза была обнаружена как у прокариот, так и у эукариот. У *E. coli* были найдены мутанты по лигазе. Оказаки поставил эксперимент на бактериях, зараженных фагом Т4, у которого есть своя термочувствительная лигаза, которая работает при 20°C и не работает при 43°C . Если в клетку попадает фаговая ДНК, то клетка переключается на

репликацию ДНК фага. Клетки заражали фагом Т4, давали импульсную метку ^3H -тимидин и выращивали при двух температурах: 20°C и 43°C . Потом проводили центрифугирование в щелочном градиенте сахарозы.

Как показано на рис. 7,А, если лигаза не работает, то вся вновь синтезированная ДНК была представлена в виде коротких, с небольшой молекулярной массой фрагментов, скорость седиментации которых составляла, примерно, 10S. Со временем увеличивается только их количество, но не длина и, соответственно, молекулярная масса. Если бактерии выращиваются при оптимальной температуре, то по мере увеличения времени реакции появляются все более длинные, с большей молекулярной массой и, следовательно, большей скоростью осаждения (S) вновь синтезированные фрагменты молекул ДНК. Это доказало прерывистость синтеза новых молекул ДНК в репликативной вилке (рис.5).

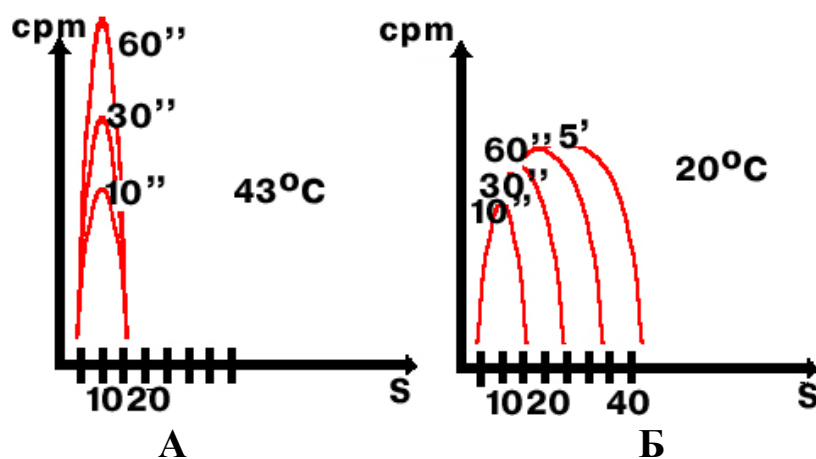


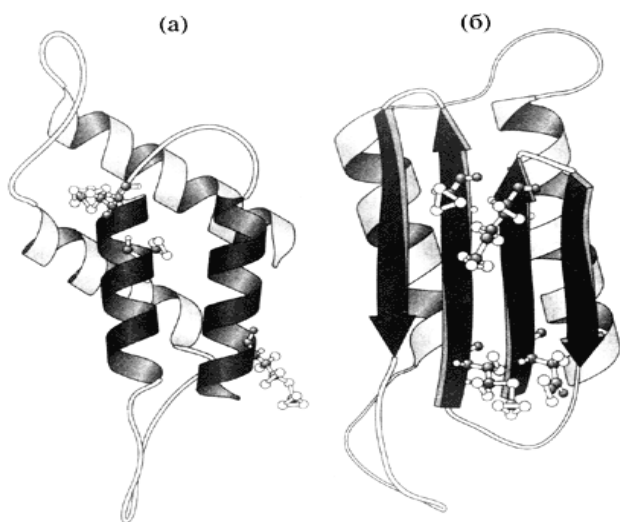
Рис. 7. Распределение вновь синтезированной ДНК фага по градиенту плотности сахарозы после центрифугирования : (А)- репликация ДНК при 43°C , (Б)- при 20°C .

Следует отметить, что лигаза *E. coli* нуждается в коферменте НАД, а лигаза фага - в АТФ. Если *E.coli* не давать никотиновую кислоту (предшественник НАД), бактериальная ДНК также реплицируется, но отдельные фрагменты не сшиваются.

На рубеже XX и XXI веков было сделано еще одно открытие. Известно, что инфекционные болезни вызываются либо вирусами, либо микроорганизмами - бактериями, микробами, грибами. Но в некоторых случаях, например, при коровьем бешенстве, ни вируса, ни микроба не было обнаружено. В 1982 году американский биохимик Стэнли Прузинер опубликовал работу, в которой впервые предположил, что коровье бешенство и другие виды губчатообразной энцефалопатии вызывает белковая молекула, свернувшаяся необычным образом. Он назвал ее "**прион**" (от английского

pr[otenciosus infect]ion - белковая инфекция). Сам термин "прион" пока мало известен. Вместе с тем открытие прионов - это, безусловно, одно из ярких достижений молекулярной биологии последних лет двадцатого столетия.

Прион - это обычный белок. Он есть у каждого человека на поверхности нервных клеток. Оказалось, что белок существует в клетках нервной ткани в двух формах - нормальной и "аномальной" (прионной). Обе разновидности белка имеют идентичную последовательность аминокислот, однако их молекулы различаются по пространственной упаковке (рис.8).



В прионе (рис. 8,б) обнаруживается существенно больше так называемых β -слоев - около 43% (в норме - 3%) и несколько уменьшается количество (с 43% до 34%) α -спиралей (8,а).

Рис.8. Предполагаемое изменение характера укладки полипептидной цепи при превращении нормального белка (а) в прион (б)

"Неправильные" (рис.8,б) распрямленные молекулы прионов легко склеиваются друг с другом, на нервной клетке образуются белковые бляшки, и она погибает. На месте погибшей нервной клетки образуется пустота - вакуоль, заполненная жидкостью. Постепенно весь мозг превращается в дырчатую субстанцию, похожую на губку, и человек или животное погибает. По последним данным, для полного уничтожения прионного белка нужна температура не менее 1000 градусов! Между тем любая бактерия легко уничтожается простым "кипячением" в автоклаве в течение пяти минут при 120 градусах. На первый взгляд устойчивость "неправильных" прионов кажется фантастической, но с научной точки зрения этот факт имеет объяснение. Оно основано на важности пространственной конфигурации для функционирования белков. Ведь потеря активности белком означает изменение его пространственной конфигурации. А так как патогенный прион уже "развернут", он уже потерял природную структуру, поэтому для нейтрализации его патогенной активности требуются более радикальные меры, чем нагревание выше 100 градусов. Но вот что самое странное: оказывается, нормальные молекулы белка, стоит им вступить в контакт с прионами, сами превращаются в них, меняют свою пространственную структуру! Достаточно лишь небольшого числа прионизирующих молекул, чтобы запустить цепную реакцию, разрушительную для клетки, т.е. прион

выступает как инфекционный агент, заражающий нормальные молекулы и таким способом воспроизводящий свою пространственную структуру.

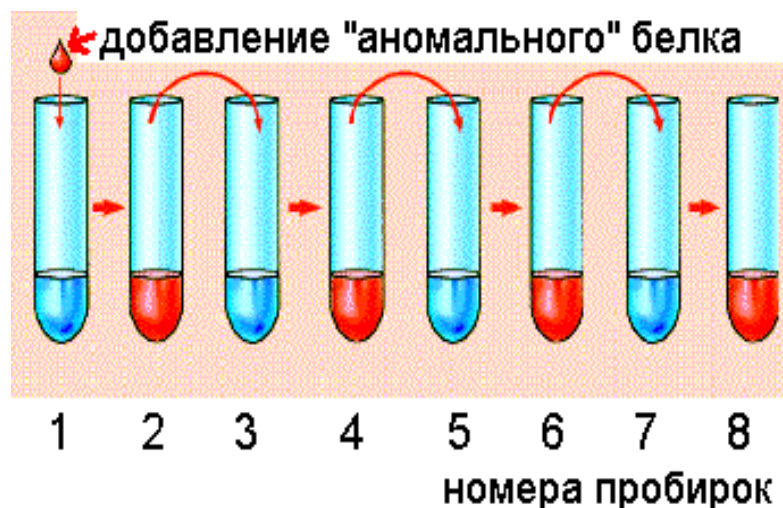


Рис. 9. Схема опыта, доказывающего, что информация о пространственной форме передается от белка к белку напрямую.

Опыт ставился в среде без ДНК - основного носителя наследственности. К белку дрожжей прионного типа в нормальной конформации (на рис. 9 - это первая пробирка) добавляли некоторое количество того же белка, но находящегося в "аномальной" форме. Через 3 часа весь белок становился "аномальным". Часть этого белка (2 пробирка) снова добавляли к "нормальному" (3 пробирка), и картина повторялась. Стало ясно, что "аномальный" белок, образованный из "нормального", способен передавать свою пространственную форму другому "нормальному" белку.

До этого открытия такого, чтобы обычная молекула, не содержащая генетического материала, передавала информацию другим белкам - вызывала инфекционное заболевание, - еще не наблюдалось. Это было похоже на переворот в биологической науке, на пересмотр основных представлений о механизме передачи информации: ДНК → РНК → БЕЛОК.

Под впечатлением этих данных возникла гипотеза белковой наследственности, то есть наследственности без ДНК. Эта гипотеза активно обсуждалась в конце 70-х - начале 80-х годов XX века. Сенсация, однако, продержалась недолго, так как вскоре был открыт ген, ответственный за вышеупомянутый белок, который может существовать и в нормальной, и в прионной форме. Мыши, лишённые этого гена, вполне жизнеспособны, они не заболевают, если их инфицировать прионом, потому что у них нет белка, который можно превратить в зловерные тяжи и бляшки.

Хотя изучать аномальные прионы весьма сложно, так как они нерастворимы и устойчивы к действию ферментов после того, как было

показано, что губчатообразная энцефалопатия вызывается белками-прионами, для постановки диагноза стало возможным не просто исследовать срез определенных участков головного мозга на наличие пустот - вакуолей, но и определять сам возбудитель заболевания. Это результат новых и испытанных методологических технологий в изучении прионов. Для этого биохимическими методами выделяют прионные белки и изучают их под электронным микроскопом - если молекулы их склеены между собой, образуют нити, то наличие патогенных прионов в мозге сомнению не подлежит. Иммунологические методы определения с использованием специфических антител к "раскрученным" патогенным прионам (иммуногистохимический анализ срезов и иммуноблоттинг) еще более чувствительны, чем электронная микроскопия. Суть их в том, что если антитела взаимодействуют с белками, выделенными из головного мозга, - патогенные прионы в нем есть.

Итак, существование прионов указывает на то, что в клетке, наряду с копированием последовательностей ДНК и РНК, идут и матричные процессы совсем иного рода, а именно: копирование конформации (пространственной упаковки) белковых молекул. Но коль скоро информация о некоторых признаках организма может передаваться без помощи нуклеиновых кислот - значит, помимо генетического аппарата в клетке существуют и иные (так называемые эпигенетические) механизмы наследования.

Цель методического руководства - ознакомить студентов с биологически-активными молекулами природного происхождения, обучить их основным приемам и навыкам, необходимым в экспериментальной работе с белками, ферментами, нуклеиновыми кислотами. В настоящей работе мы предлагаем несколько классических методов изучения нуклеиновых кислот и белков. Большинство методик состоит из множества отдельных этапов, и нюансы, имеющие место в каждом из них могут привести экспериментатора в тупик. Чтобы справиться со всеми трудностями, нужно хорошо понимать как принципы, которые лежат в основе каждого метода, так и физико-химические свойства биополимеров.

1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

1.1. Тема: Спектрофотометрия: определение концентрации белков и нуклеиновых кислот по оптической плотности, свойстве, основанном на способности азотистых оснований (нуклеиновые кислоты) и пептидных групп (белки) поглощать свет в УФ-областях

Наиболее удобными и доступными для изучения белков и нуклеиновых кислот оказались их спектры, поскольку именно в последних отражаются структурные особенности молекул (оптические свойства). Например, такое свойство как опалесценция белкового раствора или раствора олигонуклеотидов. При боковом освещении таких растворов лучи света в них становятся видимыми и образуют светящийся конус – эффект Тиндаля. Объясняется этот светорассеивающий эффект дифракцией лучей света частицами белка или олигонуклеотидов в растворе.

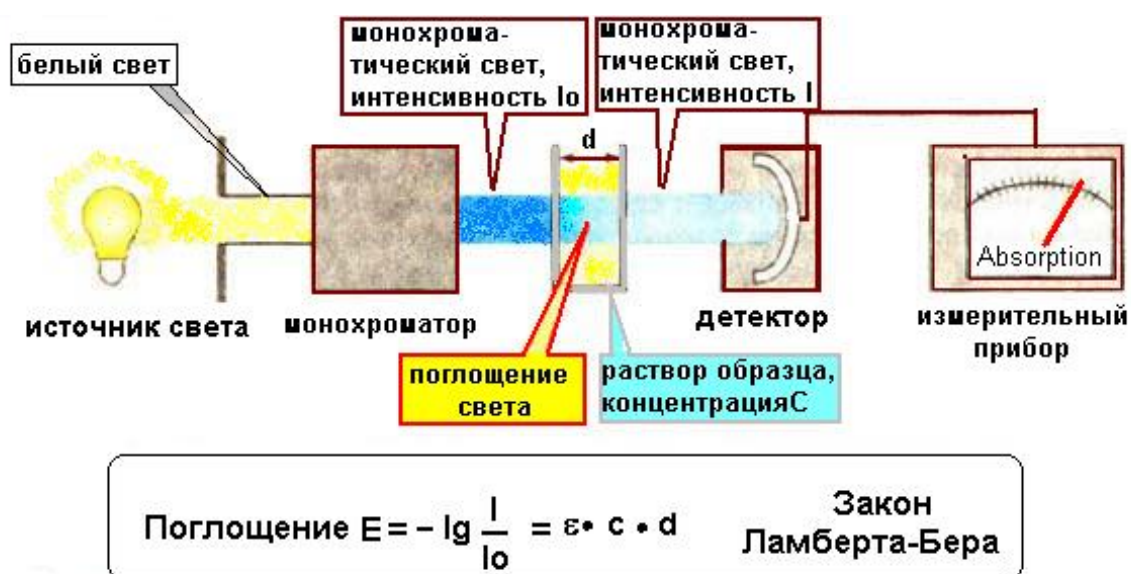


Рис.10. Схема регистрации поглощения света молекулами в растворе на спектрофотометре.

Многие молекулы способны поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Это свойство можно использовать и для определения их концентраций.

Как следует из уравнения (рис.10), величина оптической плотности (E) пропорциональна концентрации поглощающего вещества (C), длине оптического пути луча в образце (d) и молярному коэффициенту экстинкции

(ϵ -поглощения). Поэтому применяют **монохроматический свет**, т.е. свет определенной длины волны, который можно выделить из белого света с помощью **монохроматора** (рис.10). Монохроматический свет интенсивности I_0 проходит через прямоугольную ячейку из стекла или кварца (кювету), в которой находится раствор поглощающего вещества. Интенсивность I выходящего света, ослабленного поглощением, измеряется с помощью детектора. **Поглощение света** раствором (обозначается буквой **D** или **E**) определяется как логарифм отношения I/I_0 . **Закон Ламберта-Бера** гласит, что **E** пропорциональна концентрации (**Смоль/л**) вещества и толщине (**dсм**) слоя раствора. Раствор с концентрацией 1 моль/л в кювете с толщиной 1см имеет оптическую плотность, равную ϵ , т.е. ϵ численно равен поглощению 1М раствора при длине пути света 1 см. Молярный коэффициент ϵ уже не зависит от условий измерения **C**, **d** и характеризует способность молекул данного вещества поглощать свет той или другой длины волны. Размерность его -л/(моль·см). Измерив оптическую плотность раствора (**E**) в кювете с толщиной 1 см, по значению ϵ можно определить концентрацию вещества в растворе: $C = E / \epsilon$ (моль/л). Если толщина кюветы **не равна** 1 см, то

$$C(\text{моль/л}) = E / \epsilon \times d.$$

Молярные коэффициенты многих веществ определены и приводятся в соответствующих справочных изданиях. Оптическая плотность раствора (**E**) зависит от длины волны измеряемого света. Кривую, выражающую эту зависимость, называют **спектром поглощения**.

Характерными для нуклеиновых кислот полосами поглощения в УФ - области спектра являются полосы с λ_{\max} (длина волны, при которой наблюдается максимальное поглощение энергии света) при 200 ÷ 290 нм. Спектры поглощения однокомпонентных неокрашенных белков (сывороточный и яичный альбумины, гамма-глобулин, трипсин, пепсин и др.) так же располагаются в области от 200 ÷ 290 нм, включая две полосы поглощения: одну с $\lambda_{\max} \sim 220$ нм, вторую с $\lambda_{\max} \sim 278$ нм. Полоса поглощения с $\lambda_{\max} = 275$ нм обусловлена поглощением энергии света электронами ароматических аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) (табл.1). В области 240-300 нм главный вклад в спектр дает триптофан даже при относительно невысоком содержании в белке и в значительной степени определяет характер его спектра поглощения, так как **коэффициент молярного поглощения** ϵ его индольного ядра в 4 раза превышает ϵ тирозина и почти в 30 раз - ϵ фенилаланина. Светопоглощение в самой коротковолновой области спектра (короче 220 нм) связано со

светопоглощением хромофора пептидной группы белковой молекулы (рис.11).

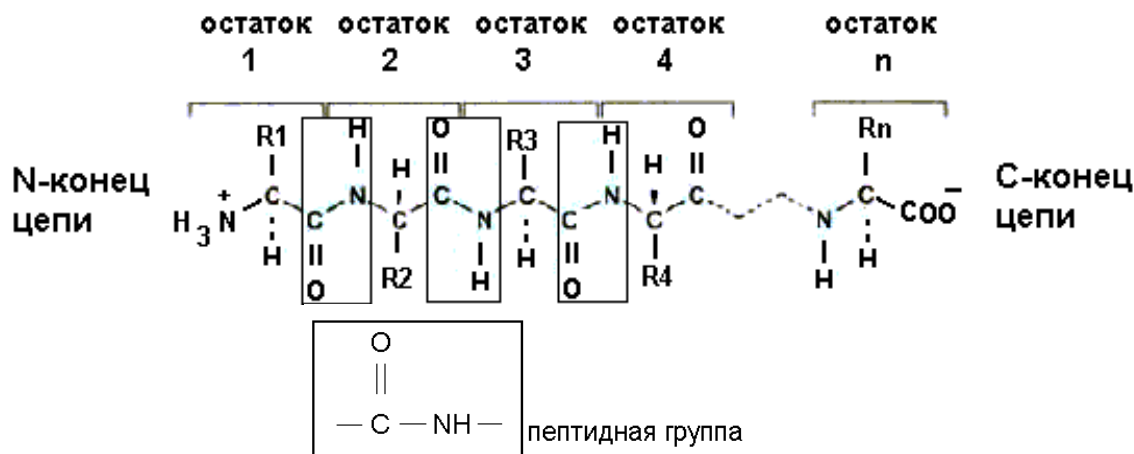


Рис.11. Пептидные группы в молекуле белка

Спектры поглощения нуклеиновых кислот, формирующиеся из спектров поглощения входящих в их состав азотистых оснований, характеризуются полосой поглощения в диапазоне 255-270 нм.

Основными хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые и пиримидиновые основания нуклеотидов (рис. 12). В состав ДНК входят аденин, гуанин (пуриновые), цитозин и тимин (пиримидиновые азотистые основания); в РНК вместо тимина присутствует урацил. За светопоглощение ответственна, главным образом, система пуриновых и пиримидиновых колец. Полосы поглощения азотистых оснований с максимумами около 260 нм отличаются высокой интенсивностью.

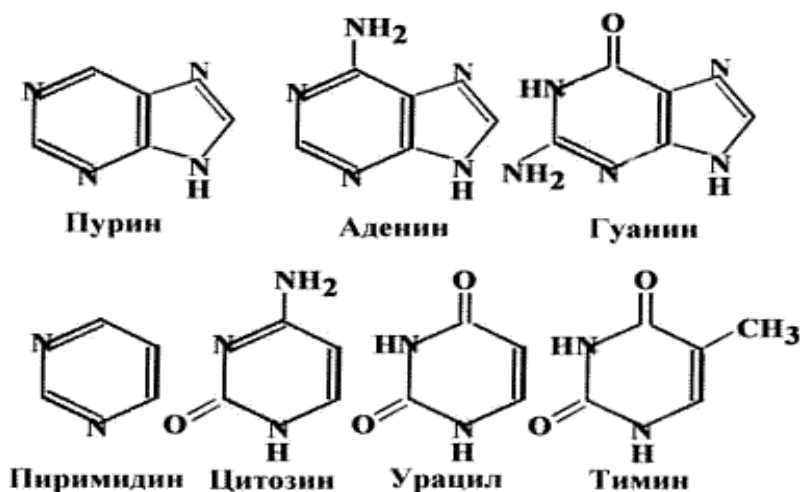
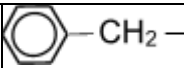
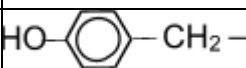
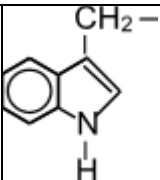
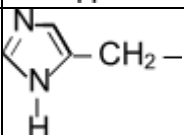
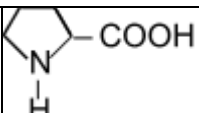


Рис.12. Структурные формулы азотистых оснований.

При денатурации ДНК наблюдается сдвиг полосы поглощения ее образцов в более длинноволновую часть спектра с одновременным увеличением экстинкции (поглощения).

Таблица 1. Важнейшие протеиногенные α- аминокислоты

| Аминокислота (*незаменимые α – АК) | Сокращенное название аминокислотного остатка в белках. | Строение R |
|--|--|---|
| Алифатические | | |
| Глицин | Gly | H– |
| Аланин | Ala | CH ₃ – |
| Валин* | Val | (CH ₃) ₂ CH– |
| Лейцин* | Leu | (CH ₃) ₂ CH–CH ₂ – |
| Изолейцин* | Ile | CH ₃ –CH ₂ –CH– I CH ₃ |
| Содержащие OH– группу | | |
| Серин | Ser | HO–CH ₂ – |
| Треонин* | Thr | CH ₃ –CH(OH)– |
| Содержащие COOH– группу | | |
| Аспарагиновая | Asp | HOOC–CH ₂ – |
| Глутаминовая | Glu | HOOC–CH ₂ –CH ₂ – |
| Содержащие NH₂CO– группу | | |
| Аспарагин | Asn | NH ₂ CO–CH ₂ – |
| Глутамин | Gln | NH ₂ CO–CH ₂ –CH ₂ – |
| Содержащие NH₂– группу | | |
| Лизин* | Lys | NH ₂ –(CH ₂) ₃ –CH ₂ – |
| Аргинин | Arg | NH ₂ –C–NH–(CH ₂) ₂ –CH ₂ – II NH |
| Серусодержащие | | |
| Цистеин | Cys | HS–CH ₂ – |
| Метионин* | Met | CH ₃ –S–CH ₂ –CH ₂ – |
| Ароматические | | |
| Фенилаланин* | Phe |  |
| Тирозин | Tyr |  |
| Гетероциклические | | |
| Триптофан* | Trp |  |
| Гистидин | His |  |
| Иминокислота | | |
| Пролин | Pro |  |

Регистрация и анализ спектров поглощения нуклеиновых кислот, а также нуклеотидов позволили получить весьма полезную информацию о радиационных и фотохимических превращениях их молекул, о термостабильности, об устойчивости ДНК и РНК по отношению к различным денатурирующим (модифицирующим) факторам.

В твердом виде ДНК всегда содержит неопределенное количество воды, поэтому необходимо определять концентрацию ДНК путем измерения ее поглощения при λ 260 нм. Раствор, содержащий 1 мг ДНК на 1мл, характеризуется оптической плотностью равной 22 при длине волны 260 нм ($E_{260}=22$). Этот метод особенно полезен для количественного определения ДНК, экстрагированной из тканей разбавленных хлорной кислотой (HClO_4) (0,25÷0,65 М). Трихлоруксусная кислота вплоть до концентрации 10% не влияет на результат анализа.

Для определения концентрации белка широко пользуются измерениями интенсивности поглощения света при λ 280 нм, которое обусловлено присутствием в белке ароматических аминокислот. Хотя количество этих аминокислот в разных белках различно и, следовательно, интенсивность неодинакова, в кювете толщиной 1 см у раствора, содержащего 1 мг “усредненного” белка в 1 мл, оптическая плотность равна 1 при длине волны 280 нм ($E_{280}=1$).

Несмотря на недостаточную точность, спектрофотометрический метод применяется очень широко: он быстр, не требует каких-либо реагентов, растворы белков-ферментов и нуклеиновых кислот после измерения могут быть использованы для дальнейшей работы.

Лабораторная работа 1: Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот в биологическом материале по фосфору

Из сложных биологических молекул особое значение имеют нуклеопротеиды, играющие роль в передаче наследственных признаков, в синтезе белков и во многих процессах обмена.

Нуклеопротеиды состоят из белков и нуклеиновых кислот, которые в своем составе содержат азотистые основания (А, Т, Г, Ц или У, входящий в РНК). Кроме того, в состав нуклеиновых кислот (Н.К.) входят углеводы (моносахариды - пентоза) и фосфорная кислота (рис.13.). Различают рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК) кислоты, которые отличаются не только по содержанию У и Т, но и в зависимости от входящего моносахарида - рибозы (РНК) и дезоксирибозы (ДНК) (рис.14).



Рис.13. Структура нуклеотида-мономера нуклеиновых кислот.

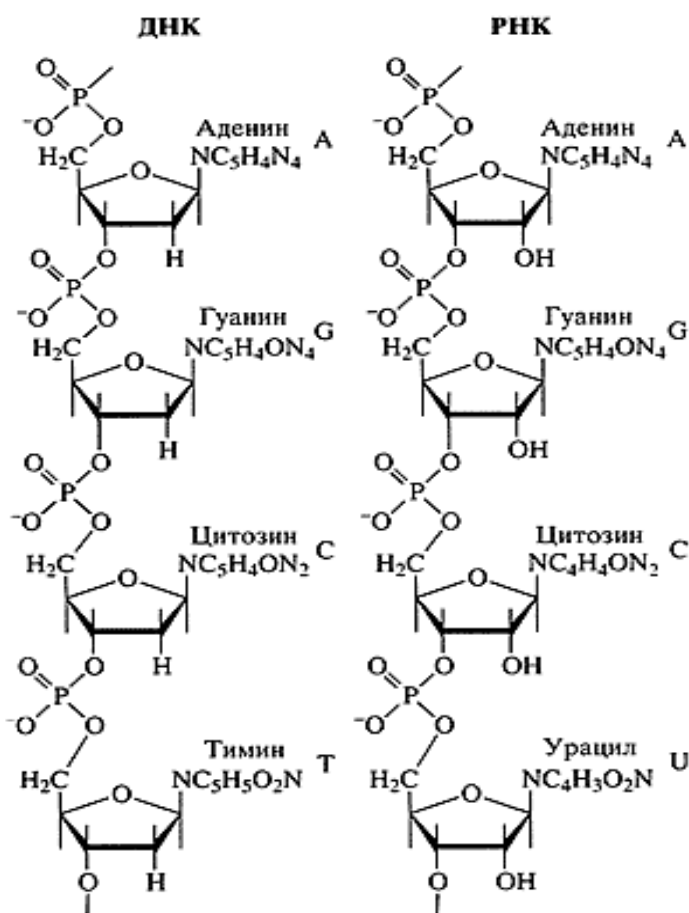


Рис.14. Различия в первичной структуре ДНК и РНК.

Так как все три компонента (азотистые основания, углеводы и фосфорная кислота) входят в состав нуклеиновых кислот всегда в постоянных молярных концентрациях (в соотношении 1:1:1), определение нуклеиновых кислот обычно проводят, исследуя содержание какого-либо одного из компонентов, в частности, фосфора.

Принцип метода основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) горячей хлорной кислотой (HClO_4) при нагревании с последующим определением нуклеинового фосфора (**Фн**) в растворе фотометрированием при длинах волн 270 и 290 нм:

$$C_{(\text{мкг/мл})\text{Фн}} = (E_{270} - E_{290}) / 0.19, \text{ где}$$

коэффициент 0,19 - это значение ΔE , где гидролизат содержит 1 мкг НК в 1 мл раствора.

По концентрации **Фн** вычисляют содержание нуклеиновых кислот:

$$C_{(\text{мкг/мл})\text{НК}} = C_{(\text{мкг/мл})\text{Фн}} \times 10.3,$$

где 10,3 - коэффициент пересчета на смесь НК.

• Можно определять отдельно содержание ДНК и РНК, измеряя величину поглощения раствора при λ_{max} 270 и 290 нм и учитывая коэффициент пересчета для ДНК ($k = 10,1$) и РНК ($k = 10,5$). Расчет проводят по формуле:

$$C = (E_{270} - E_{290}) \times k \times V / 190, \text{ где}$$

C - концентрация нуклеиновых кислот в мг/мл; E - оптическая плотность при соответствующей длине волны; k - коэффициент пересчета по фосфору нуклеиновой кислоты (для ДНК $k = 10,1$ для РНК $k = 10,5$);

V - объем исследуемой пробы; 190 - коэффициент поглощения 1 мг **Фн** в 1 мл раствора. Точность $\pm 10\%$.

Оборудование:

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 для измерения оптической плотности растворов; кварцевые кюветы для фотометрирования; центрифуга типа Т 23 D или рефрежераторная К-24, объем центрифужных пробирок 30-50мл; весы для уравнивания центрифужных пробирок; водяная баня (96°C); мерная посуда - цилиндры или пробирки на 25-50мл (2 шт.); пробирки (мерные «пальчики» - 2 шт.); стаканы, реторты; микропипетки на 100 и 1000мкл; наконечники для пипеток; стеклянные палочки; маркер; бинт; фильтровальная бумага; штативы.

Реактивы:

Проба крови или навеска мышечной ткани; 0,2Н, 0,5Н и 0,6Н растворы хлорной кислоты; дистиллированная вода ($\text{дH}_2\text{O}$).

Задание 1. Определение концентрации нуклеиновых кислот в крови животных **Схема работы:**

1. Приготовить две пробы гемолизата крови. Для этого взять два цилиндра (I, II) на 25 мл и в каждый добавить по 0,1 мл крови (по стенке пробирки), затем – по 1,4 мл дистиллированной ($\text{дH}_2\text{O}$).

•Внимание! Добавлять воду строго над каплей крови, по стенке пробирки.

2.К гемолизату добавить 13,5 мл 0,6 Н хлорной кислоты (вливать по стенке пробирки), перемешать. Пробирку I закрыть ретортой (рис.15).

3.Пробирку с пробой I поместить на 20 мин в кипящую водяную баню. (Пробу II не греть!).

За это время происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот, связанных с белками, и осаждение белков.

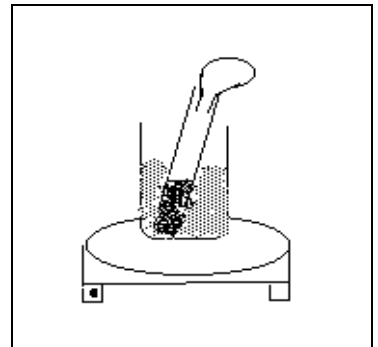


Рис.15. Система для гидролиза ДНК нагреванием в кислой среде.

4. После гидролиза пробирки охладить под струей воды из-под крана.

5. Перелить охлажденное содержимое I пробы и II (контрольной) пробы в центрифужные пробирки. Центрифужные пробирки уравновесить.

6. Центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин на центрифуге Т23 D (20°C).

7. Надосадочную жидкость обеих пробирок слить в чистые стаканчики. Отлить по 3мл каждой пробы в стеклянный «пальчик» для фотометрирования.

Оценка результатов:

1. Замерить поглощение растворов I и II проб при E_{270} и E_{290} . Контроль - хлорная кислота.

2. Рассчитать суммарное содержание нуклеиновых кислот в пробирках с учетом разведения пробы крови по формуле:

$$X=(A-B)\times\Gamma\times 10,3\times 100 / 0,19\times V=\text{мг}\% , \text{ где}$$

A и B –разность между оптическими плотностями исследуемого раствора при λ 270 и λ 290 нм; 0,19 поправка при измерение оптической плотности;

Γ – объем раствора крови с хлорной кислотой;

V – объем крови, взятой для исследования, (отношение Γ/V -разведение исходной пробы);

10,3 - коэффициент пересчета на количество нуклеиновых кислот;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Вывод:

Задание 2: Определение концентрации нуклеиновых кислот в мышечной ткани

Схема работы:

1. 10 и 500 мг мышечной ткани крупного рогатого скота поместить в центрифужные пробирки.
2. Добавить по 10 мл 0,2 Н хлорной кислоты. Перемешать стеклянной палочкой
- 3.Осадок отделить центрифугированием при 3000 об/мин (Т 23D) в течение 5 мин (20⁰ С). Осадок повторно отмыть.
4. К осадкам добавить по 10 мл 0,5 Н раствора хлорной кислоты, закрыть пробирки ретортой, нагревать в течение 30 мин в кипящей бане.
5. Гидролизат охладить под струей холодной воды и центрифугировать при 3000 об/мин (Т 23D) в течение 5 мин (20⁰ С).
6. Перелить надосадочную жидкость в чистые стеклянные пробирки и измерить поглощение растворов (E₂₇₀ и E₂₉₀); контроль 0,5Н раствор хлорной кислоты

Оценка результатов:

Рассчитать концентрацию ДНК и РНК. Так как нуклеиновые кислоты экстрагированы из ткани, сделать расчет по формуле:

$$C = (E_{270} - E_{290}) \times k \times V / 190 \text{ (см. стр. 21)}$$

(для ДНК k = 10,1; для РНК k = 10,5);

V - объем исследуемой пробы;

190 удельная экстинкция 1 мг фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора.

Вывод: Сравнить содержание РНК и ДНК в соматических клетках мышечной ткани.

Лабораторная работа 2: Определение концентрации ДНК в плазме методом флуоресцентной спектрофотометрии

Принцип метода. Метод основан на способности хромофора Hoechst 33342 встраиваться между комплементарными основаниями нитей ДНК, в результате чего происходит увеличение флуоресценции. Уровень флуоресцентного ответа (%) пропорционален количеству связавшегося с ДНК красителя. Концентрацию ДНК определяют по калибровочной кривой.

Оборудование:

Люминесцентный спектрофотометр Hitachi MPF-4; кварцевые спектрофотометрические кюветы на 500 мкл; автоматические пипетки на 5-50, 100-1000 мкл с наконечниками; стеклянные пробирки; маркер.

Реактивы:

Люминесцентный краситель Hoechst 33342 – водный раствор с концентрацией 600 мкг/мл; исследуемый материал (плазма или сыворотка крови); стандартный раствор ДНК эритроцитов цыплят с концентрацией 1,0 мкг/мл в буфере TNE (исходный стандартный раствор).

TNE-буфер: Трис-NaCl -ЭДТА, рН 7,4.

Ход работы:

1. Приготовить краситель. Для этого, из водного запасного раствора красителя с концентрацией 600 мкг/мл приготовить 100 мкл раствора с концентрацией 120 мкг/мл. (Сделать расчет и записать).

2. Приготовить рабочий буфер для реакции. Рабочая концентрация красителя Hoechst 33342 в препарате должна быть 0,6 мкг/мл. Для этого приготовить 20 мл буфера TNE-Ноечст с концентрацией красителя в нем 0,6 мкг/мл, для этого взять 100 мкл красителя (120 мкг/мл) и довести до 20 мл.

3. Приготовить стандартные растворы ДНК для построения калибровочной кривой:

3.1. К 1 мл исходного раствора ДНК (1,0 мкг/мл) добавить 10 мкл раствора Hoechst, приготовленного в п.1. Оставить на 5 минут при комнатной температуре (раствор ДНК без разведения - б/р).

3.2. Приготовить из этого раствора серию разведений, используя буфер TNE (п.2). Чтобы приготовить разведения (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) необходимо в пробирки (мерные «пальчики») внести по 250 мкл буфера TNE .

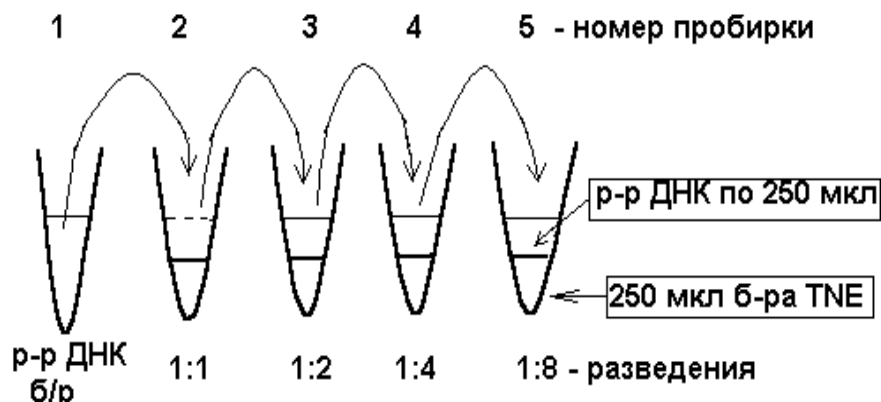


Рис. 16. Приготовление разведений стандартных растворов ДНК.

Затем из 1 пробирки взять (см. рис. 16) 250 мкл раствора ДНК без разведения и добавить во 2 пробирку (размешать осторожно), затем из 2 пробирки отобрать 250 мкл раствора ДНК и добавить в 3 пробирку и т.д.

Таким образом, должно получиться 5 стандартных растворов (включая исходный раствор – б/р), в каждом последующем – концентрация ДНК в 2 раза меньше, чем в предыдущем.

4. Построение калибровочной кривой. Измерить поглощение стандартных растворов ДНК на люминесцентном спектрофотометре (при чувствительности 0.3). При этом необходимо вывести показатель флуоресценции исходного раствора на максимальное значение (82-98%) с помощью ручки «Excitation slit», меняя чувствительность. Маркер самописца показывает на бумажной ленте уровень флуоресценции раствора ДНК без разведения, примерно, 85%. Настройки прибора записать в тетрадь (длины волн эмиссии и испускания, величины щелей, используемую чувствительность). При этих же настройках измерить флуоресценцию остальных разведений стандартных растворов. Результаты измерений оформить в виде таблицы:

| Разведение | Концентрация ДНК [мкг/мл] | Показания самописца [%] |
|------------------|---------------------------|-------------------------|
| Исходный раствор | | |
| 1:1 | | |
| 1:2 | | |
| 1:4 | | |
| 1:8 | | |

5. Построить калибровочную кривую, где по оси абсцисс отложить концентрацию ДНК (мкг/мл), по оси ординат – показания самописца (%), точки пересечения отметить и соединить их (рис.17).

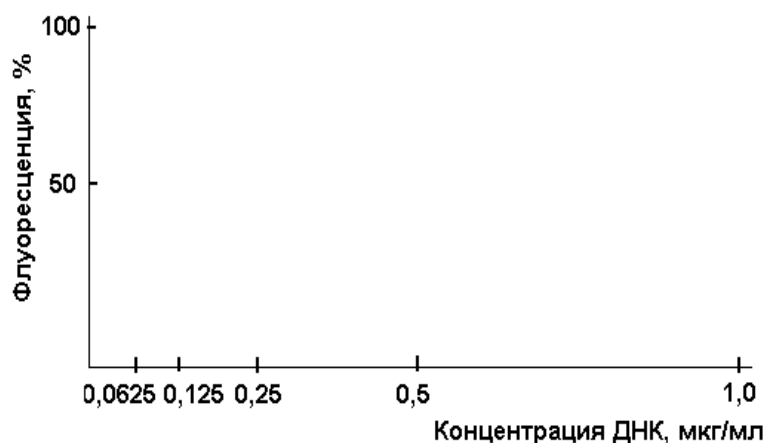


Рис. 17. Калибровочный график для определения концентрации ДНК.

6. Приготовить исследуемые образцы (сыворотки человека и животного):

6.1. Взять две пробирки. В одну добавить сыворотку человека, в другую – животного. Исходную сыворотку или плазму крови развести буфером TNE без красителя 1:100 (5 мкл сыворотки довести до 500 мкл буфером) и измерить собственную флуоресценцию плазмы крови без красителя

[контроль - фон], так как в сыворотке или плазме крови содержатся компоненты, способные флуоресцировать (некоторые аминокислоты, холестерин, билирубин). Это значение - **Fк**.

6.2. Затем исходную сыворотку или плазму развести буфером TNE-Ноеchst (красителем) 1:100. Выдержать 5 мин, измерить уровень флуоресценции. Показания самописца записать. Это значение - **Fо**.

7. Определить уровень флуоресцентного ответа исследуемых образцов (%) по формуле:

$$F = F_o - F_k,$$

где **Fо** – среднее арифметическое значение флуоресценции образца с красителем, а **Fк** – значение флуоресценции образца без хромофора (%).

8. Определить концентрацию ДНК в образцах, отложив значение **F** на калибровочной кривой.

Оценка результатов:

Сравнить уровни концентрации ДНК в сыворотках человека и животного.

Вывод:

Лабораторная работа 3: Количественное определение белка в биологической жидкости

(Микроопределение белка с биуретовым реактивом)

Для количественного определения белка применяют физические, химические и биологические методы.

Из физических методов простейшим кажется взвешивание чистого белка. Однако белки очень гигроскопичны и полностью удалить из их состава воду трудно. Наибольшее распространение из физических методов получил спектрофотометрический метод (по поглощению в ультрафиолетовой области спектра).

Самым распространенным химическим методом количественного определения белка является колориметрический метод. Он основан на изменении интенсивности цветных реакций. Цветные реакции применяются,

чтобы установить вещество белковой природы, для идентификации белков и определение их аминокислотного состава в различных биологических жидкостях. Например, в клинической лабораторной практике эти методы используются для определения количества белка в плазме крови и аминокислот в крови, для выявления наследственных и приобретенных патологий обмена веществ и т.д.

Белок – это полипептид, последовательность аминокислотных остатков в котором соединена пептидной связью (рис.18).

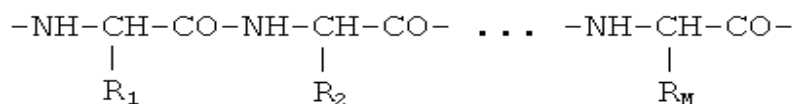


Рис.18. Схема молекулы полипептида.

Принцип метода. Биуретовая реакция это реакция на пептидную связь. В основе ее лежит способность пептидной группы – **CO–NH–** образовывать с сульфатом меди в щелочной среде окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых зависит от длины полипептидной цепи и, значит, от концентрации белка. Раствор белка приобретает сине-фиолетовое окрашивание. Реакция называется биуретовой т.к. биурет (NH₂-CO-NH-CO-NH₂) содержит в своем составе амидную (пептидную) группу (как и белки) и дает ту же цветную реакцию.

Оборудование:

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46; аналитические весы; два штатива с пробирками по 10 штук в каждом; автоматические пипетки переменного объема; наконечники; стаканы стеклянные с носиком.

Задание 1. Биуретовая реакция на пептидную связь

При взаимодействии белкового раствора с сульфатом меди в щелочной среде, раствор приобретает сине-фиолетовый цвет. Это комплексное соединение обладает способностью поглощать свет в УФ-области с λ_{max} ~ 330 нм.

Реактивы: 1) яичный белок - 1%-ный раствор (белок куриного яйца фильтруют через марлю и разводят дН₂О 1/10; 2) NaOH - 10%-ный раствор; 3) CuSO₄·5H₂O - 1%-ный раствор.

Ход определения:

1. В пробирку внести: → 5 капель 1%-ного р-ра яичного белка
2. Добавить: → 3 капли 10%-ного р-ра NaOH
→ 1 каплю 1%-ного р-ра CuSO₄, перемешать.

Оценка результатов:

Если содержимое пробирки приобрело сине-фиолетовое окрашивание, значит произошла реакция между пептидными связями яичного белка и сульфатом меди.

Задание 2. Определение концентрации белка с использованием биуретовой реакции

Реактивы: 1. Реактив Бенедикта. (1) Раствор-1: К 50 мл дистиллированной H_2O (dH_2O) добавить 17,3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия. Смесь нагреть (не доводя до кипения) до полного растворения солей. (2) Раствор-2: Растворить 1,73 г сульфата меди в 10 мл dH_2O . (3) Раствор-2 добавить к раствору-1 и довести общий объем до 100 мл dH_2O . Перемешать. Реактив Бенедикта готов к работе.

2. Раствор сывороточного альбумина (2,0 мг/ мл);

3. NaOH (10 %-ный раствор);

4. Раствор №1 (кровь - 0,5мл), раствор № 2 (моча - 0,5 мл).

Ход определения:

1. Построить калибровочный график. Для этого:

1.1. Взвесить 6 проб белка-альбумина – 0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 2 мг и внести в пробирки объемом 10 мл.

1.2. Добавить в каждую пробирку: $d H_2O$ → до 2 мл.

6% -ный р-р NaOH → 2 мл.

р-в Бенедикта → 0,2 мл.

1.3. Содержимое каждой пробирки перемешать. Выдержать 15 мин ($22^\circ C$).

1.4. Замерить оптическую плотность растворов (E_{330}).

1.5. Построить график (рис.19):

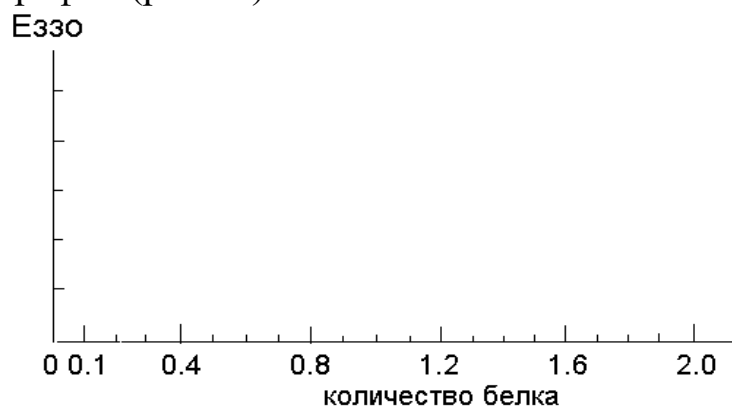


Рис.19. Калибровочный график зависимости оптической плотности (E) белкового раствора ($\lambda_{330 \text{ нм}}$) от концентрации белка.

2. Взять две пробирки (№1 и №2).
- 2.1. В одну внести р-р №1, во вторую р-р №2 - по 0,5 мл;
- 2.2. Добавить в каждую:
дН₂О до 2,0 мл
р-р NaOH → 2,0 мл
р-в Бенедикта → 0,2 мл.
3. Содержимое перемешать. Выдержать 15 мин.
4. Замерить оптическую плотность полученных растворов при E₃₃₀ нм.

Оценка результатов:

Определить количество белка в исследуемых биологических жидкостях.

Для этого:

(1) Отложить данные оптической плотности (показания спектрофотометра) на ось ординат.

(2) Спроецировать точку на калибровочную кривую и, опустив перпендикуляр на ось абсцисс, определить количество белка.

Вывод: По уровню интенсивности окраски сделать вывод о концентрации белков в исследуемых биологических жидкостях.

2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Препараты высокоочищенных белков и нуклеиновых кислот находят разнообразное применение в научных исследованиях, медицине и биотехнологии. Так как нуклеиновые кислоты и многие белки (в особенности глобулярные) высоко лабильны, выделение проводят с помощью предельно мягких методов и при пониженной температуре (0-5°C). К таким методам относят гидродинамические методы, хроматографию, электрофорез и др.

2.1. Тема: Гидродинамические методы для разделения органелл и макромолекул. Седиментация

Благодаря ультрацентрифуге биологи получили возможность быстро решать вопрос о чистоте и размерах не только макромолекул, но и клеток и их субклеточных частиц. Использование ультрацентрифугирования, как метода, основано на том положении, что поведение молекул и субчастиц в центробежном поле определяется рядом параметров - молекулярным весом, формой и плотностью. Исходная смесь частиц наносится тонким слоем на более плотную среду пробирки бакет-ротора (рис.20).

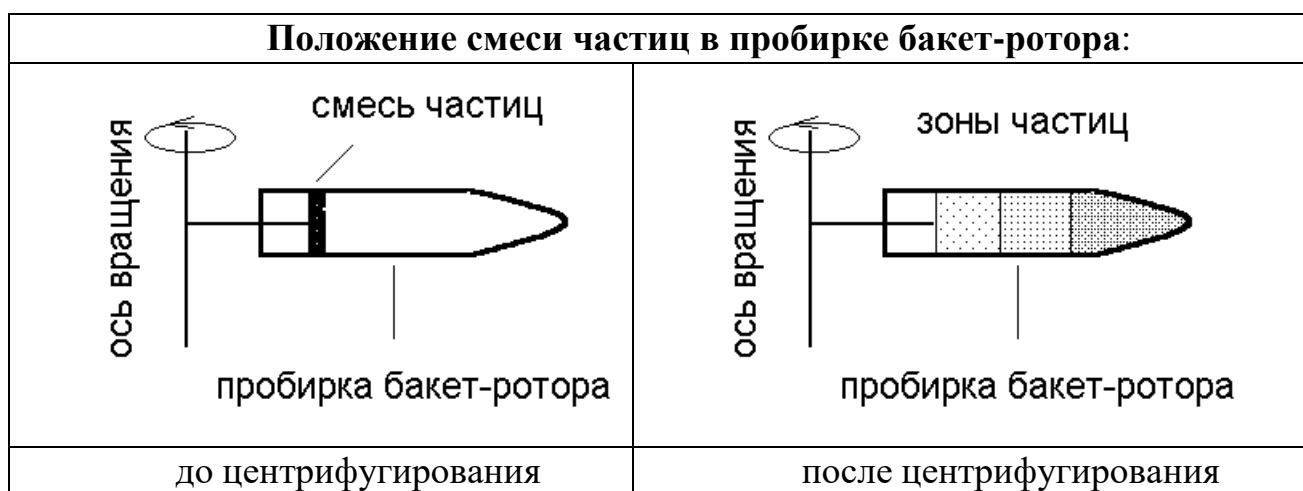


Рис. 20. Схема разделения частиц в бакет-роторе при центрифугировании.

Фракционирование происходит путем осаждения органелл или клеток под действием силы тяжести. В процессе формирования градиента среды органеллы и клетки образуют зоны в их истинной плавучей плотности.

Для создания градиента плотности используют сахарозу, перколл и фиколл. Фиколл 400 представляет собой гидрофильный полимер сахарозы с молекулярным весом 400000. Могут быть получены растворы, содержащие до 50% (вес/объем) фиколла, которые охватывают диапазон плотностей до 1,2

г/мл. Осмотическое давление его растворов низкое, что позволяет использовать изотонические градиенты плотности и сохранять физиологические и морфологические свойства клеток и органелл в процессе центрифугирования. Фиколл 400 широко применяется для разделения клеток, клеточных органелл и частиц, связанных с мембранами или ядром.

К числу наиболее употребительных относится метод выделения клеток на градиенте плотности Фиколл-Пака. Смешивая Фиколл и Пак (рентгеноконтрастное вещество) в определенной пропорции, получают раствор, имеющий плотность 1.077 г/см. Центрифугируя периферическую кровь после наслаивания на градиент, удается разделить клетки, имеющие плотность ниже (лимфоциты, моноциты) и выше (эритроциты, гранулоциты), чем 1.077 г/см.

Лабораторная работа 4: Выделение лимфоцитов методом зонально-скоростного центрифугирования

Принцип метода разделения. Особенности зонально-скоростного центрифугирования отражены в его названии: «скоростное», потому что частицы разделяются по скорости оседания, причем плотность их значительно больше, чем плотность среды, и «зональное», т.к. частицы разных размеров оседают ограниченными слоями. Частицы разных размеров разделяются одновременно при одном центрифугировании.

Оборудование:

Центрифуга (К-23; угловой ротор; объем пробирок-30 мл). Ареометр (прибор для измерения плотности раствора) с пределами измерений от 1,060 г/см до 1,090 г/см. Камера Горяева. Микроскоп. Лабораторная посуда, конические центрифужные пробирки, весы для уравнивания центрифужных пробирок, пастеровские пипетки и др.

Реактивы:

Фиколл-400 - полисахарид. Пак - рентгеноконтрастное вещество (аналоги: верографин, изопак, урографин, уротраст, низотраст-370, триозил, ронпакон, омнипак и др.). ЗФР -забуференный физраствор, рН 7,2; раствор Хенкса; 3%-ный раствор цитрата натрия. Кровь с гепарином (Система-«Vacutainer Systems», фирма Becton Dickinson (Англия);

Подготовка реагентов:

1. Р-р 1: Фиколл: 4.32 г порошка фиколла-400 растворяют в 48 мл дистиллированной воды (8,25%-вес/объем, $d \approx 1,03$ (20°C)).

2. Р-р 2: Раствор рентгеноконтрастного вещества (например, уротраста): 10,14 мл 76% раствора уротраста доводят дистиллированной водой до 21 мл ($\approx 36,6\%$ -объем/объем).

3. Градиент плотности: полученные объемы растворов фикола (р-р 1) и уротраста (р-р 2) смешивают. Измеряют ареометром плотность полученного раствора (1,077 г/см). Если плотность выше, добавляют раствор фикола, если ниже - раствор уротраста. Градиент плотности можно хранить в течение 30 суток при температуре + 4°C в склянке из оранжевого стекла.

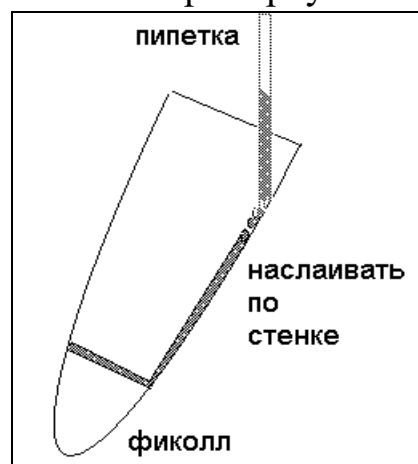
4. Забуференный изотонический раствор хлорида натрия (ЗФР): 3,56 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (м.м. 178) растворить в дистиллированной воде, доведя объем до 100 мл (р-р А); 3,12 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (м.м. 156) растворить в дистиллированной воде, доведя объем до 100 мл (р-р Б). Смешать 72 мл раствора А и 28 мл раствора Б, в полученной смеси растворить 0,85 г NaCl ; рН раствора должен составить 7,2-7,4.

Схема выделения:

1. Ополоснуть пробирки на 10 мл цитратом натрия.
2. Смешать 2 мл крови с равным объемом ЗФР в пробирке на 10 мл
3. Взять шприцем 3(2) мл раствора фикола и внести в пробирку.
4. Тщательно наслоить 4 (6) мл разведенной крови на фикола (рис.21).

•Внимание! Не смешивать образец с фиколом. Наслаивать по стенке пробирки. Соотношение объемов градиент / плазма выдерживают в пределах 1:1 - 1:3.

Рис.21,а. Схема наслоения образца на градиент



5.1. Перед центрифугированием выбрать формулу, удобную для пересчета «g» в обороты (N) по таблице:

| Технические данные центрифуги: | | |
|--|--------------------|---|
| Ротор: | N_{max} : | Мах поле тяготения (g_{max}): |
| 4×100 мл, бакет-ротор | 6000 об/мин | 5600 g |
| 6 × 10 мл, угловой ротор | 7000 об/мин | 7100 g |
| $g = \pi^2 \times N^2 \times R / 8820$, где N-число оборотов; R=радиус,(м) | | $N_{\text{раб.}} = N_{\text{max}} \times \sqrt{g_{\text{раб.}} / g_{\text{max}}}$ |

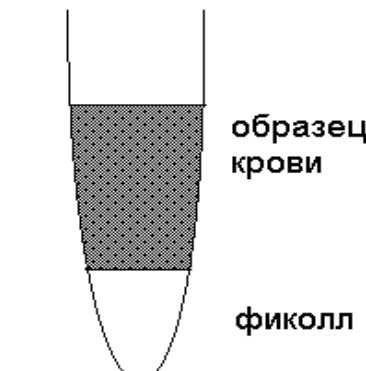
| | |
|--|---|
| <p>5.2. Затем рассчитать скорость вращения.</p> <p>•Внимание! Предварительно проверить и отобрать центрифужные пробирки по весу, чтобы не уравнивать их после наложения препарата.</p> |  |
|--|---|

Рис. 21,б. Образец готовый к работе

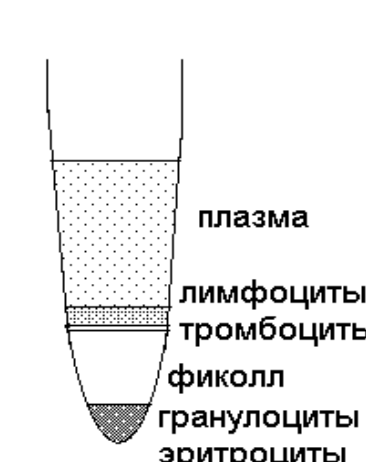
| | |
|---|--|
| <p>6. Центрифугировать 30-40 мин при 400 g и температуре 18-20°C на центрифуге К-23.</p> <p>В процессе центрифугирования эритроциты и гранулоциты “проваливаются” в градиент и оседают на дно пробирки. На верхней границе градиента при правильном разделении образуется рыхлое кольцо беловатого цвета, состоящее в основном из лимфоцитов.</p> |  |
|---|--|

Рис. 21,в. Распределение клеток по образцу после центрифугирования


| | |
|--|---|
| <p>7. Удалить верхний слой плазмы пастеровской пипеткой.</p> |  |
|--|---|

Рис.21,г. Образец очищенных лимфоцитов в пробирке

8. Собрать лимфоциты чистой пастеровской пипеткой.

- *Примечание.* Избыток крови ведет к загрязнению тромбоцитами. Избыток фиколла ведет к загрязнению гранулоцитами.

9. Для дополнительной очистки к осадку клеток добавить, примерно, 6мл ЗФР, перемешать (Осторожно!) и центрифугировать при 100 g в течение 10 мин. (Повторить очистку 2 раза).

10. После третьего центрифугирования удалить надосадочную жидкость, ресуспензировать лимфоциты в среде, выбранной для опыта.

Оценка результатов:

1. Рассчитать исходное количество лимфоцитов:

(1) к 0,1 мл осадка отмытых клеток добавляют 0,9 мл раствор Хенкса, суспензию тщательно перемешивают;

(2) в чистую пробирку вносят 0,38 мл 3% раствора уксусной кислоты и 0,02 мл взвеси лимфоцитов;

(3) в камере Горяева подсчитывают лимфоциты в 100 больших квадратах, полученное число умножают на 50000. Результат соответствует количеству лимфоцитов в 1 мл суспензии.

2. После отмывания приготовить рабочую концентрацию лимфоцитов, содержащую 2^{10} клеток в 1 мл. Оценить клетки под микроскопом.

Вывод:

2.2. Тема: Выделение ДНК из биологического материала фенол-хлороформным методом

Особенностью биохимических методов и методов молекулярной биологии является необходимость выделения и очистки биологического материала, в частности ДНК, с максимальной сохранностью нативной структуры.

Данная работа дает возможность познакомиться и освоить некоторые способы выделения хромосомной высокополимерной ДНК из клеток эукариот (рис.22) и внеклеточной низкомолекулярной ДНК.

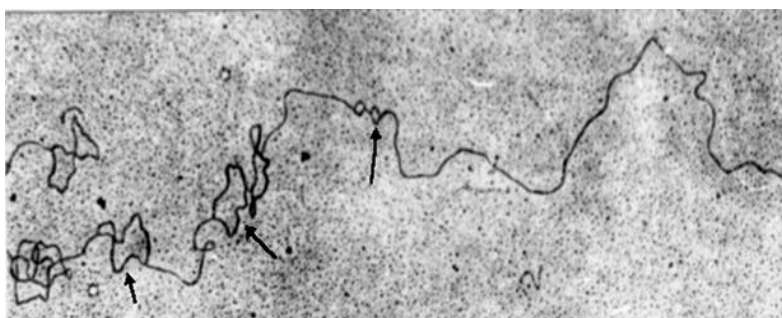


Рис. 22. Электронно-микроскопическая фотография фрагмента молекулы ДНК. Увеличение 60000 \times . Стрелки (\uparrow) - участки репликации ДНК (репликативный глазок).

Лабораторная работа 5: Выделение хромосомной ДНК из лимфоцитов

Двунитевые фрагменты ДНК, равные по длине расстоянию между двумя праймерами (темно-серый цвет), начинают накапливаться после третьего цикла (24,в). Их количество удваивается после каждого цикла до тех пор, пока почти все синтезированные фрагменты не будут соответствовать первоначальному фрагменту, ограниченному праймерами.

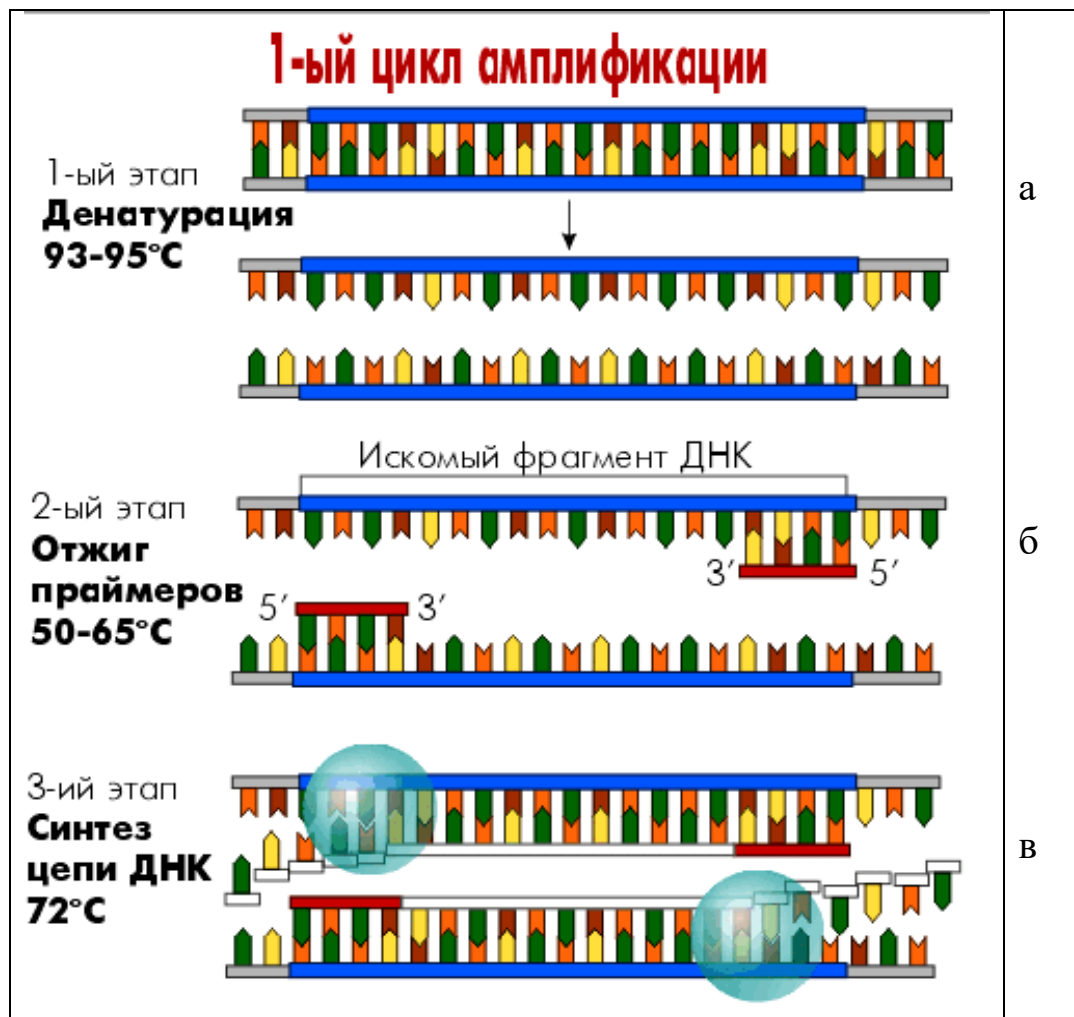


Рис.24. Схема реакции ПЦР

Далее амплифицированный фрагмент гидролизуют подходящей рестриктазой - эндонуклеазой. Полученные фрагменты разделяют гель-электрофорезом, **интересующий фрагмент** выявляют с помощью специфичного **генного зонда** (рис.25).

На рис. 25 приведены результаты применения метода в клинической практике при установлении отцовства. Карта образца ДНК, выделенной из клеток крови ребенка, четко совпадает с пробой, взятой у донора 2, а не у донора 1. Для получения такого «генетического отпечатка» достаточно очень малого количества материала, содержащего ДНК.

Первым этапом в этой работе стоит выделение ДНК из клеток (рис.25).

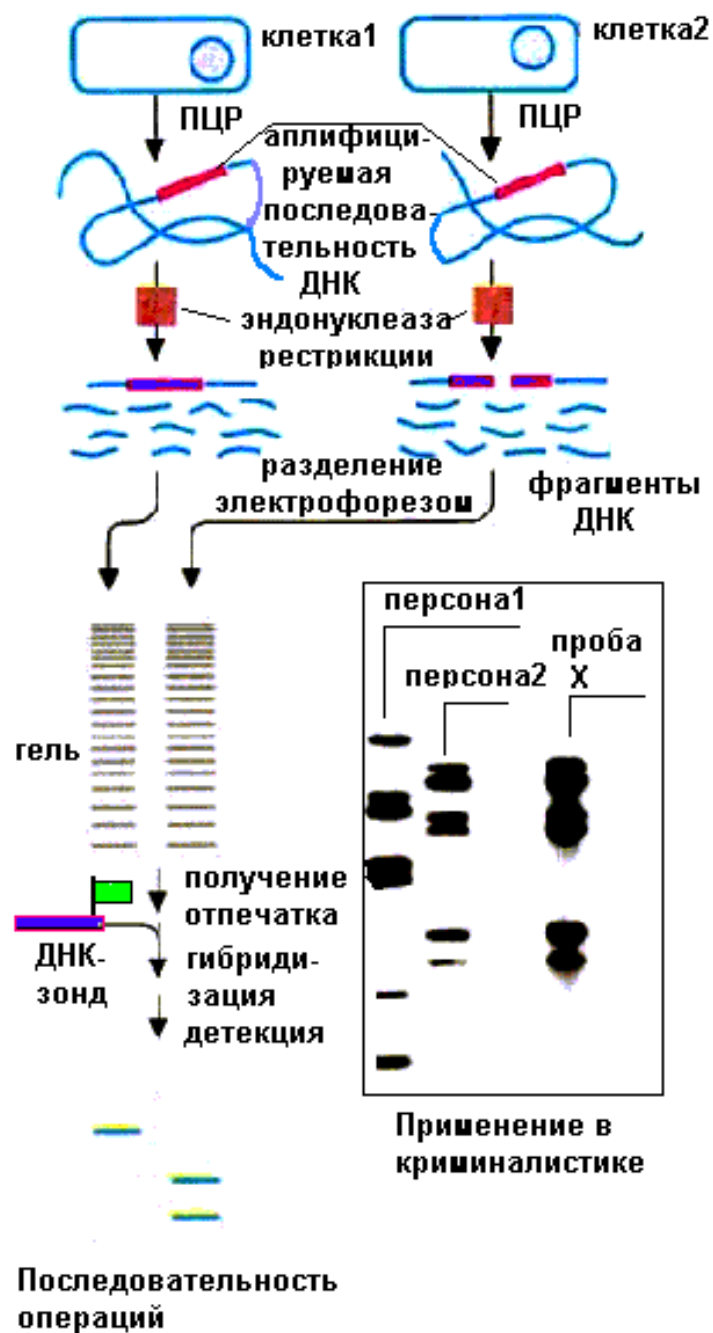


Рис. 25. Схема использования реакции ПЦР в клинической практике .

Оборудование:

Спектрофотометр СФ-26 для измерения концентрации ДНК; водяная баня (56°C); центрифуги Т23D, К24, центрифуга типа «Эппендорф»; пробирки: центрифужные полиэтиленовые; стеклянные мерные; цилиндры на 50 мл; набор автоматических пипеток.

Реактивы:

Додецилсульфат натрия (ДСН); 96% этиловый спирт; 0.5М ЭДТА- Na₂; протеиназа К или проназа;

растворы нейтрального фенола (Ф), фенол-хлороформа (Ф:Х=1:1), хлороформа с изоамиловым спиртом (24:1) (Х).

Подготовка реагентов:

1. Раствор нейтрального фенола (**Ф**). Фенол залить равным объемом «буфера 1», добавить до 0,1% 8-оксихинолина (0.1г на 100мл фенола), перемешать 0.5 ч на качалке (20⁰ С), затем выдержать 0.5 ч при +4⁰ С. После расслоения слить верхнюю водную фазу и повторить процедуру с буферами 2 и 3. После третьей обработки оставить над фенолом “шубу” из буфера 3.

500мМ трис-НСl рН 8.0/10 мМ ЭДТА/10мМ NaCl -(буфер 1);

100mМ трис-НСl рН 8.0/10 мМ ЭДТА/10мМ NaCl- (буфер 2);

50 мМ трис-НСl, рН 8.0/10 мМ ЭДТА/10мМ NaCl- (буфер 3).

2. «Лизирующий буфер I» - ЛБ I. В мерный стакан добавить компоненты по таблице:

| Компоненты | Концентрация | Запасной раствор | 50 мл |
|--|--------------|------------------|----------|
| Сахароза | 320мМ | сухая | 5,5 г |
| Тритон X-100 | 1 % | 10 % | 5,0 мл |
| Трис-ОН, рН 7,6 | 5 мМ | 1 М | 0,25 мл |
| MgCl ₂ | 5 мМ | 0,5 М | 0,5 мл |
| Добавить дистиллированной H ₂ O | | | до 50 мл |

3. «Лизирующий буфер II» - ЛБ II. В мерный стакан добавить компоненты по таблице:

| Компоненты | Концентрация | Запасной раствор | 40 мл |
|----------------------|--------------|------------------|---------|
| ЭДТА-Na ₂ | 25 мМ | 0.5 М | 2,0 мл |
| NaCl | 75 мМ | 5 М | 0,6 мл |
| H ₂ O | | | 37,4 мл |

4. Раствор ацетата натрия (3.0 М AcONa, рН 7.5): слить 1 объемом 3.0М раствора ацетата натрия и 1 объемом 2 М раствора ледяной уксусной кислоты.

Схема работы:

1. Смешать (в мерной пробирке):

препарат крови с ЭДТА-Na₂ → 1V,

буфер ЛБ I → 5V.

Выдержать 0⁰ С, 30 мин. Перенести в центрифужную пробирку, уравновесить.

2. Центрифугировать в течение 5 мин при 1500g, 4⁰ С, 5'мин; (≈ 2000 об/мин, T23D). Слить надосадочную жидкость.

3. Осадок ядер суспензировать в буфере ЛБ II в объеме, равном 1 мл и перенести в мерный «пальчик».

4. Добавить к 1 мл раствора:

- Проназу до 1мг/мл (концентрация З/Р 100мг/мл), т.е. 1/100V.

Схема расчета: 100мг/мл : 1мг/мл, т.е. разведение 100-кратное, из них 1ч р-ра проназы, а 99ч дН₂O. Сколько внести проназы на 1 мл ?

• ДСН до 1% (концентрация З/Р 10%) , т.е. 1/10 V. Сколько внести 10%-ного р-ра ДСН?

5. Выдержать при 65⁰С (водяная «баня») 5 мин.

• Добавить ацетат натрия до 0.3М (концентрация З/Р 3 М), т.е. 1/10V. Сколько внести 3 М р-ра ацетата натрия?

6. К полученному раствору прилить равный объем Ф; встряхнуть 30 с, перелить в центрифужные пробирки и центрифугировать в два этапа:

(1) 1500 об/мин, t - 20⁰С, 5 мин,

(2) 4500 об/мин, t - 20⁰С, 10мин;

8 Мягко экстрагировать поэтапно: Ф : Х и Х (ЦФ 4500 об/мин, 20⁰С, 10 мин на Т23). Ф : Х приготовить заранее из расчета - 1мл нейтрального фенола и 1 мл хлороформа. (Процедуру повторять до исчезновения промежуточной фазы). Зарисовать центрифужную пробирку со смесью ДНК до и после первого центрифугирования (рис. 26). Отобрать водную фазу, содержащую ДНК.

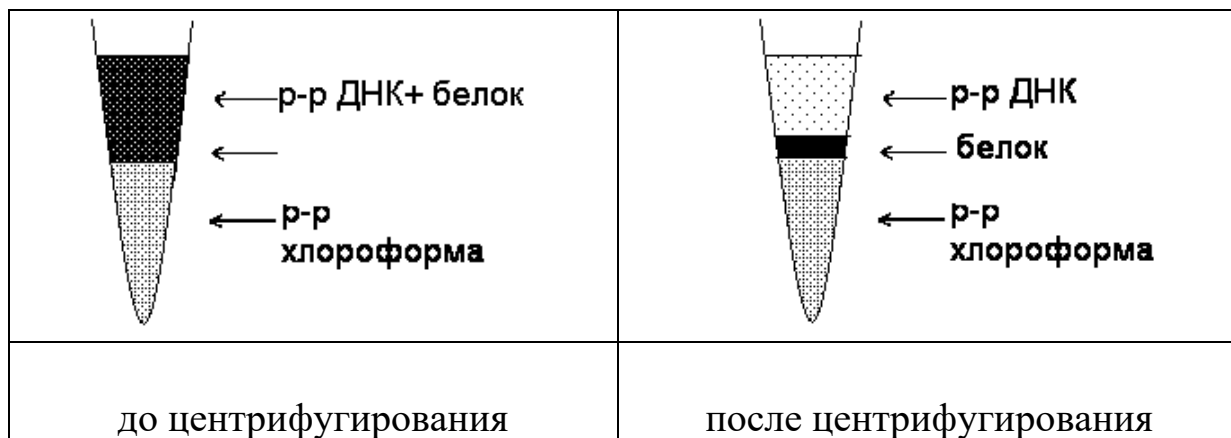


Рис. 26. Центрифужная пробирка с раствором ДНК-белок до и после центрифугирования

9. Осадить ДНК этанолом (1) или изопропанолом (2):

(1) в пробирку с раствором ДНК добавить:

AcNH₄ (10 M) => 1/4V

этанол (96%) => 2V;

(2) отобрать водную фазу в пробирку «Эппендорф» (500мкл или 1000 мкл). Добавить к раствору ДНК 0,6 V изопропилового спирта (ИП-спирта),

для этого предварительно составить пропорцию и определить требуемое количество ИП-спирта (объем водной фазы, содержащей ДНК, принять за единицу, например, 500 мкл - 1 V):

$$\begin{array}{rcl} 500 \text{ мкл (ДНК)} & - & 1 \text{ V} \\ Y \text{ мкл (ИП-спирт)} & - & 0,6 \text{ V.} \end{array}$$

После добавления с ИП-спирта выпадает хлопьевидный осадок ДНК.

10. Комочек или взвесь ДНК центрифугировать в течение 5 мин на центрифуге типа «Эппендорф» при 10000 об/мин (4°C). Полученный осадок растворить в 0,2 мл или 0,5 мл дН₂O.

Пояснения к ходу работы по пунктам:

▪п.1. ЭДТА предотвращает свертывание крови. В некоторых методах для этого используют гепарин, но он является мощным ингибитором ПЦР и благополучно проходит сквозь всю процедуру очистки.

Triton X-100 лизирует клеточную мембрану, но не разрушает ядро. На этом этапе вскрываются клетки, от лейкоцитов остаются только ядра.

▪п. 2. Идет осаждение ядер лейкоцитов.

▪п.3. Получение суспензии ядер очищенных от клеточных загрязнений.

▪п.4. Расщепление белков проназой.

▪п.6. Соль лучше добавить до фенольной экстракции, т.к. экстракция фенолом в низкосолевого буфере может привести к значительным потерям ДНК.

Оценка результатов:

1. Замерить оптическую плотность на СФ в кювете толщиной 1 мм при $\lambda_{\text{max}} = E_{260}$.

2. Определить рабочую оптическую плотность (РОП). Так как считается, что при концентрации «усредненной» ДНК в растворе, равной 1 мг в 1 мл, величина оптической плотности при длине волны 260 нм равна 22 (предполагается использование спектрофотометрической кюветы толщиной 10 мм), то полученное показание оптической плотности необходимо умножить на 10. Далее сделать пересчет, составив пропорцию:

$$\begin{array}{rcl} \text{если } 22 \text{ сп.ед.} & - & 1000 \text{ мкг/мл, то} \\ \text{РОП} & - & Y \text{ мкг/мл} \end{array}$$

3. Рассчитать концентрацию ДНК образца, т.е. найти Y.

4. ДНК осадить, добавив 0,6 V ИП-спирта (оставить для исследования полученной фракции ДНК электрофорезом).

Вывод: Сравнить полученные данные с данными по содержанию ДНК в лейкоцитах человека в норме (30-60 мкг/мл крови), если проба крови составила 5 мл.

Лабораторная работа 6: Выделение внеклеточной ДНК из плазмы крови животных

Внеклеточная ДНК (ДНК плазмы эукариот) несет важную биологическую нагрузку. Увеличение ДНК в плазме крови (фрагменты хромосомной ДНК) часто является результатом воздействия на организм внешней среды (магнитные поля, электромагнитное излучение или канцерогены и т.д.). Аутоиммунные заболевания (заболевания, связанные с нарушением иммунного статуса) также приводят к повышению в кровотоке внеклеточных нуклеиновых кислот.

Повышение нуклеиновых кислот часто связано с процессом нарушения апоптоза - программируемой клеточной гибели (механизма контроля за нормальным функционированием клеток.) В случае возникновения проблем в одной клетке, запускается механизм ликвидации этой единственной клетки. Нарушение механизма апоптоза ведет к возникновению различных заболеваний, например, торможение апоптоза ведет к возникновению опухолевых заболеваний (неконтролируемый процесс репликации ДНК и, как следствие, увеличение количества «лишних» клеток ткани). Возникновение нейродегенеративных заболеваний (рассеянный склероз, поражаются аксоны нейронов и прекращается передача сигналов) связано с увеличением скорости апоптоза. Часто эти нарушения связаны с заключительным этапом апоптоза, суть которого во фрагментировании ДНК «приговоренной» клетки и вывода ее из организма. В случае нарушения этого процесса такая ДНК и попадает в кровотоки.

Итак, низкомолекулярная фракция ДНК появляется в плазме крови при некоторых экстремальных и патологических состояниях.

Для изучения этих проблем часто необходимо выделение внеклеточной ДНК с последующим изучением ее характеристик: формы, размера и т.д. различными методами, в том числе и электрофорезом, поэтому важно уметь выделять внеклеточную ДНК и готовить препараты для электрофореза.

Оборудование:

Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 для измерения концентрации ДНК; термостат или водяная баня 56⁰С; центрифуги Т 23D, К 24, «Эпандорф»; вортекс (микрокачалка). Пробирки: полиэтиленовые (центрифужные); одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1.5 мл (типа

«Эппендорф»); пробирки мерные («пальчики»); пипеточные дозаторы переменных объемов (200мкл, 1000 мкл); наконечники для них; стеклянная посуда.

Реактивы:

Подкисленный 95%-ный раствор этилового спирта; изопропиловый спирт; физиологический раствор; 0.5М ЭДТА- Na_2 ; 0,1 М трис-ОН, (рН 8,0); 3 М ацетатный буфер (рН 5,7), 0,1%-ный раствор поливинилсульфата калия, 3%-ная суспензия бентонита, проназа (100 мг/мл); додецилсульфат натрия (0,5% ДСН); раствор хлороформа с изоамиловым спиртом (раствор X); 0,25% раствор БФС в 50 %-ном глицерине (бромфеноловый синий - краситель для электрофореза).

Подготовка реагентов:

1. «Лизирующий раствор» -ЛР для проназы (5мл):

| Конечная молярность ЛР | Молярность: | | Количества реагентов, на 5 мл РР |
|---------------------------|-------------|--------------------------|----------------------------------|
| | РР* | ЗР* | |
| 0,01 М трис-ОН | 0,02 М | 0.1 М трис, рН 8.0 | 1000 мкл |
| 0,005МЭДТА- Na_2 | 0,01 М | 0,5 М ЭДТА Na_2 | 100мкл |
| 1мг/мл проназа | 2 мг/мл | 100 мг/мл | 100 мкл |
| 0.5% ДСН | 1 % | 10% ДСН | 500 мкл |
| H_2O | | | 3300 мкл |

*РР-рабочий раствор; ЗР- запасной раствор

2. Физиологический раствор для разведения компонентов представляет собой 0.85% раствор хлорида натрия в дистиллированной воде, рН 7.2-7.4.

3. Подкисленный 95%-ный этиловый спирт (0,4 мл ледяной уксусной кислоты на 1 л этанола).

4. Хлороформ-изоамиловый спирт (X) – (24:1).

Получение плазмы крови

В качестве экстремального воздействия, индуцирующего появление в крови животных внеклеточной низкомолекулярной ДНК, можно использовать ионизирующее излучение (в диапазоне доз от 1 до 8 Гр) или сильнодействующие токсические агенты (в субтоксических дозах). Кровь у крыс следует забирать через 5 ч после воздействия. К этому сроку достигается максимальный уровень низкомолекулярной внкДНК, которая и является объектом анализа. Кровь собирается в пластиковые чашечки при покачивании. В качестве антикоагулянта используется 0,5 М ЭДТА- Na (рН 7,3), добавляемый в соотношении **кровь:ЭДТА** как **70:1**. Следует подчеркнуть нежелательное использование гепарина, который ассоциируясь с

молекулами ДНК, может исказить данные о количестве нуклеиновых кислот в крови. Для одного анализа требуется 5 мл крови. Плазму отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 810 g и 4° С в бакет-роторе. Для полного удаления форменных элементов ее подвергают еще двухкратному центрифугированию при 2200g в угловом роторе.

Вариант А

Схема работы:

1. К 1мл плазмы добавить 1 мл ЛР (в мерном «пальчике»); закрыть пробкой и встряхивать 1 мин, выдержать 5 мин при 65°С на водяной бане (раствор I).

2. К полученному раствору I добавить равный объем раствора X.

3. Мягко экстрагировать, встряхивая в вортексе или вручную (3 мин). Перенести смесь в центрифужную пробирку.

4. Центрифугировать 4500 об/мин, при температуре 20°С, в течение 10 мин. (Процедуру повторять до исчезновения промежуточной фазы, каждый раз повторяя процедуру встряхивания и центрифугирования). Зарисовать центрифужную пробирку со смесью ДНК до и после центрифугирования (см. рис. 26 на стр.49).

5. Отобрать водную фазу с раствором ДНК в пробирку «Эппендорф» и добавить 0,6 V (объема) изопропилового спирта (должен образоваться рыхлый белесый осадок).

Оценка результатов:

1. Измерить концентрацию полученного раствора ДНК.

(1). Чтобы измерить концентрацию ДНК, комочек или взвесь ДНК в спирте осадить центрифугированием в течение 5 мин, при 10000 об/мин, (4°С) на центрифуге типа «Эппендорф». Надосадочную фазу отобрать пипеткой, оставив 20 мкл, подсушить на воздухе или при 56°С в термостате. Осадок растворить в 0,2 мл д Н₂О.

(2). Замерить оптическую плотность на СФ в 1 мм кювете при длине волны 260 ($E_{260}=X$), результат умножить на 10, т.к. обычно оптическую плотность измеряют в кювете толщиной 10 мм.

(3). Определить концентрацию ДНК в полученном растворе, составив пропорцию, зная, что раствор, содержащий 1 мг ДНК в 1мл, характеризуется оптической плотностью равной 22 при длине волны 260 нм ($E_{260}=22$).

2. Приготовить образцы ДНК для электрофореза. Для этого в пробирку «Эппендорф» внести:

ДНК (1мг/мл) – 10 мкл
0,25% р-р БФС в 50 %-ном глицерине – 1 мкл.

Вывод:

Вариант Б

Схема работы:

1. К отмеренному объему плазмы при комнатной температуре добавить ингибиторы нуклеаз и детергенты из расчета - на 10 мл плазмы добавить:

10 мкл - 0,1 %-ного р-ра поливинилсульфата К
10 мкл - 3%-ной суспензии бентонита
1 мл - 10%-ного р-ра ДСН
330 мкл - 3 М Na-ацетатного буфера (рН 5,7).

2. Перемешать и добавить 10 мкл водонасыщенного фенола. Пробирку поместить в ротационную качалку(вортекс) и в течение 10 мин покачивать в «мягком» режиме.

3. Добавить 1 мл хлороформа и процедуру покачивания повторить.

Внимание! Чтобы избежать поломки нитей ДНК, следует придерживаться

щадящего режима и избегать резких встряхиваний.

4. Экстракт нуклеиновых кислот отобрать пипеткой с широким носиком и ЦФ 15 мин при 12000g и 4°C. Верхнюю (водную) фазу отделить и к ней добавить 80%-ный фенол (из расчета 0,5 объема фенола на 1 объем плазмы). Смесь покачивать 10 мин, ЦФ в течение 10 мин при 12000g и 4°C. (*Внимание!* Процедуру депротенинизации повторить дважды.).

5. Нуклеиновые кислоты осадить двойным объемом охлажденного (-20°C) и подкисленного 95%-ного этанола (ночь).

6.Осадок уплотнить ЦФ в течении 15 мин при 12000g и 4°C, промыть (1-5)мл охлажденного этанола и перенести в полиалломерные пробирки для ультрацентрифугирования. Выдержать 1 ч при -20°C.

7. ЦФ при 50000 об/мин (роторе SW65 Ti) в течение 30 мин в ультрацентрифуге L8/80 (фимы «Векман»).

8. Надосадочную жидкость (этанол) слить. Осадок подсушить 5 мин в вакуумном шкафу. Нуклеиновые кислоты растворить в деинизованной воде, учитывая исходный объем плазмы крови (на осадок ДНК из 1 мл плазмы-2 мкл воды). Раствор хранить при -70°C.

Оценка результатов.

Для характеристики нуклеиновых кислот с помощью электрофореза применяют агарозные и полиакриламидные гели. Первые обеспечивают разделение фрагментов нуклеиновых кислот до 20000 п.н., вторые - более низкомолекулярных - от 1000 п.н. до единичных).

Ход оценки:

1. Приготовить 0,85%-ный и 1,5%-ный агарозные гели. Растворить навеску агарозы NA ("Pharmacia", Швеция) в буфере, содержащем 0,04 М трис, 0,01М ЭДТА-Na, 0,05М ацетата -Na (pH7,7), автоклавировать 5 мин и охладить до 50°C.

2. Залить пластины геля 70× 100 ×3 мм.

3. Препарат ДНК (2 мкл) смешать с красителем в соотношении 5:1, содержащем 0,25% бромфеноловый синий и 50% (вес-объем) сахарозы в электрофоретическом буфере.

4. Внести препараты в лунки геля под электрофоретический буфер, эппендорфовой пипеткой. *Внимание!* Количество ДНК должно составлять не менее 2 нг на лунку.

5. Электрофорез вести 2-3 ч (в зависимости от концентрации геля) при напряжении 80В и силе тока 50 мА. Для окрашивания гель погрузить в раствор бромистого этидия (5мкг/мл) на 15 мин.

•Этот фенантроновый краситель несет положительный заряд и способен внедряться в двунитевые участки ДНК между плоскостями пар оснований.

6. Фракции ДНК выявляют по флюоресценции в УФ -свете при длине волны 306 нм. Для определения длины фрагментов используют маркеры, например, λДНК обработанная Hind III.

Вывод:

Лабораторная работа 7: Выделение плазмидной ДНК из бактерий

У бактерий генетическая информация заключена в одной большой молекуле ДНК – хромосоме бактерии. В бактериальной клетке имеются, еще и небольшие кольцевые ДНК. Эти молекулы ДНК, называют плазмидами. Количество плазмидной ДНК в клетке составляет не более нескольких процентов от клеточного генома, а число плазмид колеблется от 1 до 38. Плазмиды — это, как правило, ковалентно замкнутые молекулы ДНК, содержащие от 1500 до 40 000 пар нуклеотидов.

Плазмиды можно амплифицировать, т.е. увеличивать их количество в бактерии. Плазмиды можно извлечь из одной клетки и перенести в другую для изучения процесса передачи генетической информации. Процесс получения бактерий, несущих «нужный» ген, включает в себя несколько стадий: разрезание ДНК человека, включение фрагментов ДНК человека в плазмиды, введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки, отбор среди клонов трансформированных бактерий тех, которые несут нужный человеческий ген. Такие работы проводятся, например, на *Escherichia coli* (кишечной палочке), безвредной бактерии (рис.27), обитающей в желудочно-кишечном тракте человека.

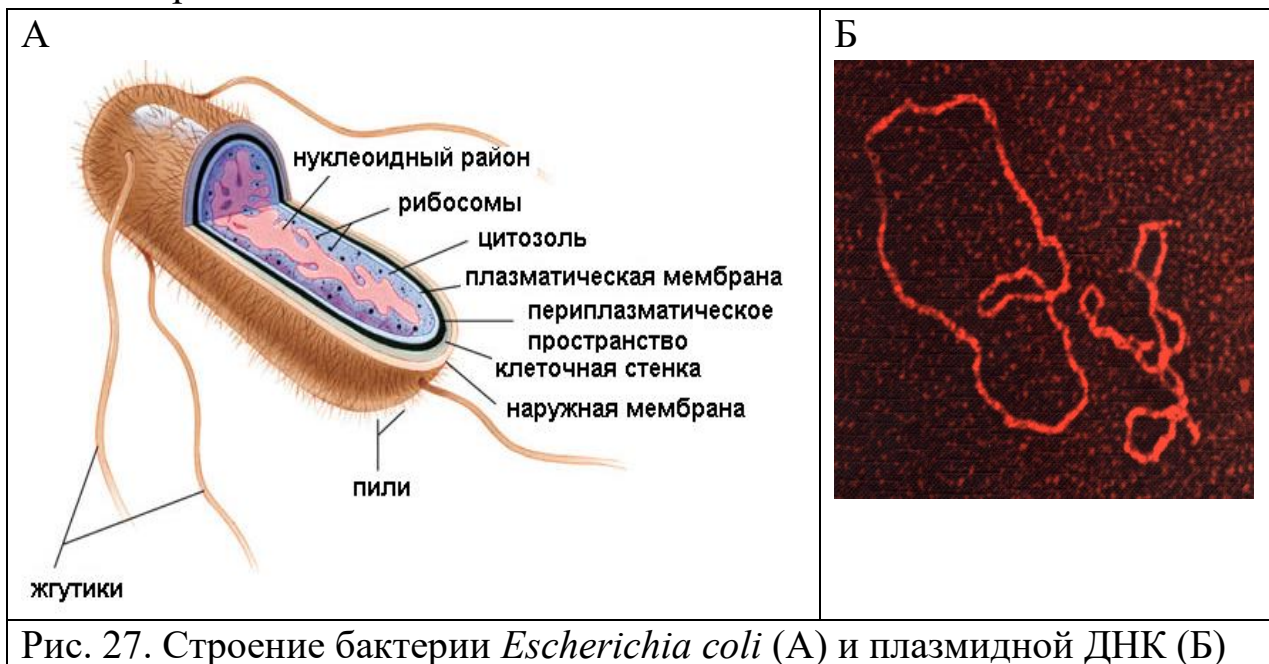


Рис. 27. Строение бактерии *Escherichia coli* (А) и плазмидной ДНК (Б)

Плазмиды используют как субстрат для изучения каталитических свойств нуклеаз. Плазмидная ДНК (рис.27,А) в нативном состоянии имеет структуру кольца, свернутого в «жгут», а под действием нуклеаз меняет свою конформацию, которую можно регистрировать или электрофорезом или методом электронной микроскопии (рис.28).

По скорости изменения структуры плазмидной ДНК: суперскрученная → кольцевая → линейная судят и о ферментативной активности и о специфичности нуклеазы ко вторичной структуре ДНК. При этом необходимо иметь плазмидную ДНК с высокой степенью очистки.

Большинство методов выделения и очистки плазмидной ДНК включают три основных этапа: 1) рост бактерий и амплификацию плазмиды, 2) сбор бактерий и их лизис, 3) выделение и очистку плазмидной ДНК. В этих методах, так или иначе, используется два основных различия между хромосомной ДНК бактерии (*E. coli*) и плазмидной ДНК: хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид; основная масса ДНК *E. coli* выделяется

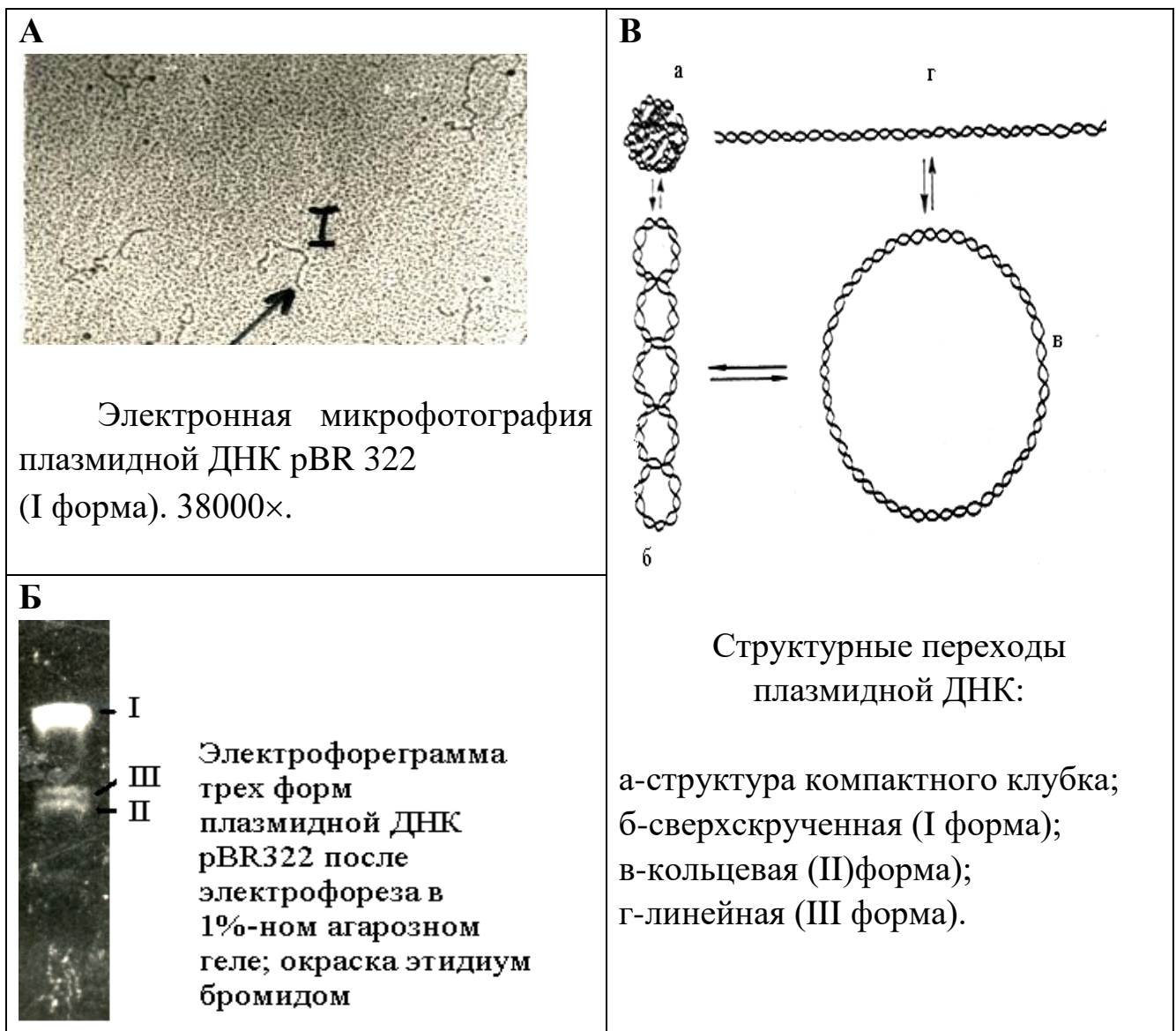


Рис. 28. Формы молекул плазмидной ДНК.

из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул. Поэтому большинство методов очистки включают осаждение бактериальной ДНК, при котором из препарата удаляются преимущественно длинные цепи ДНК *E. coli*, случайно захваченные обломками лизированных клеток.

Нативная плазмидная ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, цепи которой нельзя отделить друг от друга в условиях, при которых происходит разрыв большинства водородных связей в молекулах бактериальной ДНК, например, при нагревании или при обработке щелочью. Учитывая эти различия, первый пассаж *E. coli* проводят в среде LB, доращиваем до насыщения (ночная культура), затем с утра проводим второй пассаж (100 мл среды М 9). Через $\approx 4,5$ ч, когда культура достигала поздней

логарифмической фазы ($D_{600} = 0,6$), ею засеивается основной объем (1л) среды М 9. Через $\approx 2,5$ ч плотность культуры обычно достигает $D_{600} = 0,4-0,5$. (*Важно!* Концентрация клеток не должна быть выше $4,8-5,0 \times 10^8$ клеток, так как снижается эффективность амплификации в присутствии хлорамфеникола). Следует обратить внимание на один момент второго этапа очистки ДНК. При лизисе бактерий ДСН следует быстро перемешивать суспензию бактерий при добавлении лизоцима и ацетата калия, но достаточно осторожно, чтобы не повредить освобождающуюся бактериальную ДНК, обломки которой могут загрязнять препараты плазмидной ДНК. Таким образом, описанный методический прием позволяет освободиться от основной массы бактериальной ДНК и РНК.

Оборудование:

Центрифуги типа К-70, К -23; качалка; термостат, водяная баня; весы для уравнивания; колбы: на 1л, 20 мл, 50 мл; центрифужные стеклянные стаканы, стеклянные палочки; автоматические пипетки, наконечники к ним; колонка с сефарозой CL-2В в ТЕ-буфере.

Реактивы и растворы:

Бактериальная культура *Escherichia coli* / Hb 101-pBR 322; р-ры фенола (Ф), хлороформа с изоамиловым спиртом (Х).

Таблица 1. Среда LB (Livic-Bertani)

| Состав: | на 1 л | Довести объем дистиллированной H ₂ O до 1 л |
|--|--------|--|
| Бакто-триптон | 10 г | |
| Бакто-дрожжевой экстракт | 5 г | |
| NaCl | 10 г | |
| <i>Довести pH до 7,5 с помощью NaOH</i> | | |
| <i>Автоклавировать при 0,5 АТ 30 мин</i> | | |

Таблица 2. Среда М 9

| Состав: | на 1 л | Довести объем дистиллированной H ₂ O до 1 л |
|--|----------------|--|
| Na ₂ HPO ₄ (б/в) (×12 H ₂ O) | 6,0 г (15,0 г) | |
| KH ₂ PO ₄ , б/в | 3,0 г | |
| NaCl | 0,5 г | |
| NH ₄ Cl | 1,0г | |
| <i>Довести pH до 7,4 с помощью NaOH</i> | | |
| <i>Среду автоклавировать при 0,5АТ 25 мин, охладить и добавить в нее:</i> | | |
| Глюкоза | 4,0 г (20 %) | |
| Гидролизат казеина | 5,0 г | |
| <i>Автоклавировать при 0,5 АТ 25 мин и добавить в нее, отдельно стерилизованные:</i> | | |
| MgCl ₂ (1 М) | 10 мл | |
| CaCl ₂ (0,1 М) | 1 мл | |

| Таблица 3. ТЭС I-буфер, рН 8,0 | | | | | |
|--|-----------------------|----------------|---------|----------|----------------------|
| Состав: | Исходная концентрация | Количество на: | | | Рабочая концентрация |
| | | 1 л | 0,5 л | 0,25 л | |
| Tris-HCl | 1,0 М | 60 мл | 30 мл | 15 мл | 60 мМ |
| Na ₂ ЭДТА | 0,2 М | 50 мл | 25 мл | 12,5 мл | 10 мМ |
| NaCl | 2,0 М | 12,5 мл | 6,25мл | 3,125 мл | 25 мМ |
| Таблица 4. ТЭ-буфер-глюкоза, рН 8,0 | | | | | |
| Состав: | Исходная концентрация | Количество на: | | | Рабочая концентрация |
| | | 1 л | 0,5 л | 0,25 л | |
| Глюкоза | | 9 г | 4,5 г | 2,25 г | 0,05 М |
| Tris-HCl | 1,0 М | 25 мл | 12,5 мл | 6,25 мл | 0,025 М |
| Na ₂ ЭДТА | 0,2 М | 50 мл | 25 мл | 12,5 мл | 0,01 М |
| Таблица 5. ТЭС II-буфер, рН 8,0 | | | | | |
| Состав: | Исходная концентрация | Количество на: | | | Рабочая концентрация |
| | | 1 л | 0,5 л | 0,25 л | |
| Tris-HCl | 1,0 М | 30 мл | 15 мл | 7,5 мл | 30 мМ |
| Na ₂ ЭДТА | 0,2 М | 25 мл | 12,5 мл | 6,25 мл | 50 мМ |
| NaCl | 2,0 М | 25 мл | 12,5 мл | 6,25 мл | 50 мМ |

Ледяная уксусная кислота (ЛУК); 10%-ный раствор NaOH; 20%-ный раствор ДСН; 3М раствор ацетата натрия; хлорамфеникол; 40%-ный раствор глюкозы; 5М хлористый литий, РНКазы А (10 мг/мл); хлористый цезий (1 г на пробу), дН₂О.

Вариант А.

Ход работы:

Амплификация.

1. Засеять 1 колонию в 5 мл среды LB (оставить на ночь, 37⁰С).
2. В 3 колбы (по 750 мл) разлить по 150 мл среды LB, внести по 1 мл ночной культуры клеток. Добавить антибиотик (ампициллин из расчета 50 мг/мл или тетрациклин- 200 мг/мл).
3. Подрастить культуру на качалке до оптической плотности раствора $\lambda_{600} \approx 1,0$.
4. Добавить в колбу 10 мг хлорамфеникола (предварительно растворенный в этаноле) и 200 мкл 40%-ного раствора глюкозы.
 - Глюкоза добавляется для улучшения среды обитания бактерий после хлорамфеникола.
5. Инкубировать ночь на качалке.
 - Пункты 1-5 делает дежурный студент.

Выделение ДНК с использованием щелочи. (Далее с каждой колбой работает группа из 3-4 студентов).

6. ЦФ при 8000 об/мин , 10 мин.

7. Растворить осадок бактерий в 10 мл дН₂О.

8. Добавить 20 мл 1%-ного ДСН в 0,2 н NaOH (готовится в день лизиса), осторожно перемешать. Выдержать 20 мин, при комнатной температуре.

| | | |
|--------------|-------------------|-----------|
| Раствор ДСН: | 10%-ный р-р NaOH | - 0,4мл |
| | 20%-ный р-р ДСН | - 1,0 мл |
| | дН ₂ О | - 18,6 мл |

9. Добавить 15 мл 3М ацетата натрия (рН 5,0), перемешать, инкубировать в холодильнике (+4°C) 1 ч. ЦФ 12000 об/мин, 15 мин.

10. Супернатант перелить, добавить к нему 80 мл этанола, перемешать, инкубировать 30 мин при 20°C. ЦФ 12000 об/мин, 10 мин.

11. Растворить осадок в 1 мл дН₂О, разлить в 1,5мл пробирки по 0,5мл.

12. Добавить 5 М хлористый литий (LiCl) в пропорции 1:1. Перемешать, инкубировать 10 мин при 70°C. ЦФ 12000 об/мин 10 мин.

- LiCl селективно осаждает РНК, удаляется большая часть РНК в препарате.

13. К супернатанту добавить 2 V этанола, перемешать. ЦФ 12000 об/мин 10 мин.

14. Растворить в 800мкл дН₂О.

15. Добавить 10 мкл РНКазы А (10 мг/мл).

Очистка ДНК на колонке.

16. Добавить к раствору ДНК 1 г хлористого цезия (CsCl), растворить.

17. Инкубировать 1ч или ночь(+4°C). ЦФ 12000 об/мин, 10 мин.

18. К супернатанту добавить краску для нанесения на форе́з и нанести на колонку с CL-2В в ТЕ буфере .

- Колонку можно сделать из стеклянной пипетки на 10 мл.

19. Собирать фракции по 0,5-1 мл.

- Метод удобен для выделения низкокопийных плазмид. Не нужна ультрацентрифуга;

- Из 450 мл среды можно выделить до 0,1 мг низкокопийной плазмиды.

Оценка результатов:

1. Для проверки качества очистки провести электрофорез в 1%-ой агарозе.

Вывод.

Вариант Б.

Ход работы:

1. Отдельную колонию, выросшую в присутствии ампициллина (50 мкг/мл), зацепить микробиологической петлей и засеять в 20 мл среды LB (табл.1). Оставить на ночь при 37°С без качалки.

- Пункт 1 делает дежурный студент.

2. 1 мл ночной культуры добавить к 100 мл среды М 9 (табл. 2). Выдержать на качалке ≈ 4 ч при 37°С пока поглощение среды не станет при $\lambda_{600} \approx 0,5$.

- Если концентрация клеток будет выше, идет снижение эффективности амплификации.

3. 100 мл выросшей культуры перенести в 1 л среды М 9, инкубировать при 37°С при встряхивании, пока поглощение раствора при λ_{600} не достигнет 0,4-0,6 ($\approx 2,5$ ч).

4. Добавить 5 мл хлорамфеникола (34 мг/мл в 100% этаноле) до конечной концентрации 170 мкг/ мл. Инкубировать 16 ч (37°С) при постоянном покачивании. (На этом этапе идет амплификация плазмид).

- Пункты: 2,3,4 –делает дежурный студент.

5. Разлить культуру в 4 центрифужных стакана на 300 мл, уравновесить. Собрать клетки центрифугированием при 3000об/мин (4°С) в течение 20 мин (К-70). *Примечание.* Делает дежурный студент. Далее материал раздают 4 группам студентов.

6. Осадок клеток растворить в 50 мл ТЭС I-буфера, содержащего 25 % сахарозы (табл.3). Клетки, осадить центрифугированием при 5000 об/мин (4°С) в течение 20 мин (К-24).

7. Осадок клеток растворить в 7 мл ТЭ-буфера, содержащего 50 мМ глюкозы (табл. 4), и добавить 1 мл свежее-приготовленного лизоцима (16 мг/мл в ТЭ-буфер-глюкоза). Конечная концентрация лизоцима 2 мг/мл. (*Для эффективной работы лизоцима рН раствора должен быть не ниже 8,0!*). Перенести в центрифужный стаканчик на 100 мл. Выдержать 10 мин при 20°С (стакан с культурой уравновесить со вторым стаканом, заполненным водой).

- Лизоцим разжижает клеточную стенку, детергент разрушает внутреннюю стенку.

8. К этому раствору добавить 16 мл (готовится в день лизиса) 1%-ного ДСН в 0,2 н NaOH. осторожно перемешать. Выдержать 10 мин, при 0°С.

| | | | |
|--------------|-------------------|---|---------|
| Раствор ДСН: | 10%-ный р-р NaOH | - | 0,4мл |
| | 20%-ный р-р ДСН | - | 1,0 мл |
| | дН ₂ О | - | 18,6 мл |

- Идет отделение белка.

9. Добавить 12 мл охлажденного в ледяной бане 5 М ацетата калия, рН 4,8 (АК). Закрыв пробирку пробкой перемешать содержимое (несколько раз резко перевернув пробирку), образуется творожистая масса. Выдержать ночь при 0°C. Центрифугировать при 15000 об/мин (К-24) в течение 1 ч при 0°C.

| | | |
|-------------------------------|---|---------|
| Раствор ацетата калия: 5 М АК | - | 60,0 мл |
| ЛУК | - | 11,5 мл |
| дН ₂ О | - | 28,5 мл |

- Бактериальная ДНК и обломки клеток образуют на дне пробирок плотный осадок.

10. Надосадочную жидкость ($\approx 30 - 40$ мл) осторожно отобрать, добавить 2V охлажденного этанола. Оставить на 1 ч при -20°C .

11. Вязкое содержимое перенести в центрифужные пробирки объемом 30 мл, уравновесить и центрифугировать при 5000 об/мин (4°C) в течение 30 мин (К-24).

12. Надосадочную жидкость слить, осадок растворить в 2 мл ТЭС II-буфера (табл.5) (2 мин).

13.Экстракция: к 2 мл раствора ДНК добавить 2 мл смеси фенол-хлороформ (1:1). Закрывать пробирку пробкой и встряхивать 5мин. Центрифугировать при 5000 об/мин (К-24) в течение 5 мин (4°C). Зарисовать центрифужную пробирку со смесью ДНК до и после центрифугирования (см. рис. 26);

- Фенол разделяет ДНК и белки, хлороформ – полисахариды.

14. Водную фазу перенести в стеклянную центрифужную пробирку (≈ 2 мл), добавить 2 V охлажденного этанола. Хорошо перемешать. Оставить на 30 мин (или на ночь) при -20°C .

15. Нуклеиновые кислоты осадить центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин (К-24).

16.Осадок растворить в 2 мл ТЭС-буфера, рН 8,0, добавить 2 V 5 М ацетата аммония. Выдержать 20 мин при 4°C . Центрифугировать в течение 20 мин, 5000 об/мин (4°C);

- Осаждается высокомолекулярная РНК.

17. К осадку нуклеиновых кислот добавить 1 мл ТЭС II-буфера.

Оценка результата:

1.Определить концентрацию ДНК по поглощению раствора при $\lambda 260$.

2.К раствору ДНК добавить 0,6 V изопропанола.

Вывод.

2.3. Тема: Выделение индивидуальных белков

Все методы разделения смесей белков основаны на том, что разделяемые компоненты в результате каких-либо манипуляций оказываются в разных участках системы и могут быть механически отделены друг от друга. Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, так как на первых этапах очистки фракции содержат множество примесей, на каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют **фракционированием**. На каждой стадии разделения белок находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

1.Осаждение. Для осаждения необходимо понизить каким-либо способом растворимость белка (рис.29).

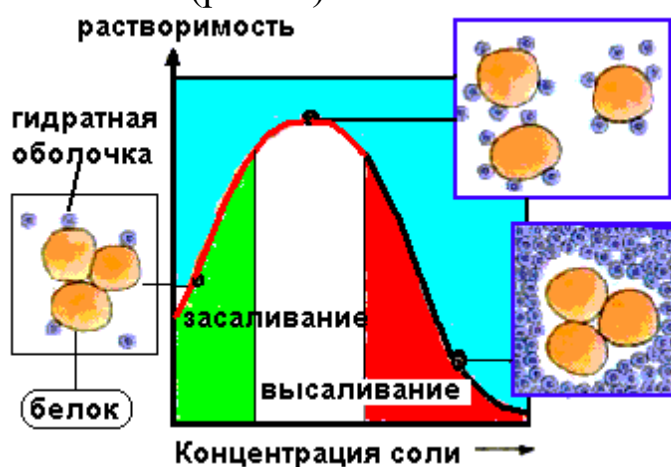


Рис. 29. Схема высаливания белков.

Растворимость белка зависит от их способности к гидратации. У глобулярных водорастворимых белков высокий уровень гидратации обеспечивается расположением гидрофильных групп на поверхности. В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются плохо, но их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы (концентрации соли в среде). При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов (рис. 29, гидратная оболочка) связываются с поверхностью белка и, тем самым, уменьшается степень его агрегации (**засаливание**). При высокой ионной силе молекулы белков лишаются гидратирующих оболочек, что приводит к агрегации и выпадению в осадок (**высаливание**). Используя различие в растворимости, можно с помощью обычных солей, например, сульфата аммония, разделить, т.е. фракционировать смесь белков.

Принцип этого метода основан на том, что при повышении концентрации соли в растворе происходит сжатие ионных атмосфер, образуемых противоионами белка, что способствует сближению их до

критического расстояния, на котором межмолекулярные силы Ван-дер-Ваальсова притяжения перевешивают кулоновские силы отталкивания. Это приводит к слипанию белковых частиц и их выпадению в осадок.

2. Изоэлектрическое осаждение. Заряд белков обусловлен в первую очередь остатками аспартата и глутамата («-» заряд) и остатками лизина и аргинина («+» заряд). По мере повышения рН заряд белков проходит от положительных к отрицательным значениям и в изоэлектрической точке оказывается равен нулю. (Изоэлектрическая точка -это рН, при котором суммарный заряд белка равен нулю). В результате белок лишается своей ионной атмосферы, и его частицы слипаются, выпадая в осадок.

3. Центрифугирование. Выпавший осадок белка можно выделить фильтрованием. Для этого часто пользуются центрифугами. Частицы осажденного вещества под действием центробежной силы оседают на дне центрифужных стаканов (пробирок) и сжимаются в плотный осадок, с которого оставшийся раствор (надосадочная жидкость, или супернатант) легко сливается или отсасывается. Скоростные центрифуги (ультрацентрифуги) создают центробежное ускорение порядка 10^5g (т.е. 10^5 ускорений свободного падения), что позволяет осаждать даже некоторые крупные надмолекулярные агрегаты-вирусы.

4. Ситовой эффект. Молекулярные сита представляют собой материалы с очень маленькими порами определенного размера. Следует отметить особенности этих «сит»: крупные частицы не остаются на поверхности материала сита, а обтекают его частички (гранулы), тогда как мелкие вещества примесей диффундируют в частицы сита и задерживаются. Материалом для молекулярных сит может служить сефадекс (полисахарид декстран, у которого после соответствующей обработки цепи оказываются сшитыми трехуглеродными мостиками)

В перечисленных методах в конечной смеси остаются низкомолекулярные вещества – органические растворители, соли и кислоты. Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют диализ. Диализ основан на применении мембран проницаемых для воды и низкомолекулярных веществ и непроницаемых для белков (**полупроницаемые мембраны**). Чаще всего используют пленки из целлофана (нитрат целлюлозы). Подлежащий диализу раствор белка помещают в мешок из целлофана и погружают последний в сосуд с водой (рис. 30). Непрерывный ток воды через сосуд приводит к полному переходу в него всех проходящих через целлофан веществ, а белки остаются внутри. После многократной замены внешнего раствора в будет тот же, что и в окружающем растворе.

сосуде состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина рН.).

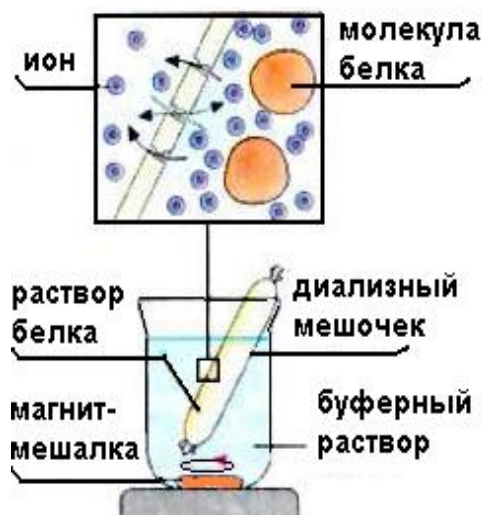


Рис. 30. Схема диализа.

Лабораторная работа 8: Выделение белков из мышечной ткани

Миофибриллы мышечной клетки содержат сократительные белки (миозин и актин) и регуляторные белки (тропомиозин и тропонин). Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. Многие белки саркоплазмы (гиалоплазмы мышечных клеток) растворимы в воде или в солевых растворах низкой концентрации (0,05 моль/л). При экстракции мышечной ткани 5% раствором хлорида калия извлекаются как миофибриллярные, так и саркоплазматические белки.

Оборудование:

Ступка фарфоровая с пестиком; воронка; стакан стеклянный с носиком на 1 л; фильтры бумажные; колба; центрифуга К23.

Реактивы: навеска мышечной ткани; 5%-ный раствор хлорида калия (KCl); 10%-ный раствор NaOH; 1%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Ход работы:

1. Взвесить 2 г мышечной ткани. Поместить в фарфоровую ступку, добавить 2 мл 5%-ного раствора KCl и растереть песком до гомогенного состояния.

2. К гомогенату добавить 3 мл раствора KCl и растирать 5 мин, затем прибавить еще 5 мл 5%-ного раствора KCl. Растирать 5 мин.

3. Полученный гомогенат профильтровать через два слоя марли или центрифугировать в течение 15 мин при 4000 об/мин.

4. С фильтратом проделать биуретовую реакцию: вставить воронку с фильтратом в пробирку и добавить 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди.

Оценка результата:

Кратко запишите результаты проделанных реакций.

Вывод.

Лабораторная работа 9: Реакции осаждения белков

Информация относительно биологической активности нативной конформации полипептидной цепи закодирована в аминокислотной последовательности. Вторичные, третичные и четвертичные структуры многих белков образуются в растворе самопроизвольно в пределах нескольких минут. Свертывание полипептидной цепи в нативную конформацию (рис. 31) и существование белковой молекулы наиболее успешно происходит в физиологических условиях. Потеря нативной конформации (**денатурация**) наступает при экстремальных значениях pH, высокой температуре, под действием высоких концентраций солей, органических растворителей и других денатурирующих веществ. Эти особенности используются и для очистки белков.

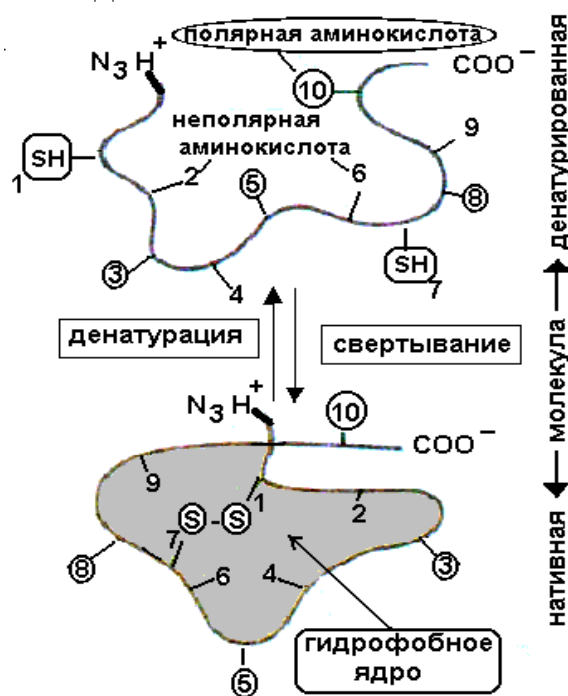


Рис. 31. Схема денатурации белка.

Задание 1. Обратимое осаждение

Принцип метода. Белки в растворе и соответственно в организме

сохраняются в нативном состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная оболочка вокруг нее (см. рис. 29). Удаление этих факторов приводит к склеиванию молекул белков и выпадению их в осадок. **Осаждение белков может быть обратимым и необратимым** в зависимости от реактивов и условий реакции. На практике реакции осаждения используют для выделения альбуминовой и глобулиновой фракций белков плазмы крови, количественной характеристики их устойчивости в плазме, обнаружения белков в биологических жидкостях и освобождения от них с целью получения гомогенного белкового раствора. Из глобулиновой фракции впоследствии выделяют антитела к различным антигенам. Под действием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) этих факторов белки вновь переходят в растворимое состояние и приобретают свои нативные свойства. Одним из видов обратимого осаждения белков является **высаливание**. Насыщенным раствором сульфата аммония осаждается альбуминовая фракция белков, полунасыщенным раствором - глобулиновая фракция.

Работа 1. Выделение яичного альбумина высаливанием

Оборудование:

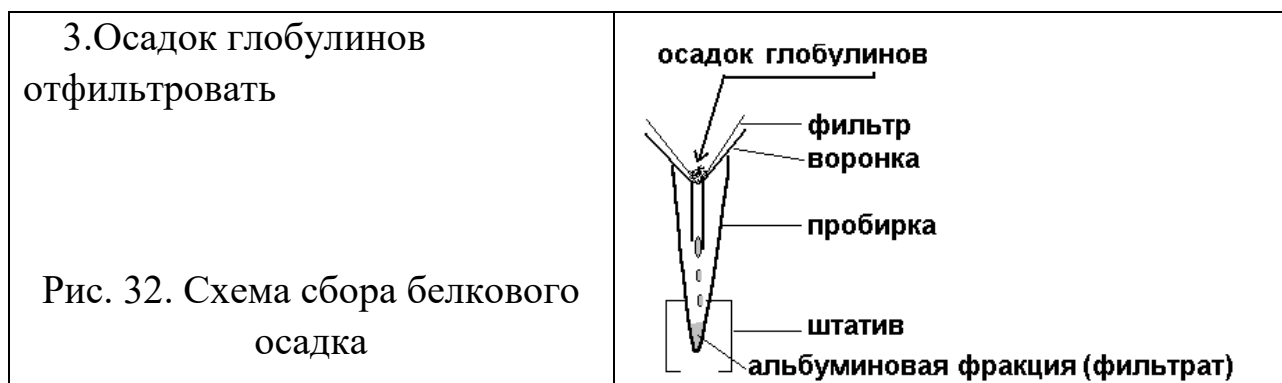
Фильтровальная бумага; воронки; штативы с мерными пробирками; автоматические пипетки, наконечники.

Реактивы:

Неразведенный яичный белок; сульфат аммония в порошке; насыщенный раствор сульфата аммония (7,67 г до 10 мл); NaOH (10%-ный раствор); CuSO_4 (1%-ный раствор); дистиллированная вода.

Ход работы:

1. В пробирку налить 30 капель не разведенного яичного белка.
 2. Добавить 30 капель насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешать.
Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония.
- При этом глобулиновая фракция осаждается, а альбуминовая остается в растворе.



4.К фильтрату добавлять порошок сульфата аммония до тех пор, пока не прекратится растворение соли. Должен выпасть осадок – это альбумины. Сущность реакции заключается в дегидратации молекул белка.

Работа 2. Выделение яичного альбумина при понижении ионной силы

При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Ход работы:

1. Осторожно иглой проделать отверстие в скорлупе яйца с двух сторон и вылить белок в стакан на 500 мл, затем добавить 250 мл дН₂О и содержимое перемешать стеклянной палочкой с резиновым наконечником.

2. Раствор перенести в мерный цилиндр и объем довести дН₂О до 300 мл. Раствор оставить на 30 мин при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

•*Примечание:* Пункты 1 и 2, выполняет дежурный студент, приготовленную суспензию использует каждый студент.

3. 20мл суспензии профильтровать через складчатый фильтр.

4. Наличие белка на фильтре проверить биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром вставить в чистую пробирку и на фильтр налить 1 мл 10% раствора NaOH и 1 каплю 1% раствора сульфата меди.

Появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание. Для пептидной (амидной) группы характерна лактам-лактимная таутомерия: В щелочной среде преобладающая лактимная (енольная) форма полипептида взаимодействует с медью с образованием стабильного окрашенного комплекса.

Оценка результатов:

Кратко записать результаты реакций.

Вывод.

Работа 3. Фракционное осаждение белков плазмы крови

Фибриноген выпадает в осадок при 33% насыщении плазмы сернокислым аммонием, глобулины - при полунасыщении, а альбумины - при полном насыщении.

Ход работы:

1. К 2 мл плазмы крови добавить 5 мл дН₂O, 3,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония, перемешать. В осадок выпадает фибриноген (можно наблюдать лишь незначительное помутнение), который отделяется фильтрованием (фильтрат №1).

2. К 4 мл фильтрата №1 добавить 4 мл насыщенного раствора сульфата аммония и перемешать. В осадок выпадают глобулины, которые отделяют фильтрованием. Получают осадок глобулинов, с которым проводят биуретовую реакцию, и фильтрат №2.

3. К фильтрату №2 добавляют при постоянном перемешивании стеклянной палочкой кристаллический сульфат аммония до насыщения (пока соль не перестанет растворяться). Выпадают в осадок альбумины, наличие которых проверяют биуретовой реакцией: 1 мл смеси переносят в чистую пробирку, добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди.

Оценка результатов:

Выписать результаты фракционного разделения белков плазмы в таблицу:

| Название белка | Степень насыщения (NH ₄) ₂ SO ₄ | Характер осадка | Результаты биуретовой реакции |
|----------------|---|-----------------|-------------------------------|
| Фибриноген | | | |
| Глобулин | | | |
| Альбумин | | | |

Выводы.

Задание 2. Необратимое осаждение белков

Необратимое осаждение белков связано с глубокими нарушениями структуры белков (вторичной и третичной) и потерей ими нативных свойств. Такие изменения белков можно вызвать кипячением, действием

концентрированных растворов минеральных и органических кислот, солями тяжелых металлов.

Осаждение при кипячении. Белки являются термолабильными соединениями и при нагревании свыше 50-60°C денатурируются (рис. 29). **Сущность тепловой денатурации** заключается в разрушении гидратной оболочки, разрыве стабилизирующих белковую глобулу связей и разворачивании белковой молекулы (рис. 29). Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке (когда заряд молекулы равен нулю), поскольку частицы белка при этом наименее устойчивы. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки с основными свойствами - в слабощелочной. В сильнокислых или сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, т.к. его частицы перезаряжаются и несут в первом случае положительный, а во втором - отрицательный заряд, что повышает их устойчивость в растворе.

Оборудование:

Штативы с мерными пробирками; автоматические пипетки; наконечники.

Реактивы:

Яичный белок, 1%-ный и 10% -ный растворы уксусной кислоты, 10%-ный раствор NaOH.

Ход работы:

В 5 пронумерованных пробирок налить по 10 капель раствора яичного белка. (*Внимание!* Все пробирки при нагревании закрывать ретортами).

1.Затем I пробирку нагреть до кипячения. Раствор мутнеет, но т.к. частицы денатурированного белка несут заряд, они в осадок не выпадают. Это связано с тем, что яичный белок имеет кислые свойства (его изоэлектрическая точка- 4,8) и в нейтральной среде заряжен отрицательно;

2.Во II пробирку добавить 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты и нагреть до кипячения. Белок выпадает в осадок, т.к. его раствор приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд (один из факторов устойчивости белка в растворе);

3.В III пробирку добавить 1 каплю 10% раствора уксусной кислоты и нагреть до кипения. Осадка не образуется, т.к. в сильнокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе);

4. К раствору белка в IV пробирке добавить 1 каплю 10% раствора уксусной кислоты, 1 каплю насыщенного хлорида натрия и нагреть. Выпадает осадок вследствие адсорбции ионов электролита (образование двойного электрического слоя) и нейтрализация заряда на частицах белка.

5. В V пробирку налить 1 каплю раствора NaOH, нагреть до кипения. Осадок не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд белка увеличивается

Оценка результатов:

Внести в таблицу характер изменений в растворах.

| № | Среда | Наблюдаемые изменения | Выводы |
|-----|---|-----------------------|--------|
| I | Нейтральная | | |
| II | Слабокислая (1% CH ₃ COOH) | | |
| III | Кислая (10% CH ₃ COOH) | | |
| IV | Кислая (10% CH ₃ COOH + электролит NaCl) | | |
| V | Щелочная (10% NaOH) | | |

Вывод: о влиянии структуры белка на его свойства, используемые при очистке.

3. МЕТОДЫ АНАЛИЗА БИОПОЛИМЕРОВ

3.1. Тема: Хроматография белков и нуклеиновых кислот

Для этого метода предложено несколько названий: гель-проникающая хроматография, молекулярно-ситовая, но наиболее распространен термин «гель-фильтрация». **В основе метода лежит фракционирование молекул по их размерам.**

Разделение производят в хроматографических колонках (рис.33).

Колонка (рис. 33) для хроматографии в простейшем варианте - это стеклянная трубка (1), с оттянутым нижним концом, на который надет шланг (2). На дно колонки помещают фильтр из фильтровальной бумаги (5). Сверху колонка закрывается стеклянной или резиновой пробкой (6) с трубкой (7), через которую поступает элюирующий раствор (8). Сверху над фильтром оставляют защитный слой жидкости «шуба» (10)

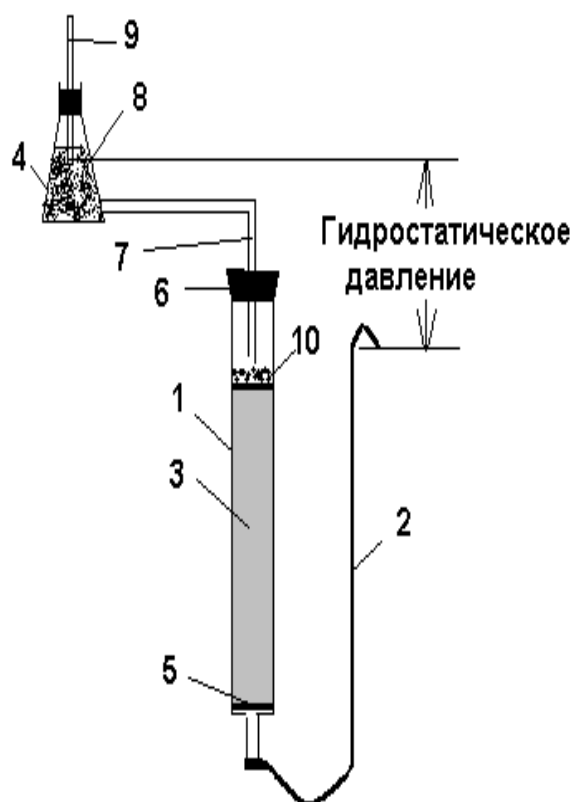
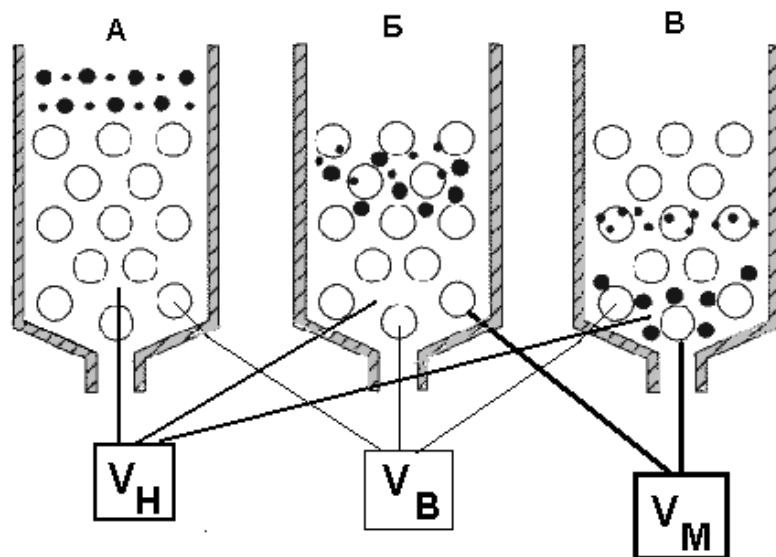


Рис. 33. Хроматографическая колонка.

Основной принцип хроматографического разделения. Процесс разделения веществ на колонке, заполненной набухшим сорбентом (гранулами сефадекса), схематически представлен на рис. 34, для большей наглядности изображены молекулы лишь двух типов (крупные и мелкие черные точки) и гранулы геля (кружки). На рис. 34, А показан вид колонки с гелем непосредственно после нанесения на нее смеси. При промывании колонки растворителем начинается движение веществ. Если размер гранул геля не препятствует диффузии небольших молекул, они проникают в гранулы геля, на какое-то время задерживаются там, тогда как более крупные молекулы, будучи не в состоянии диффундировать внутрь гранул, движутся только в окружающем их слое растворителя (подвижная фаза - внешний объем колонки) (рис. 34, Б).



$$V_O = V_H + V_B + V_M, \text{ где}$$

- V_M – объем, занимаемый гранулами сорбента,
- V_B – внутренний объем (объем растворителя внутри гранул),
- V_H – свободный объем (объем растворителя вне гранул),
- V_O – объем колонки

Рис. 34. Разделение веществ на колонке с сефадексом

В результате, при продолжающейся подаче растворителя зона крупных молекул (хроматографическая зона) перемещается по колонке с большей скоростью, чем хроматографическая зона мелких молекул (рис. 34,В), движение которых постоянно тормозится диффузией в неподвижную фазу (жидкость внутри гранул геля). Для молекул промежуточных размеров доступна только часть объёма пор неподвижной фазы, поэтому зона таких молекул будет мигрировать быстрее, чем мелкие, но медленнее, чем крупные.

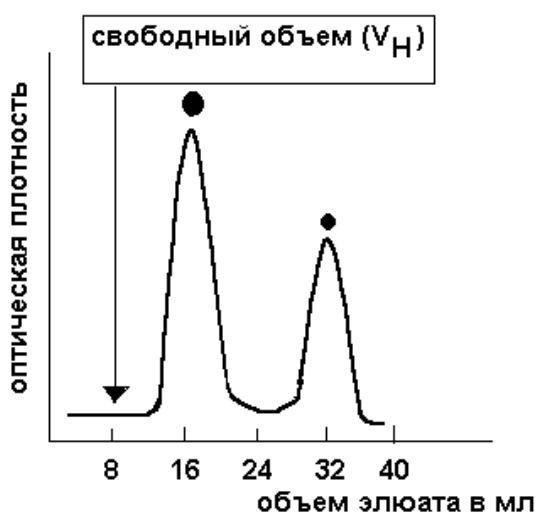


Рис. 35. График элюции белков с различной молекулярной массой.

В конечном итоге компоненты смеси элюируются с колонки, наполненной сефадексом, в порядке уменьшения их молекулярной массы, т.е. в соответствии со степенью торможения, вызванной их диффузией в гранулы геля. На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций (рис. 35).

Основные параметры хроматографической колонки. Колонка (рис. 34), наполненная набухшим сорбентом, имеет два вида объёмов: «внутренний» и «наружный». Внутренним объёмом или объёмом неподвижной фазы называют объём растворителя внутри гранул (V_B). Наружный объём или свободный объём колонки - это объём растворителя вне гранул (V_H). Следовательно, объём колонки (V_O) равен $V_B + V_H + V_M$, где V_M —объём занимаемый гранулами сорбента. При пропускании растворенного вещества белок выходит в элюате после того, как выйдет объём, равный V_H , а низкомолекулярные компоненты после того, как выйдет $V_H + V_B$. Наружный объём рассчитывается из уравнения:

$$V_H = V_O - [a \times (1 + M) / d], \text{ где}$$

a - сухая масса, M - степень набухания сорбента (табл. данные), d - плотность раствора.

Коэффициент распределения (K_R) растворенного вещества между внутренним и наружным объёмом зависит, в основном, от размеров растворенного вещества и определяется из уравнения:

$$K_R = (V_E - V_H) / V_B, \text{ где}$$

V_E - элюиционный объём, равный объёму элюанта, вышедшему с колонки за время от нанесения белка на колонку до выхода его с колонки (если наносится маленький объём) или до половины высоты поднимающейся части пика элюции (если наносится большой объём образца).

Чем выше молекулярная масса белка, тем ниже его элюиционный объём, поэтому сначала выходят белки с большей молекулярной массой, затем с более низкой (рис. 35) и т.д.

Матрицы для гель-фильтрации. Важнейшее значение при работе методом гель-фильтрации имеет правильный выбор марки **сефадекса**. Сефадексы отличаются различной степенью сшивки молекул декстрана друг с другом. Это находит выражение в различной *набухаемости* гранул сефадекса и *пределах эксклюзии* (см.табл.) (выражаемой значениями молекулярной массы вещества, еще способных входить внутрь гранул сефадекса, в связи с чем и построена их классификация.

Номер в маркировке сефадекса характеризует его пористость, т.е. означает количество воды в мл, которое связывает 10 г сухого геля. Для всех типов сефадексов указываются области фракционирования макромолекул. Например, сефадекс G-100 (область фракционирования 4-150 тыс.) - меньшая

цифра, соответствует молекулам, для которых доступен весь объём гранул, большая - молекулам, не проникающим в гранулы.

| Марка сефадекса | Предел эксклюзии (мол.масса) | Поглощение воды (в мл/10г) | Уд.объем в колонке (в см ³ /г) | Время полного набухания при t 20 ⁰ С (в ч) | Диапазон фракционирования белков по мол.массе (в тыс.) |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|---|---|--|
| G-25 | 5000 | 25 | 4- 6 | 3 | 1,0 - 5,0 |
| G-50 | 10000 | 50 | 9-11 | 3 | 1,5 - 30,0 |
| G-75 | 50000 | 75 | 12-15 | 24 | 3,0 - 75,0 |
| G-100 | 100000 | 100 | 15-20 | 48 | 4,0 -150,0 |
| G-200 | 200000 | 200 | 30-40 | 72 | 5,0 -600,0 |

Верхнюю границу называют «пределом исключения» молекул из гранул. Во влажном виде сефадексы стерилизуются при нейтральном рН и при 110⁰С. В сухом – 120⁰С. Важно хорошо «отмучивать», т.е. удалять мелкие и разрушенные частицы» сефадекса перед работой.

Сефакрилы - это матрица на основе декстрана и N,N'-метиленабисакриламида. В ней сочетаются качества сефадексов и ПААГ - нити декстрана и полимерные нити метиленабисакриламида химически связаны друг с другом. Получается жесткий гель, пористость которого легко контролируется. Он гидрофилен, химически инертен; его можно автоклавировать при 120⁰С, благодаря его жесткости гельфильтрацию можно вести при относительно бо'льших скоростях по сравнению с сефадексом. Рабочий диапазон рН – 2-11. Сефакрилы поставляются в виде суспензии набухших гранул с размером 40-105 мкм. Сефакрилы используют для очистки плазмид, рибосом и, даже, ДНК (сефакрилы S-500 и S-1000. Пористость S-1000 соответствует, примерно, пористости 0,5%-ной агарозы, а S - 400-как у 5%-ной агарозы.

Сефароза – матрица на основе агарозы. Существует три типа матриц на основе агарозы, различающихся по размеру пор. Размер пор в гранулах зависит от процентного содержания агарозы в гелях (6В - 6%, 4В - 4%, 2В - 2%). Поставляется в виде суспензий, подсушивание которых не допускается. Автоклавирование исключено! Матрицы на основе геля агарозы, химически «сшитого» дибромпропанолом обозначаются как сефароза CL-4В. Колонку с таким гелем можно регенерировать 2М щелочью, гель можно автоклавировать (Франция). В Америке этот тип матриц выходит под названием «Bio-Gel А», в Швеции - Ультрогели серии А- ультрогель А2, А4, А6 соответствует матрицам сефарозы.

Биогели серии Р. Это сферические матрицы на основе полиакриламидного геля под общим торговым наименованием «Bio-Gel R». Пористость геля определяется концентрацией акриламида. Биогели серии R поставляются в сухом виде. Матрицы этого типа имеют некоторые преимущества перед сефадексом. Во-первых, более низкое содержание карбоксильных групп, что позволяет вести обессоливание макромолекул в более разбавленных буферах. Во-вторых, – наличие более узкого диапазона размеров гранул для аналитического фракционирования. Недостаток - биогели химически нестойки и элюант через них течет медленнее, чем из колонки с соответствующим сефадексом.

Лабораторная работа 10: Подбор оптимальных условий фракционирования белков при гель-фильтрации

Выбор матрицы. Выбор диктуется характером задачи, свойствами разделяемых молекул (размером). На степень разрешения влияет тип материала, т.е. интервал эффективного фракционирования, для которого предназначен данный материал. Если предполагается, что белки не имеют необычно низкой (<1500) или высокой ($>10^5$) молекулярной массы, то для фракционирования могут подойти либо сефакрилы S-200 (для белков с мол.массой 5-250 тыс.Да) и S-300 (10-1500 тыс.Да). Для белков небольших размеров – сефадекс G-75. Для крупных белков лучше применять агарозные гели: сефароза 4В, CL-4В, ультрагели А4, А6. Для обессоливания используют жесткие, с крупными гранулами сорбенты (сефадексы G- 25 или G -50).

Размер колонки. Выбор длины колонки определяется объемом препарата. При обессоливании, смене буфера объем препарата может составлять 20-25 % полного объема колонки (V_0). Отношение высоты колонки к её диаметру может быть 10:1. При хроматографическом фракционировании молекул объем препарата должен составлять 1-3 % общего объема колонки, т.к. разрешающая способность колонки пропорциональна корню квадратному из её длины, то соотношение **L:d** колонки может достигать 100:1. В повседневной практике гель-хроматографию проводят в колонках, длина которых превышает диаметр в 20-40 раз. Таким образом, по объему препарата можно выбрать объем колонки, а затем её длину и диаметр.

Скорость элюции. Для обессоливания и рассортировки скорость может быть до 20 мл/см²×ч. Для достижения наилучшего разрешения пиков существует понятие **оптимальная скорость фракционирования (v_{opt})**. v_{opt} зависит от размеров молекул и гранул, увеличиваясь при уменьшении тех и

других. Для белков оптимальная скорость составляет, примерно, $2 \text{ мл/см}^2 \times \text{ч}$. Для определения **объемной скорости элюции** ($v_{\text{об}}$) надо умножить $v_{\text{опт}}$ на площадь сечения колонки (S). Например, для колонки с диаметром (d) 2 см, узнаем площадь $S = \pi r^2 = 3,14 \times 1 \text{ см}^2 = 3,14 \text{ см}^2$, то $v_{\text{об}} = v_{\text{опт}} \times S = 2 \text{ мл/см}^2 \times 3,14 \text{ см}^2 \approx 6 \text{ мл/ч}$. Как правило, рабочая скорость элюции превышает оптимальную в 5-6 раз, соответственно увеличивается и объемная скорость элюции.

Практические рекомендации: размеры колонки должны в 30-100 раз превышать объем образца. Исходная концентрация белка в идеале должна составлять 10-20 мг/мл, самое большее – 30 мг/мл. Т.о. 100 мг белка следует растворять в объеме не меньшем, чем 3,0 мл, лучше в 5-6 мл, поэтому можно использовать колонку объемом 90-300 мл (в среднем 250 мл). Длина колонки должна в 20-40 раз превышать ее диаметр, поэтому для данного количества белка потребуется колонка 75 см высотой, если ее диаметр - 2,5 см.

Ход пересчета следующий:

$$V = \pi r^2 \times h \rightarrow 250 \text{ мл} = 3,14 \times r^2 \times 40r = 3,14 \times r^3 \times 40, \text{ отсюда}$$
$$r^3 = 250 / (3,14 \times 40), \text{ следовательно, } r = \sqrt[3]{250 / (3,14 \times 40)} = 1,25 \text{ см, тогда}$$
$$d = r \times 2 = 1,2 \times 2 = 2,5 \text{ см, } h = d \times 30 = 75 \text{ см.}$$

Идеальные размеры колонки можно определить и по формуле: $d = \sqrt[3]{m/10}$ см, где m -количество белка в мг, тогда длина колонки равна $30d$.

Оборудование:

Колонки стеклянные (20×1см; 10×1см), стеклянные палочки, фильтровальная бумага, ножницы, воронка с пробкой. Штативы для пробирок, 10 мерных и 10 не мерных пробирок, пипетки.

Реактивы:

Бычий сывороточный альбумин – 3 мг/мл, цитохром c – 3мг/мл; Сефадекс G-100; G-25 или G- 50; Трис - буфер 0,01М, рН 7,2.

Подготовка сорбента. Сефадексы и биогели поставляются в сухом виде. Для приготовления сорбента необходимое количество порошка высыпать тонкой струйкой в стакан с жидкостью, перемешивая стеклянной палочкой (нельзя приливать жидкость к порошку, т.к. могут образовываться комки). Время набухания даётся в таблице (см. стр. 78).

Задание 1. Набивка колонки

Операция набивки проводится тщательно, т.к. это важно для разрешения пиков.

(1) Необходимо проверить - нет ли одностороннего нагрева колонки.

(2) Подготовить сорбент, т.к. разрешение пиков зависит от однородности гранул сорбента. Удаление мелких частиц идет в процессе «отмучивания». Для этого разведённую в буфере суспензию сорбента переносят в цилиндр, заливают 5-6 объёмами буфера.

(3) Дают сорбенту осесть до образования чёткой границы «сорбент - мутный слой» (отсюда термин «отмучивание»). Как правило, образуется три фазы: сорбент - мутный слой – буфер. Процедуру повторяют до исчезновения мутного слоя, пока не сформируются две фазы: сорбент - буфер. Затем дать осадку уплотниться.

(4) Измерить высоту осадка, слить надосадочную жидкость до уровня $\frac{1}{2}$ высоты осадка. Кашица такой консистенции наиболее удобна для заливки в колонку. В идеальном случае колонку заполняют подготовленным сорбентом за один прием (рис. 36, а).

Ход набивки колонки:

1. Измерить рабочий объём колонки с помощью цилиндра (сделать риску на колонке). Записать объём.

2. Колонку закрепить в штативе.

3. Влить буфер на высоту слоя, равную диаметру колонки. Поместить на дно фильтр (рис.36).

4. В гнездо шлифа (верх колонки) вставить воронку (мерную), объёмом равным 1,5 объёмам рабочей части колонки.

5. Кашицу сорбента осторожно взбалтывают, переносят в воронку, из нее кашица должна стекать в колонку по каплям.

6. Сливной носик колонки должен быть открыт (рис. 36, а)

7. Когда весь сорбент окажется в колонке на него поместить сверху фильтр.

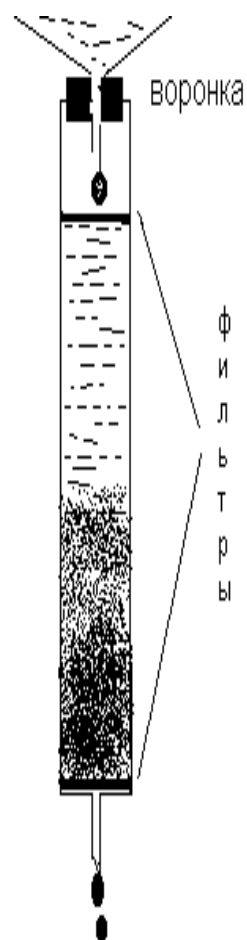


Рис. 36, а. Процесс заполнения колонки к работе.

8. Сделать защитную петлю (рис. 36,б).

(Если раствор в колбе будет израсходован, то после того, как жидкость опустится до уровня А, жидкость из колонки перестанет вытекать)

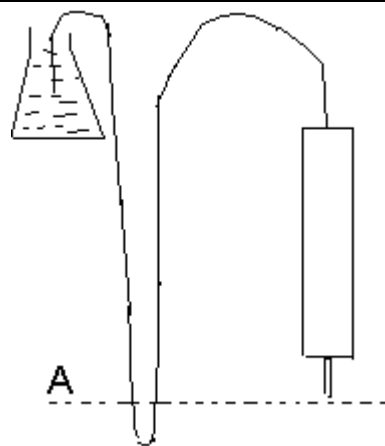


Рис. 36,б. Устройство защитной петли

9. Буфер следует прокачивать через колонку до тех пор, пока уровень сорбента не опустится до стационарного положения (риска– пункт 1).

Задание 2. Определение нулевого объёма

Исходная концентрация декстрана голубого - 0,2%, бычьего сывороточного альбумина - 3мг/мл, цитохрома с- 3мг/мл.

1. Рассчитать объем образца, который должен составлять 1-2 % от общего объема колонки (V_0).

2. Чтобы определить V_0 необходимо измерить высоту и диаметр колонки и определить объем колонки по формуле: $V_0 = S \times h$ и определить объем наносимого образца (мл).

3. Для проверки качества набивки и определения V_H пропустить через колонку высокомолекулярный белок декстран голубой.

Ход проверки:

Исходный препарат вносят в буфере, в котором уравновешена колонка. Растворённый препарат должен быть освобожден от осадка.

1. Слой жидкости над фильтром удалить, но не дать высохнуть фильтру.

2. Сливную трубку пережать.

3. Нанести раствор белка пипеткой с широким носиком. Держать наконечник на расстоянии 1мл от центра поверхности фильтра.

4. Дать препарату войти в гель, открыв слив из колонки.

5. Вновь перекрыть колонку, внести буфер, объём которого равен объёму препарата. Открыть слив колонки, дать буферу войти в гель.

6. Перекрыть колонку, нанести слой буфера на высоту 1-2 см (защитный слой-«шуба») и подключить сосуд с элюирующим буфером. (Вставить пробку с иглой через которую подается буфер для элюции).

• *Внимание!* При хроматографии декстрана голубого обратить внимание на искривления, перекосы и негладкие границы окрашенной зоны. В частности, искривление зоны, когда её края отстают от средней части, может быть результатом слишком жидкой суспензии при заливке, в результате гранулы располагаются не однородно, более крупные гранулы оказываются в середине колонки. Перекос – результат не вертикально расположенной колонки. Неровные границы - результат наличия крупных неоднородностей в набивке колонки, загрязнений, пузырей или неровный фильтр.

7. Собирать элюат в мерный цилиндр от момента вхождения декстрана голубого в гель до его появления (ориентир голубой цвет раствора) в цилиндре. Это наружный объем - V_n . Именно при выходе такого объема следует ожидать выход исследуемого белка, т.е. входящего в гранулы геля.

Задание 3. Определение разрешающей способности хроматографической колонки

Обычно после проведенного эксперимента следует провести анализ качества хроматографирования. Например, если после хроматографии смеси белков получено несколько пиков, из которых одни располагаются вблизи друг от друга (рис. 37, 1 - двухвершинный пик), а другие располагаются на достаточном расстоянии (рис. 37, 2 - одновершинный пик) необходимо скорректировать параметры хроматографического процесса и вспомнить о таком параметре как величина разрешения. **Разрешение (R_s)** - это отношение расстояния между вершинами двух пиков [ΔX] в см на ленте самописца (или мл) к ширине второго пика у его основания [ΔY],

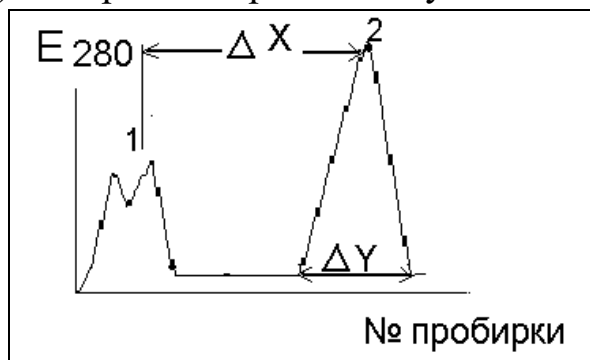


Рис. 37. График элюции белков, где ΔX — расстояние между первым двухвершинным (1) и вторым (2) пиками, ΔY — ширина основания второго пика (в см).

т. е. $R_s = \Delta X / \Delta Y$. Минимальное разрешение, при котором зоны считаются разделенными, равно единице ($R_s=1$), если $R_s > 1$, то можно увеличить скорость элюции, или можно изменить параметры колонки и при той же скорости элюции добиться хорошего разрешения. Например, R_s получилось

1,5. Чтобы изменить высоту колонки следует знать, что разрешение (R_s) пропорционально корню квадратному длин колонок (L_1 и L_2). Если надо перейти от колонки длиной L_1 (1 м) к колонке длиной равной L_2 (X м), то составляем пропорцию:

$$\sqrt{L_2} / \sqrt{L_1} = R_{s2} / R_{s1}, \text{ отсюда } L_2 / L_1 = R_{s2}^2 / R_{s1}^2, \text{ следовательно,}$$

$$L_2 = L_1 \times (R_{s2}^2 / R_{s1}^2).$$

Если $R_{s1} = 1,5$, а нас удовлетворяет минимальное разрешение $R_{s2} = 1$, то в этом случае подставляем числовые данные и получаем:

$$L_2 = L_1 \times (R_{s2}^2 / R_{s1}^2) = 1\text{ м} \times (1^2 / 1,5^2) = 1\text{ м} \times (1 / 2,25) = 1\text{ м} \times 0,45 = 0,45\text{ м}$$

или 45 см, т.е. длину колонки можно сократить вдвое: с 1 м до 45 см.

Ход работы:

1. Установить колонку с сорбентом в штатив. По высоте сорбента и диаметру колонки определить объем колонки занятый сорбентом.

2. На колонку, заполненную сефадексом G-100 и уравновешенную трис-буфером нанести рассчитанный объем смеси белков.

3. Провести хроматографию белков.

4. Собирать фракции по объему (по 3 мл в пробирку) или определить время сбора одной фракции (3 мл) и далее собирать по времени.

5. Замерить поглощение растворов при длине волны $\lambda 280$

6. Построить график (рис. 38), отложив по горизонтали номер пробирки, а по вертикали - величину оптической плотности при длине волны $\lambda 280$ нм.

Оценка результатов

Оценить R_s для данных условий фракционирования, построив график элюции (см. рис.37), если $R_s >$ или < 1 , оптимизировать условия фракционирования для минимальной степени разрешения, т.е. $R_s=1$.

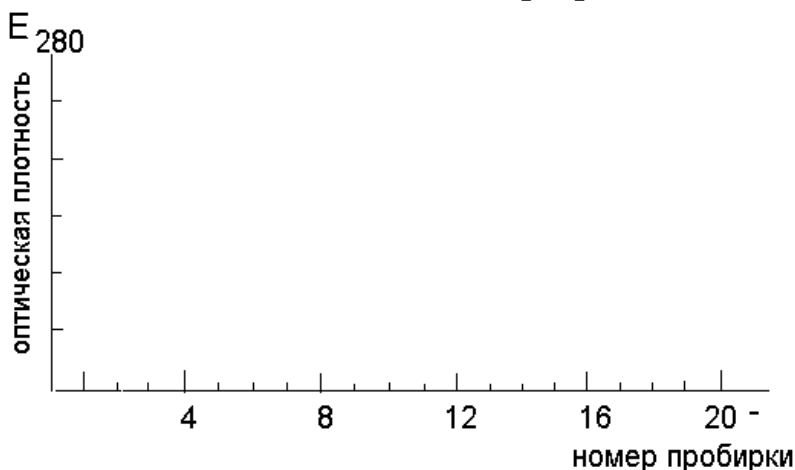


Рис. 38. Параметры графика элюции.

Вывод:

Лабораторная работа 11: Обессоливание и смена буфера в ходе очистки белков

Часто содержание белка в растворе бывает низким, для повышения его концентрации белки осаждают высаливанием. Для этого к раствору белка добавляют сульфат аммония порошком до 80% насыщения. (58,6 г на 100 мл белкового раствора). Образовавшийся осадок собирают центрифугированием и растворяют в меньшем объеме dH_2O . Однако при этом в растворе остаются примеси низкомолекулярных солей. Смену буфера в растворе и удаление этих солей можно осуществить гель-фильтрацией. При обессоливании и смене буфера объем препарата может составлять 20-25 % полного объема колонки (V_0). Минимальное отношение высоты колонки к её диаметру может быть 10:1.

Оборудование:

Стеклянная колонка; аналитические весы; центрифуга T23D; весы для уравнивания; штативы с пробирками; чашка Петри; пипетки и наконечники.

Реактивы:

Порошок сульфата аммония, раствор белка; сефадекс G-50 (средний); трис-буфер 0,01 М, рН-7,5; 10%-ный раствор хлористого бария.

Ход работы:

1. Определить концентрацию белка в изучаемом образце до высаливания, по оптической плотности.
2. К 10 мл раствора добавить порошком сульфат аммония до 80% насыщения (из расчета 5,8 г на 10 мл белкового раствора).
3. Образовавшийся осадок осадить центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге T23D.
4. Осадок растворить в 1 мл dH_2O .
5. На колонку 20×1 см, заполненную сефадексом, нанести 1 мл раствора белка. Элюировать со скоростью 0,5 мл/мин.
6. Собирать фракции по 0,5 мл.
7. Определить в них наличие сульфата аммония.

На чашку Петри нанести по 1 капле растворов из каждой пробирки и капнуть по одной капле хлористого бария. Появление мути (образуется нерастворимый осадок сульфата бария) указывает на наличие ионов сульфата.

Оценка результатов:

1. Определить объем раствора белка в пробирках без сульфата аммония.
2. Объединить фракции, измерить объем и определить концентрацию белка по оптической плотности.
3. Сравнить с исходной концентрацией белка.
 - В результате происходит смена среды: сначала раствор находился в растворе сульфата аммония, а после пропускания через колонку – в Трис-буфере.

Вывод:

Лабораторная работа 12: Определение молекулярной массы белка гель-фильтрацией через сефадекс

Принцип метода: элюионный объём белка (V_E) (см. табл. стр. 78) является практически линейной функцией логарифма его молекулярной массы. Пропуская через колонку с сефадексом G-75 или G 100 исследуемый раствор белка и определив V_E , можно по калибровочной кривой найти значение молекулярной массы данного белка.

Оборудование:

Система для хроматографии, включающая самописец, спектрофотометр; штативы с пробирками; колонка для хроматографии 45x1 см.

Реактивы:

Маркёры: бычий сывороточный альбумин (БСА) – м.м. 6800 Да, $IgM = 4,833$; яичный альбумин (ЯА) – м.м. 43000 Да, $IgM = 4,633$; цитохром с (ЦС) – м.м. 12400 Да, $IgM = 4,093$; лизоцим (Л) – м.м. 13930 Да, $IgM = 4,144$; белок X с неизвестной молекулярной массой; сефадекс G-100; 0,01M трис - буфер, pH 7,5.

Ход работы:

1. Определить V_E для БСА, ЯА и ЦС. Для этого:
 - 1.1. На колонку нанести 0,5 мл БСА, сразу начинать сбор вышедшей жидкости в одну пробирку, собирать до тех пор (наблюдая по самописцу) пока величина пика не достигнет максимума – это V_E БСА; Замерить V_E .
 - 1.2. После выхода 1-го белкового пика, нанести на колонку ЯА – замерить V_E (не забывать передвигать ленту самописца в начальную точку).
 - 1.3. После выхода второго пика нанести ЦС. Замерить V_E .
2. Пропустить через колонку 0,5 мл раствора белка с неизвестной молекулярной массой. Замерить V_E .

3. Построить логарифмический график, отложив по оси ординат значение логарифмов мол. массы - БСА, ЯА, цитохрома С. По оси абсцисс отложить полученные элюционные объемы, или пройденные белками пути в (см).

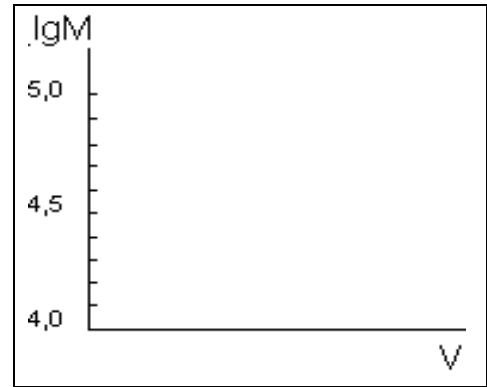


Рис. 39. График зависимости логарифма молекулярной массы белков от их элюционного объема.

Оценка результатов:

1. Построить график, отложив $V_{\text{Э}}$ X - раствора;
2. Определить $\lg M$ и по $\lg M$ определить молекулярную массу X-белка.

Вывод:

Лабораторная работа 13: Гель-фильтрация нуклеиновых кислот. Разделение ДНК и РНК на сефарозе 4В.

На рис. 40 представлен пример хроматографического разделения плазмидной ДНК и РНК:

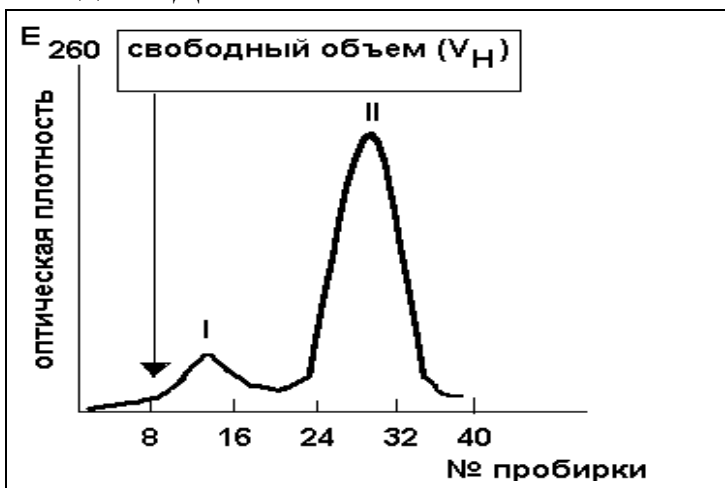


Рис.40. Хроматографический профиль очистки ДНК pBR-322.

I – пик ДНК, II – пик РНК.

Часто для разделения нуклеиновых кислот используют сефарозу.

| Марка сефарозы | Концентрация агарозы, % | Диаметр гранул, мкм | Размер белков, тыс. Дальтон |
|----------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 6 В | 6 | 45-165 | 10 - 4000 |
| 4 В | 4 | 60-140 | 60 - 20000 |
| 2 В | 2 | 60-200 | 70 - 40000 |

Как видно из представленных данных, процентное содержание агарозы в гелях отражено в маркировке матриц. Учитывая, что молекулярная масса плазмидной ДНК рBR322 равна 2600000 Дальтон, рекомендуется использовать в качестве матрицы Сефарозу 4В.

Во время первого эксперимента следует собирать образцы небольшими порциями, примерно, 1/2 - 1/3 от объема посаженного раствора. Например, если объем посадки составил 1000мкл, следует собирать в пробирки фракции по 300-400 мкл

Оборудование:

Колонка размером 20×1 см; штатив с 20 мерными пробирками; набор пипеток и наконечников; спектрофотометр СФ-26; маркер по стеклу.

Реактивы:

ТЭС-буфер (1 л); сефароза 4В, уравновешенная буфером ТЭС:

| ТЭС -буфер, рН 8,0 | | | |
|---------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| Состав | Исходная концентрация | Количество на: 1 л | Рабочая концентрация |
| Tris-HCl | 1,0 М | 30 мл | 30 мМ |
| Na ₂ ЭДТА | 0,2 М | 25 мл | 50 мМ |
| NaCl | 2,0 М | 25 мл | 50 мМ |

Раствор, содержащий смесь ДНК и РНК (6-7 мг).

Ход работы:

1. Рассчитать концентрацию нуклеиновых кислот в исследуемом растворе. Для этого определить оптическую плотность при длине волны 260 нм, зная, что раствор, содержащий 1 мг нуклеиновых кислот на 1 мл, дает поглощение при 260 нм равным 22,

2. Колонку установить в штативе.

3. На колонку размером 1×20 см нанести 6-7 мг нуклеиновых кислот в 1мл ТЭС-буфера.

4. Подключить элюирующий буфер, предварительно перекрыв выход раствору из колонки.

5. После подключения открыть колонку и собирать фракции со скоростью 0,4 мл/мин, т.е. каждую минуту собирать в пробирки по 400мкл элюата.

Оценка результатов:

1. Определить поглощение растворов в каждой пробирке.

2. Построить график элюции.

3. Определить: который из вышедших пиков соответствует ДНК.

• В состав ДНК рBR322 входит 4300 пар оснований, а РНК, например транспортная, состоит, примерно, из 90 пар оснований.

Вывод:

3.2. Тема: Электрофорез биополимеров.

Оценка размеров и форм белковых молекул и нуклеиновых кислот

В настоящее время электрофорез широко используется в различных областях биологии (Остерман, 1981). В зависимости от природы носителя различают жидкостный (свободный) электрофорез и зональный электрофорез с использованием опорных сред. В качестве сред применяются бумага, агарозный и полиакриламидный гели, а также силикагели, целлюлоза и сефадекс.

Преимущества зонального электрофореза состоят в следующем:

- Простое устройство приборов, применяемых для электрофореза;
- После электрофоретического разделения биомолекул, фракции можно зафиксировать в поддерживающей среде и выявить специфическими красителями, а затем элюировать;
- Разделение по фракциям идет достаточно быстро.

Физический принцип метода электрофореза Биологические макромолекулы – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, находятся в растворе в виде частиц, которые по своим размерам соответствуют коллоидным частицам. Они несут определенный электрический заряд благодаря наличию групп, способных к электролитической диссоциации. Общий заряд данной частицы определяется, прежде всего, концентрацией протонов в среде и может изменяться при взаимодействии с ионами малой молекулярной массы или другими макромолекулами. Если поместить раствор макромолекул в гель, пространственная сетка которого удерживает жидкость от вытекания, и пропустить через этот раствор электрический ток, то вдоль пластины устанавливается градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов на концах рабочей пластины с гелем, отнесенной к ее длине (В/см).

Под действием электрического поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом (– или +) мигрируют в направлении катода (-) или анода (+). Такое явление носит название электрофореза.

Далее, в зависимости от размера пор геля (среды) и размера молекул, последние приобретают разные скорости миграции. Постепенно исходный препарат, состоящий из разных молекул, разделяется на зоны одинаковых по размеру молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине пластины (рис.41).

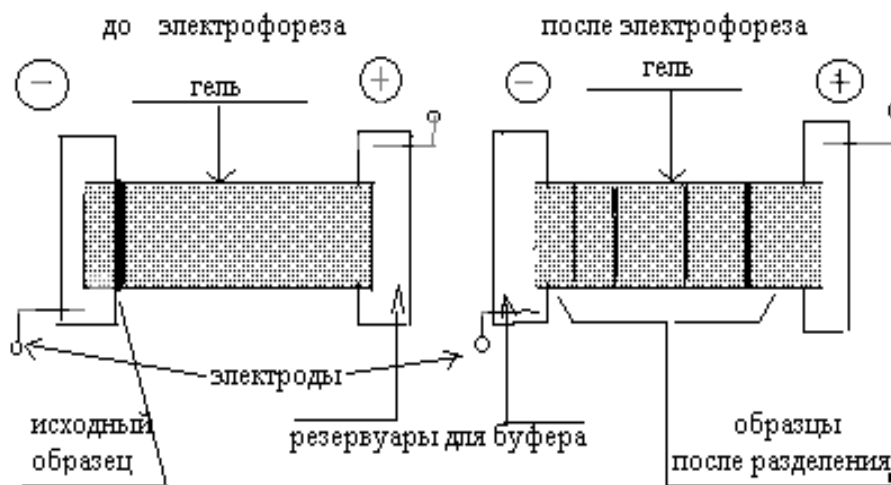


Рис. 41. Схема электрофореза.

Для наблюдения за электрофорезом в препарат образца добавляют краситель (например, бромфеноловый синий), который передвигается со скоростью несколько большей, чем скорость движения наиболее подвижных макромолекул. Когда окрашенная зона доходит до конца пластины, электрофорез прекращается. Детальные исследования показали, что посредством электрофореза можно получать данные о важнейших характеристиках биомолекул:

Определить чистоту, молекулярную массу и субъединичную природу белка или установить, является ли образец рибо- или дезоксирибонуклеотидом.

В результате электрофореза нуклеиновых кислот в агарозе можно:

1. Изучить влияние вторичной структуры ДНК на поведение при электрофорезе. Нативная двунитевая молекула имеет более жесткую структуру (палочкообразную), чем таких же размеров однонитевой фрагмент молекулы ДНК, поэтому двунитевая молекула, проходя через сетку геля, движется медленнее, чем однонитевая (рис.42).

2. Изучить конформационные переходы плазмид (рис.28). Кольцевые ДНК бактерий (плазмидная) в нативном состоянии имеют структуру кольца, свернутого в «жгут», что увеличивает ее компактность (I форма). Если в одной из двух цепей имеется единичный разрыв в сахаро-фосфатной цепи, то «жгут» разворачивается, превращаясь в кольцо (II форма), причем в процессе электрофореза форма I мигрирует быстрее, чем форма II (рис.42.).

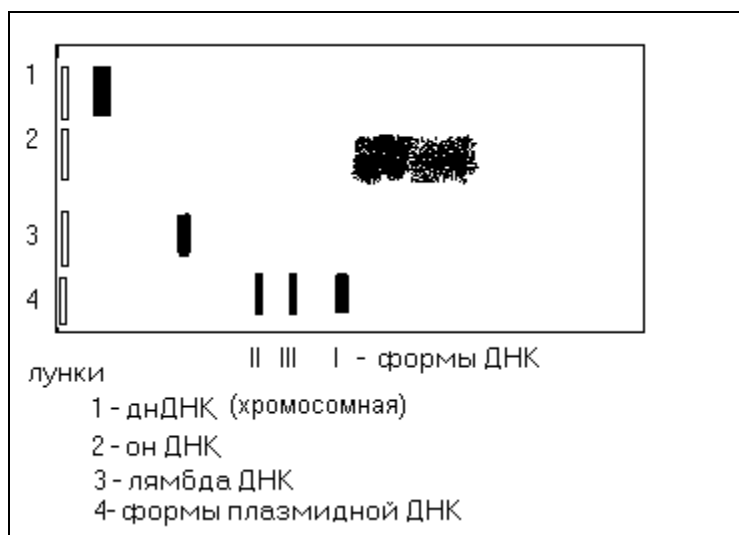


Рис. 42. Схема распределения НК по гелю после электрофореза в зависимости от конформации

Форма III (линейная) может мигрировать быстрее или медленнее, чем I форма (при этом они одинаковой длины) в зависимости от размера пор геля. В крупнопористом геле важна компактность I формы, поэтому в 0,6% - 1% геле скорость миграции убывает в порядке: I → III → II. В мелкопористом геле на первый план выступает большая гибкость линейных молекул, например, в 1,4%-ном геле три формы мигрируют в следующей последовательности: III → I → II.

Лабораторная работа 14: Характеристика структурной организации внеклеточной и хромосомной ДНК в агарозном геле

Специфика фракционирования нуклеиновых кислот (НК) в гелях агарозы связана с характерными особенностями структуры НК, вытекающими из природы этих соединений – неизменно отрицательный и значительный по величине суммарный электрический заряд, обусловленный диссоциацией многочисленных остатков фосфорной кислоты (рис. 14). Величина заряда НК мало зависит от величины рН среды, а отношение заряда к массе НК практически одинаково для всех НК, поэтому фракционирование НК при электрофорезе идет за счет различия размеров и форм молекул. Таким образом, метод позволяет разделить макромолекулы, различающиеся по размерам, пространственной конфигурации и вторичной структуре.

Агарозный носитель. Благодаря прочности и крупнопористости гели агарозы используют для электрофореза НК.

Агароза – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида – агара, который извлекается из некоторых видов морских водорослей. При температурах 84-96°C (у некоторых типов при 70°C) растворы агарозы переходят в гелеобразное состояние – агароза “плавится”. Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков

нитей (линейных полимеров) агарозы за счет водородных связей. Растворы агарозы характеризуются ярко выраженным гистерезисом, т.е. они затвердевают, образуя гель при относительно низких температурах (36-42°C). В результате можно не опасаться преждевременного застывания агарозы. Гели агарозы непрозрачны, однако это обусловлено не наличием примесей, а своего рода “кристаллизацией” геля и свидетельствует о чистоте агарозы.

Агароза для электрофореза выпускается в виде порошка. Для приготовления геля нужной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере, выдерживают в кипящей водяной бане 2 часа. Перед приготовлением агарозных пластин гель расплавляют и выдерживают при 50°C в течение не менее 30 мин. Заливку пластин производят в специальных приборах на строго горизонтальной поверхности. Длина и толщина пластины ограничивается задачами. Контакт с воздухом при заливке не сказывается на полимеризации геля.

В настоящее время электрофорез ведут на агарозных пластинах в горизонтальном направлении. Эта система имеет ряд преимуществ:

- можно применять низкие концентрации агарозы, т.к. гель поддерживается снизу;
- можно готовить гели разных размеров;
- хранение и заливка гелей и последующие манипуляции с ними достаточно просты;
- для проведения электрофореза можно быстро изготовить прочные и недорогие установки в лабораторных условиях.

Выбор концентрации агарозы. Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, диктуется размером фракционируемых молекул. Средний размер пор 2 %-ного геля агарозы, приблизительно, соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн дальтон (1 дальтон = 1/12 массы изотопа ^{12}C или $1,66 \times 10^{-24}$ г.). При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь притормаживать их миграцию в электрическом поле за счет трения. Поэтому для электрофореза применяют гели с концентрацией от 0,3 до 2,5 %.

Буферы. Для электрофореза обычно применяют трис-ацетат, трис-борат, трис-фосфат в концентрации 50 мМ рН 7,5-8,5. Запасные растворы готовятся в виде концентрированных растворов ($\times 10$) и хранятся при комнатной температуре. Буфер создает и стабилизирует рН носителя и, тем самым, влияет на скорость передвижения разделяемых веществ. Электродные буфера обеспечивают широкий набор диапазонов рН, ионной силы и подвижности катионов и анионов буферной системы, что дает возможность проводить

разделение биомолекул без изменения их физико-химических и биологических свойств.

В буферах с высокой ионной силой скорость движения образца уменьшается, а при низкой ионной силе увеличивается. Обычно применяют буферные системы с ионной силой в диапазоне 0,05-0,1М.

Напряженность электрического поля. Скорость движения ДНК зависит от ряда факторов:

- концентрации агарозы;
- силы тока;
- ионной силы буфера;
- напряженности электрического поля (ЭП) (рис. 43).

Рабочее значение напряжения и тока выбирают так, чтобы напряженность электрического

поля в геле не превышала 5В/см. При этом происходит максимальное разделение фрагментов (оптимально 0,5–2 В/см)

Температура. Протекание электрического тока через жидкость связано с выделением тепла, которое влияет на скорость миграции макромолекул в геле. Неравномерность нагревания геля может привести к искажению зон и ухудшению их разделения. Электрофорез в агарозном

геле обычно ведут при комнатной температуре. Но гели, содержащие менее 0,5 % агарозы - очень мягкие, поэтому с ними работают при 4°C.

Окрашивание НК при электрофорезе. Для окрашивания ДНК используют **бромистый этидий (БЭ)** – краситель, несущий положительный заряд, и обладающий способностью внедряться в двунитевые участки нуклеиновых кислот между плоскостями соседних пар оснований. При оптической плотности раствора БЭ равной единице (измерено при длине волны 480 нм), концентрация этого раствора соответствует 70 мкг/мл.

Чувствительность метода обнаружения Н.К. в геле агарозы составляет 0.01мкг ДНК в полосе. Рабочий раствор для окраски – 2 мкг/мл. Время окраски – 0,5 - 1ч.

Оборудование:

Прибор для электрофореза, блок питания; хемископ; термостат на 56°C. Стаканы: 50мл, 100мл; пипетки переменного объема для нанесения образца (50мкл); наконечники для пипеток. Очки стеклянные, линейка, карандаш, стеклянные дротики.

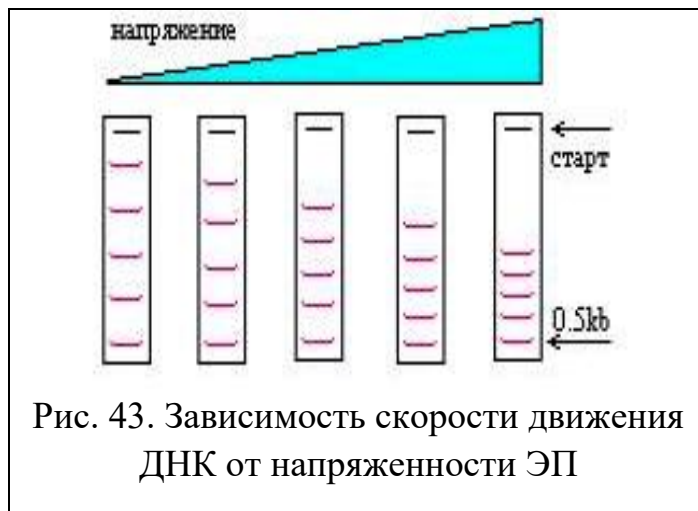


Рис. 43. Зависимость скорости движения ДНК от напряженности ЭП

Реактивы:

0,8%-ный или 1%-ный раствор агарозы; образцы ДНК; маркеры Э/Ф; глицерин (50%); БФС (0,25%); 0,089М трис-боратный буфер (рН 8,0), содержащий бромистый этидий (2мкг/мл).

Состав электродного буфера: 0,089М трис-ОН (рН 8,0 – 8,2) / 0,089М борной кислоты / 0,002М ЭДТА.

Схема работы:

1. Установить бортики (рис.44) в форму для электрофореза на расстоянии 8-10 см.

Промазать с помощью пипетки агарозой.

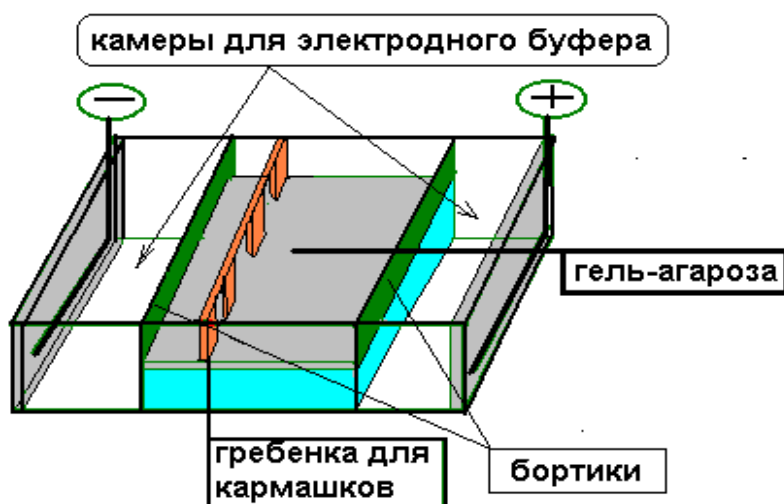


Рис. 44. Подготовка камеры для агарозного геля.

2. Установить гребенку для формирования «карманов» для образцов. Гребенку установить так, чтобы зубья не доходили до основания пластины на 0,5мм (рис. 44).

3. Отмерить в мерном стакане 30-50мл агарозы и залить форму.

4. Время полимеризации 15-20мин. (За этот период подготовить образцы ДНК).

5. Приготовить образцы ДНК. В пробирку типа «Эппендорф» внести:

| | |
|--------------------------------|----------|
| ДНК (1мг/мл) | – 10 мкл |
| 0,25% БФС в 50 %-ном глицерине | – 1 мкл. |

6. После полимеризации из геля удалить гребенку, внести в кювету электродный буфер так, чтобы гель был покрыт буфером толщиной 1 мм.

7. Осторожно внести в лунки по 10 мкл образцов ДНК (отметить номера лунок и образцов в журнале).

8. Включить блок питания, предварительно установив напряжение -5 В/см (т.е. если длина геля 10 см, то установить на приборе напряжение в 50В).

9. Время электрофореза, примерно, 40 – 60 мин. Следить за движением красителя БФС (при необходимости электрофорез можно остановить, когда краситель пройдет $\frac{1}{2}$ длины геля).

10. Отключить блок питания

11. Вынуть пластину с гелем и промыть в dH_2O 5 раз по 1 мин.

12. Перенести гель на стекло хемископа. В ультрафиолетовом свете этидиум бромид начинает светиться оранжево-розовым светом. По светящимся полосам судят о месте нахождения ДНК.

Оценка результатов:

1. Зарисовать полученные картины распределения НК в агарозном геле после электрофореза.

2. По характеру распределения светящихся полос определить местоположение форм плазмидной ДНК.

Вывод:

Лабораторная работа 15: Определение структуры и молекулярной массы белка методом электрофореза в ПААГ с ДСН

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) является общепринятым методом при определении гомогенности белков, определения их молекулярной массы и очистки (препаративный электрофорез)

Особенности электрофореза белков. Белки – это цвиттер-ионы, т.е. молекулы, имеющие и положительно (+) заряженные и отрицательно (-) заряженные радикалы. Поэтому молекула белка в растворе при любом рН, отличным от изоэлектрической точки, имеет определенный преобладающий заряд (+) или (-) и мигрирует к соответствующему полюсу в постоянном электрическом поле. Этот метод начала XX века получил название электрофорез с подвижной границей.

Позднее был разработан метод ступенчатого электрофореза (диск-электрофорез (от англ. «discontinuous» - прерывистый)). Отличительная особенность диск-электрофореза - это полимеризация на пластине двух гелей: рабочего (мелкопористого) и над ним – «формирующего» (крупнопористого) геля. Диск-электрофорез – метод, сочетающий в себе разделение белков по их общему электрическому заряду, по величине молекулярной массы и по форме. Использование двухслойного носителя с различным размером пор и двух буферов, отличающихся между собой по составу и рН, обеспечивает

концентрирование исследуемых белков в узкой стартовой зоне. *Это важно для чёткого разделения смеси белков.*

Полиакриламид. Раствор, в котором мигрируют белки, удерживается сеткой полиакриламидного геля (ПААГ). ПААГ служит при электрофорезе поддерживающей средой и принимает активное участие в процессе разделения макромолекул благодаря эффекту молекулярного сита.

В качестве носителя при диск-электрофорезе используют ПААГ, который имеет структуру трехмерной сетки. Получают его сополимеризацией акриламида и сшивающего агента N,N'-метиленабисакриламида. Подбирая соответствующую концентрацию акриламида получают гель с нужным размером пор. При работе с глобулярными белками пользуются соотношением между средней молекулярной массой белков (М) и концентрацией (С) акриламида, которую надо взять для полимеризации, например (см. табл.):

| М | С, % |
|----------------|-------------|
| 10000 – 30000 | 15,0 – 30,0 |
| 30000 – 100000 | 7,5 – 15,0 |

В качестве катализаторов при получении ПААГ - геля используют персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Варьируя концентрацией полимера можно получить гели с широким диапазоном пор.

Для удобства изложения используются следующие обозначения: **Т** - процентное отношение *суммарной* массы обоих мономеров к *объему* их раствора, **С** – процентное отношение массы метиленабисакриламида (Бис) к общей массе обоих мономеров. Для крупнопористых гелей, чтобы увеличить степень сшивки линейных полимеров акриламида отношение акриламида/Бис должно составлять, от 35:1 до 20:1. Процентное содержание мономеров определяется по формуле: $T = (a + b) / M \times 100\%$, количество сшивающего агента в % от общего количества мономеров определяется по формуле: $C = b / (a + b) \times 100\%$, где **Т** - процентное содержание мономеров; **С**- процентное количество (концентрация) сшивающего агента; **а** – количество акриламида, (г); **б** – количество бис-акриламида, (г); **М** – объём буфера, (мл). Правильно подобранные соотношения акриламида и бис-акриламида важны для качества фракционирования, окрашивания, высушивания и т.д.

Для расчёта оптимального соотношения акриламида и бис-акриламида можно использовать эмпирическую формулу: $C = 6,5 - 0,3T$, которая обеспечивает приемлемые гели в диапазоне $T = 5 - 20 \%$.

На практике для исследования белков часто **Т** составляет 30 %, а **С**-2,6 %. Чтобы приготовить растворы используют следующий расчет:

Количество Бис $\rightarrow T \times C / 100 = 30 \times 2,6 / 100 = 0,76 \text{ г.}$

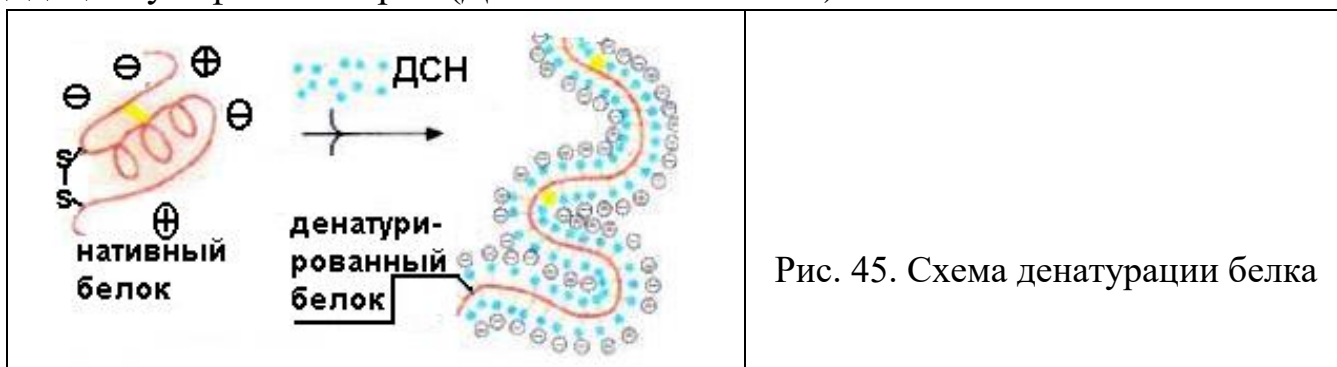
Количество акриламида $\rightarrow 30 \text{ г} - 0,76 \text{ г} = 29,24 \text{ г.}$

Навески акриламида и бис-акриламида растворяют в 100 мл dH_2O .

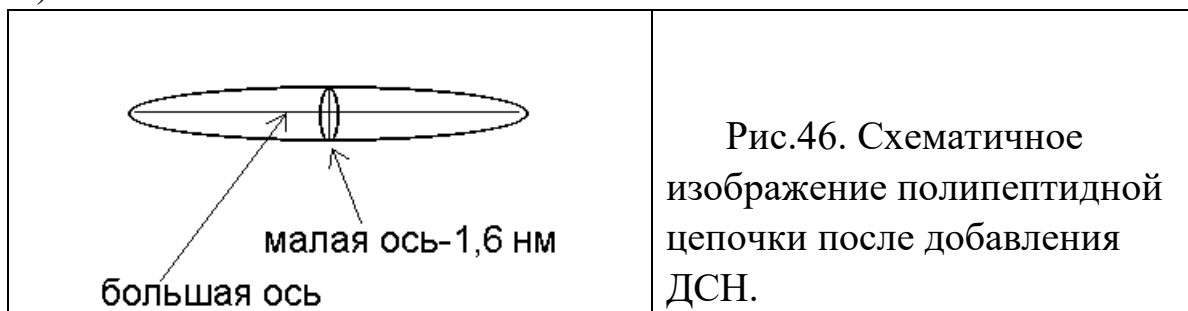
Характеристика миграции белков. Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле (Rf') пропорциональна их подвижности в свободной жидкости (Rf_0), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к её массе. Фактором, обуславливающим отличие Rf' от Rf_0 , является сила трения о гель. Сила трения зависит от соотношения линейных размеров белков и пор геля, и, следовательно, от молекулярных масс белков. Молекулярные массы большинства белков не превышают 500000, поэтому использование гелей агарозы не целесообразно. Как правило, электрофорез белков проводят в ПААГ, содержащем от 5% до 20 % акриламида.

Как говорилось выше, белки являются цвиттер-ионами. Их суммарным зарядом, а, следовательно, и отношением заряда к массе можно управлять изменением рН буфера, в котором полимеризуется ПААГ и ведется электрофорез. Оптимальное значение рН рабочего буфера обуславливает не максимальный заряд, а максимальное различие зарядов разных белков, составляющих смесь. Таким образом, рН рабочего буфера не должно слишком отличаться от изоэлектрических точек всех белков смеси (при изоэлектрической точке все белки имеют нейтральный заряд). Для кислых белков оптимальные значения рН – нейтральное или слабощелочное. Белки мигрируют от катода (-) к аноду (+). Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и т.д.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН = 4 – 5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода (+) к катоду (-). Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе полипептидную цепочку распрямляют (рис. 45). Такой приём используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия (ДСН - $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$)



Разделение белков по размеру с использованием додецилсульфата натрия (ДСН). Суть метода. Электрофорез в ПААГ-ДСН позволяет фракционировать белки только по молекулярной массе. Для этого белки обрабатывают трёхкратным избытком ДСН-Na (1,4 мг ДСН-Na на 1 мг белка). Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Постоянство соотношения детергент/белок делает постоянным отношение (-) заряда к массе любого белка. Благодаря электрическому отталкиванию остатков серной кислоты на поверхности белка полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жёсткого эллипсоида вращения (рис.46).



Размер малой оси эллипсоида равен 1,6нм, большой - линейно связан с числом аминокислотных остатков, т.е. с молекулярной массой. Электрофоретическая подвижность (Rf') связана с молекулярной массой белка (M) соотношением: $Rf' = A - B \lg M$, где A и B – коэффициенты пористости геля и др. условий.

Величину электрофоретической подвижности (Rf) определяют в относительных единицах, выражающих отношение пути миграции белка к миграции бромфенолового синего за время электрофореза. Одновременно проводят электрофорез белков-«маркёров», молекулярные массы которых известны.

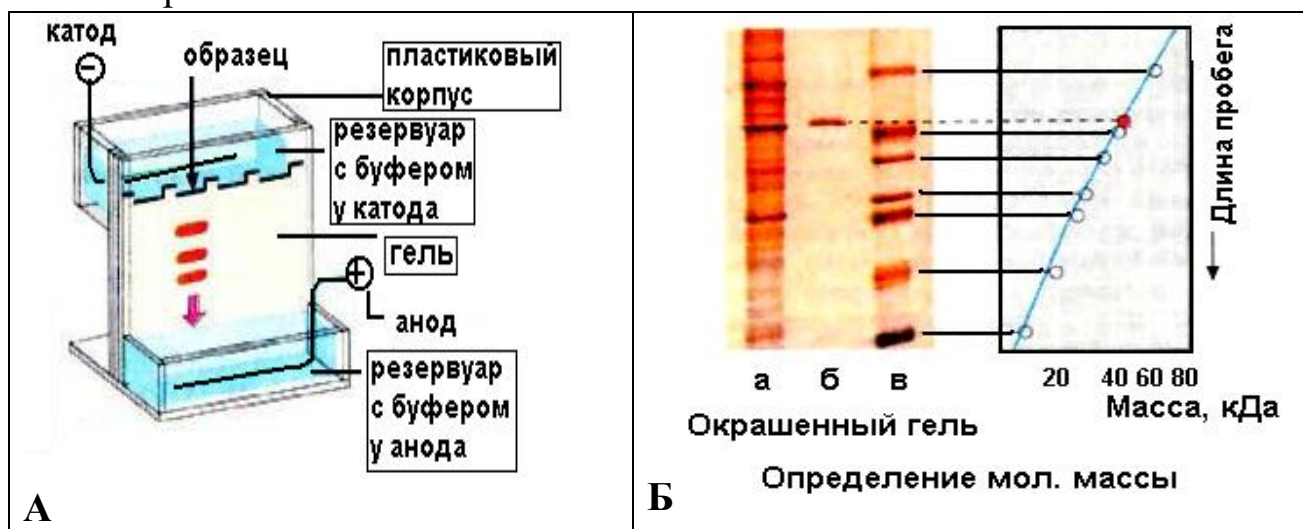


Рис. 47. Схема электрофореза: А - камера для электрофореза, Б - электрофореграмма трех препаратов.

Электрофорез проводят в тонком слое полиакриламида. После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.

В качестве примера на рис. 47,Б приведена электрофореграмма трех препаратов: клеточного экстракта, содержащего сотни белков (а); выделенного из экстракта гомогенного белка (б); контрольной смеси белков с известными молекулярными массами (в).

Оборудование:

Прибор для электрофореза, блок питания. Стаканы мерные: 50мл, 100мл; пипетки переменного объема для нанесения образца (50мкл); наконечники для пипеток. Линейка, карандаш, стеклянные палочки.

Реактивы:

Запасной раствор акриламида (З.Р.А - 30%);

N,N-метиленбисакриламид (З.Р бис-А - 0,7% ; С 2,4-см. стр.103);

Буфер для разделяющего геля (б-р Р.Г.×4): 1,5 М трис - HCl (pH 8,8)/0,4% ДДС-Na;

Буфер для концентрирующего геля (б-р К.Г.×4): 0,5 М трис-HCl (pH 6,8)/0,4% ДДС-Na;

10% раствор персульфата аммония (ПСА); раствор ТЕМЕДа;

Буфер для добавления к пробам (×10): 0,625 М трис-HCl (pH 6,8), 20% ДДС-Na;

Раствор БФС (бромфеноловый синий): 50% глицерин, 0,25% БФС;

Электродный буфер: 0,025 М трис-HCl, 0,192 М глицин, 0,1% ДСН.

Схема работы:

1. Собрать стеклянную камеру для электрофореза (рис. 48). Камера состоит из подставки для стекол, двух стеклянных пластин разной толщины, пластиковых прокладок, которые устанавливаются между стеклами (толщина геля) и резиновых прокладок (2-короткие, 2-длинные).

•После сборки обязательно проверить камеру на герметичность: для этого залить в нее дН₂О.

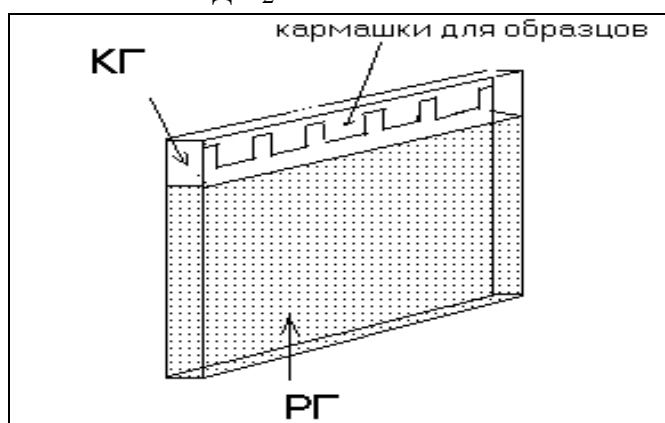


Рис.48. Стеклянная камера для электрофореза. КГ- концентрирующий гель, РГ- разделяющий гель

2. Приготовить 8%-ный разделяющий гель (Р.Г.):

З.Р.А. → 5,5 мл,
дН₂О → 9,5 мл,
б-р Р.Г. → 5,0 мл,
ТЕМЕД → 100 мкл,
10% ПСА → 100 мкл.

3. Залить РГ в стеклянную камеру, не доводя до верха 2 см.

4. Наслоить поверх геля дН₂О (полимеризация геля 10-20 мин)

5. Приготовить 4,5% концентрирующий гель (К.Г.):

З.Р.А. → 1,0 мл,
дН₂О → 2,75 мл,
б-р К.Г. → 1,25 мл,
ТЕМЕД → 50 мкл,
10% ПСА → 50 мкл.

6. Вылить К.Г. на поверхность Р.Г. и вставить гребёнку. (Полимеризация ≈ 5 мин).

7. Установить стеклянную камеру в аппарат для электрофореза (рис.49).

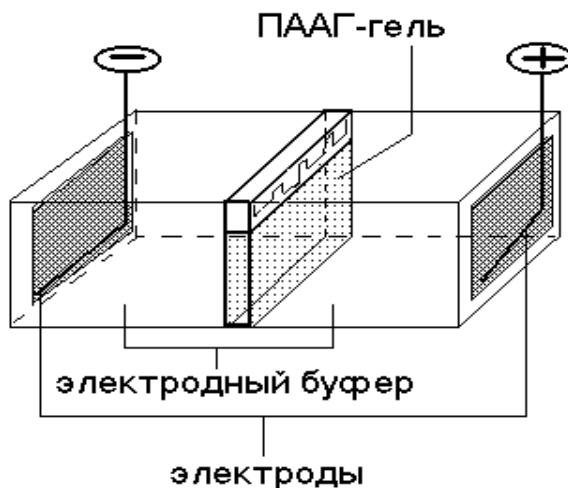


Рис. 49. Схема камеры для вертикального электрофореза.

8. Налить электродный буфер по обе стороны геля. «Кармашки» должны быть в буфере со знаком (-).

9. Убрать гребёнку, вынуть заднюю (длинную) резинку, чтобы открыть доступ к буферу со знаком (+) нижней части геля.

10. Подготовка образцов. Смешать в пробирках «Эппендорф»:

образец (1 мг/мл) X → 50 мкл
буфер для проб → 5 мкл
БФС → 5 мкл

11. Пробу прогреть в водяной бане при 96⁰С в течение 3 мин, с последующим охлаждением до 20⁰ С.

12. Режим проведения электрофореза:

(1) Установить ток 10 мА. Внести в кармашки по 20 мкл проб. (Каждую пробу вносить новым наконечником. Записать № кармашка и тип образца.)

(2) Электрофорез ведется при постоянной силе тока. До входа образцов в Р.Г. – ток 20 мА, основной режим – 40-45 мА. Когда полоса БФС дойдёт до границы геля, электрофорез остановить.

13. Фиксация белков в геле. После электрофоретического разделения буфер слить, стеклянную камеру с гелем, разъединить стёкла и гель поместить в кристаллизатор, содержащий раствор 7% уксусной кислоты и 20% спирта (1ч – 24ч).

14. Окраска белков:

(1). Слить фиксирующий раствор.

(2). Отмыть гель в дН₂О 4 раза по 5 мин (на качалке).

(3). Налить краситель Кумасси, содержащий 9% уксусной кислоты/40 % этилового спирта/ 0,25% Comassie G-250. Время окраски 10-30 мин.

(4). Краску слить, промыть гель 3 раза по 5 мин (на качалке). При необходимости отмывать гель до снятия фона и проявления синих полос.

Оценка результатов:

1. Зарисовать полученную картину распределения белков (полосы) после электрофореза.

2. Определить молекулярную массу неизвестного образца – **X**:

(1). Измерить путь, пройденный бромфеноловым синим (**г_{БФС}** в см) и белковыми маркерами: бычьим сывороточным альбумином (**г_{БСА}** в см), яичным альбумином (**г_{ЯА}** в см), и лизоцимом (**г_Л** в см).

• Определить **R_fБСА** = **г_{БСА} / г_{БФС}** = **2см/10см = 0,2**

• Определить **R_fЯА** = **г_{ЯА} / г_{БФС}** = ?

• Определить **R_fЛ** = **г_Л / г_{БФС}** = ?

(2). Построить график зависимости логарифма молекулярной массы белков (**lgM**) от относительного расстояния миграции (**R_f**) белков-маркёров (рис. 50).

(3). На графике по горизонтали найти **R_f**-маркеров; по вертикали найти **lgM** (табличные данные):

| Белок | Мол. масса, Да | lgM |
|----------|----------------|------|
| БСА | 68000 | 4,84 |
| Альбумин | 43000 | 4,63 |
| Лизоцим | 13900 | 4,14 |

(4). В точках пересечения IgM и R_f ставим точки (o) и проводим прямую (рис.50).

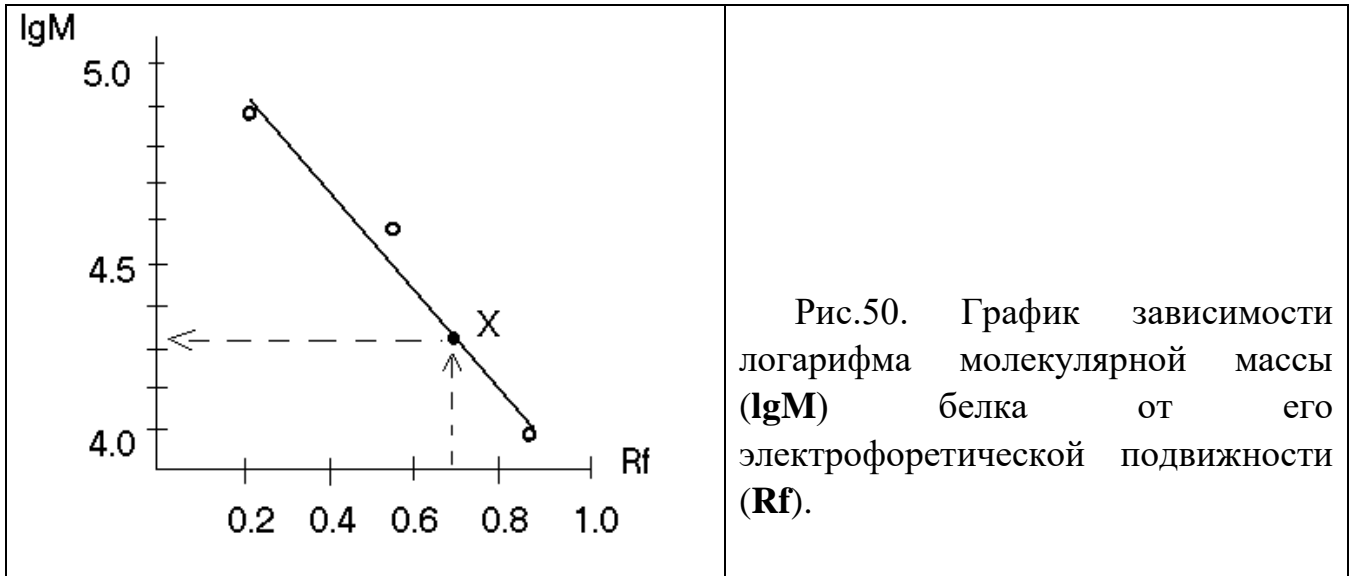


Рис.50. График зависимости логарифма молекулярной массы (IgM) белка от его электрофоретической подвижности (R_f).

(5). Измерить r_x , пройденный X-белком, и определить $R_f = r_x / r_{\text{БФС}}$.

(6). Спроецировать положение точки X на вертикальную прямую и определить IgM X-белка и вычислить по таблице или на калькуляторе молекулярную массу.

Вывод:

4. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ

Ферменты являются **биокатализаторами**, т.е. веществами биологического происхождения, ускоряющими химические реакции. Они повышают скорость катализируемой реакции в 10^{12} раз и более. Это вещества, которые влияют на скорость реакции, но сами при этом не расходуются. Организованная последовательность процессов обмена веществ возможна при условии, что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов. Только при этом условии осуществляется согласованная последовательность реакции (**метаболический путь**). Почти все ферменты являются **белками**.

Ферментативная активность. Каталитическое действие фермента, то есть его активность, определяют в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции. Обычно скорость реакции указывают как изменение концентрации субстрата или продукта за единицу времени [моль/(л·с)]. Так как каталитическая активность не зависит от объема раствора, в котором протекает реакция, активность фермента выражают в **каталах**. **1 кат** — это количество фермента, которое превращает **1 моль субстрата за 1 с**. Другой единицей активности является международная единица (Е) — количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в 1 мин ($1 \text{ E} = 16,7 \text{ нкат}$).

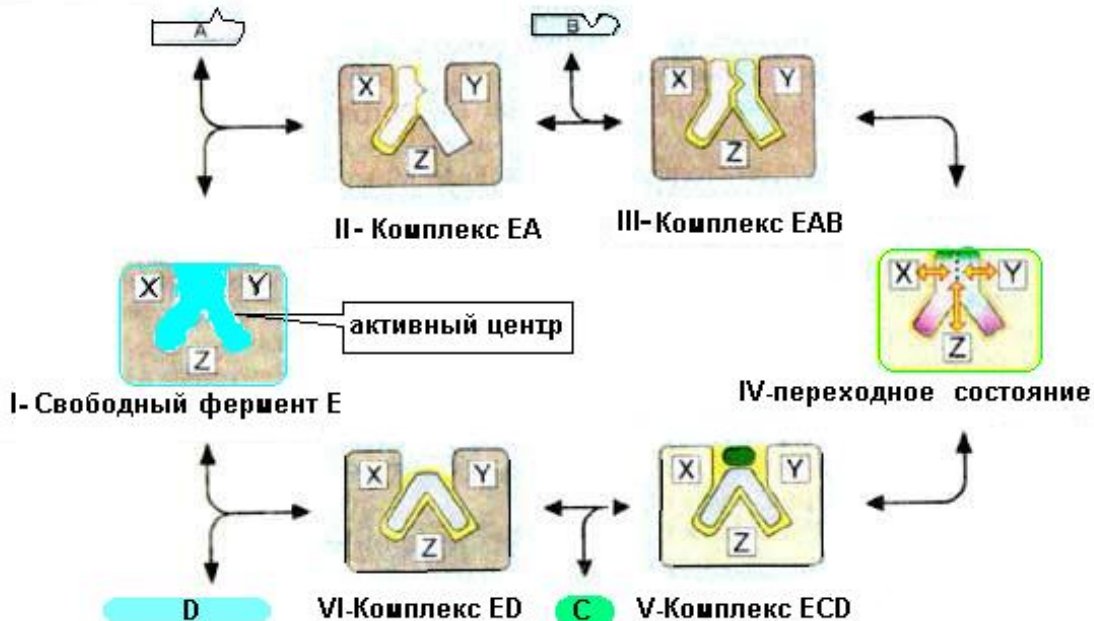
Реакционная и субстратная специфичность. Действие большинства ферментов высоко специфично. Понятие специфичности относится не только к типам каталитических реакций (реакционная специфичность), но и к природе соединений, т.е. субстратов (субстратная специфичность). Высокоспецифичные ферменты катализируют расщепление только одного типа связи в субстратах определенной структуры.

Некаталитическая реакция (в отсутствие фермента). В качестве примера можно рассмотреть реакцию типа $A + B \rightarrow C + D$ (рис.51,1). **Вещества А и В** в растворе окружены оболочкой из молекул воды (*гидратной оболочкой*) и под действием теплового движения перемещаются случайным образом. Они могут вступать в реакцию друг с другом только в том случае, когда сталкиваются в благоприятной ориентации, что маловероятно и происходит редко. Для образования продуктов $C + D$ **комплекс А—В**, возникший в результате соударения молекул, должен образовать **переходное состояние**, для чего требуется, как правило, значительная **энергия активации E_a** . Для вступления в реакцию молекулы

реагента должны обладать определенной минимальной энергией, называемой энергией активации (рис. 52).

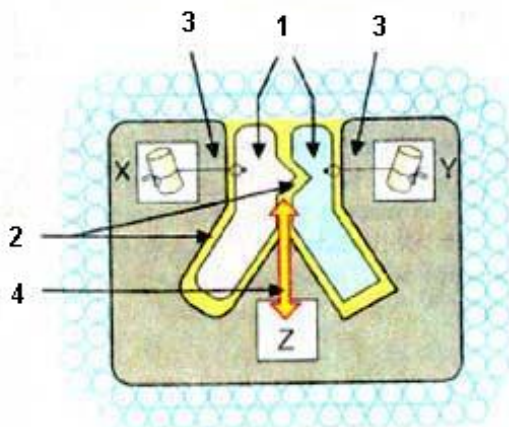


1. Некаталитическая реакция (в отсутствии фермента)



2. Ферментативная реакция

1. Сближение и ориентация субстратов
2. Исключение воды
3. Стабилизация переходного состояния
4. Перенос группы



3. Основы ферментативного катализа

Рис. 51. Схема ферментативного катализа.

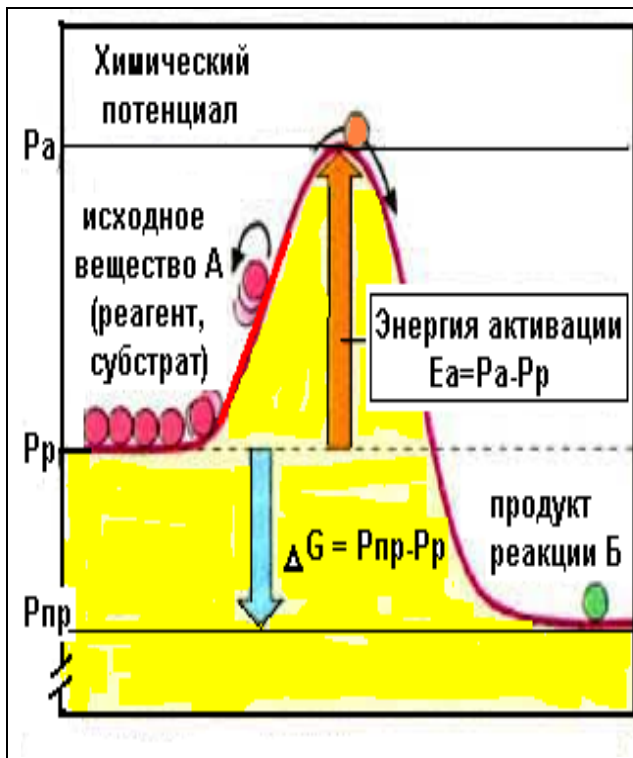


Рис. 52. Энергетическая диаграмма реакции $A \rightarrow B$. Каждое из соединений, реагент А и продукт реакции В, обладает химическим потенциалом (P_p и $P_{пр}$ соответственно). Изменение свободной энергии реакции (ΔG) соответствует разности потенциалов. Для превращения в В соединение А должно преодолеть энергетический барьер, пик которого P_a выше P_p . Разность потенциалов $P_a - P_p$ носит название **энергия активации (E_a)**.

Поскольку получить эту энергию может только небольшая часть комплексов $A-B$, достижение переходного состояния — еще более редкий случай, чем возникновение комплекса. В растворе большая часть энергии активации расходуется на *преодоление гидратных оболочек* между А и В, *сближение реагентов* и *другие химические процессы*, в которых эти реагенты участвуют. В результате в отсутствие катализатора образование продуктов происходит крайне редко.

Ферментативная реакция (рис. 51,2). Ферменты специфически связывают реагенты (свои субстраты) в **активном центре**. При этом субстраты ориентируются таким образом, что приобретают оптимальное положение для образования переходного состояния (I-III). **Сближение и необходимая ориентации** реагентов значительно повышают вероятность образования *продуктивного комплекса* $A-B$. Кроме того, связывание субстрата в активном центре приводит к удалению гидратной оболочки субстрата. В результате **удаления молекул воды** в активном центре фермента во время катализа создаются совершенно другие условия, чем в растворе (III-V). Еще одним важным фактором является **стабилизация переходного состояния** вследствие взаимодействия между аминокислотными остатками белка и субстратом (IV). Таким образом, переходное состояние в случае ферментативной реакции требует меньшей энергии активации. Кроме того, многие ферменты во время катализа переносят специфические группировки с субстрата или на субстрат. Особенно часто осуществляется перенос протонов. Этот ферментативный **кисотно-основной катализ**

значительно более эффективен, чем обмен протонов с кислотами и основаниями в растворе. Часто химические группировки ковалентно присоединяются к остаткам фермента. Это явление называют **ковалентным катализом**.

Основы ферментативного катализа (рис.51,3). **Кинетика** ферментативной реакции - это зависимость скорости реакции от ее условий). Несмотря на то, что сегодня трудно количественно оценить вклад отдельных каталитических эффектов, решающим фактором считается **стабилизация переходного состояния** в активном центре фермента. При этом наиболее существенным моментом является прочное связывание не столько субстрата, сколько его переходного состояния. Данное положение подтверждается крайне высоким сродством многих ферментов по отношению к аналогам переходного состояния, что можно пояснить простой механической аналогией (на схеме рис.51,3 справа): если хотят перекатить металлические шарики (реагенты) с места EA (состояние субстрата) в энергетически более высокое переходное состояние, а затем в EP (состояние продукта), нужно расположить магнит (катализатор) таким образом, чтобы сила притяжения действовала не на EA (а), а на переходное состояние (б).

4.1. Тема: Изучение нуклеазной активности белков-ферментов

Нуклеазы - многочисленная группа ферментов, специфичных по отношению к нуклеиновым кислотам и расщепляющих межнуклеотидные связи в их молекуле с образованием обломков различной величины без освобождения неорганического фосфата. Нуклеазы делятся на две основные категории: эндонуклеазы и экзонуклеазы.

Эндонуклеазы расщепляют фосфодиэфирные связи одновременно во многих пунктах внутри молекулы нуклеиновой кислоты, проявляя при этом определенную степень избирательности или предпочтение в отношении тех или иных азотистых оснований. Экзонуклеазы - последовательно отщепляют от одного из концов полинуклеотидной цепи по одному нуклеотиду путем разрыва фосфодиэфирной связи. Кроме того, в зависимости от входящего сахара различают дезоксирибонуклеазы и рибонуклеазы. Дезоксирибонуклеазы - катализируют гидролиз (расщепление) ДНК. Рибонуклеазы – РНК.

Определение начальной скорости энзиматической реакции. Для определения ДНКазной активности белков используют метод определения нуклеазной активности по приросту кислото-растворимых продуктов в результате гидролиза субстрата (ДНК) белковой фракцией. Для

приготовления реакционной пробы берут 100 мкл раствора ДНК (1 мг на мл), 60 мкл буфера, 20 мкл раствора активатора (двухвалентные металлы) и 20 мкл фермента. Реакция идет при 37°C. В ходе реакции отбирают пробы по 20 мкл через определенные промежутки времени и добавляют в каждую пробирку по 380 мкл холодного 3%-ного раствора хлорной кислоты. Наличие продуктов реакции определяют на спектрофотометре СФ-46 в 2 мм кювете. Контролем служит хлорная кислота. Результаты оптической плотности умножают на 5 и строят графики зависимости прироста кислото-растворимых продуктов от времени реакции.

Чтобы правильно оценить активность нуклеазы принимают во внимание, что скорость ферментативной реакции зависит от природы фермента, характеризующегося низкой или высокой активностью. Под ферментативной кинетикой понимают зависимость скорости реакции (ускоряемой ферментом) от природы субстрата, фермента и условий окружающей среды.

Обычно для сравнения активности различных ферментативных препаратов или активности одного фермента при разных условиях измеряют **начальную скорость ферментативной реакции, т.е. количество превращенного субстрата за определенный промежуток времени.** Скорость реакции при этом в начале более или менее постоянная, затем начинает уменьшаться. Замедление скорости ферментативной реакции может быть обусловлено несколькими причинами:

- По мере расхода субстрата его концентрация в системе падает, что приводит к снижению степени насыщения фермента субстратом.
- Если реакция обратима, скорость обратимой реакции становится ощутимой.
- Возможно ингибирующее действие образующимися продуктами реакции (график при этом становится вогнутым).
- Изменение условий в системе, например подкисление, если образуются кислые продукты.

Чтобы правильно оценить уровень активности фермента, обращают внимание на **начальную скорость реакций, т.е. при расчетах исходят из данных полученных за промежуток времени, когда скорость реакции не зависит от времени инкубации.** Другими словами, когда за каждую минуту расщепляется одно и то же количество субстрата. Чтобы убедиться, что скорость реакции лимитируется только концентрацией исследуемого фермента, отбирают пробы через кратные промежутки времени. Если это приводит к увеличению или уменьшению определяемой активности тоже кратно, значит, при данных условиях только концентрация фермента определяет скорость ферментативной реакции, т.е. измеряется истинная

каталитическая активность. Таким образом, при прочих равных условиях и при наличии избытка субстрата *начальная скорость энзиматической реакции при графическом изображении выражается прямой линией.*

Применение фотометрических методов определения скорости ферментативной реакции предполагает образование продуктов, поглощающих свет в определенной области спектра, как видимой, так и в ультрафиолетовой. Специфическое поглощение в определенных участках спектра может быть присуще различным соединениям, которые являются активными группами белков-ферментов, или субстратами или продуктами реакции. Положение максимума поглощения при определенной длине волны определяется наличием в исследуемом материале определенных групп - аналитических форм (например, олигонуклеотидов).

Для измерения спектров используют специальные приборы – спектрофотометры. Этот метод отличается **высокой чувствительностью, быстротой определения, малым расходом фермента и реактивов и позволяет следить за течением реакции во времени.** Через малый промежуток времени после добавления фермента (или субстрата) и быстрого перемешивания измеряют поглощение при длине волны, характерной для используемого субстрата или конечного продукта, образующегося в данной реакции. С помощью спектрофотометрического метода можно измерять непосредственно концентрацию некоторых ферментов (после достаточной очистки).

Необходимо иметь произвольно выбранную единицу, с помощью которой можно было бы количественно выразить чистоту и активность различных фракций. В большинстве случаев выбор единицы зависит от избираемого метода определения. В случае спектрофотометрического метода такой единицей может служить количество фермента, которое вызывает определенное изменение в оптической плотности за определенное время при данных условиях опыта; если определяется продукт реакции, то единицей будет количество фермента, которое вызывает образование определенного количества вещества в минуту, и т.д. Тогда удельную активность (уд. акт.) фермента, которая является мерой чистоты ферментного препарата, выражают числом единиц в 1 мг вещества (белка).

Лабораторная работа 16: Определение активности ДНКаз методом кислоторастворимых продуктов

Суть метода определения кислоторастворимых продуктов: К субстрату (ДНК) добавляют фермент, который должен его расщеплять. К

продуктам реакции вносят раствор хлорной кислоты. Высокополимерная ДНК в кислоте не растворима. Олигонуклеотиды (короткие фрагменты молекулы ДНК) - растворимы. В результате после центрифугирования кислоторастворимые продукты - олигонуклеотиды, остаются в растворе, а не гидролизованные высокомолекулярные фрагменты осаждаются.

По приросту растворимых продуктов реакции и судят о степени активности фермента.

Оборудование:

1. Штатив с пробирками (стеклянные) для хлорной кислоты; штатив с пробирками (стеклянные) для реакции; штатив с центрифужными пробирками; штатив с пробиркой для реакционной смеси (Р/С);

5. Пипетки на 1000 мкл и 200 мкл переменного объема; наконечники для пипеток;

6. Центрифуга на 5000-7000 об/мин;

7. Водяная баня на 37 °С; «ледяная» баня;

8. Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46 для определения продуктов реакции;

9. Карандаш по стеклу;

10. Емкость для отработанных наконечников и пробирок;

11. Стеклоянный стакан (V=50мл).

Реактивы:

1. Фермент: Ca²⁺, Mg²⁺-зависимая ДНКаза (или ДНКаза I) 2. Раствор 0,05М Mg²⁺ + 0,001М Ca²⁺ ; 0,025М раствор Mn²⁺ или Mg²⁺; 0,2 М и 0,02 М раствор трис-буфера, рН 7,2 и рН 7,5, соответственно; препарат ДНК (1мг/мл); раствор 3%-ой хлорной кислоты

Подготовка растворов.

Фермент - Ca²⁺, Mg²⁺-зависимая ДНКаза. Препарат фермента (лиофильно высушенный и хранившийся в герметически запаянной ампуле под вакуумом) развести в 3 мл дистиллированной воды.

Подготовка субстрата – ДНК. Развести 20 мг высокополимерной нативной ДНК цыплёнка в 15 мл дистиллированной воды.

Для приготовления денатурированной (однонитевой) ДНК пробу нативной ДНК поместить в стеклянную пробирку, опустить её в емкость с кипящей водой («водяная баня»). Кипятить в течение 30 мин при температуре 100°С. Через 30 мин пробирку с раствором ДНК опустить в «ледяную баню» (вода с мелкими кусочками льда) и охладить при постоянном вращении пробирки до полного охлаждения в течении 3-5 мин. Можно хранить при t - 20° С.

Для обнаружения и изучения характера взаимодействия нуклеаз с ДНК реакцию проводят *in vitro* (в пробирке) при оптимальных условиях течения реакции (рН раствора, активаторы и температура). Полученные продукты реакции регистрируют спектрофотометрически .

Реакционные смеси (РС):

РС для определения Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой активности при действии на нативную - дцДНК:

| Исходная концентрация компонентов РС | Количество на: | |
|---|----------------|----------|
| | 1 пробу | 10 проб |
| дцДНК(1мг/мл) | 100 мкл | 1000 мкл |
| Трис-ОН (0,02М; рН 7,5). | 60 мкл | 600 мкл |
| Ca^{2+} , Mg^{2+} (0,001 М Ca^{2+} и 0,5М Mg^{2+}) | 20 мкл | 200 мкл |
| ДНКаза | 20 мкл | 200 мкл |
| Общий объем РС | 200 мкл | 2000 мкл |

РС для определения Mn^{2+} зависимой активности при действии на денатурированную - оцДНК:

| Исходная концентрация компонентов РС | Количество на: | |
|--------------------------------------|----------------|----------|
| | 1 пробу | 10 проб |
| оцДНК (1,0 мг/мл) | 100мкл | 1000мкл |
| Трис-ОН (0,2М; рН 7,2) | 60мкл | 600мк |
| Mn^{2+} (0,025М) | 20мкл | 200мкл |
| ДНКаза | 20 мкл | 200 мкл |
| Общий объем РС | 200 мкл | 2000 мкл |

Комментарии по ходу работы:

- Инкубация идет при 37°C на водяной бане.

- Для определения активности в динамике из РС периодически отбирают пробы по 200мкл (т.е. через 0, 5, 10, 20, 40 и 60 минут). Для остановки реакции к отобранной пробе добавляют по 3,8 мл 3%-ного раствора хлорной кислоты. В результате кислоторастворимые продукты - олигонуклеотиды, остаются в растворе, а не гидролизованные высокомолекулярные фрагменты ДНК осаждаются хлорной кислотой.

- Через 10 минут осадок кислотонерастворимых продуктов удаляют центрифугированием при 7000 об/мин в течение 5-10 минут.

• Надосадочную жидкость сливают в чистые сухие пробирки и измеряют прирост кислоторастворимых продуктов (ΔE_{260}) на спектрофотометре (кювета 10мм).

• Контролем (при изучении активности в динамике) служат пробы, к которым добавлена хлорная кислота до инкубации (0' - нулевая точка отсчета времени реакции).

• За единицу активности ДНКазы принимают количество фермента образующего прирост кислоторастворимых продуктов гидролиза ДНК на 1 оптическую единицу при $\lambda = E_{260}$ за 1ч инкубации на 1 мг белка. Результаты опыта занести в таблицу:

| Время реакций (мин) | Опыт | Опыт- контроль |
|---------------------|------|----------------|
| 0' | | |
| 5' | | |
| 10' | | |

• и построить график зависимости скорости образования продукта при $\lambda = 260$ нм (ΔE_{260}) от времени (рис.53):

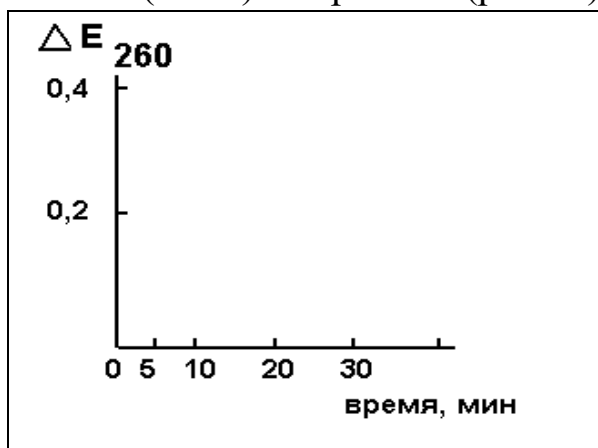


Рис.53. График зависимости скорости образования продукта (поглощение при ΔE_{260}) от времени.

Схема работы:

1. Определить концентрацию белка по оптической плотности, замерив поглощение раствора при длине волны 280 нм;
2. Приготовить РС по таблице.
3. Налить в пробирки раствор 3%-ной хлорной кислоты по 3,8 мл.
4. Надписать стеклянные (для реакции) и полиэтиленовые (центрифужные) пробирки : 0', 5', 10', 20' - время отбора проб.
5. Внести пробу (200 мкл) из пробирки с РС в опытную пробирку (0' мин), стоящую в «ледяной бане».
6. Штатив с пробиркой, содержащей РС поставить в «баню» при 37 °С. Отбирать из нее пробы по схеме (пример: 0 мин – 10⁵⁰, 5 мин – 10⁵⁵, 10 мин – 11⁰⁰, 20 мин – 11¹⁰). Пробирки с пробами держать в «ледяной бане».

7. В стеклянные пробирки с пробами, стоящими в "ледяной бане", после реакции влить хлорную кислоту, выдержать 10 мин,
8. Через 10 мин содержимое пробирок перелить в соответственно надписанные центрифужные полиэтиленовые пробирки.
9. ЦР в течение 10 мин при 7000 об/мин.
10. После остановки центрифуги, жидкость слить в пробирки из-под хлорной кислоты и измерить поглощение растворов в 1 см кюветах на СФ при длине волны 260 нм [Оформление записи: $\Delta E^{1\text{см}}_{260} = \dots$]
11. Записать результаты в таблицу (см. стр.130).

Оценка результатов:

1. Построить график (см. рис. 53):
2. По характеру высоты кривой сделать вывод об активности фермента.
3. Зная концентрацию белка ($C_{\text{белка}}$) определить удельную активность белка (**Уд. акт.**). Для этого:
 - (3.1) определить оптическую плотность за 1 ч инкубации, например, показания СФ через 20 мин реакции умножить на 3 $\rightarrow [\Delta E_{260.}] \times 3$;
 - (3.2) определить общую активность (**Об. акт.**) $\rightarrow \{([\Delta E_{260.}] \times 3) \times 200\}$;
 - (3.3) определить удельную активность (**Уд. акт.**) \rightarrow полученный результат разделить на показания концентрации белка изучаемой пробы.

$$\text{Итак, уд. акт.} = \{([\Delta E_{260.}] \times 3) \times 200\} / C_{\text{белка}}$$

Вывод:

Лабораторная работа 17: Флуорометрический метод определения активности эндонуклеаз

Принцип метода. Флуорометрический метод определения специфических и неспецифических эндонуклеаз основан на способности красителя-этидиум бромид (2,7 - диамино - 10 - этил - 9 - фенилфенантрен бромид) (ЭБ) интеркалировать (встраиваться) между двумя парами оснований спирали нативной ДНК. Интеркалирование красителя вызывает вращение оснований ДНК вдоль оси дуплекса (рис.54). Если ЭБ взаимодействует с линейной (открытой) молекулой ДНК, то обе нити ДНК, имея свободные концы, могут легко вращаться относительно друг друга, при этом происходит присоединение максимального числа молекул красителя к ДНК. В случае взаимодействия ЭБ с ковалентно замкнутой кольцевой ДНК свободного вращения нитей ДНК относительно друг друга не происходит, в результате только незначительное количество красителя может интеркалировать между

основаниями ДНК, следовательно, число молекул ЭБ, связанного на нуклеотид линейной ДНК всегда больше числа молекул ЭБ связанного замкнутой кольцевой ДНК аналогичного молекулярного веса.

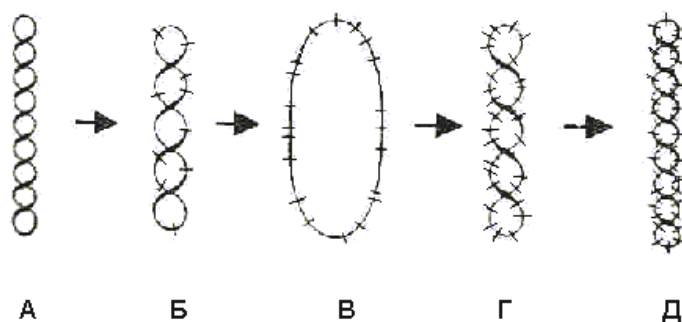


Рис.54. Схематичное изображение (без соблюдения масштаба) раскручивания и закручивания в обратную сторону суперспирали ДНК:

А-количество витков суперспирали в исходной молекуле ДНК; Б- уменьшение количества витков при связывании ДНК с молекулами этидиум бромид (черточки перпендикулярные нитям); В- в отсутствие суперспирализации ДНК принимает форму простого кольца; Г,Д-дальнейшее раскручивание спирали ДНК приводит к образованию суперспирали, теперь противоположного направления.

Единичный разрыв в кольцевой ДНК в результате действия ДНКаз приводит к появлению свободных концов ДНК, которое сопровождается увеличением количества молекул ЭБ, связанных с ДНК (Винтер, 1969). Зная число молекул ЭБ, способного связываться с кольцевой молекулой ДНК и число молекул ЭБ, связываемое гомологичной линейной ДНК, можно рассчитать число однонитевых разрывов в кольцевых ДНК, вызываемых эндонуклеазами. Второй особенностью ЭБ, делающей его удобным красителем для определения активности ДНКаз, является его свойство при связывании ДНК резко увеличивать интенсивность флуоресценции. Показано, что изменение флуоресценции кольцевых ДНК при действии ДНКаз при условии избытка в растворе ЭБ зависит от характера действия ДНКазы. При действии неспецифических ДНКаз, когда фермент делает большое количество разрывов в молекуле ДНК, концентрация субстрата практически не изменяется в течение времени, необходимого для раскрытия всех кольцевых молекул ДНК, т.е. количество разрывааемых связей незначительно, по сравнению со всеми фосфодиэфирными связями в ДНК. Во всех случаях изменение флуоресценции находится в линейной зависимости от концентрации фермента, времени, молекулярного веса ДНК и в зависимости от константы Михаэлиса фермента. Для специфических эндонуклеаз – рестриктаз, гидролизующих молекулу ДНК по одному или нескольким специфическим сайтам с разрывом обычно одной нити кольцевой ДНК,

изменение флуоресценции не зависит от молекулярного веса ДНК. При определении активности к пробам, взятым из инкубационной среды, в ходе реакции добавляют 100-кратный объем раствора этидиум бромид. Пробы инкубируют и определяют интенсивность флуоресценции.

Измерение флуоресценции проводят на спектрофотометре марки МР-4 фирмы “Hitachi”. Возбуждение флуоресценции ведут при длине волны $\lambda=365$ нм, запись флуоресценции ведут при $\lambda=590$ нм при температуре 20°C. Расчет кинетики гидролиза субстрата проводят по формуле: I_t-I_0 , где I_t - интенсивность флуоресценции через время t после добавления ДНКазы; I_0 - интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-субстрат в начальный момент времени реакции (контроль). Изменение флуоресценции находится в линейной зависимости от концентрации фермента и времени. $T^{1/2}$ - время в течении которого половина суперскрученных кольцевых молекул ДНК получает разрывы, можно определить по формуле:

$$T^{1/2} = I_{op} - I_t / I_{op} - I_0 \times 100 \%$$

(масштаб полулогарифмический), где I_{op} - флуоресценция в условиях, когда все молекулы ДНК открыты, или через $t = \infty$ действия ДНКазы на кольцевую ДНК; $T^{1/2}$ - пропорциональна количеству фермента и используется в экспериментах по обнаружению специфических и неспецифических эндонуклеаз. Скорость ДНКазной активности определяется по времени, в течение которого половина кольцевых ковалентно замкнутых молекул ДНК (плазмидная ДНК) получает разрывы ($T^{1/2}$).

Оборудование:

Люминесцентный спектрофотометр марки МР-4 фирмы “Hitachi”; кварцевые спектрофотометрические кюветы на 500 мкл; автоматические пипетки на 5-50, 100-1000 мкл; стеклянные пробирки; ручка, маркер; водяная баня на 37° С.

Реактивы:

1. Фермент: Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимая ДНКаза (1 мг/мл); раствор активаторов- 0,05М Mg^{2+} + 0,001М Ca^{2+} ; 0,02М раствор Трис-буфера, рН 7,5; препарат плазмидной ДНК (≈ 50 мкг/мл); стандартный раствор этидиум бромид (ЭБ), содержащего 1 мкг/мл ЭБ /10мМ трис-НСl буфер (рН-7,8) / 20 мМ NaCl / 5 мМ Na_2 ЭДТА; реакционная смесь (Р.С.) без фермента.

Хлористый натрий добавляют для предотвращения не специфического связывания красителя с ДНК, ЭДТА – для остановки ферментативной реакции.

Субстрат. Выбор субстрата для определения ДНКаз зависит от доступности получения кольцевых ДНК. Необходимо учитывать, что чем больше молекулярный вес ДНК, тем выше чувствительность метода. Точность метода зависит от разницы флуоресценции ЭБ с открытой молекулой ДНК и с

кольцевой «закрытой» молекулой ДНК (I_{ор}-I_о), чем больше разница, тем лучше повторяемость результатов.

Состав реакционной смеси (РС):

| Исходная концентрация компонентов РС | Количество на: | |
|---|----------------|---------|
| | 1 пробу | 10 проб |
| ДНК | 100мкл | 1000мкл |
| Трис-ОН (0,02М; рН7,5). | 60мкл | 600мкл |
| Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (0,001 М Ca ²⁺ и 0,5М Mg ²⁺) | 20мкл | 200мкл |
| ДНКаза | 20мкл | 200мкл |
| Общий объем РС | 200мкл | 2000мкл |

Ход работы:

Перед постановкой реакции готовится раствор кольцевой ДНК (50 мкг ДНК растворяется в 1 мл дН₂О). Концентрация ДНК выбирается таким образом, чтобы в зависимости от чувствительности прибора, интенсивность флуоресценции комплекса кольцевая ДНК+ ЭБ составляла порядка 70-80% шкалы прибора.

1. Надписать стеклянные пробирки: 0', 1.0', 2.0', 5.0', 10.0', 20.0'- время через которое отбираются пробы. (Пробирки держать на «ледяной бане»).

2. В пробирку с Р.С., стоящую в «ледяной бане», добавить 200 мкл раствора фермента. Это инкубационная проба (И.П.)

3. Отобрать 20мкл И.П. и внести в пробирку 1 (0'-мин), оставить пробирку в «ледяной бане».

4. И.П. поставить в баню при 37 °С. Отбирать из нее пробы по схеме: 0 мин (проба взята сразу после смешивания компонентов И.П.), затем через 1,0 мин, 2,0 мин, 5,0 мин от начала реакции и так далее).

5. В каждую пробирку, стоящую в «ледяной бане», добавить по 2 мл стандартного раствора ЭБ при 0° С. Когда отбор проб закончится, пробы инкубировать в водяной бане 30 мин при комнатной температуре, измерить уровень флуоресценции. Показания записать (см. пример:

К ЭБ=7% (контроль), 0'=26% , 1'=30,5% , 2'=33% , 5'=35,5% , 10'=34,8% , 20'=34%.

Оценка результатов:

1. Рассчитать I_т- I_о (см. пример):

| | |
|------------------------|-------------------------|
| К ЭБ = 7% | 5' = 35,5% - 26% = 9,5 |
| 0' = 26% - 26% = 0 | 10' = 34,8% - 26% = 8,8 |
| 1' = 30,5% - 26% = 4.5 | 20' = 34% - 26% = 8.0 |
| 2' = 33% - 26% = 7.0 | |

2. Построить график зависимости интенсивности флуоресценции (%) образцов от времени (см. пример рис. 55).

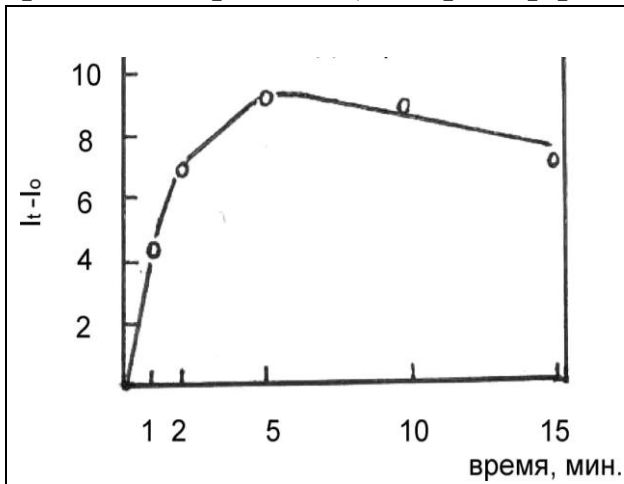


Рис. 55. Кинетика гидролиза ДНК ДНКазой,

I_0 - флуоресценция комплекса ДНК - ДНКазы (момент внесения фермента - 0 мин);

I_t - интенсивность флуоресценции комплекса ДНК-ДНКазы через t время. (Масштаб линейный).

3. Построить график определения $T_{1/2}$ - время, в течение которого половина (50%) молекул суперспиральной ДНК получила разрывы (см. пример рис. 56).

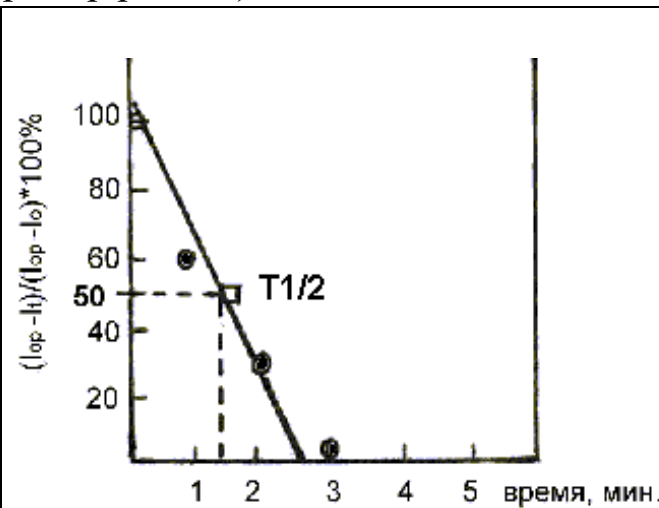


Рис. 56,а. Определение $T_{1/2}$; где I_{op} - флуоресценция в условиях, когда все молекулы ДНК открыты.

$$T = \frac{I_{op} - I_t}{I_{op} - I_0} \times 100 \%$$

где $I_{op} = 35,5\%$ (см. стр. 127), отсюда:

$$0' = \frac{(35,5\% - 26\%)}{9,5} \times 100 = 100\%$$

$$1' = \frac{(35,5\% - 30,5\%)}{9,5} \times 100 = 53\%$$

$$2' = \frac{(35,5\% - 33\%)}{9,5} \times 100 = 26\%$$

$$5' = \frac{(35,5\% - 35,5\%)}{9,5} \times 100 = 0\%$$

Рис. 56,б. Схема расчета.

Вывод:

4.2. Тема: Иммуноферментный анализ при определении антител к ДНК

Химия иммунитета. Иммунный ответ

У организмов существует специальная защитная система, предотвращающая проникновение в него чужеродных патогенных

микроорганизмов. Белки оболочек этих организмов, их полисахариды, нуклеиновые кислоты называют в таких случаях АНТИГЕНАМИ.

При попадании в организм, антигены вызывают ответную иммунную реакцию, результатом которой является синтез специальных защитных белков, называемых АНТИТЕЛАМИ (иммуноглобулины или γ -глобулины). Антитела взаимодействуют с соответствующими им антигенами с образованием прочных иммунных комплексов ($K_m < 10^{-7}$), инициируя процессы уничтожения чужеродных молекул. В человеческом организме имеется около 100 миллионов различных видов антител (с очень близкой, однако, друг другу структурой). Каждое антитело специфически связывается только со своим антигеном, в ответ на попадание которого оно было синтезировано. Антигенные детерминанты- Участки молекул антигена (6-10 аминокислотных остатков), инициирующие синтез антител. Таких детерминант у отдельных белков может насчитываться несколько.

Гаптены- небольшие органические молекулы и пептиды, которые не могут самостоятельно инициировать синтез антител, но будучи ковалентно “пришитыми” к молекуле белка (даже дружественного данному организму) становятся антигенной детерминантой. Синтезируемые в ответ антитела обладают способностью связывать такие гаптены.

Длительное время препятствием к изучению иммуноглобулинов являлась невозможность их индивидуального разделения. Клетки миеломы мыши соединили с клетками В-лимфоцитов, получив в результате клетки гибридомы, синтезирующие единственный вид антител- моноклональные.

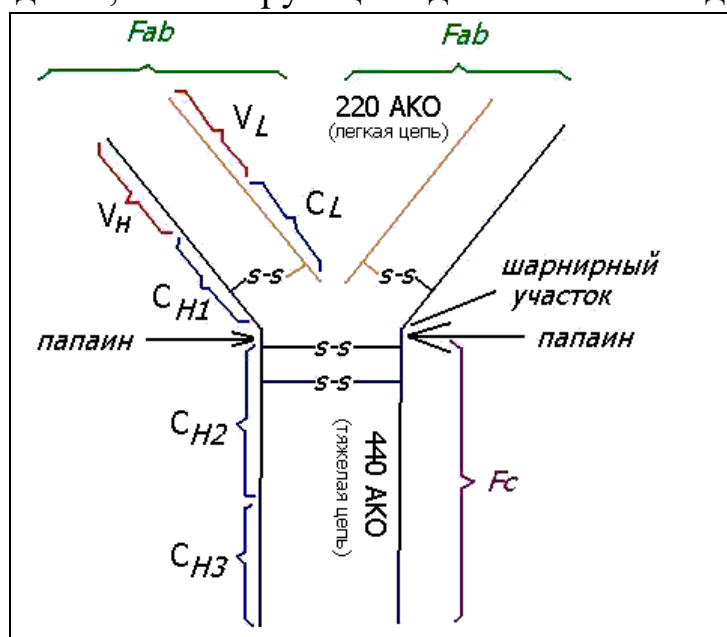


Рис.57.Строение иммуноглобулинов

К настоящему моменту времени установлено строение иммуноглобулинов класса G. Строение иммуноглобулинов других классов весьма совпадает со строением IgG. Все они имеют по 2 тяжелых и по 2

легких цепи, соединенных дисульфидными мостиками, как указано на схеме (рис.).

Средняя длина тяжелой цепи составляет 440 аминокислотных остатков (масса ~ 50 kDa), легкой- 220 (MM ~ 25 kDa).

Всего насчитывается пять классов иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM): в каждом классе иммуноглобулинов имеются подклассы (IgG1, IgG2, IgG3 ...) и подподклассы (IgG1a, IgG2b и т. д.).

На молекуле антител различают КОНСТАНТНЫЕ (CH1, CH2, CH3, CL) и ВАРИАБЕЛЬНЫЕ (VH и VL) участки легкой и тяжелой цепей. Гипервариабельная зона переменного участка и является антигенсвязывающей (Fab) . Молекула иммуноглобулина насчитывает, таким образом, ДВЕ зоны связывания антигена. При разрушении ферментом (папаин) молекулы антитела в зоне “шарнира”, образуется 3 фрагмента Ig- один константный Fc и два антигенсвязывающих Fab, сохраняющих свою способность связывать антигены.

Иммуноферментный анализ

Принцип. Используются специальные планшеты из полистирола, с круглыми плоскодонными лунками, вместимостью около 300 мкл. Число лунок на планшете- 96 (8 рядов по 12 лунок) (рис.58).

Перед анализом планшету сенсibiliзируют, нанося раствор антигена. Обычно это белки. Очень часто антигены для ИФА получают генноинженерными технологиями, выращивая на трансгенных *E.coli*.

Растворимые антигены закрепляются на поверхности планшеты рядом специфических взаимодействий непосредственно из раствора. Для снижения помех участки незанятой антигеном поверхности “укрывают” нанесением раствора бычьего сывороточного альбумина. Несвязанный материал удаляют и планшету сушат.

При выполнении анализа лунки заполняют исследуемым материалом (сыворотка крови), нанося его в разные лунки с дробным разбавлением (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 и т.д.), после чего выдерживают около 30 мин для связывания. Если в образцах имеются антитела, комплементарные нанесенному антигену, они образуют с ним прочные комплексы. Образцы из лунок удаляются и, не связавшийся материал удаляется трехкратной промывкой буфером.

Далее лунки заполняются раствором конъюгата, представляющего собой связанные глутаровым альдегидом молекулы белка-фермента (чаще всего- пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза) и молекулы антител против

антител к возбудителю, полученные из сыворотки кролика (или другого организма) при введении в его кровь антител человека к искомому возбудителю. Дают время на прохождение реакции комплементарного связывания, после чего избыток раствора конъюгата удаляется, и лунки промываются буфером. Молекулы конъюгата осаждаются на молекулах осадившихся на антигене антител из испытуемого образца. В довершение всего лунки заполняют раствором субстрата, превращение которого в окрашенный продукт осуществляется конъюгированным ферментом.

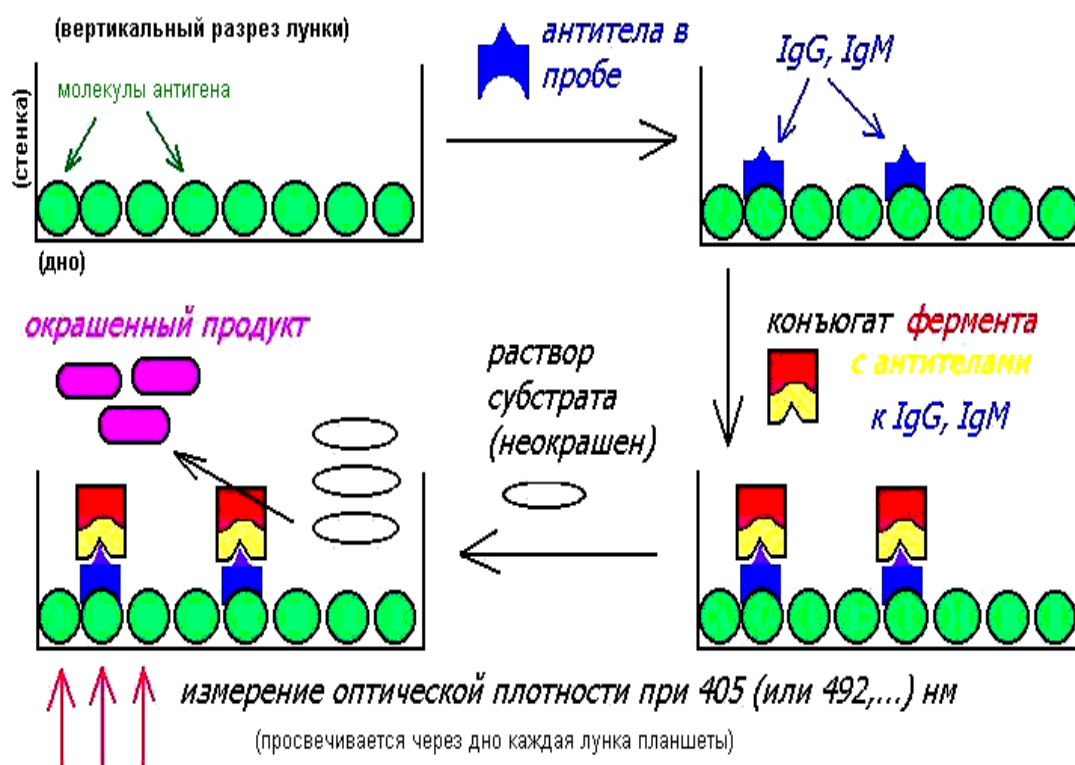


Рис. 58. Схема иммуноферментного анализа.

Такое ферментативное превращение осуществляется примерно 60 мин, после чего реакция останавливается добавлением кислоты. Количество превращенного субстрата пропорционально концентрации конъюгата и, следовательно, концентрации антител в исследуемом образце. По плотности окраски в УФ-свете можно судить о концентрации антител в исследуемой сыворотке. В “холостых” контрольных лунках параллельно проводят реакцию для установления порога “шумов”. Имеются также лунки, заполненные антителами из контрольного раствора для проверки специфичности реакции.

В качестве субстратов для конъюгатов с пероксидазой хрена применяется о-фенилендиамин в смеси с перекисью водорода, дающие после остановки реакции оранжево-коричневые растворы, измеряемые при длине волны 492 нм. Субстратом для щелочной фосфатазы является п-нитрофенилфосфат, превращающийся в п-нитрофенол, индицируемый при 405 нм.

ИФА повышает чувствительность анализа благодаря "усилению сигнала" на конъюгированном ферменте. На каждую молекулу исследуемого в сыворотке антитела "садится" по одной молекуле фермента, которая способна катализировать превращение десятков и сотен тысяч молекул субстрата.

Итак, метод иммуноферментного анализа (ИФА) основывается на двух **принципиальных научных открытиях**. Первое заключается в способности энзимов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, т.е. расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела; второе базируется на создании комплекса антитело-фермент (АТ-Ф) в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе. АТ-Ф-конъюгаты характеризуются высочайшей специфичностью и чувствительностью, достигающей 97-99%. Метод ИФА незамедлительно нашел свое самое широкое применение в области иммуногистохимии, иммунологии, медицины и ветеринарии.

Некоторые ошибки при постановке ИФА

- Для приготовления реагентов следует использовать дистиллированную или деионизированную воду. Эту воду следует хранить в неметаллических емкостях.

- Все реагенты и компоненты тест-системы должны быть доведены перед использованием до комнатной температуры, а после работы должны храниться при температуре от 2 до 8°C.

- Перед использованием убедитесь, что растворы и реагенты гомогенны.

- Планшеты (стрипы) можно использовать для постановки ИФА только один раз.

- Перед вскрытием пакета с планшетом его следует выдержать при комнатной температуре примерно 30 минут для предотвращения конденсации влаги на планшете. Если планшет разборный, и используются не все стрипы сразу, то после вскрытия оставшиеся стрипы следует поместить в пакет, который необходимо закрыть.

Постановка реакции

- Следует убедиться в том, что исследуемый образец или реагент внесен в лунку.

- Как при использовании одноканальной пипетки, так и при использовании многоканальной пипетки следует использовать новые наконечники для каждого используемого реагента.

- Реакция связывания антител с антигенами начинается сразу после внесения сыворотки в лунку, поэтому желательно, по-возможности,

уменьшить период между внесением первой и последней сывороток на планшет.

- Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов (например, 2 сыворотки внесены в одну лунку), нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец. Такая лунка бракуется.

- Не следует допускать подсушивания лунок в период между инкубациями или промывками — возможно образование плохорастворимой пленки на их поверхности. В случае необходимости длительного перерыва следует положить планшет вверх доньшками лунок на смоченную водой марлю или фильтровальную бумагу, в норме — не допускать длительного перерыва.

- Не следует касаться дна лунок — отпечатки пальцев или перчаток могут привести к неправильной регистрации оптической плотности.

Особенности работы с конъюгатом

- Необходимо выделить отдельную посуду и наконечники для работы с раствором конъюгата. Идеальный вариант — использование посуды и наконечников однократного применения. В реальной жизни часто не имеется такой возможности. Если посуда и наконечники используются многократно, то при подборе схемы мойки должно быть учтено сильное влияние даже следовых количеств таких веществ, как перекись водорода, хлорамин, азид натрия или добавки в синтетические моющие средства, на активность конъюгата.

- Рабочий раствор конъюгата желательно готовить непосредственно перед применением.

Промывки

- Равномерность заполнения и опорожнения всех лунок планшета контролируют, как правило, визуально в процессе промывки.

- В идеале — перед промывкой содержимое лунок отсасывается пипеткой или вошером, затем при промывке лунки заполняются до самого верха. При таком способе промывки резко падает вероятность появления неправильных результатов, связанных с загрязнением боковых поверхностей лунок растворами сывороток или конъюгата.

- Особенно тщательно следует промывать планшет после инкубации конъюгата.

- Растворы хромогена (ОФД, ТМБ) и конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием. Исключить воздействие света на раствор хромогена.

Раствор ОФД

•Для работы с раствором ОФД рекомендуется выделить отдельную посуду, которую нужно каждый раз ополаскивать 50 %-ным раствором спирта и затем дистиллированной водой. Запрещается мыть посуду для ОФД растворами синтетических моющих средств.

•Также желательно выделить отдельные наконечники для пипеток, которые будут применяться только для работы с раствором ОФД. Сразу после использования рекомендуется промывать такие наконечники спиртом и дистиллированной водой.

•При работе с таблетками ОФД следует использовать только пластиковые пинцеты или пинцеты с пластиковым покрытием, так как ОФД может реагировать с металлами, что может привести к неправильным результатам.

•ОФД является свето- и влагочувствительным. Флакон с ОФД следует хранить плотно закрытым. Перед тем, как открыть флакон с ОФД следует довести его до комнатной температуры во избежание конденсации влаги внутри флакона. Не следует использовать сломанные таблетки ОФД.

Раствор ТМБ

В основном требования к работе с ТМБ такие же, как и при работе с ОФД, в той части, которая касается светочувствительности, использования отдельной посуды и ее подготовки, использования отдельных наконечников для дозирования растворов ТМБ в ЦФР. Кроме этого, следует соблюдать следующие правила:

•Отбор концентрата ТМБ проводить только **новыми** наконечниками. Не использовать посуду и наконечники для отбора раствора ТМБ в ЦФР, если они ранее применялись для растворов ОФД, так как даже следовые количества ОФД приводят к неправильным результатам.

•Составы ЦФР для ТМБ и ОФД различны, поэтому нельзя использовать для разведения ТМБ ЦФР из наборов с комплектацией таблетками ОФД и наоборот.

•В тест-системах с комплектацией ТМБ нельзя использовать комплект ЦФР-ОФД из других наборов, это может привести к неправильным результатам, поскольку все компоненты набора подобраны для системы ТМБ-ЦФР.

•В тест-системах с ОФД и ТМБ обычно используются стоп-реагенты, отличающиеся количеством серной кислоты, поэтому нельзя использовать стоп-реагент из тест-системы с комплектацией ОФД для работы с тест-системой, укомплектованной ТМБ.

- Следует учитывать, что система ТМБ-ЦФР обеспечивает примерно в 10 раз более высокую чувствительность выявления пероксидазы, чем система ОФД-ЦФР, поэтому необходима более тщательная и аккуратная работа во избежание попадания в лунки капель растворов, содержащих входящую в состав конъюгатов пероксидазу, с рабочих поверхностей оборудования, перчаток и спецодежды. Признаком такого нарушения правил работы является спорадическое появление на планшете лунок с более высокой оптической плотностью.

Учет результатов

- Следует учитывать, что реакция окисления ОФД при добавлении серной кислоты до конца не останавливается. Поэтому нежелательно измерять оптическую плотность лунок позже, чем через 30 минут после добавления серной кислоты в качестве стоп-реагента.

Отказ спектрофотометра

- Возможная ситуация: необходимо измерить оптическую плотность, спектрофотометр не работает. Если оставить планшет до следующего дня, то произойдет повышение оптической плотности во всех лунках, так как даже при добавлении серной кислоты в раствор ОФД цветная реакция не останавливается полностью. Возможным выходом может стать быстрое замораживание планшета после добавления серной кислоты с последующим быстрым оттаиванием перед измерением оптической плотности. Следует учитывать при этом, что оптическая плотность все-таки возрастает, а относительный прирост сигнала более высок для небольших значений оптической плотности.

На рис. 59 приведены графики зависимости относительного роста

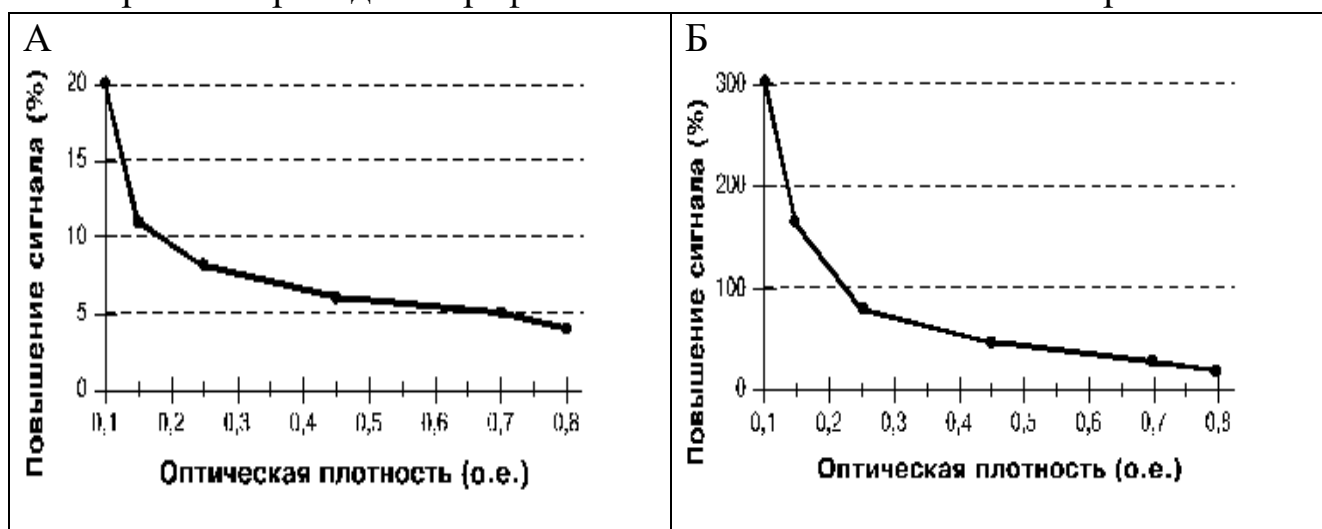


Рис.59. Зависимость роста относительной оптической плотности планшетов от температуры.

А - уровень повышения сигнала при замораживании планшета,

Б - без замораживания планшета.

величины оптической плотности от начальной оптической плотности для планшета, помещенного на ночь в морозильную камеру бытового холодильника, и для планшета, оставленного в темноте на ночь при комнатной температуре.

Отказ термостата

- Если обнаружено, что термостат не обеспечивает необходимой температуры, то наилучшим выходом следует признать приостановление работы.

- Распространенная ошибка при отказе термостата — постановка ИФА при пониженной температуре, но с увеличением времени инкубации.

Отсутствие места в холодильнике

- В случае, если отсутствует возможность размещения наборов при хранении в холодильнике, следует обеспечить хранение хотя бы основных компонентов: планшетов, конъюгата, концентратов растворов для разведения сывороток и конъюгата, контрольных образцов. Буферные растворы (ФСБТ, ЦФР) и таблетки ОФД обычно менее чувствительны к изменению температуры хранения.

Методика подготовки одноразовых наконечников для пипеток к повторному использованию

- Наконечники для автоматических пипеток желательно использовать однократно. Предлагаемая ниже методика рассчитана только на такие лаборатории, у которых нет возможности однократного использования наконечников.

- Замачивание в 6 % растворе перекиси водорода, содержащем 0.5 % жидкого моющего средства (типа жидкости для мытья посуды серии “Клер” по ТУ 2383-001-26332142-99) или хозяйственного мыла (50 г на 10 л воды) на 24 часа. *Внимание!* Категорически запрещается использовать МС в виде любых стиральных порошков!

- Промывка 10 раз холодной водой.

- Промывка 2 раза дистиллированной водой.

- Кипячение в третьей порции дистиллированной воды не менее 40 минут.

- Сушка в сухожаровом шкафу при 80 °С не менее 5-6 часов до полного высыхания.

- Раскладка наконечников в штативы только пинцетом!

- Желательно разделить наконечники на предназначенные для работы с конъюгатом, с сыворотками, с растворами хромогенов (отдельно ТМБ и ОФД), не допуская последующего их перемешивания.

- Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с остальными реагентами, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами. В случае повторного использования посуду (ванночки), наконечники для пипеток промыть проточной водой, тщательно и многократно ополаскивая дистиллированной водой.

- Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, используемые для работы с хромогеном, в случае повторного использования, сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой. Посуду (ванночки), наконечники для пипеток, предназначенные для работы с ОФД, не использовать для работы с ТМБ.

- При промывке планшета лунки заполнять полностью (0,3 мл промывочного раствора) и не касаться лунок наконечниками пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 10 сек.

- При использовании автоматического вошера или гребёнки необходимо следить за состоянием ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть заростов. Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

- Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

Работа с сыворотками

Следует учитывать, что сыворотки и типичные разводящие растворы для сывороток могут различаться по плотности и вязкости. Поэтому при приготовлении разведений их следует тщательно перемешать пипетированием.

- Желательно использовать свежесобранные образцы сыворотки (плазмы) крови. Допускается использование образцов, хранившихся при 2-10 °С не более 5 суток, либо при минус (20 ± 3)°С не более 1 мес.

- Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

- Для скорейшего формирования фибринового сгустка (*не превратившийся в фибрин фибриноген может быть источником ложнопозитивных реакций*) выдержать пробирки с кровью в термостате при 37°С 30 мин, а затем центрифугировать при 1000-1500 об/мин 20 мин или при 3000 об./мин 10 мин.

- Старайтесь избегать пользоваться стеклянной палочкой или иными предметами для обведения сыворотки крови. Устраняйте образовавшуюся на поверхности сыворотки крови плёнку стряхиванием пробирки!

Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счет автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) – ИФА в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

Лабораторная работа 18. Определение уровня АТ к нДНК.

Оборудование:

Планшеты для иммуноферментного анализа однократного применения; центрифуга К-24; магнитная мешалка; спектрофотометр СФ-16; мультискан; рН-метр; дозаторы переменного объема, наконечники; фильтровальная бумага; центрифужные пробирки.

Материалы:

Набор сывороток здоровых доноров, сыворотка СКВ и кролика; раствор ДНК эритроцитов цыплят (1мг/мл); конъюгат пероксидазы хрена с антителами козы против IgG человека; цитратный буфер (ЦБ) - рН 4,95-5,0; фосфатно-солевой буфер (ФСБ) - рН 7,2-7,4; твин; перекись водорода (H_2O_2) - 33 %; ортофенилендиамин (ОФД).

Подготовка реагентов и комментарии

1. Подготовка сыворотки. Кровь отбирается из локтевой вены в пробирки в количестве 7 мл, прогревается в течение 1ч при 37°C. Образовавшийся сгусток отслаивается, оседает на дно, сверху ормируется сыворотка.

- Сыворотка дозатором отбирается в мерные пробирки, центрифугируется в течение 5 минут при 1000 - 1500g. Надосадочная жидкость снова центрифугируется 10 минут при 3000 - 5000 g.

- Сыворотка, используемая для проведения ИФА, прогревается при температуре 56°C в течение 40 минут для инактивирования системы комплемента. Полученную сыворотку разливают по 100 мкл в пробирки Эппендорф и замораживают. *Внимание! Повторно образцы не замораживать.*

2. Подготовка раствора ДНК. Готовится запасной водный раствор ДНК (1 мг/мл).

- Определяется концентрация раствора ДНК спектрофотометрически из расчета: раствор ДНК с концентрацией 1 мг/мл имеет оптическую плотность 22 сф.ед.

- Раствор ДНК разливается на аликвоты по 200мкл и замораживается. Перед проведением ИФА готовится рабочий раствор ДНК на цитратном буфере, исходя из концентрации запасного раствора ДНК.

3. Подготовка планшета. Планшет облучается ультрафиолетовым светом в течение 2 ч.

- Планшет храниться при комнатной температуре, защищенный от пыли, в течение 3 суток.

- После облучения планшет используется через 30 мин. *Внимание!* Для работы не годятся планшеты, предназначенные для работ с клеточными культурами.

Схема постановки реакции:

1. Сорбция антигена.

- Раствор ДНК в ЦБ (рН 4,95 - 5,0) с концентрацией 10мкг/мл вносится в лунки планшета по 100мкл на лунку.

- Планшет инкубируется в течение ночи при комнатной температуре.

- По окончании инкубации раствор ДНК удаляется встряхиванием планшета.

- Планшет три раза промывается фосфатно-солевым буфером с твином (ФСБТ - 0,01 М, рН 7,2 - 7,4). Для этого лунки заполняются буфером по 300 мкл и встряхиванием буфер удаляется.

2. Внесение антител.

- Сыворотка разводится в 100раз ФСБТ.

- В каждую лунку с сорбированным антигеном вносится по 100мкл рабочего образца.

- Планшет с нанесёнными антителами инкубируется в течение 1,5 ч при температуре 37°C и 0,5 ч при температуре 4°C.

- По окончании времени инкубации сыворотка, встряхиванием планшета, удаляется. Планшет три раза промывается ФСБТ.

3. Внесение конъюгата.

- Рабочий раствор конъюгата на ФСБТ готовится перед внесением в лунки. *Внимание!* Рабочий раствор конъюгата хранению не подлежит.

- Конъюгат вносится по 100мкл на лунку планшета.

- Инкубируется 1,5 ч при 37°C и 0,5 ч при 4°C .

- По окончании времени инкубации раствор конъюгата, встряхиванием планшет, удаляется. Планшет три раза промывается ФСБТ и три раза дистиллированной водой.

4. Внесение субстратной смеси.

•Субстратную смесь готовят непосредственно перед внесением в лунки планшета из расчёта: 10 мл ЦБ/ 0,004 г ОФД/14 мкл H_2O_2 33 % - ного раствора на один планшет.

•Вносится по 100 мкл.

•Планшет с внесённой субстратной смесью инкубируется 0,5 часа в темноте при комнатной температуре.

•Уровень ответа цветной реакции определяется на Мультискане при длине волны 492 нм непосредственно после окончания реакции.

Внимание! По окончании работы планшеты ополаскиваются от реакционной смеси водопроводной водой и выбрасываются в контейнеры.

Оценка результатов:

1.Записать в виде таблицы полученные данные оптической плотности (E_{492})исследованных образцов.

2. Построить диаграмму зависимости оптической плотности образцов от вида сыворотки.

Вывод:

Сделать вывод о наличии АТ к ДНК в образцах.

СПИСОК БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

1. Аденин - пуриновое азотистое основание в составе нуклеотида ДНК.

2. Активный центр ферментов. В определенном месте (это определяется четвертичной структурой фермента) образуется полость, её входное отверстие имеет очень точную форму. Именно это «устье» и является активным центром фермента (определенная последовательность аминокислот). Активный центр формируют особые химические группы в молекуле фермента, ориентированные друг относительно друга определенным образом. Потеря ферментативной активности связана именно с изменением взаимной ориентации этих групп.

3. Аминокислоты (АК) - мономеры белков, представляют собой производные карбоновых кислот, в углеводородном радикале которых один или несколько атомов водорода замещены аминогруппами NH_2 .

4. Антиген. Вещество, воспринимаемое организмом как чужеродное и вызывающее специфический иммунный ответ, что сопровождается выработкой антител, взаимодействующих с А.; элементарным А. является эпитоп. Антитело. Белок, иммуноглобулин, синтезируемый иммунной системой в ответ на введение в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий; образование А. - один из основных процессов формирования иммунитета; А. человека относятся к 5 классам иммуноглобулинов - IgM, IgG, IgA, IgE, IgD

5. Апоптоз или запрограммированная смерть клетки, представляет собой процесс, посредством которого внутренние или внешние факторы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки и ее эффективному удалению из ткани. Апоптоз – это биохимически специфический тип гибели клетки, который характеризуется активацией нуклеолизомных эндонуклеаз, которые расщепляют ядерную ДНК на маленькие фрагменты. Морфологически апоптоз проявляется гибелью единичных, клеток, а именно в клампинге хромосом, фрагментациях ядра, конденсации цитоплазмы и пузырьковидных вздутиях мембран, что сопровождается формированием округлых, окруженных мембраной телец (“апоптотические тельца”), которые тут же фагоцитируются окружающими клетками. При замедлении процесса апоптоза происходит накопление клеток, пример – опухолевый рост. При увеличении апоптоза наблюдается прогрессивное уменьшение количества клеток в ткани, пример – атрофия.

6. Белок. Высокомолекулярное органическое соединение, состоящее из 1 или нескольких полипептидных цепей, построенных из остатков аминокислот (в основном 20 α-L-аминокислот), соединенных пептидными связями; Б., являясь по большей части ферментами, играют ключевую роль в жизнедеятельности всех организмов и характеризуются чрезвычайно высоким структурным и функциональным разнообразием, единой классификации ББ. пока нет; существует 4 уровня структурной организации Б. - первичная, вторичная, третичная и четвертичная; аминокислотная последовательность Б. отражает структуру его гена (генетического кода) и потому является маркером эволюционных процессов.

7. Белки - природные высокомолекулярные органические соединения, построенные из остатков 20 аминокислот, которые соединены пептидными связями (-CO-NH-) в длинные цепи (полипептид). Белок - это отдельный полипептид или агрегат нескольких полипептидов, выполняющий биологическую функцию. Полипептид - понятие химическое. Белок - понятие биологическое.

8. Бромистый этидий. Краситель из группы фенантридинов, интеркалирующий агент, т.е. вещество, способное встраиваться между основаниями ДНК, что приводит к увеличению расстояния между ними; интеркаляция Б.э. сопровождается раскручиванием суперспирализованных участков ДНК.

9. Ген - участок ДНК, контролирующий формирование какого-либо элементарного признака.

10. Генетический код - это система записи информации о последовательности расположения аминокислот в белках с помощью последовательности расположения нуклеотидов в ДНК. Единая система записи наследственной информации в ДНК.

11. Геном - полный набор генов организма.

12. Гистоны - основные белки, образующие с ДНК комплексы в хромосоме.

13. Гуанин - пуриновое азотистое основание в составе нуклеотида ДНК.

14. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Носитель генетической информации, записанной в виде генетического кода.

15. Дальтон-единица молекулярной массы, равная массе атома водорода: 1,6710⁻²⁴ г.

16. Иммуноглобулины. Антитела - сложные белки, которые специфично связываются с чужеродными веществами - антигенами.

17. Импульсная метка- ^3H -тимидин (нуклеозид-тимин+дезоксирибоза), меченый радиоактивным изотопом водорода-тритием (^3H).

18. Кодон (триплет) - последовательность трех нуклеотидов в молекуле ДНК (или мРНК), кодирующая одну из аминокислот в молекуле белка или определяющая «знаки пунктуации» при считывании информации.

19. K_m - константа Михаэлиса. Кинетический параметр ферментативной реакции, численно равный концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной; $K.M.$ характеризует сродство фермента к субстрату.

20. Молекулярная биология. Наука о свойствах и проявлениях жизни на молекулярном уровне; становление М.б. приурочено к 50-м гг. XX в.; основные направления М.б. - молекулярная генетика, молекулярная вирусология (изучает молекулярные механизмы взаимодействия клетки и вируса), молекулярная иммунология (изучает закономерности иммунных реакций организма) и др.

21. Нативный, природный. Характеризует вид в пределах его естественного ареала; также характеризует макромолекулу, находящуюся в биологически активной форме (Н. структура белка и т.п.).

22. Нуклеаза. Фермент, катализирующий реакцию гидролиза фосфодиэфирных связей полипептидных цепей с образованием моно- и олигонуклеотидов; по специфичности действия различают экзонуклеазы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, рестриктазы.

23. Нуклеиновая кислота, полинуклеотид. Универсальный биополимер, состоящий из рибо- или дезоксирибонуклеозидмонофосфатов, соединенных фосфодиэфирными связями, образованными между 5'-фосфатом одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой следующего; молекулярная масса н.к. может достигать 10^{10} ; различают (по типу входящих сахаров) 2 основных типа н.к. - ДНК и РНК, главная роль н.к. - хранение и передача генетической информации; термин «н.к.» предложен в 1889 (впервые н.к. обнаружена в сперматоцитах лосося Ф.Мишером в 1868)

24. Нуклеопротеид (хроматин)- ДНК с белками.

25. Нуклеосома - участок хроматина, состоящий из двухцепочечной ДНК (около 200 пар оснований), навитой на белковую сердцевину (кор, состоящий из молекул белков-гистонов).

26. Нуклеотид - мономер ДНК или РНК, в состав которого входят азотистые основания, углевод и остаток фосфорной кислоты.

27. Нуклеотиды. Нуклеозидфосфаты. Фосфорные эфиры нуклеозидов. Состоят из азотистого основания (обычно пуринового и пиримидинового),

углевода рибозы или дезоксирибозы и одного или нескольких остатков фосфорной кислоты.

28. Опалесценция. При боковом освещении белковых растворов лучи света в них становятся видимыми и образуют светящийся конус – эффект Тиндаля. Объясняется этот светорассеивающий эффект дифракцией лучей света частицами белка или олигонуклеотидов в растворе.

29. Правило пар оснований. Правило комплементарности оснований в молекуле нуклеиновой кислоты - А-Т и Г-Ц в ДНК и У-Т и Г-Ц в РНК

30. Пара комплементарных оснований (п.о.) - комплементарные основания противоположных цепей в молекуле ДНК. Часто пишут пара нуклеотидов (п.н.). Средний молекулярный вес п.н. (находящейся в виде натриевой соли) равен 664.

31. Пептидная связь. Разновидность амидной связи, образуется между α-карбоксовой и α-аминогруппой двух аминокислот

32. Плазмиды - Внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и редупликации в цитоплазме; представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК длиной в 1-200 тыс. пар нуклеотидов, обычно кольцевую, хотя у некоторых растений и грибов известны линейные П.; к П. относятся различные специализированные бактериальные факторы (F-фактор и т.п.); П. выполняют разнообразные функции (индукции колицина, половую, лекарственной устойчивости и др.) и могут обеспечивать содержащим их клеткам селективное преимущество; как правило, они препятствуют проникновению в клетку др. П. того же типа, используя механизмы поверхностного исключения и плазмидной несовместимости

33. Полипептид - последовательность аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидной связью. Конструкция полипептидной цепи одинакова для всего многообразия пептидов. Имеет неразветвленное строение

34. Полуконсервативная репликация - осуществляется за счет разделения нитей двухцепочечной молекулы ДНК и последующего использования каждой из материнских цепей в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи. Таким образом, в результате полуконсервативного механизма репликации дочерние молекулы ДНК состоят из одной материнской цепи и одной вновь синтезированной цепи.

35. Прокариоты. Организмы, клетки которых лишены ограниченного мембраной ядра; аналогом ядра является нуклеоид, генетическая система которого (генофор) соответствует примитивной хромосоме; митоза у П. нет, клетки-П. лишены хлоропластов, митохондрий, аппарата Гольджи,

центриолей, а рибосомы существенно отличаются от рибосом эукариотических клеток; П. составляют отдельное царство (возможно, надцарство), включающее одноклеточные (архебактерии, эубактерии) и многоклеточные (синезеленые водоросли, или цианобактерии) организмы; термин “П.” предложен в 1937 Э.Шаттоном, который впервые сформулировал принципиальные различия П. и эукариот

36. Радиоактивная метка. Вещество, содержащее радионуклид, введенное в исследуемый объект, - например, при анализе механизмов репликации ДНК часто используется меченный тритием тимидин (предшественник ДНК); среди широко используемых в молекулярно-генетических и цитогенетических исследованиях Р.м. - соединения, включающие ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S и др.

37. рН –это отрицательный десятичный логарифм (обозначается буквой «р») молярной концентрации водородных ионов (H^+). $\text{pH} = -\lg[\text{H}^+] = -\lg 10^{-7} = 7$. Концентрация водородных ионов является мерой кислотности среды. В кислых растворах $[\text{H}^+]$ больше, чем 10^{-7} , т.е. $\text{pH} < 7$. В щелочных растворах $[\text{H}^+]$ меньше, чем 10^{-7} и $\text{pH} > 7$.

38. Репарация - восстановление поврежденной структуры ДНК.

39. Репликативная вилка (репликон) - часть молекулы ДНК, в которой осуществляется синтез новой цепи ДНК в одноцепочечной форме.

40. Репликация - удвоение ДНК. Процесс, при котором информация, закодированная в последовательности нуклеотидов молекул родительской ДНК, передается с максимальной точностью дочерней ДНК.

41. РНК - рибонуклеиновые кислоты - одноцепочечные полимерные молекулы нуклеиновых кислот, участвующие в процессах биосинтеза белка и выполняющие разные функции (см. мРНК, тРНК рРНК гяРНК).

42. Сайт - участок молекулы нуклеиновой кислоты.

43. Структурная организация ДНК. Первичная структура – полинуклеотидная цепь, вторичная структура – 2 комплементарные друг другу и антипараллельные полинуклеотидные цепи, соединённые водородными связями, и третичная структура – трёхмерная спираль. Молекула ДНК, состоящая из двух цепей, образует спираль, закрученную вокруг собственной оси. Диаметр спирали составляет 2 нм, длина шага 3,4 нм. В каждый виток входит 10 пар нуклеотидов.

44. Субстрат. Вещество, подвергающееся превращению в присутствии фермента.

45. Терминация - завершение процесса.

46. Тимин - пиримидиновое азотистое основание в составе нуклеотида ДНК.

47. Транскрипция - синтез РНК на матрице ДНК.
48. Трансляция - синтез белка на матрице иРНК (мРНК).
49. тРНК (транспортная) - переносит специфические аминокислотные остатки к определенному участку мРНК в рибосоме.
50. Урацил - пиримидиновое азотистое основание в составе нуклеотида РНК.
51. Ферменты. Вещества белковой природы, являются биокатализаторами. Большинство ферментов наиболее активны в растворах, рН которых близок к изоэлектрической точке. Все реакции клеточного метаболизма осуществляются под контролем биокатализаторов – ферментов, структура которых записана в ДНК генов.
52. Фрагменты Оказаки - короткие фрагменты вновь синтезированной ДНК, образуемые в результате прерывистой репликации отстающей нити, впоследствии соединяемые в непрерывную цепь.
53. Хроматин - представляет собой молекулу ДНК в комплексе с белками. Хроматин является интерфазной формой существования хромосом клетки.
54. Хромосомы - суборганойды ядра, видимые в период деления клетки, имеют определенную форму и структуру, содержат большое число генов, способны к самовоспроизведению.
55. Цитозин - пиримидиновое азотистое основание в составе нуклеотида ДНК.
56. Электронный микроскоп. Высоковольтный вакуумный прибор, в котором увеличенное изображение объекта получают с помощью потока электронов, разрешающая способность Э.м. достигает 0,1 нм; основными типами Э.м. являются сканирующий (растровый) и трансмиссивный (просвечивающий)
57. Электрофорез. Направленное перемещение заряженных частиц в дисперсионной среде под действием внешнего электрического поля; в генетике Э. широко используется для разделения биологических макромолекул - белков, нуклеиновых кислот, антигенов и антител (иммуноэлектрофорез), мелких хромосом (получение электрокариотипов) и др.; при использовании определенных сред (гелей) подвижность различных макромолекул становится функцией не только их заряда, но и их молекулярной массы; Э. был открыт Ф.Ф.Рейссом в 1807, а в биологии его использование было начато в 30-е гг. XX в. А.Тизелиусом, сконструировавшим первый прибор для электрофоретического разделения белков.

58. Экзонуклеаза. Фермент, последовательно отщепляющий нуклеотиды от конца молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК)

59. Эндонуклеаза. Фермент, способный осуществлять гидролиз внутренних фосфодиэфирных связей и таким образом расщеплять молекулы ДНК или РНК; Э. участвуют в рекомбинации, репарации, а Э., участвующие в рестрикции, называют рестриктазами.

60. Эукариоты. Организмы (высшие животные и растения, грибы, одно- и многоклеточные водоросли - кроме сине-зеленых - и простейшие), клетки которых содержат сформированное ядро; ядерная ДНК входит в состав хромосом, содержащих гистоны и некоторые негистоновые белки, и организована в виде хроматина; термин "Э." предложен Э.Шаттоном в 1937, он впервые установил принципиальные отличия Э. и прокариот; одним из наиболее древних Э. признается лямблия

61. Ядро - жизненно важный органоид эукариотических клеток, особенностью которого является наличие генетического материала (ДНК).

ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ

Для тех размеров и тех количеств вещества, с которым приходится иметь дело на клеточном и субклеточном уровне, используются соответствующие единицы измерения. К подобным единицам длины относятся, например, микрон и нанометр. Массу выражают в нанограммах или пикограммах или дальтонах.

Единицы измерения:

1г(грамм) = 1000 мг(милли-) = 10^6 мкг (микро-) = 10^9 нг (нано-) = 10^{12} пг (пико-)

1kb(килобаза) = 1000 в.р. (пар оснований – п.о.).

1 Да (дальтон) = 1/12 массы атома углерода (^{12}C). ^{12}C - изотоп углерода, атомный вес которого равен 12.

| | |
|---------------------------------------|--|
| 1 см = 10 мм | 1 г = 1000мг |
| 1 мм = 1000 мкм | 1 мг = 1000 нг |
| 1 мкм = 10^{-6} м | 1 нг = 10^{-9} г |
| 1 нм = 10^{-12} м = 10 Å (ангстрем) | 1 пг = 10^{-12} г = $0,7 \cdot 10^{12}$ Да |
| 1 Å = 0,1 нм | 1 Да = $1,66 \cdot 10^{-24}$ г |

Количество вещества, молекулярная масса и дальтон, молярная концентрация.

Молярность (М или моль/л) – число молей растворенного веществ, содержащихся в 1 л раствора.

Моляльность (м) – число молей растворенного вещества, содержащихся в 1000 г растворителя.

Нормальность (н.) – число химических эквивалентов растворенного вещества, содержащихся в 1 л раствора.

Мольная доля (безразмерная величина) – число молей данного компонента, отнесенное к общему числу молей растворенного вещества и растворителя. (Мольный процент – мольная доля, умноженная на 100.)

Наиболее распространенная единица – молярность. Например, чтобы получить 1М раствор данного вещества, растворяют в заведомо небольшом количестве воды точную его навеску, равную мол. массе в граммах, и доводят объем раствора до 1 л.

В Международной системе единиц СИ за единицу количества вещества (*n*) принят моль – количество вещества, содержащее столько же структурных единиц (молекул, атомов, ионов, электронов или др.), сколько атомов углерода содержится в 0,012 кг углерода -12.

Молярная масса (M) – масса 1 моля вещества (m/n), имеет размерность г/моль. Масса вещества (m , г), количество вещества (n , моль) и молярная масса (M , г/моль) – понятия разные и между ними существует простое соотношение: $m = nM$.

Для обозначения массы биомолекул преимущественно используют величины *относительной молекулярной массы* (Mr , прежнее наименование – «молекулярный вес») – это отношение массы молекулы вещества к 1/12 массы атома углерода, следовательно, величина безразмерная, и

молекулярной массы – массы одной молекулы вещества, выраженной в дальтонах. Например: про некий белок можно сказать, что он имеет относительную молекулярную массу 50 000 ($Mr = 50\ 000$) или молекулярную массу 50 000 Да (лучше 50кДа).

При описании растворов следует давать **молярную концентрацию** (M , мМ, мкМ и т.д.), показывающую, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора. Концентрацию указывают в десятичной системе (например, 0.25 М HCl). Использование процентных выражений концентрации следует уточнять дополнением: m/m или m/v или v/v , например, 5%-ный раствор (m/v) означает взято 5 г на 100 мл.

Для растворов солей, выраженных в процентах, следует указывать, были ли использованы кристаллогидраты или безводные соли.

Спектрофотометрические перерасчеты:

- двухцепочечная (дц) ДНК: $E_{(260)} = OD_{(260)} = 1$ для раствора с концентрацией 50 мкг/мл.
- одноцепочечная (оц) ДНК: $E_{(260)} = OD_{(260)} = 1$ для раствора с концентрацией 33 мкг/мл.
- РНК: $E_{(260)} = OD_{(260)} = 1$ для раствора с концентрацией 40 мкг/мл.
- Смесь-(дц)ДНК+(оц)ДНК: $E_{(260)} = OD_{(260)} = 22$ для раствора с концентрацией 1 мг/мл.

Молекулярный вес нуклеиновых кислот:

- 1 Да = 1/12 массы одного ^{12}C
- 1kb дц ДНК = 650 000 Да
- 1kb оц ДНК = 325 000 Да
- 1kb РНК = 340 000 Да
- Средний молекулярный вес дезоксирибонуклеотида (дНТФ) = 325 Да
- 1 kb ДНК (1000 п.о.) кодирует полипептид размером в 333 аминокислотных остатка и весом в 37 000 Да
- 1 кодон = 3 п.н. = 1 АК; 1 ген ~100 п.н.; 1 п.н. ≈ 664 Да.

Перерасчет пМоль дц ДНК в мкг и обратно:

$$m_{\text{(масса, мкг)}} = [n_{\text{(пМоль)}} \times N \times 650] / 1000000,$$

где **N**- размер фрагмента ДНК в bp (парах оснований), **n** –количество ДНК.

Пример:

10 пМоль рUC 19(n) 2686 п.о.(N) соответствуют $(10 \times 2686 \times 650) / 1000000 = 17.4$ мкг(m).

ОБЩЕПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

| | |
|----------------------|---|
| " с | секунды (по аналогии с угловыми мерами); |
| ' мин | минуты (по аналогии с угловыми мерами); |
| h (ч) | (hour) час; |
| + | добавить; |
| -> | перенести; |
| ρ | плотность; |
| Ф | «фенол» или «экстракция фенолом»; |
| Ф:Х | «фенол : хлороформ : изоамиловый спирт» =24:24:1 или «экстракция этой смесью»; |
| Х | смесь «хлороформ : изоамиловый спирт» = 24:1 или "экстракция этой смесью"; |
| ЦФ | центрифугировать; |
| Эппендорф | Центрифуга или микроцентрифужная пробирка от 0.2 до 2.0мл; |
| [cpm] | counts per minute (импульсов в мин); |
| bp (п.о.) | (base pairs –пар оснований; |
| kg | тысяч "g" (ускорение); |
| krpm | (kilo revolutions per minute) тысяча оборотов в минуту; |
| Rpm | (revolutions per minute) обороты в минуту; |
| M | молярная концентрация (моль/л) |
| NT | (normal temperature) комнатная температура (18-20°C |
| ON | (overnight) ночь; |
| v/v | объёмное процентное содержание (объем/объем) |
| m/v | смешанное процентное содержание (вес/объем) |
| m/m | весовое процентное содержание (вес/вес) |
| pDNA (pДНК) | плазмидная ДНК; |
| dsDNA (дцДНК) | (double strand DNA) двухцепочечная ДНК |
| ssDNA (оцДНК) | (single strand DNA) одноцепочечная ДНК; |
| нДНК | нативная ДНК |
| дДНК | денатурированная ДНК |
| БСА | бычий сывороточный альбумин |
| ДЭАЭ- целлюлоза | Диэтиламиноэтилцеллюлоза |
| ПААГ | полиакриламидный гель |
| ЭДТА-Na ₂ | этилендиаминтетраацетат |
| ДСН (Ds-Na) | додецилсульфат натрия |
| ТРИС | трис(гидроксиметил)аминометан |

СПИСОК, ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боуэн Т. Введение в ультрацентрифугирование. -М: Мир, 1973. 247с.
2. Винтер В.Г. Нуклеиновые кислоты опухолевых клеток //В сб.: Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост / Казань: Изд-во КГУ. - 1969. - 27с.
3. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. -М.: Мир, 1982 .- 446с.
4. Инге - Вечтомов С.Г. // Вестник РАН.- 2000. - Т.70, №4. - С.299-306.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. -М.: Высшая школа, 1980. - 272 с.
6. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул изоэлектрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. -М.: Наука, 1983. - 304с.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. -М.: Наука, 1981. - с.
8. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. - 536с
9. Практическая химия белка /ред. А. Дебре. - М.: Мир, 1989. - С. 17-32.
10. Сердюк И.Н. //Успехи биологической химии.- 2002.- Т. 42.-С.3-28.
11. Ферменты и нуклеиновые кислоты: учеб. пособие /под ред. В.Г. Владимирова, С.Н.Лызловой.-СПб.:Изд.С-Петербург.ун-та,1997.-152с.
12. Физико-химические методы исследования биополимеров и низкомолекулярных веществ/под ред. В.Т.Иванова. -М.: Наука, 1992.-405с.
13. Meselson M., Stahl F.W. // Proc. Nat. Acad. Sci. - 1958. - V.44.- P.671.
14. Okazaki R. // Meth. Enzymol. - 1971.- V.21.- P.296.
15. Taylor J.H.(ed) Selected papers on molecular genetics. New York: Acaltmic, 1965 (оригинальные работы Полинга, Херши и Чейза, Уотсона и Крика, Мезельсона).