

Базовые методы анализа протеинов
Хроматография, электрофорез,
изоэлектрофокусирование и другие
иммунохимические методы белкового анализа

- Лектор Храпова Н.П.

Изучение химической природы белков начинают с двух последовательных этапов:

- - выделение и очистка отдельных белков
- - анализ полученных фракций с целью выявления неоднородности этих фракций и последующего определения структуры этого компонента при условии его чистоты

В классических методах разделения белков учитывают характерные для разных типов молекул различия:

- в размерах
- форме
- растворимости
- электрическом заряде
- в способности белков к специфическому связыванию на основе иммунологического сродства (как основу для аффинной хроматографии)

Хроматография

История открытия

- Хроматография - метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ. Основан на распределении веществ между двумя фазами — неподвижной (твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе) и подвижной (газовая или жидкая фаза, *элюент*)
- Название метода связано с первыми экспериментами по хроматографии, в ходе которых **разработчик метода Михаил Цвет** разделял ярко окрашенные растительные пигменты.

Хроматография

История открытия



Михаил Семёнович Цвет

- **1872 Асти (Италия) – 1919 Воронеж (Россия)**
- 1893 — бакалавр физических и естественных наук (Женевский университет)
- 1896 — возвращение в Россию
- 1901 — защита магистерской диссертации в Казанском университете
- 1910 — защита диссертации в Варшавском университете «Хромофиллы в растительном и животном мире»

Хроматография

История открытия

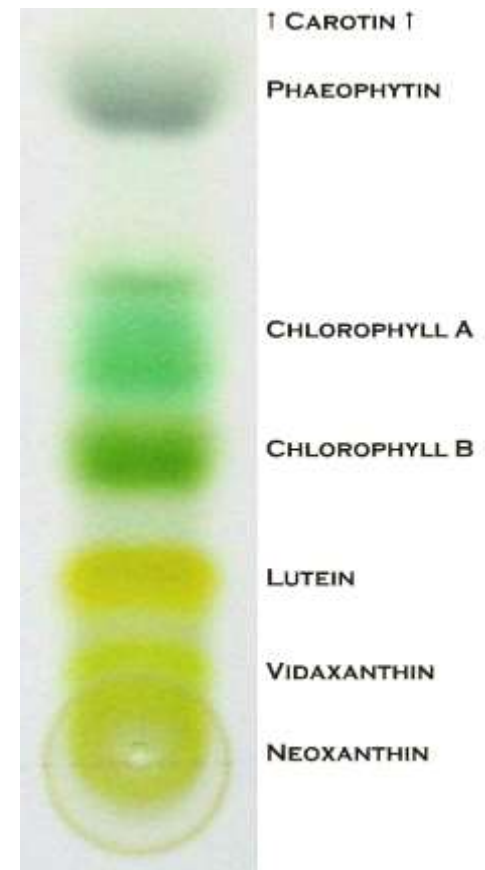


- Работал в Санкт-Петербурге, Варшавском университете, Москве, Нижнем Новгороде, Воронеже
- 1918 — январь — выдвижение на Нобелевскую премию (отказ)
- 1919 — умер от голода (по другим сведениям, от болезни), похоронен в Воронеже на территории монастыря

Хроматография

История открытия

- Первая хроматография проведена в 1900 году.
- М.Цвет использовал колонку, заполненную карбонатом кальция, для разделения пигментов растительного происхождения. Первое сообщение о разработке метода хроматографии было сделано Цветом в 1901 году на *XI Съезде естествоиспытателей и врачей* в С.-Петербурге
- В 1910—1930 годы метод был забыт и не развивался.
- В 1941 году А. Дж. П. Мартин и Р. Л. М. Синг разработали новую разновидность хроматографии, в основу которой легло различие в коэффициентах распределения разделяемых веществ между двумя несмешивающимися жидкостями. Метод получил название *«распределительная хроматография»*. Нобелевская премия 1952 года.



Хроматография

Общие понятия

- **Хроматография** — метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.
- **Подвижная фаза** (элюент): газ, жидкость или (реже) сверхкритический флюид.
- **Неподвижная фаза** — твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе, в адсорбционной хроматографии — сорбент.
- **Колонка** — содержит хроматографический сорбент, в ней происходит разделения смеси на индивидуальные компоненты.
- **Хроматограмма** – регистрируемый на детекторе результат зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени.

В классических методах разделения белков учитывают характерные для разных типов молекул различия:

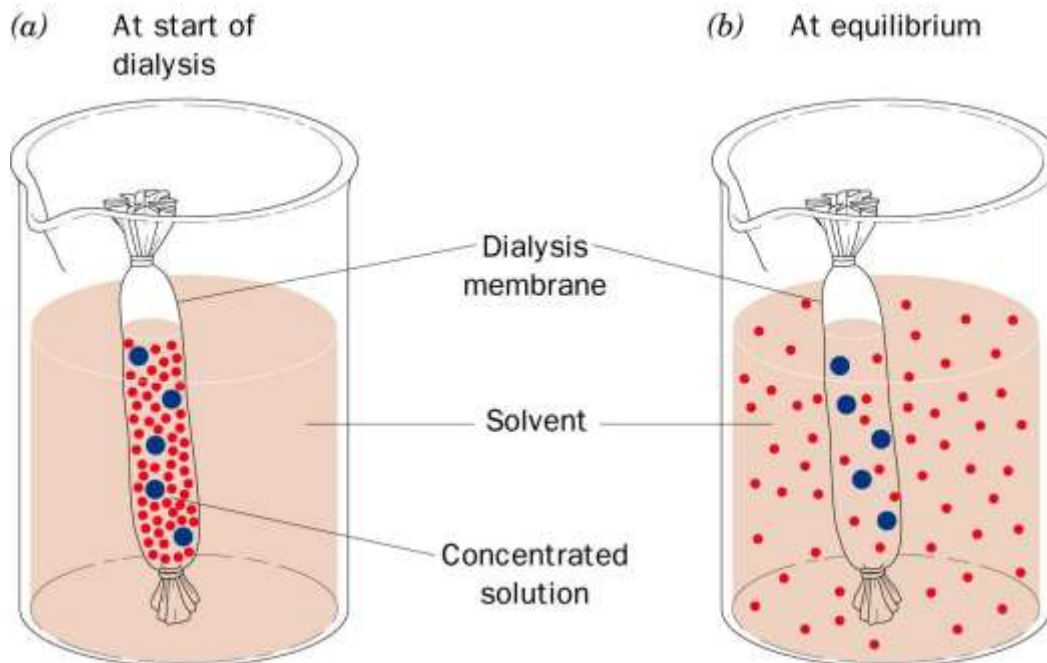
- - в размерах
- - форме
- - растворимости
- - электрическом разряде
- - в способности белков к специфическому связыванию на основе иммунологического сродства (как основу для аффинной хроматографии)

- При разделении белков используют различные методы:

- - высаливание
- - диализ
- - электрофорез
- - ультрацентрифугирование
- - хроматографические методы

Диализ как метод очистки от низкомолекулярных примесей

- Диализ - очистка коллоидных растворов и субстанций высокомолекулярных веществ от растворённых в них низкомолекулярных соединений при помощи полупроницаемой мембраны.
- При диализе молекулы растворенного низкомолекулярного вещества проходят через мембрану, а неспособные проходить через мембрану частицы остаются за ней.



- Процесс

Хроматография

В основу хроматографических методов положены разные принципы: гель-фильтрации, ионного обмена, адсорбции, биологического сродства

Классификация видов хроматографии по механизму взаимодействия:

- распределительная*
- ионообменная*
- адсорбционная*
- аффинная*
- гель- фильтрация и другие*

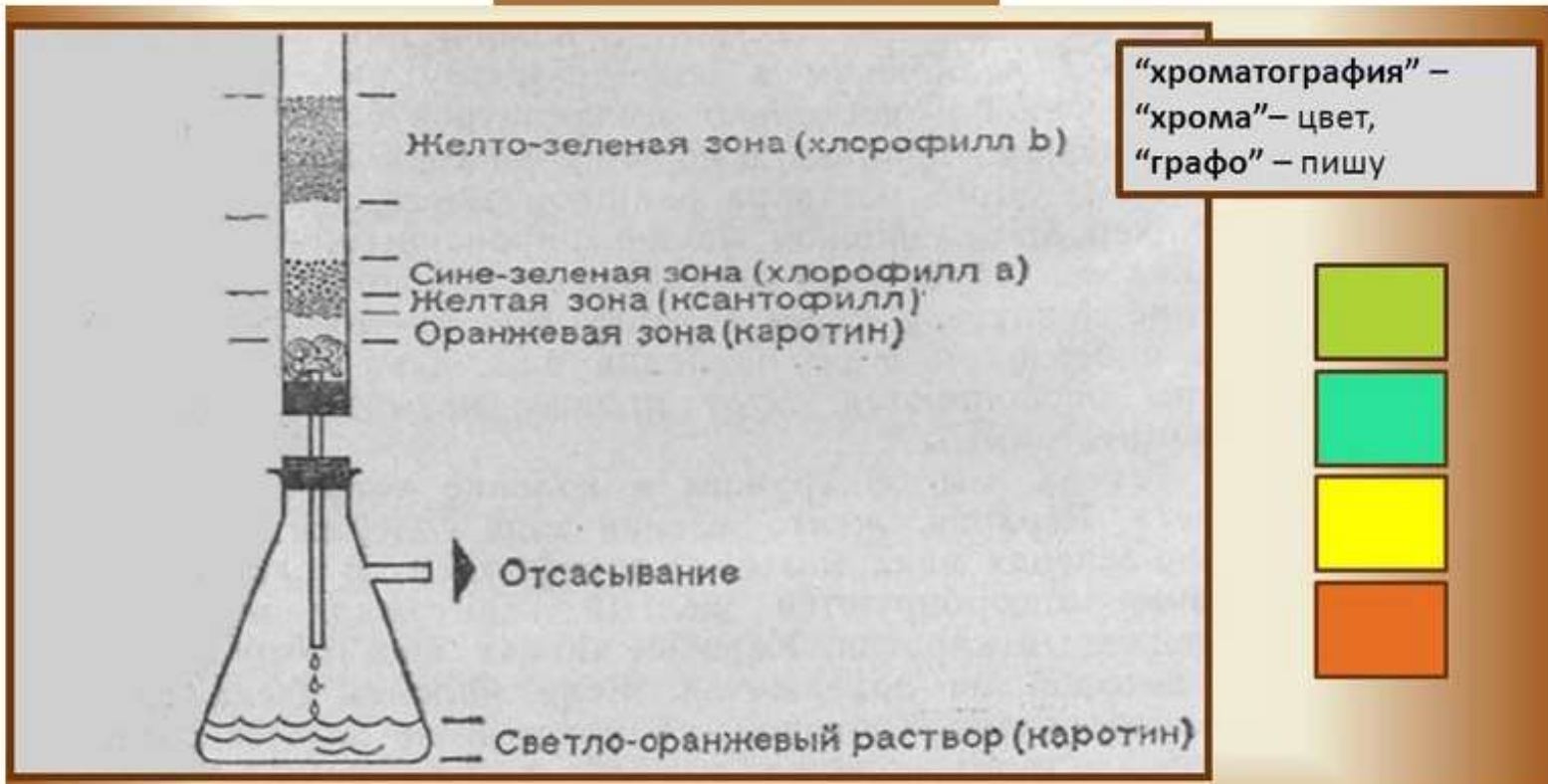
Распределительная хроматография

- Один из типов распределительной хроматографии осуществляется *на колонках*, в которых в качестве неподвижной фазы применяют влажный крахмал или силикагель

Образец растворяют в подходящем растворителе, затем вносят в колонку. Разделяемые вещества, подвергаясь многократному распределению между неподвижной стационарной фазой (водный слой) и движущейся фазой органического растворителя, с разной скоростью перемещаются ко дну колонки. При помощи коллектора фракций можно собрать пробы. Одна проба содержит одно вещество, которое можно выделить в чистом виде.

Хроматография – адсорбционный метод анализа

опыт М. С. Цвета



Распределительная хроматография на бумаге

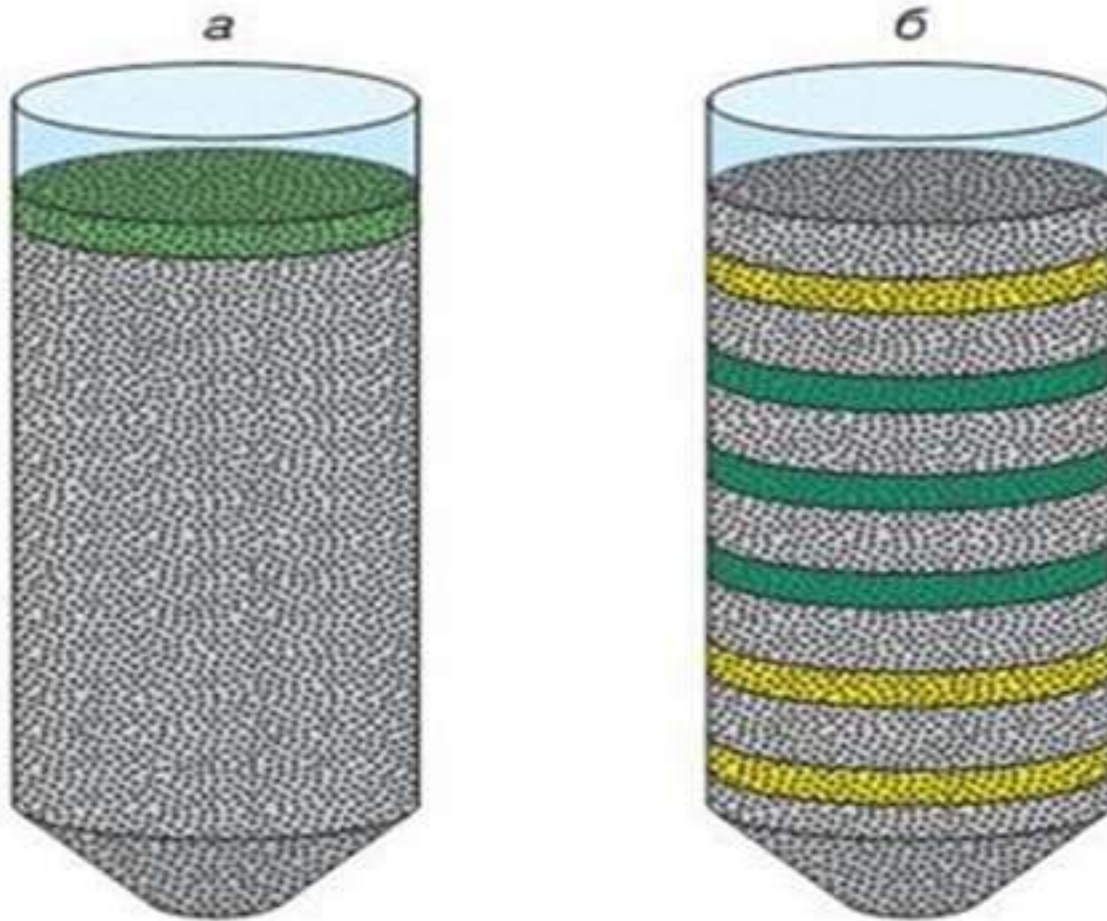
Она оказалась наиболее доступной для разделения аминокислот, отличающихся гидрофобностью радикалов. В качестве неподвижной фазы служит вода, а подвижной – смесь органических растворителей (например, бутанол-уксусная кислота-вода в определенных соотношениях). Образец помещают на одном конце бумажной полосы, этим же концом бумагу погружают в смесь, при движении растворителя по бумаге происходит разделение компонентов смеси. Хроматограмму проявляют и высушивают, а местоположение каждого из разделяемых веществ определяют химическими или физико-химическими методами

В практической работе меняют два варианта хроматографии: восходящую и нисходящую хроматографию

Адсорбционная хроматография

- Разделение компонентов смеси (образца) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте. В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния.
- Адсорбент в виде суспензии с растворителем (чаще всего буферным раствором) вносят в колонку и равномерно в ней упаковывают.
- Образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку, компоненты разделяемой смеси адсорбируются на сорбенте.
- Затем приступают к стадии освобождения-десорбции компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты. Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций

Адсорбционная хроматография



Гель-фильтрационная хроматография (ситовая, гель-проникающая)

- Разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы.
- При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы большей м.м., способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. В отличие от адсорбционной хроматографии, при гель-хроматографии, при гель-фильтрации стационарная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействуют.

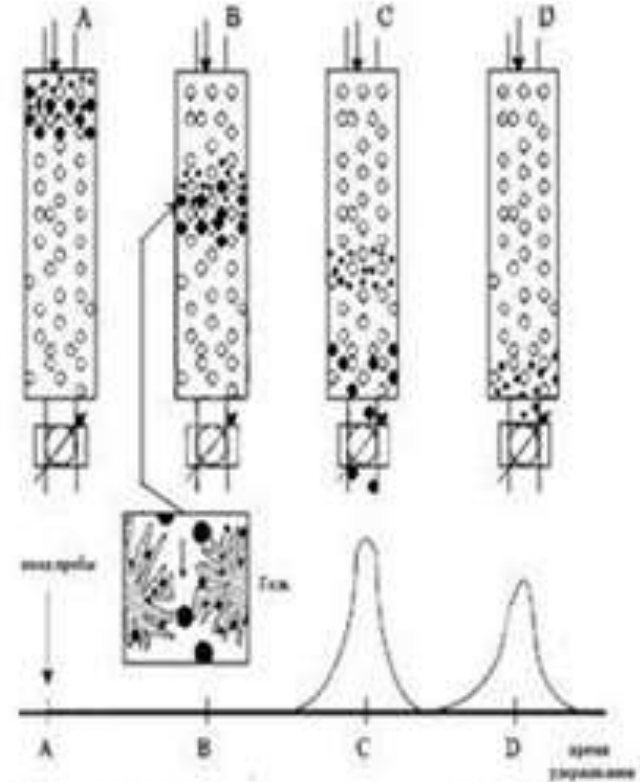
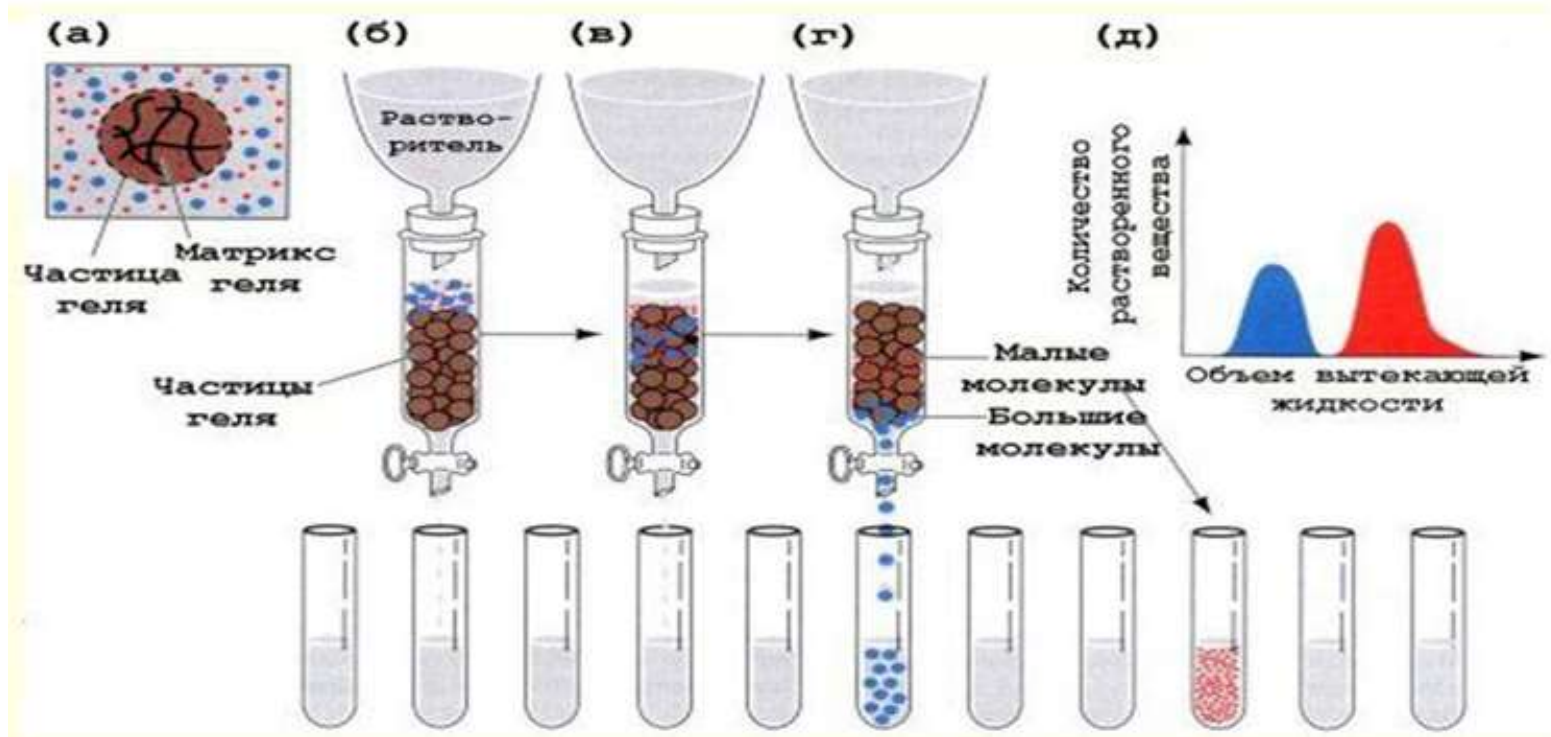


Рис. 1.20. Принцип разделения и детектирования пробы в эксклюзионной хроматографии. А – ввод образца; В – разделение по размерам; С – выход крупных макромолекул; D – выход мелких макромолекул

Гель-фильтрационная хроматография



- Хроматографическую колонку заполняют гранулами геля (сефадекс), который имеет поры определенной величины. В
- колонку вносят смесь белков. Белки, размер которых меньше, чем размер пор сефадекса, задерживаются в колонке, так как «застревают» в порах, а остальные свободно выходят из колонки. Размер белка зависит от его м.м.

Ионообменная хроматография

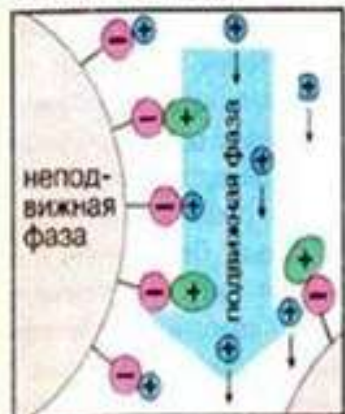
- Этот вариант хроматографии позволяет разделять ионы и полярные молекулы, на основании зарядов разделяемых молекул. Данный вид хроматографии позволяет разделить практически любые заряженные молекулы, в том числе: крупные белки, малые молекулы нуклеотидов и аминокислот.
- Неподвижная фаза имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда.
- Классифицируют два типа ионообменной хроматографии: катионная и анионная ионообменная хроматография.

Ионообменная хроматография

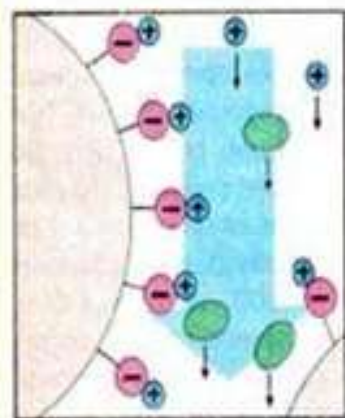
В зависимости от заряда разделяемых веществ используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается и задерживается на колонке часть соединений, в то время как другие беспрепятственно элюируются с колонки.

Осажденные на колонке вещества снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменения pH элюента.

1. Основы метода

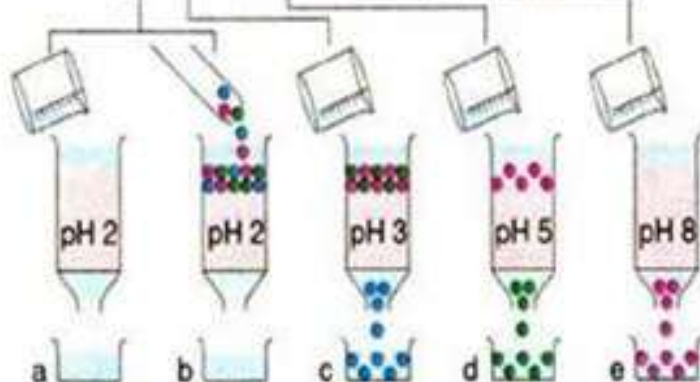
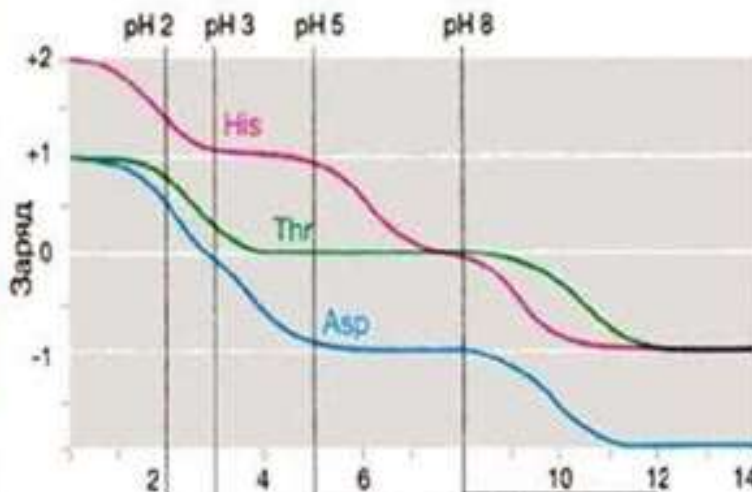


1а. Низкие значения pH



1б. Высокие значения pH

2. Графики диссоциации



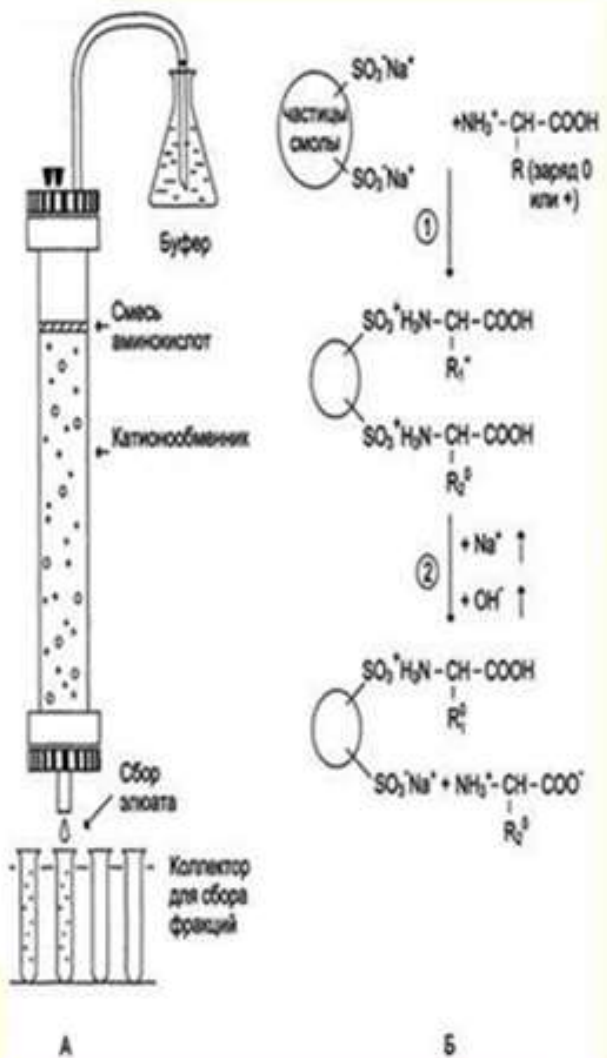
3. Элюирование в ступенчатом градиенте pH

А. Ионнообменная хроматография свободных аминокислот

Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии

- При разделении аминокислот методом ионообменной хроматографии в качестве неподвижной фазы используют гранулы полимера, несущие сульфогруппы (SO_3^-). Эти группы ионизированы во всем диапазоне pH и несут отрицательный заряд.
- Для подготовки к работе ионообменник помещают в колонку и промывают Na^+ -содержащим буферным раствором с pH 2. При этом сульфогруппа (красный цвет) связывает ионы натрия.
- Если теперь нанести на колонку раствор аминокислот (1а), то положительно заряженные аминокислоты (зеленый цвет) вытеснят ионы натрия и будут сорбированы на ионите.
- Поскольку аминокислоты не несут заряда в изоэлектрической точке, их элюируют с колонки буфером с более высоким значением pH (1б).
- В качестве примера приведен эксперимент (3) по разделению аспарагиновой кислоты, треонина и гистидина. Графики титрования (2) наглядно объясняют, почему три аминокислоты элюируются в указанной последовательности.
- Строго говоря, аминокислоты элюируются при величинах pH, значительно ниже изоэлектрических точек, поскольку за связывание с ионообменником конкурируют Na^+ -ионы буферного раствора.
- Смесь аминокислот разделяют в колонке с катионообменной смолой, которая содержит прочно связанные с ней отрицательно заряженные группы (например, остатки сульфоновой кислоты $-\text{SO}_3^-$), к которым присоединены ионы Na^+ .

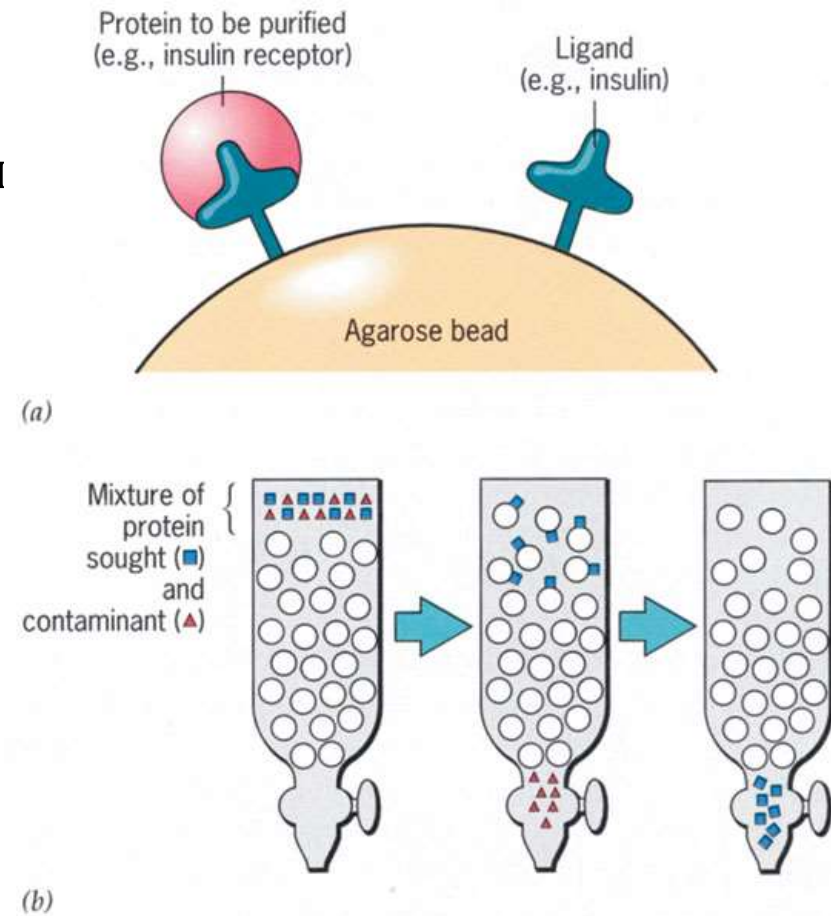
Ионообменная хроматография



- В катионообменник вносят смесь аминокислот в кислой среде (рН 3,0), где аминокислоты в основном представляют катионы, т.е. несут положительный заряд. Положительно заряженные аминокислоты присоединяются к отрицательно заряженным частицам смолы. Чем больше суммарный заряд аминокислоты, тем прочнее ее связь со смолой. Так, аминокислоты лизин, аргинин и гистидин наиболее прочно связываются с катионообменником, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты – наиболее слабо.
- Высвобождение аминокислот из колонки осуществляют элюированием их буферным раствором с увеличением концентрации NaCl и рН. При увеличении рН аминокислоты теряют протон, в результате уменьшается их положительный заряд, а следовательно и прочность связи с отрицательно заряженными частицами смолы.
- Каждая аминокислота выходит из колонки при определенном значении рН и ионной силы. Собирая с нижнего конца колонки раствор (элюат) в виде небольших порций, можно получить фракции, содержащие отдельные аминокислоты.

Аффинная хроматография

- Наиболее специфичный метод выделения индивидуальных белков, основанный на взаимодействии белков с лигандами, прикрепленными (иммобилизованными) к твердому носителю.
- В качестве лиганда может быть использован субстрат или кофермент. Через колонку, заполненную лигандом, пропускают смесь белков.
- К лиганду присоединяется только белок специфично взаимодействующий с ним, все остальные белки выходят с элюатом.
- Белок, адсорбированный на колонке, можно смыть раствором с измененным рН или ионной силы.



Электрофорез

- Электрофорез в геле – один из наиболее широко распространенных методов, обладающих высокой разрешающей способностью и высокой чувствительностью, но недостаточной эффективностью для целей препаративного разделения больших количеств белка.
- Электрофорез основан на свойстве заряженных молекул белка перемещаться в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду и молекулярной массе.
- Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важным параметрам, как размеры (или молекулярная масса), форма и электрический заряд. Именно различия в электрофоретической подвижности белков, содержащихся в анализируемой смеси, делают возможным разделение этих белков в пространстве, в разных зонах электрофореграммы.
- Эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Электрофоретическая подвижность белка зависит:

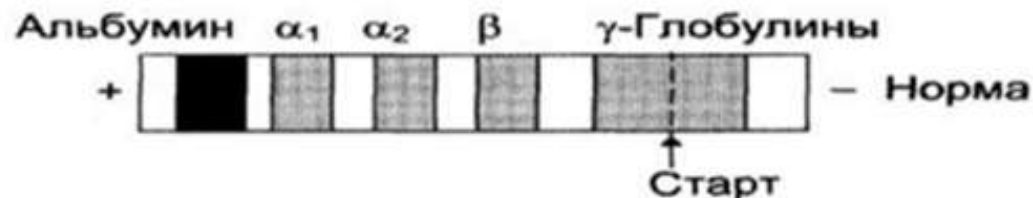
- - от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы),
- формы, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации,
- - от концентрации молекул,
- - от среды: ее вязкости, рН, температуры и ионной силы,
- - от характеристик используемого электрического поля
- Ввиду того, что размер молекулы является одним из факторов, определяющих подвижность белка в геле, было предпринято большое количество попыток получения информации о размере молекул, исходя из их подвижности. Не всегда они были успешными.
- Но были и успешные достижения. Так, с помощью ЭФ определена молекулярная масса фибриногена, в то время, как при использовании гель-фильтрации были получены ошибочные величины.
- В некоторых случаях первоначальное разделение можно провести методом изоэлектрического фокусирования.

Классификация электрофоретических методов

- ***По цели*** различают:
 - - аналитический
 - - препаративный
- ***По степени денатурации разделяемых белков*** различают:
 - - нативный электрофорез
 - - ЭФ в денатурирующих условиях
- ***По направлению фракционирования:***
 - - однонаправленное движение
 - - двумерный электрофорез

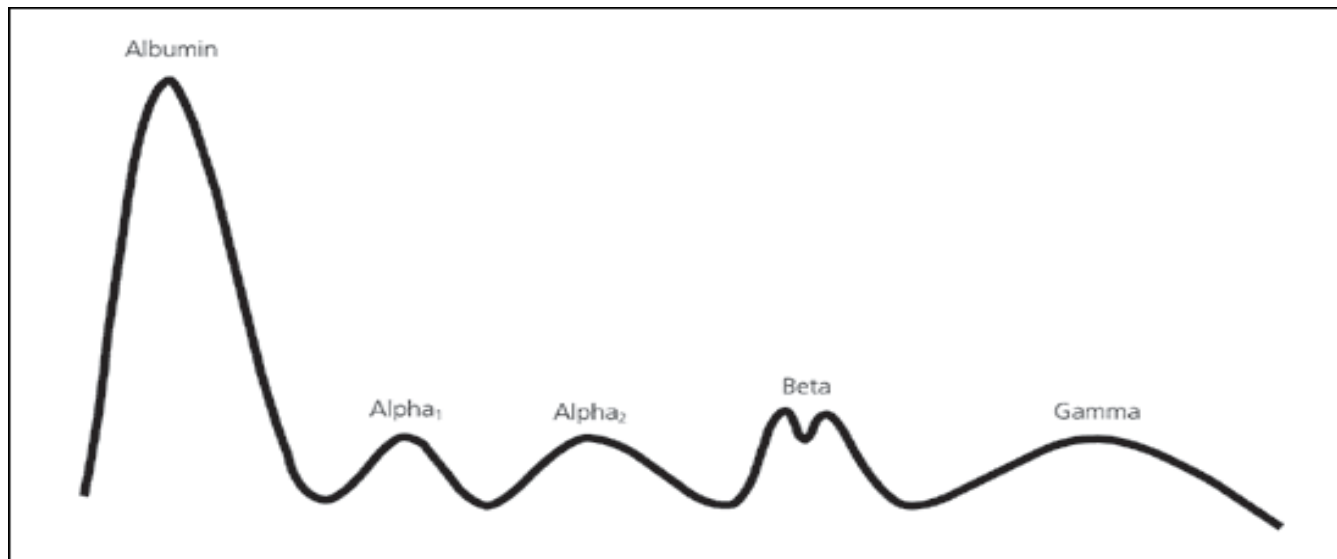
Электрофорез белков

- Под действием электрического поля макромолекулы белка в соответствии со своим суммарным зарядом и массой мигрируют в направлении катода или анода.
- Электрофорез проводят на носителях: бумаге, геле и проч. При выполнении электрофореза *на бумаге* скорость миграции белка зависит от заряда; при постановке электрофореза *в геле* скорость миграции белка зависит от молекулярной массы.
- Для обнаружения белковых фракций бумагу или гель обрабатывают красителем. Окрашенный комплекс белков выявляет расположение различных фракций на носителе.



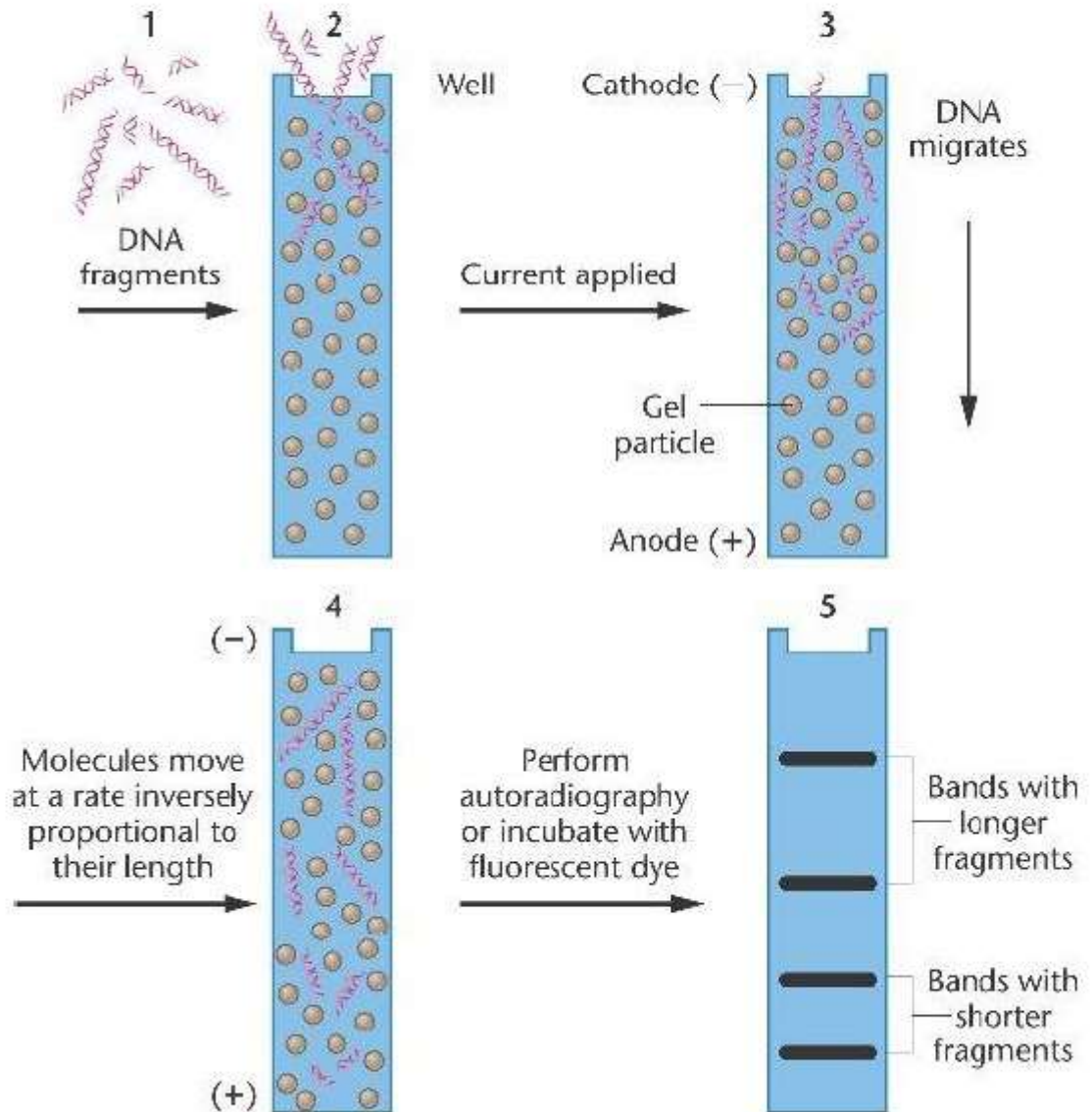
Электрофорез белков сыворотки крови здорового человека на бумаге.

Электрофорез белков сыворотки крови человека в геле



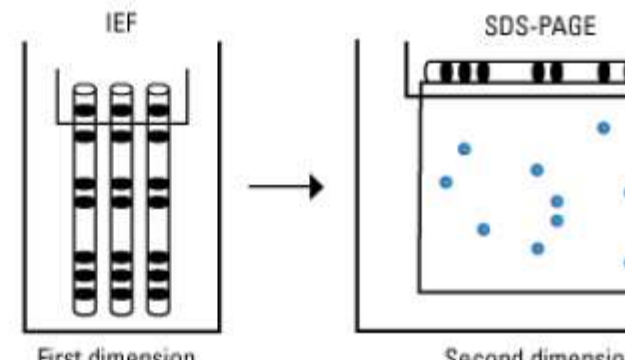
Гель-электрофорез

- метод анализа или разделения веществ под действием электрического поля, когда в качестве носителя используется гель.



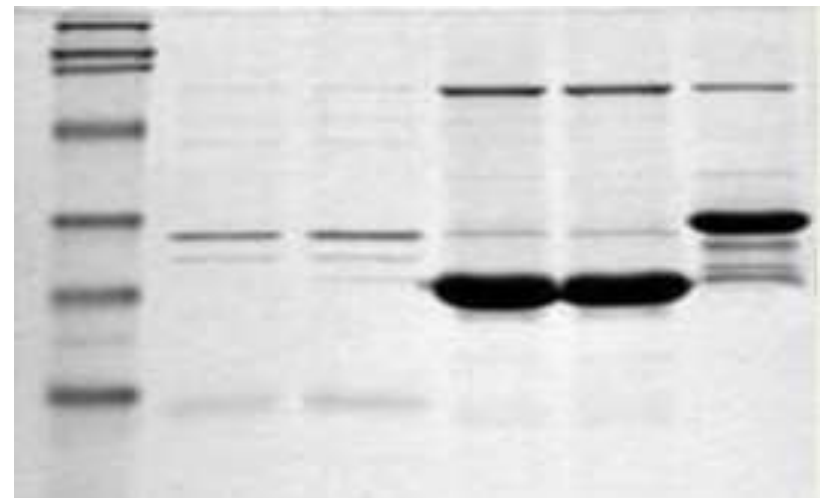
Гель-электрофорез

- В агарозном или полиакриламидном геле
- Капиллярный или обычный
- В денатурирующих или нативных условиях
- В градиентном или обычном геле
- В постоянном поле или пульс-электрофорез
- Одно- и двухмерный (в случае белков)



Электрофорез в полиакриламидном геле

- Предварительно белки денатурируют с тем, чтобы скорость миграции зависела только от молекулярной массы.
- Для этого анализируемую смесь обрабатывают додецилсульфатом натрия (ДСН), который представляет собой детергент с сильно выраженными амфифильными свойствами (обладают поверхностно-активными свойствами).
- Развернутые полипептидные цепи связывают ДСН и приобретают отрицательный заряд.
- Электрофорез проводят в тонком слое геля.
- После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.
- (Фотография полиакриламидного геля, маркеры на на левой дорожке).
Идеальный гель должен быть электрически нейтральным, химически инертным, механически устойчивым и иметь однородную структуру пор, размеры которых можно менять в широких пределах.



(продолжение)

- Полиакриламид, используемый в качестве носителя при ЭФ белков в значительной степени вытеснил все другие гелевые среды, главным образом благодаря его способности действовать как наиболее эффективное молекулярное сито.
- Размер пор полиакриламида может варьировать в широких пределах, меняя концентрацию акриламида и степень поперечной сшивки (ковалентные поперечные связи).
- Полиакриламидные гели применяют как в аналитических, так и в препаративных целях (вертикальный и горизонтальный).
- Для препаративного фракционирования в полиакриламидном геле применяют (1) большие вертикальные колонки, наполненные гелем, в которых белки разделяются электрофоретически и последовательно вымываются протекающими через колонку буфером или (2) выполняют на больших пластинах, что технически удобнее и эффективнее.
- Еще одно преимущество пластин – возможность приспособить этот вариант для двумерного разделения (двумерный ЭФ).

Двумерный электрофорез в ПААГ

Полное разделение сложной смеси белков не всегда удается осуществить в ходе одного электрофоретического эксперимента. Всегда есть вероятность того, что в данной системе электрофореза различные белки мигрируют в одной зоне либо в силу близости их размеров, либо ввиду совпадения их электрофоретических подвижностей при выбранном значении рН, либо, наконец, в результате неблагоприятной для разделения комбинации этих параметров.

Поэтому в сложных случаях фракционирования смеси белков имеет смысл использовать разделение в первом направлении как исходное для разделения во втором, перпендикулярном первому направлении при измененных условиях электрофореза.

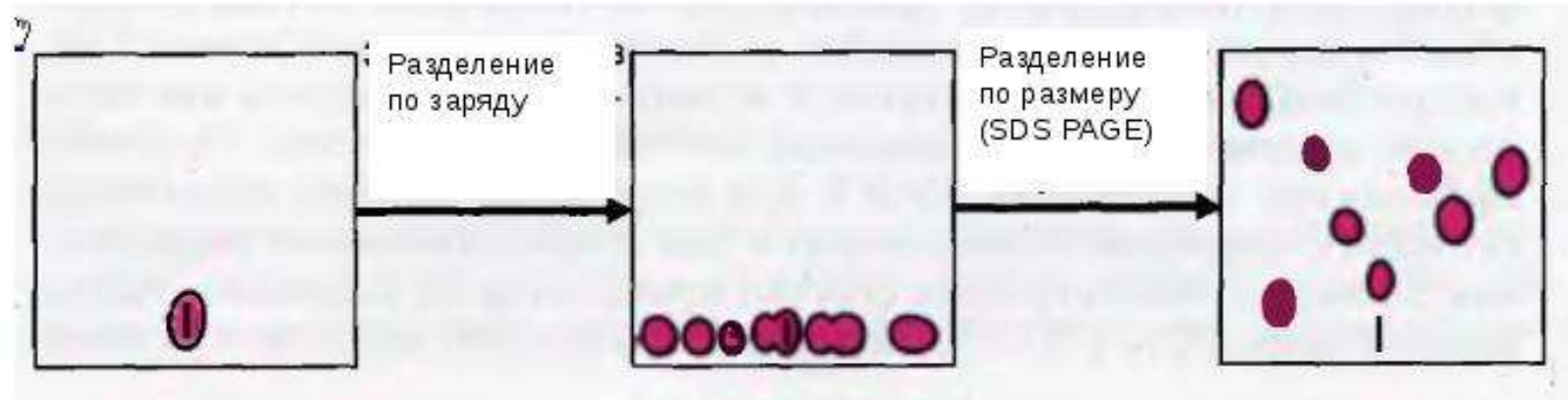
- Для этого трек первого направления (без осаждения и окраски белков в нем) вырезают и накладывают на стартовую зону пластинки второго направления (без карманов). Контакт между двумя гелями обеспечивают заливая место их соприкосновения расплавленным раствором агарозы в том же буфере.
-

Двумерный электрофорез в ПААГ

- Электрофорез, естественно, ведут в направлении, перпендикулярном полоске. Каждая неомогенная полоса в ней может дать несколько пятен во втором направлении, если в новых условиях содержащиеся в ней белки обретут различную электрофоретическую подвижность. В результате после осаждения и прокрашивания на пластинке появляется картина распределенных по всей поверхности пятен («фингерпринт»). Число пятен различных белков, которое удастся зафиксировать на одной пластине может достигнуть нескольких сотен.
- Визуализация белков достигается применением техники их окрашивания. Для этих целей используют Кумаси синий, серебро (нитрат серебра с тиосульфатом натрия), флуоресцентные красители (SYPRO красный, SYPRO оранжевый).



2-D электрофорез



Двумерный электрофорез (2-DE, 2-D электрофорез) используется для анализа белковых молекул. Смесь белков разделяется в двух направлениях по 2 различным свойствам. К таким **свойствам** относятся – **изоэлектрическая точка, масса белка в нативном и денатурированном состоянии.**

Двумерный электрофорез начинается с одномерного, а затем разделенные молекулы подвергаются второму разделению в направлении 90 градусов по направлению к первому фореу.

Мало вероятно что 2 молекулы будут обладать двумя одинаковыми индивидуальными свойствами, поэтому белки более эффективно разделяются 2-D электрофорезом, чем обычным электрофорезом.

Изоэлектрическая точка (IEP) – значение pH при котором молекула не заряжена (нейтральна).

1. Разделение по изоэлектрической точке

Разделение белков (пептидов) по IEP называется **изоэлектрическое фокусирование (IEF)**. Белки распределяются по гелю в первом направлении и «накапливаются в изоэлектрической точке (заряд белка нейтральный)»

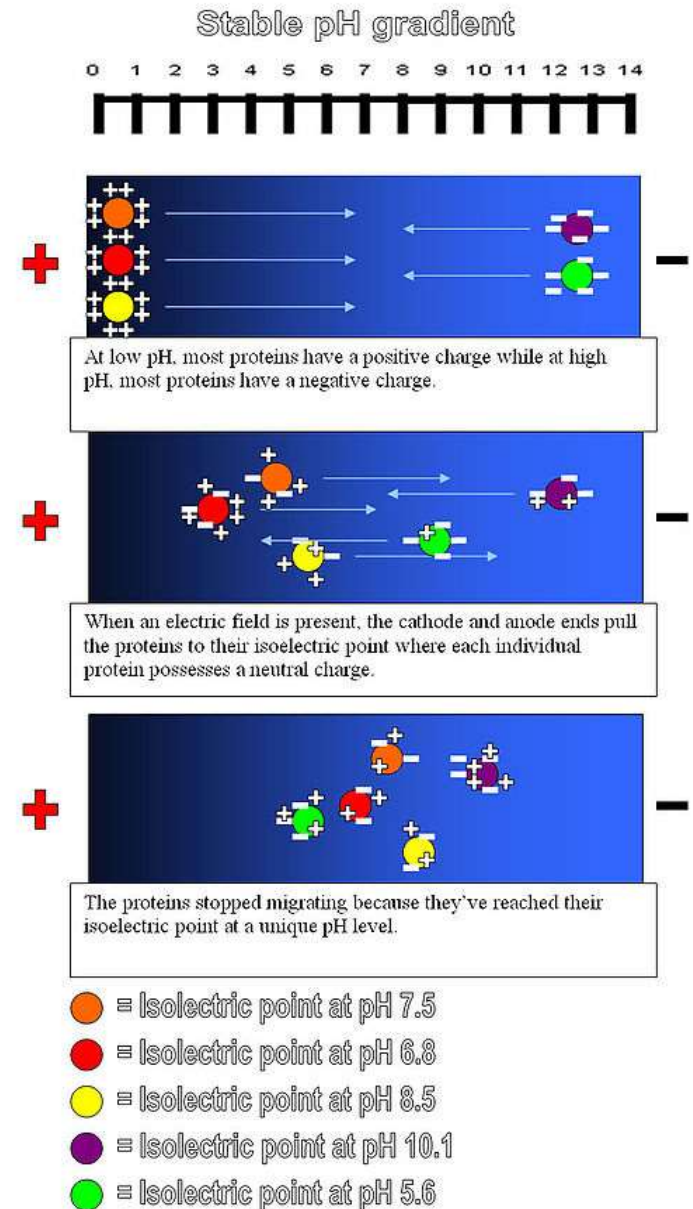
2. Разделение по массе

Используется стандартный SDS-электрофорез в направлении перпендикулярном первому.

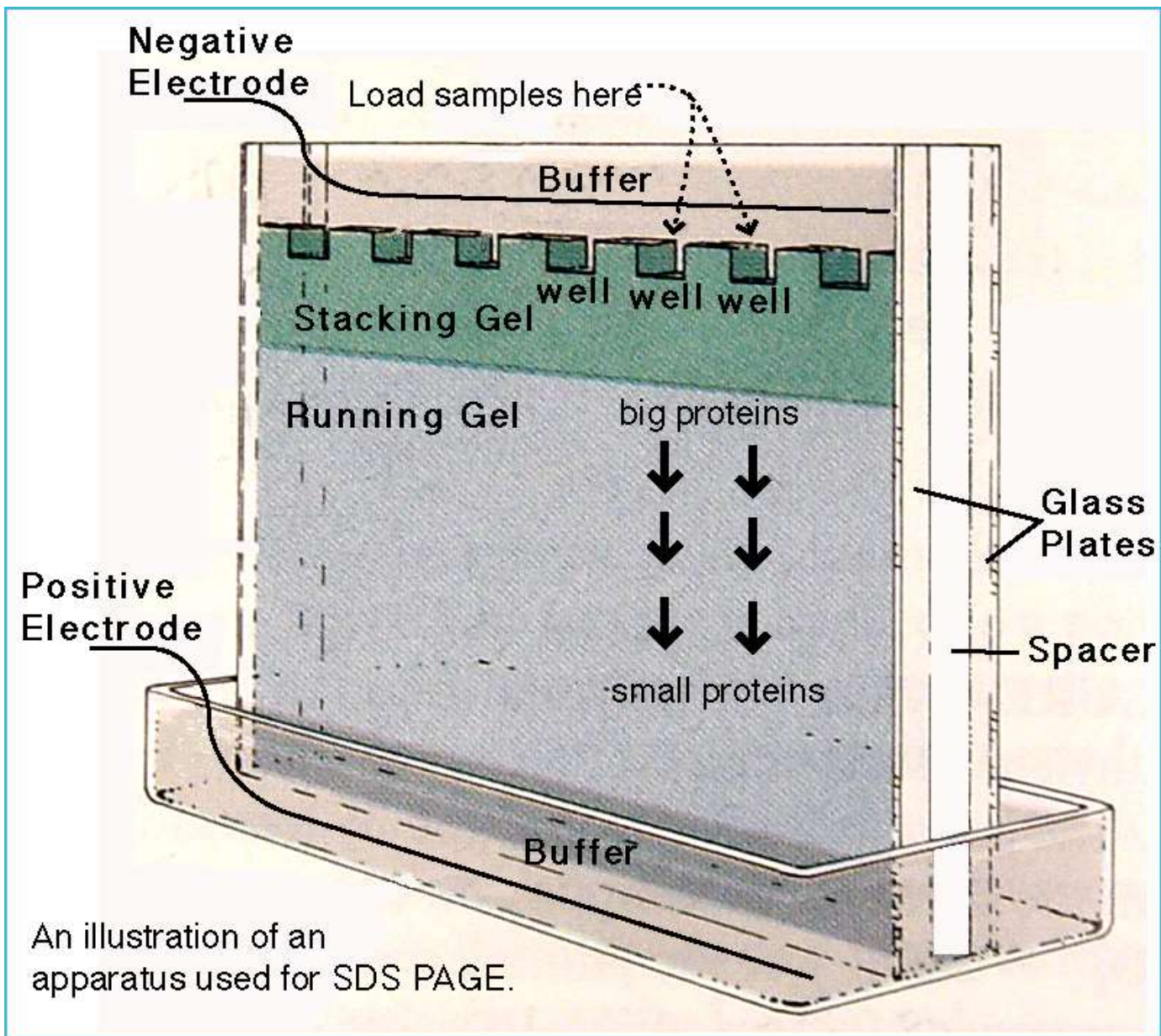
Электрофорез нуклеиновых кислот

- С точки зрения электрофореза отличает нуклеиновые кислоты от белков – это значительный по величине суммарный отрицательный заряд, обусловленный диссоциацией многочисленных остатков фосфорной кислоты в связях между нуклеотидами. рН окружающей среды мало влияет на этот заряд. Поэтому электрофорез можно вести не в буфере, а в любом подходящем ионосодержащем растворе, например в слабом растворе щелочи. Во всех случаях в жидкую среду вносят ЭДТА до концентрации 1-2 мМ. Это необходимо для блокирования действия нуклеаз и предупреждения осаждения (особенно РНК) двухвалентными металлами.
- Таким образом, разделение фрагментов ДНК и РНК электрофорезом приходится вести только по размеру. Однако размеры эти могут варьировать в очень широких пределах: от десятков нуклеотидных звеньев до многих сотен тысяч, а если выразить через молекулярные массы, то от нескольких тысяч до сотен миллионов дальтон.
- Для фракционирования относительно коротких фрагментов используют электрофорез в ПААГ, а для разделения высокомолекулярных ДНК, более крупнопористый носитель – агарозу.

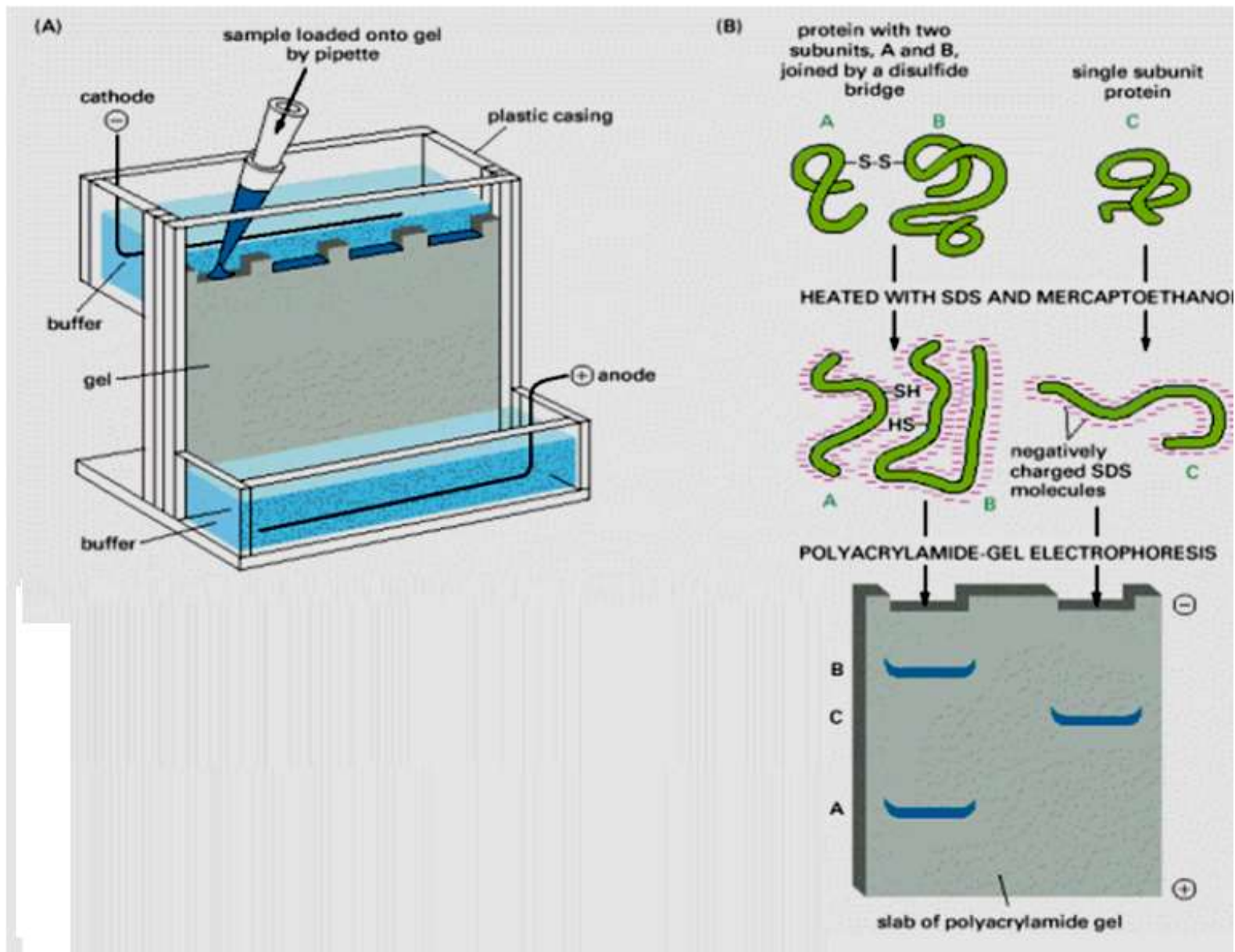
- **Изоэлектрическое фокусирование**
- Технология разделения молекул по разнице в их изоэлектрических точках.
- Это разновидность зонного электрофореза, которую обычно производят в геле.
- Белок, который находится в рН-зоне ниже собственной изоэлектрической точки, будет положительно заряжен и будет перемещаться к катоду.
- В результате перемещения заряд молекулы будет снижаться, а перемещение — замедляться.
- В результате белки образуют четкие полосы, и каждый белок будет располагаться в градиенте значений рН в соответствии со своей изоэлектрической точкой.



Диск-электрофорез ПААГ в присутствии с ДДС-Na



Общие принципы электрофореза

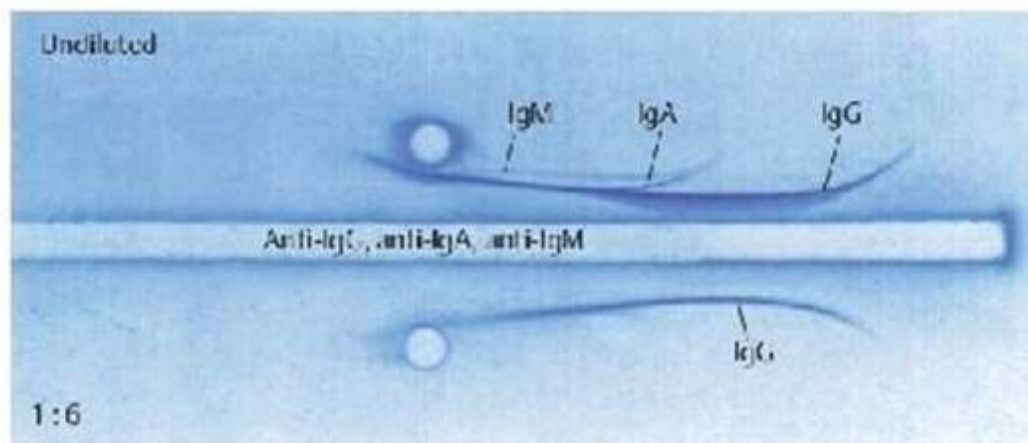
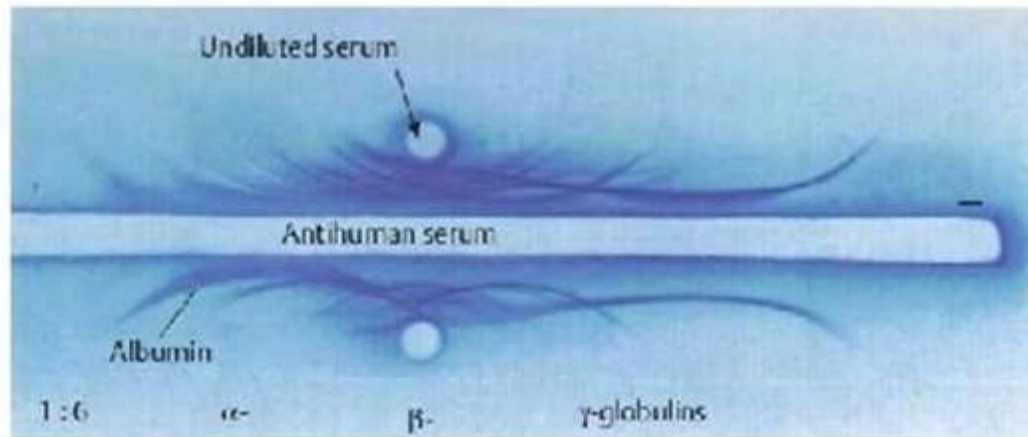


Иммуноэлектрофорез

- Стадия 1: электрофорез антигена в агаровом геле. Антиген мигрирует на некоторое гипотетическое расстояние.
- Стадия 2: ток выключен. В агаре вырезают канавку и заполняют ее антителами. Образуется дуга преципитата. Теоретически антиген диффундирует из точечного источника радиально, а антитела из канавки – ровным фронтом. Преципитаты, образующиеся в точках оптимальных соотношений антигена и антител, формируют дугу. Дуга расположена ближе всего к канавке там, где наиболее высока концентрация антигена.
- Иммуноэлектрофорез помогает идентифицировать антигены по электрофоретической подвижности, особенно в том случае, когда в образце присутствуют и другие антигены.
- С помощью данного метода в клинической иммунологии полуколичественно определяют концентрацию иммуноглобулинов и идентифицируют миеломные белки.

Иммуноэлектрофорез

— Immunelectrophoresis According to Grabar and Williams —

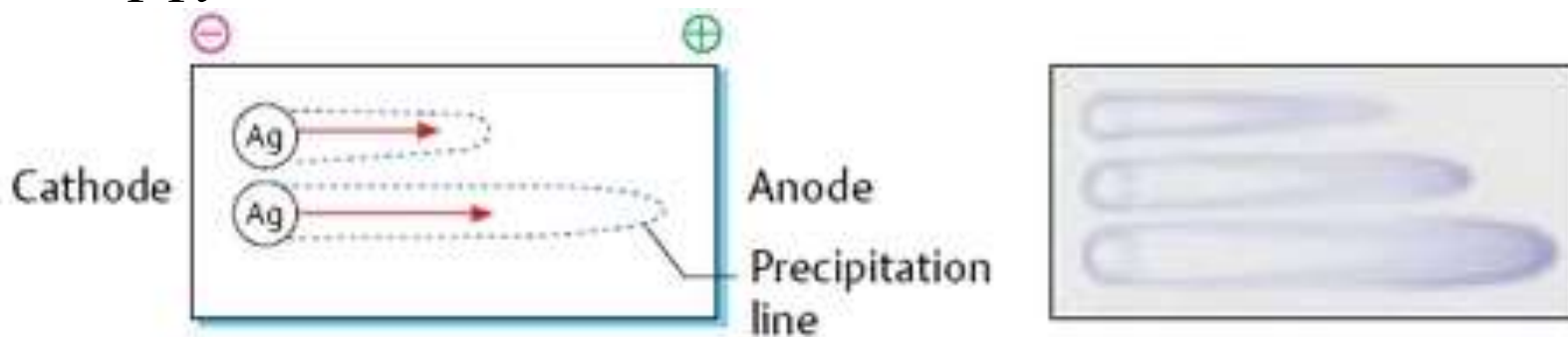


Сочетание метода электрофореза и иммунопреципитации. Смесь антигенов вносят в лунки геля и разделяют с помощью электрофореза. Затем в канавку параллельно зонам электрофореза вносят сыворотку и в месте «встречи» с антигеном образуются линии преципитата.

Ракетный электрофорез – это количественный метод, предусматривающий внесение антигена в гель, содержащий антитела. Линия преципитата имеет форму ракеты, длина которой определяется концентрацией антигена. Расстояние между стартовой лункой и передним краем дуги, имеющей форму ракеты, зависит от концентрации антигена.

Как и встречный электрофорез, это-быстрый метод, но и здесь антиген должен перемещаться к положительно заряженному электроду.

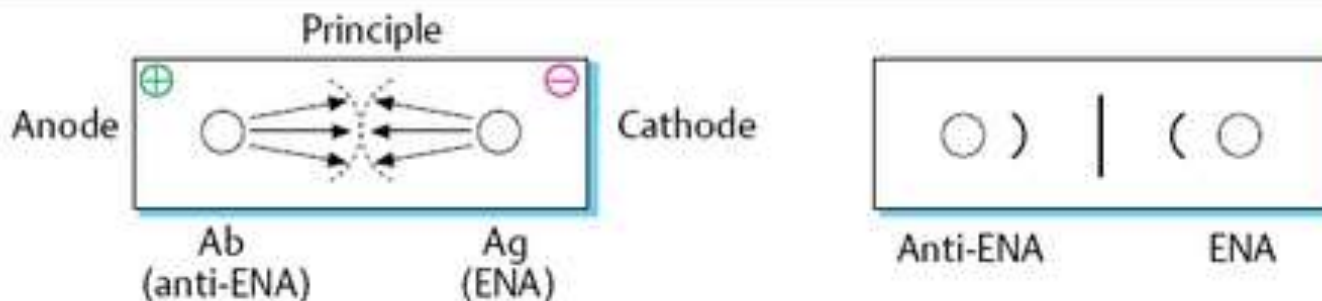
Ракетный электрофорез подходит для белков, например альбумина, трансферрина и церулоплазмина, в то время как концентрацию иммуноглобулинов обычно определяют методом простой радиальной иммунодиффузии.



D. Electrophoresis in antibody-containing gel (rocket electrophoresis)

Встречный иммуноэлектрофорез

- На основе сочетания электрофореза с иммунопреципитацией разработано несколько удачных методов, в каждом из которых перемещение антигена в электрическом поле приводит к его контакту с антителами.
- Встречный иммуноэлектрофорез может применяться для определения антигенов, мигрирующих в агаре к положительно заряженному электроду.
- Из-за эндосмоса антитела движутся в геле «назад»; антиген, отрицательно заряженный при соответствующем рН, перемещается к положительному электроду и при контакте с антителами образует преципитат.
- Данный метод занимает меньше времени и более чувствителен, чем двойная иммунодиффузия по Оухтерлони. Его применяют для идентификации антигенов вируса гепатита В и соответствующих антител, антител к ДНК при системной красной волчанке, аутоантител к растворимым ядерным антигенам при коллагенозах, а также антител (преципитинов) к *Aspergillus* при аллергическом бронхолегочном аспергиллезе.



B. Transmigration electrophoresis (countercurrent electrophoresis)

Иммуноблоттинг

- Иммуноблоттинг (western blotting) – аналитический метод определения белков и других биополимеров в исследуемых образцах. Метод предназначен для выявления искомым белков в клеточном гомогенате или белковом экстракте, посредством их электрофоретического разделения, последующего переноса их на мембрану и использования соответствующих специфических антител.
- Термин «блоттинг» означает перенос биологических образцов из геля на мембрану с последующим обнаружением их на ней. Содержание термина «western blotting» было раскрыто в работе *H. Towben* и др. в 1979 году и в настоящее время метод включен в состав иммунохимических методов анализа.
- Основой для создания иммуноблоттинга явилась разработка чувствительного метода анализа визуальной оценки специфической активности антител в отношении гомологичных антигенов.

(продолжение)

В настоящее время иммуноблоттинг - незаменимый метод исследования в иммунодиагностике, иммунохимии и других областях биологии и медицины.

- Иммуноблоттинг является приоритетным способом иммунодетекции белковых фракций, полученных после электрофореза, особенно тех, концентрация которых в анализируемом образце не позволяет исследовать их другими методами иммунохимии.
- Процесс переноса биополимеров на пористую мембрану называют «блоттингом» («blotting», промокание), суть которого состоит в переносе аналитического образца из плоскости геля на поверхность мембраны.
- Белки, денатурированные в результате действия на них додецилсульфата натрия (SDS) в полиакриламидном геле, как правило, переносятся и абсорбируются на поверхности мембраны под действием электрического тока в направлении от катода к аноду.
- Абсорбция протеинов на мембрану создает точную копию их электрофоретического разделения в полиакриламидном геле, что обеспечивает доступность биополимеров для последующего иммуноанализа.
- Это позволяет раскрыть антигенные эпитопы, с которыми в дальнейшем могут взаимодействовать специфические антитела.

Масс-спектрометрия

- Масс-спектрометрия – метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы.
- Это один из мощнейших способов качественной идентификации веществ, допускающий также и количественное определение.
 - Открытие масс-спектрометрии – 1901г., Кауфман В., основополагающие опыты были проведены в 1913 г. Томсоном Дж.Дж.
 - Метод обеспечивает достоверную идентификацию как относительно простых, так и сложных молекул.
 - Единственное общее требование – это возможность ионизации исследуемых молекул.

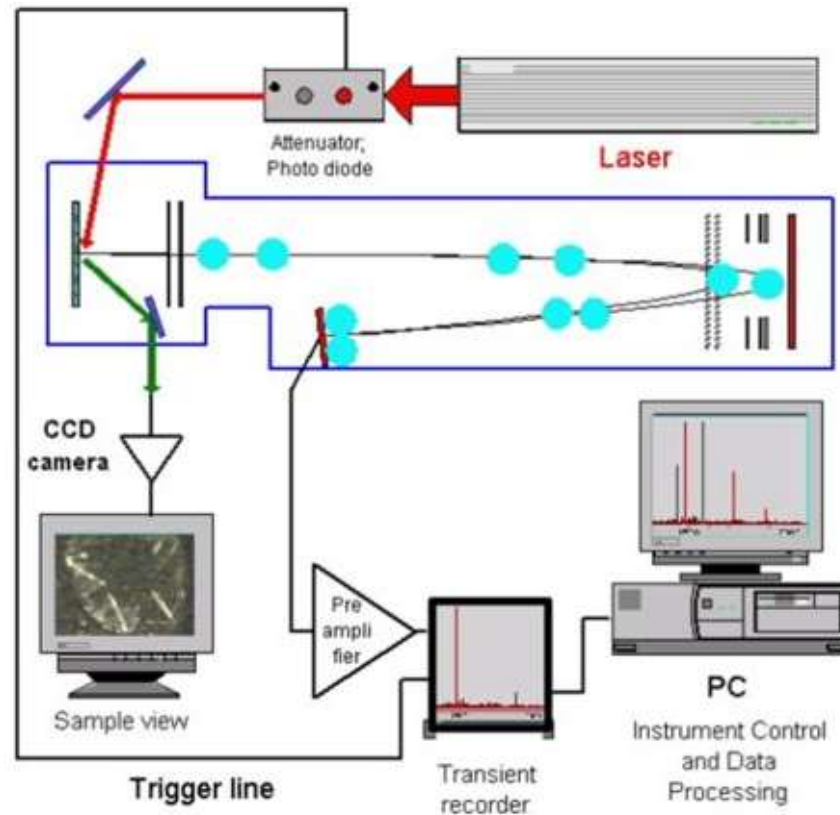
(продолжение)

- Масс-спектрометрия – совокупность трех отдельных процессов:
- - ионизация молекулы
- -разделение ионов по массам
- -детектирование ионов.

- *Области применения масс-спектрометрии:*
- -установление строения соединений
- - анализ высокомолекулярных соединения с м.м. до нескольких млн. (белки, полипептиды, синтетические полимеры и проч.)
- - выявление следовых количеств веществ
- - изучение элементарных химических процессов: ионизации, перегруппировок, ионных реакций
- -определение термодинамических величин: потенциалов ионизации, энергии диссоциации молекул.

Масс-спектрометрия

- Проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются.
- Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Для предотвращения столкновения с молекулами газа ионизатор, анализатор масс и детектор работают в вакууме.
- Образец → дозатор (инжектор) проб → анализатор масс → детектор ИОНОВ



Протеомика: высокопроизводительный функциональный анализ белков

- *Методы обнаружения белков:*
- - **белковые микрочипы;**
- *Область применения:*
- - протеомный анализ белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий;
- - открытие новых мишеней биологически активных соединений для разработки новых лекарств.
- - **генетические гибридные системы;**
- *Область применения:*
- - протеомный анализ белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий.
- -технология «лаборатория на чипе» - «lab-on-a-chip»
- *Область применения:*
- - обработка данных белковых и ДНК микрочипов.

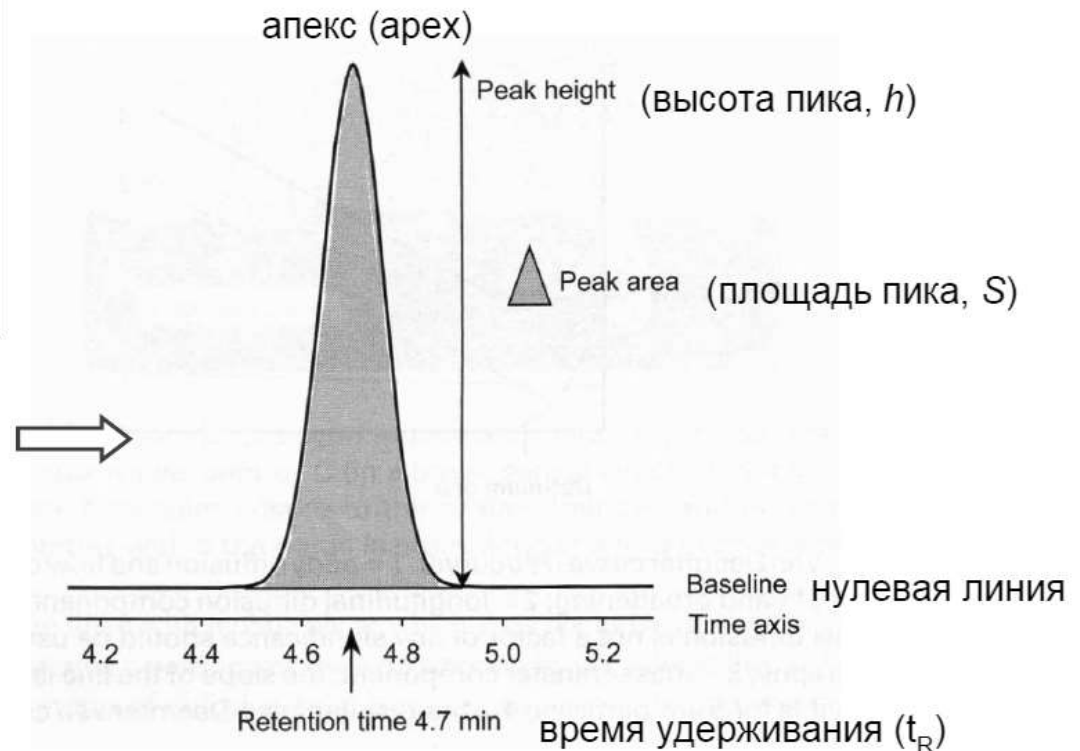
Параметры хроматограммы

Хроматограмма (chromatogram) – графическое отображение хроматографического процесса (формирования хроматографических зон), зависимость интенсивности ответа детектора от времени

Индивидуальные сигналы – **хроматографические пики** (соответствуют хроматографическим зонам)

Качественный параметр - t_R

Количественные параметры – S и h





Масс-спектрометрия

Идентификация молекул путём измерения отношения их массы к заряду в ионизированном состоянии.

Проба впрыскивается в ионизатор, где молекулы образца ионизируются. Затем ионы образца анализируются и регистрируются. Для предотвращения столкновения с молекулами газа ионизатор, анализатор масс и детектор работают в вакууме.



Принципиальная схема масс-спектрометра



Сканирующая зондовая микроскопия

Сущность метода – генерация изображения образца с высоким разрешением путём его сканирования с помощью микроскопических механических, электрических, оптических, тепловых и иных зондов.

Атомно-силовой микроскоп – один из представителей так называемых сканирующих зондовых микроскопов.

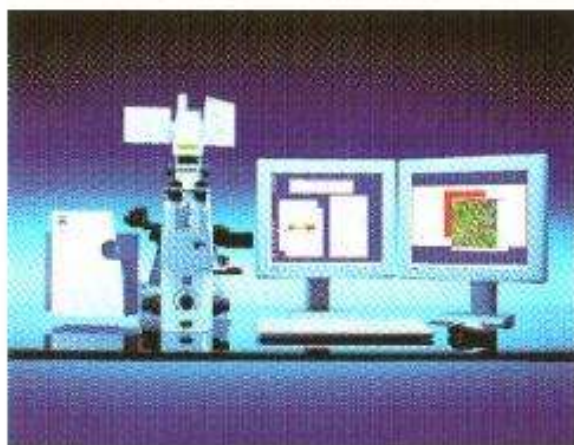
Возможности:

- получение изображения металлических поверхностей в атомном масштабе;
- получение изображения трёхмерных профилей поверхности биологических образцов в нанометровом масштабе;
- определение размеров и конформации единичных молекул и их агрегатов, адсорбированных на твёрдых поверхностях.

АСМ сканирует образцы с помощью острой иглы, расположенной на конце кантилевера. Он измеряет слабые силы взаимодействия, возникающие между остриём и поверхностью образца, определяя изменения в отражении лазерного луча, вызванные этим взаимодействием при перемещениях кантилевера. Изображение рельефа поверхности регистрируется с помощью подвижного пьезоэлектрического предметного столика. Точность измерений достигает нескольких Å.



Лазерные сканирующие микроскопы



LSM 510 (LCM 510)

Исследовательский лазерный сканирующий микроскоп

- Разрешающая способность до 2048x2048 пикселей
- Мультифлуоресцентное изображение без засветок на абсолютно темном фоне
- Сканирующий модуль: два независимых сканирующих зеркала; плавное изменение сканирования ZOOM 1x-8x
- Возможность установки 3-4 лазеров



LSM 5 PASCAL (LCM 5 Паскаль)

Малогабаритный рабочий лазерный сканирующий микроскоп с 3 генераторами

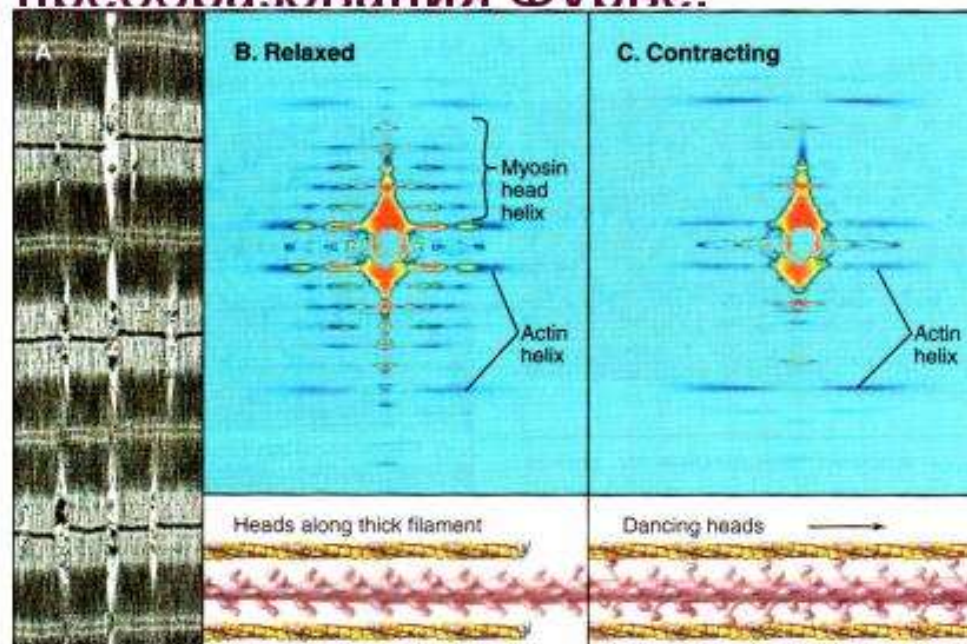
- Разрешающая способность от 1x4 до 2048x2048 пикселей
- Мультифлуоресцентное изображение без засветок на абсолютно темном фоне
- Сканирующий модуль: два независимых сканирующих зеркала; плавное изменение сканирования ZOOM 0,7x-8x с шагом 0,1



Рентгеноструктурный анализ

Рентгеновская кристаллография – метод с значительно доступной разрешающей мощностью при установлении структуры макромолекул и макромолекулярных комплексов.

Центральной в этом методе является техника преобразования Фурье.



**Взаимодействие
актина
и миозина в
процессе
мышечного
сокращения**



Инфракрасная спектроскопия белков

Основана на поглощении инфракрасного излучения молекулами.

Различают сканирующие инфракрасные спектрометры, спектрометры с преобразованием Фурье, приборы с одной длиной волны.

Электронная микроскопия

Просвечивающая электронная микроскопия использует волновые свойства движущихся электронов с целью получения изображения изучаемого объекта с высоким разрешением.

LEO 912 с Omega-фильтром





Протеомика: высокопроизводительный функциональный анализ белков

Методы обнаружения белков:

- **двухмерный полиакриламидный гель-электрофорез и масс-спектрометрия;**

Область применения:

- ✓ идентификация биомаркёров, специфичных для данного типа клеток, болезненных состояний, процесса старения;
- ✓ изучение изменения в составе белков в ответ на действие лекарственных средств.

- **ДНК-микрочипы.**

Область применения:

- ✓ обнаружение онкомаркёров;
- ✓ выявление маркёров нейродегенеративных заболеваний.



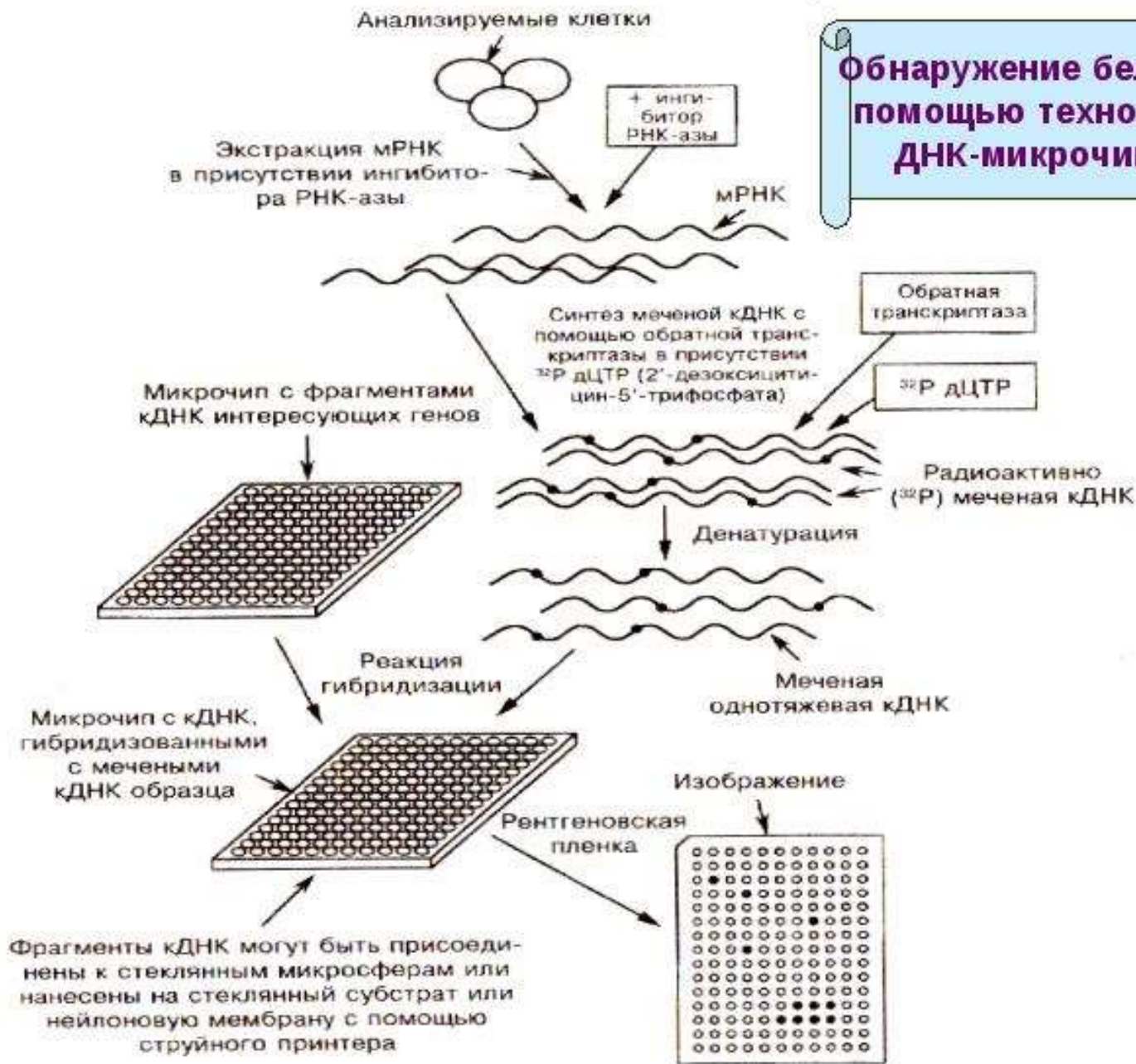
Технология ДНК-микрочипов



- Выявляются различия в населённости мРНК, определяемых как кДНК (комплементарная ДНК).
- Чипы с кДНК на стеклянных или нейлоновых субстратах изготавливаются с помощью высокоскоростных роботов или струйных принтеров.
- Каждое пятно содержит иммобилизованные зонды – фрагменты кДНК различной длины, комплементарные кДНК-мишеням.
- Радиоактивно меченные кДНК-мишени синтезируются с помощью обратной транскриптазы на основе мРНК из анализируемых клеток.
- Однонитевые кДНК-мишени гибридизируются с комплементарными кДНК на матрице, не связавшиеся вымываются буфером.
- Анализ радиоактивных пятен на фотоплёнке демонстрирует наличие мРНК в анализируемых клетках, что свидетельствует об экспрессии соответствующего белка.



Обнаружение белков с помощью технологии ДНК-микрочипов





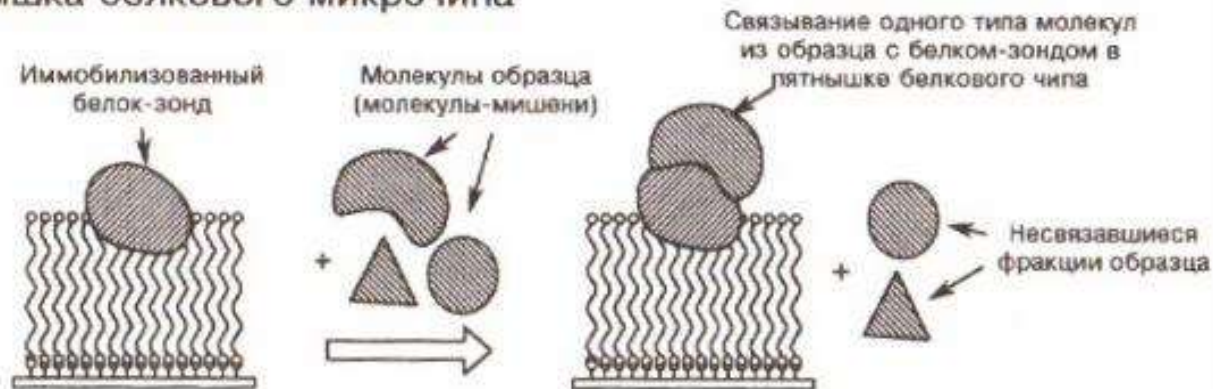
Технология белковых микрочипов

- Для сохранения структурной целостности белок иммобилизован на матриксе или слое химических линкеров, обеспечивающих нативно-подобное окружение для внедрения в них белковых молекул.
- Молекулы анализируемого белка (молекулы-мишени) взаимодействуют с молекулой-зондом в пятнышке чипа. Несвязавшиеся белки вымываются
- Молекулы образца метятся радиоактивно или люминесцентно, что позволяет регистрировать связывание целевого белка с молекулой-зондом.

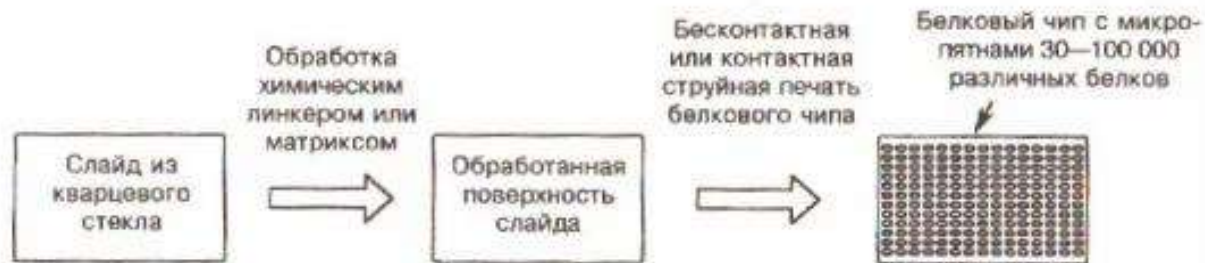


Создание
белкового
микрочипа

Приготовление одиночного пятнышка белкового микрочипа



Измерение белок-белкового взаимодействия



Создание белкового микрочипа

