

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Алтайский государственный университет»
Факультет химии и химико-фармацевтических технологий
Кафедра органической химии

Методы разделения и очистки биополимеров

(учебное пособие)

Барнаул • 2019

Содержание

Лабораторная работа №1. Экстракция нуклеиновых кислот из клеток. Выделение и очистка суперскрученной ДНК плазмиды с использованием метода лизиса клеток, фракционирования в солевых растворах, растворах органических растворителей, и анализ ее электрофорезом в геле агарозы.....	4
Лабораторная работа №2. Фракционирование и очистка иммуноглобулинов (IgG) из сыворотки крови методами солевого осаждения.....	10
Лабораторная работа №3. Фракционирование белков сыворотки крови методом гель - фильтрации	14
Лабораторная работа №4. Разделение и анализ белков сыворотки крови электрофорезом в полиакриламидном геле.....	23
Лабораторная работа №5. Определение концентрации ДНК в плазме методом флуоресцентной спектрофотометрии	35
Лабораторная работа № 6. Разделение двуспиральной высокополимерной РНК в растворе хлористого лития методом центрифугирования.....	39
Лабораторная работа №7. Определение чистоты биополимеров. Диализ.....	42
Лабораторная работа №8. Введение чужеродной ДНК в клетки дрожжей и бактерий.....	44
Лабораторная работа №9. Процедура очистки геномной ДНК из лука.....	49

Лабораторная работа №1. Экстракция нуклеиновых кислот из клеток.

Выделение и очистка суперскрученной ДНК плазмиды с использованием метода лизиса клеток, фракционирования в солевых растворах, растворах органических растворителей, и анализ ее электрофорезом в геле агарозы

Цель работы: знакомство с методами выделения и рестрикционного анализа ДНК, получение экспериментальных навыков для конструирования и анализа рекомбинантных ДНК.

Задачи: выделение плазмидной ДНК из кишечной палочки *E. coli* на примере плазмиды pUC18, содержащего вставку чужеродного гена, оценка качества полученного препарата с помощью электрофореза в геле агарозы.

Плазмиды – внехромосомные автономно реплицирующиеся генетические элементы клетки, представляющие собой преимущественно кольцевые замкнутые молекулы ДНК. Методы выделения плазмидной ДНК основаны на том, что бактериальные плазмиды находятся в кольцевой замкнутой форме и имеют небольшие размеры по сравнению с геномной ДНК. Первый этап многих методов состоит в разрушении жесткой бактериальной клеточной стенки путем их обработки ЭДТА и лизоцимом (для грамотрицательных бактерий) с образованием сферопластов. ЭДТА, хелатируя ионы металлов, также защищает ДНК от действия катион-зависимых нуклеаз. Реакцию проводят в изотоническом растворе (при достаточно высокой концентрации сахарозы или другого вещества) для предотвращения немедленного лизиса получаемых сферопластов. Затем сферопласты лизируют, например, путем добавления детергента. Клеточный дебрис и фрагменты бактериальной хромосомы, связанные с клеточной оболочкой, можно удалить центрифугированием или фильтрованием. Из различных методов выделения плазмид наиболее широко используется метод щелочного лизиса бактерий (метод Бирнбойма – Доли) и его модификации, как для получения мини-препаратов, так для крупномасштабного выделения ДНК.

Метод основан на том, что в щелочных условиях ($\sim \text{pH } 12,0\text{--}12,5$) происходит денатурация линейных молекул ДНК (расплетение двойной спирали), в то время как кольцевые замкнутые молекулы не денатурируют или денатурируют незначительно и обратимо. Когда клеточный экстракт нейтрализуют при высокой концентрации соли, белки, геномная ДНК и клеточная РНК осаждаются. Происходит это, по-видимому, потому, что длинные одноцепочечные молекулы ДНК и РНК реассоциируют в высокой соли после денатурации случайным и беспорядочным образом, образуя нерастворимую массу. Большая часть клеточной РНК осаждается вместе с белками, поскольку реакцию проводят в присутствии додецилсульфата Na (SDS). Оставшуюся клеточную РНК в препарате удаляют обработкой РНКазой А (в основном это транспортная РНК, которая, видимо, вследствие легкости образования внутримолекулярных двухцепочечных участков, сравнительно легко ренатурирует и растворяется в высокой соли).

После удаления осадка центрифугированием плазмидную ДНК осаждают из осветленного клеточного лизата этанолом или изопропанолом. Такой препарат ДНК можно использовать для многих целей, например, для рестрикционного анализа. Для многих других приложений часто необходимы более чистые препараты ДНК, например, для подготовки фрагментов к клонированию или для трансфекции – в таком случае ДНК подвергают дальнейшей очистке. Для получения высокочистых препаратов небольших по размерам ДНК, пригодных для практически всех молекулярно-биологических приложений, очень популярен метод очистки ДНК на колонках с фильтрами из стекла (glass), кварца (silica slurries) или силикагеля (silica-gel membrane). DNA обратимо сорбируется на поверхность стеклянной мембраны в растворе с высокой концентрацией хаотропной соли, примеси отмываются хаотропной солью и 70 % этанолом. Затем очищенная DNA элюируется в буфере с низкой ионной силой. Для очистки небольших количеств плазмидной ДНК или фрагментов часто используют центрифужные мини-колонки с такими силикатными фильтрами. Подобные наборы выпускаются многими фирмами.

Материалы и оборудование:

- термостатируемый шейкер-инкубатор Exella E-24,
- «New Brunswick»(США) для выращивания клеточных культур;
- система видеодокументирования гелей «Molecular Imager Gel Doc XR» производства «Bio-Rad» (США) с трансиллюминатором;
- микроцентрифуга для пробирок «Eppendorf» 5417R (США) с ротором для микропробирок 1,5–2,0 мл;
- оборудование для горизонтального ДНК гель-электрофореза фирмы «Bio-Rad» (США): источник постоянного тока «PowerPac HV Power Supply» и «Sub-Cell GT» камеры с заливочными столиками;
- лабораторный шейкер-вортекс V-1 фирмы «BioSan»;
- охлаждаемый термостат, модель KB53 фирмы «Binder» (Германия);
- наборы из трех автоматических пипеток на 2–20 мкл, на 20–200 мкл и на 100–1000 мкл «Gilson»;
- мерные стаканы и колбы, одноразовые пластиковые пробирки и наконечники для пипеток;
- стационарная культура *E. coli*, содержащая рекомбинантную плазмиду;
- буферы и реагенты для выделения плазмидной ДНК;
- буферы и реагенты для рестрикционного анализа ДНК;
- буферы и реагенты для проведения агарозного электрофореза.

Ход работы:

1. Культуру *E. coli*, содержащую рекомбинантную плазмиду pUC18, центрифугировать 2 мин в 2 мл пробирках при 8 об/мин. Культуральную среду вылить, осадок осушить.
2. Ресуспендировать осадок в 100 мкл раствора 1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM глюкозы, РНКаза А) с лизоцимом (на кончике шпателя на 10 мл), инкубировать 5 мин при комнатной температуре.

3. Добавить 200 мкл раствора 2 (0,2 М NaOH, 1 10% SDS). Инкубировать с мягким перемешиванием с перевертыванием пробирки до полной прозрачности, но не более 5 мин.
4. Добавить 200 мкл 3 М NaOAc pH 4,75, смешать перемешиванием и инкубировать 5 мин, периодически помешивая.
5. Центрифугировать на максимальных оборотах 10 мин (~16 тыс. об/мин).
6. Супернатант осторожно, не разрушая осадок, прилить к 1 мл этанола, перемешать и центрифугировать 2 мин на максимальных оборотах.
7. Осадок промыть 1 мл 70 % этанола перемешиванием на вортексе, затем центрифугировать 2 мин на максимальных оборотах.
8. Супернатант удалить, осадок подсушить на воздухе 10 мин и растворить в 80 мкл TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA).

Анализ полученных препаратов плазмидных ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле

Для оценки количества и качества ДНК, а также размеров молекул ДНК используют электрофорез в гелях агарозы (горизонтальный) или полиакриламидных гелях (вертикальный электрофорез). Молекулы ДНК визуализируются интеркалирующими флуоресцентными красителями, например, бромистым этидием. Двучепочная ДНК эффективно связывает бромистый этидий и начинает ярко флуоресцировать при облучении ультрафиолетом (УФ). Результаты электрофореза документируют в проходящем УФ-свете с помощью цифровой фотокамеры или специальной системы для документирования гелей. Плазмидная интактная ДНК из клетки выделяется обычно в нескольких формах, которые разделяются в процессе электрофореза (рис. 2.7). В хорошем препарате ДНК доминирует суперскрученная мономерная и димерная формы (суперспиральная плаزمид), при некотором повреждении ДНК появляются релаксированная форма (расплетенное кольцо, к чему приводит наличие разрыва в одной из цепей), редко бывает линейная форма, образующаяся при двучепочных разрывах плазмидного кольца. В препарате плазмидной ДНК возможна небольшая

примесь денатурированной ДНК, а также фракция РНК. Денатурированная форма образуется при необратимых сдвигах цепей плазмидного кольца относительно друг друга в процессе денатурации. Рестриктазы не опознают сайты на такой ДНК с нарушенной двуцепочечной структурой и, соответственно, не расщепляют данную фракцию ДНК (рис. 1). Подвижность полос с формами кольцевой плазмиды зависит от условий электрофореза и концентрации бромистого этидия, так как внедрение интеркалирующих красителей расплетает ДНК, изменяя ее конформацию. Суммарное количество плазмидной ДНК во внесенной в гель пробе оценивают путем сопоставления интенсивности свечения полос со стандартной ДНК маркерами.

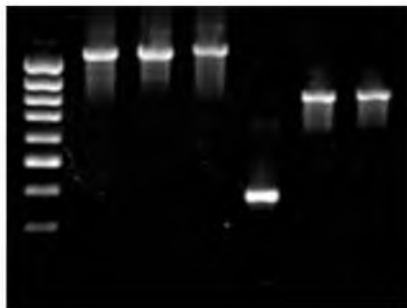


Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК

Ход работы:

1. Приготовить буфер ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0) для электрофореза разведением стокового раствора ТАЕх50.
2. Приготовить 1 % гель агарозы на ТАЕ-буфере путем расплавления навески агарозы в микроволновой печи. После остывания до умеренно горячего состояния добавить бромистый этидий до 0,25 мкг/мл и залить гель в форму.
3. Нанести 1 и 2 мкл полученного препарата рядом с 1 мкл маркерной ДНК в лунки приготовленного 1 % геля агарозы. Образцы перед нанесением смешивают с 1 мкл буфера для нанесения и электрофорезным буфером так,

чтобы наносимый объем составил 10–15 мкл, для равномерного распределения ДНК по толщине геля.

4. Провести электрофорез в течение 30 мин при напряжении 100 В.
5. С помощью системы видеодокументации получить фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.
6. Идентифицировать полосы плазмидной ДНК в препарате. Оценить суммарное количество плазмидной ДНК во внесенной в гель пробе путем сопоставления интенсивности свечения полос полученного препарата с интенсивностью свечения стандартной ДНК. После этого пересчитать количество полученной ДНК на общий объем препарата.
7. Записать вывод о качестве и количестве полученного препарата плазмидной ДНК.

Вопросы.

1. Что представляют собой плазмиды?
2. На чем основаны методы разделения хромосомной и плазмидной ДНК в клетке?
3. Каков принцип щелочного метода выделения плазмидной ДНК?
4. На чем основано разделение макромолекул ДНК при агарозном гельэлектрофорезе?
5. Как можно определить размер молекул ДНК?
6. Какие формы плазмидной ДНК можно увидеть после электрофореза полученного препарата в агарозном геле?

Лабораторная работа №2. Фракционирование и очистка иммуноглобулинов (IgG) из сыворотки крови методами солевого осаждения

В отличие от иммуноглобулинов других классов IgG сравнительно просто выделить в чистом виде. Выделение проводят путем осаждения сульфатом аммония и хроматографии на анионообменниках, например ДЭАЭ-целлюлозе или ДЭАЭ-сефадексе. Исходным материалом служит сыворотка. IgG представляет собой гетерогенную смесь иммуноглобулинов с похожими характеристиками, эти Ig можно разделить на анионообменниках, изменяя ионную силу элюента. Часто перед проведением хроматографии проводят осаждение сульфатом аммония или риванолом (2-эток-си-6, 9-диаминоакридинлактат).

Получение препаратов с повышенным содержанием IgG

Осаждение сульфатом аммония. К 100 мл сыворотки добавляют 50 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Осадок удаляют центрифугированием, растворяют в 50 мл дистиллированной воды и снова осаждают 25 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Осаждение повторяют 4—5 раз. Затем препарат диализуют против соответствующего буфера. Иногда осаждение проводят при 40% насыщении соли, что увеличивает выход, но снижает чистоту препарата. Иногда насыщение сульфата аммония выражают в молях; насыщенный раствор при 0°C соответствует 3,9 М (514,72 г в 1 л), при 20°C — 4,06 М (536,34 г в 1 л).

Осаждение сульфатом натрия. К 100 мл сыворотки при комнатной температуре добавляют 18 г сульфата натрия (при 4°C растворимость сульфата натрия уменьшается). Осадок растворяют в 40 мл фосфатного буфера с pH 8,0 и ионной силой 0,1. Переосаждают белок, прибавив 4,8 г сульфата натрия. Осадок после центрифугирования растворяют в 20 мл фосфатного буфера (см. выше) и переосаждают 2,4 г сульфата натрия. Выпавший осадок отделяют, растворяют в небольшом количестве буфера, диализуют.

Осаждение риванолом. Риванол образует с сывороточными белками комплексы, которые выпадают в осадок, но растворяются при pH 5. Ввиду высокой изоэлектрической точки IgG по сравнению с остальными сывороточными

белками в слабощелочной среде риванол не образует комплексов с IgG. На этом основана очистка IgG. К сыворотке добавляют раствор риванола (7,5 г/л) при постоянном перемешивании. Осадок удаляют центрифугированием. IgG остается в надосадочной фракции. Риванол можно удалить активированным углем (10 мг/мл) или NaCl (до 50 г/л). Соотношение сыворотки и риванола может быть различным. Наилучшее соотношение сыворотка/риванол при выделении человеческого IgG равна 1+2. На один объем сыворотки животных берут 1—1,5 объема риванола. При обработке сыворотки человека используют даже соотношение 1+3—3,5.

Фракционирование органическими растворителями. У этого вида фракционирования есть недостаток: необходим строгий контроль температуры и pH. Поскольку органические растворители легко вызывают денатурацию, необходимо проводить работу при температуре ниже 0°C. Чаще используют этанол при фракционировании белков плазмы человека. В лаборатории к фракционированию этанолом прибегают редко, однако в промышленности этот метод нашел широкое применение. Так называемая II фракция по Кону состоит в основном из IgG.

Материалы и оборудование. Для работы необходимы сыворотка человека, ДЭАЭ-сефадекс (Pharmacia, Швеция), 0,1 М и 0,01 М фосфатный буфер с pH 6,5, 0,1 М H_3PO_4 , 0,5 М NaOH, 1 М K_2HPO_4 , 1 М NaCl.

Ход работы:

1. Дают ДЭАЭ-сефадексу А-50 набухнуть, мелкие частицы декантируют.
2. Отмывают 0,5 М NaOH до тех пор, пока промывная жидкость не освободится от ионов хлора.
3. Отмывают сорбент водой до достижения нейтрального pH. При помощи 0,1 М фосфорной кислоты переводят обменник в фосфатную форму.
4. Добавляют такое количество кислоты, чтобы надосадочная фракция имела выраженную кислую реакцию.
5. Отмывают избыток кислоты дистиллированной водой, уравнивают сорбент 0,1 М фосфатным буфером с pH 6,5, затем 0,01 М фосфатным буфером с pH 6,5. К

100 мл сыворотки человека добавляют 20 г набухшего уравновешенного ДЭАЭ-сефадекса А-50.

6.Сыворотку можно предварительно продиализовать против 0,01 М фосфатного буфера с рН 6,5.

7.Смесь периодически суспендируют в течение часа (4°C). Затем фильтруют и 4 раза отмывают порциями 0,01 М буфера по 50 мл.

8.Фильтрат и промывную жидкость объединяют и снова инкубируют с 20 г ДЭАЭ-сефадекса в тех же условиях.

Снова фильтруют и отмывают 0,01 М фосфатным буфером. Доводят рН с помощью 1 М K_2HPO_4 до 7,5 для предотвращения образования нерастворимого продукта. Раствор IgG диализуют против дистиллированной воды, после чего его лиофилизируют. После лиофилизации IgG приобретает склонность к агрегации. И использованный сефадексе регенерируют 1 М NaCl, 0,5 М NaOH и этанолом. Этанол удаляет адсорбированные липиды. Избыток щелочи отмывают дистиллированной водой, после чего ионообменник переводят в фосфатную форму как было описано выше.

Обсуждение. Метод приготовления IgG из сыворотки человека состоит по существу из одного этапа. Хроматография на колонке является более эффективным методом, чем метод спонтанной седиментации (англ. Batch method). Однако ввиду того, что гель изменяет объем в зависимости от ионной силы, регенерация геля непосредственно на колонке невозможна, гель приходится выбивать из колонки. При получении больших количеств IgG желательно до хроматографии провести еще одну стадию очистки. Возможно также использовать для хроматографии QAE-сефадекса, объем гранул которого не зависит от рН. В качестве элюента используют смесь этилендиамида и уксусной кислоты с рН 7,0, ионной силой 0,1; регенерируют сорбент натрий-ацетатным буфером с рН 4,0 с ионной силой 0,1. Липопротеиды удаляют 5% раствором твина-80 в ацетатном буфере. Этилендиамин-ацетатный буфер улетучивается при лиофилизации, что является преимуществом. Перед лиофилизацией концентрацию IgG доводят до 30 г/л, так как в случае меньших концентраций образуются нерастворимые продукты. Протеин А из клеточной стенки *Staphylococcus aureus* осаждает IgG 1,2 и 4, но не

IgG3. Формализированную культуру золотистого стафилококка можно использовать для специфической очистки IgG3. IgG 1,2 и 4 можно десорбировать с иммобилизованного протеина А при помощи глицин-солянокислого буфера с рН 3,0, а также электрофоретически. Градиентом рН удается десорбировать IgG 1 и 2 с протеин-А-сефарозы с 90% и 95% чистотой соответственно. Подклассы IgG можно также выделить при помощи антисывороток со специфичностью к отдельным подклассам, конъюгированных с бромциансефарозой.

Вопросы:

1. В чем заключается принцип выделения иммуноглобулинов (IgG) из сыворотки крови методами солевого осаждения?
2. Какие существуют способы получения препаратов с повышенным содержанием IgG? В чем их суть?

Лабораторная работа №3. Фракционирование белков сыворотки крови методом гель - фильтрации

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.2).



Рис 2. Хроматографическая колонка

Колонка (рис. 2) для хроматографии в простейшем варианте - это стеклянная трубка (1), с оттянутым нижним концом, на который одет 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).

Основной принцип хроматографического разделения. Процесс разделения веществ на колонке, заполненной набухшим сорбентом (гранулами сефадекса), схематически представлен на рис. 2 для большей наглядности

изображены молекулы лишь двух типов (крупные и мелкие черные точки) и гранулы геля (кружки). На рис. 2 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. 3).

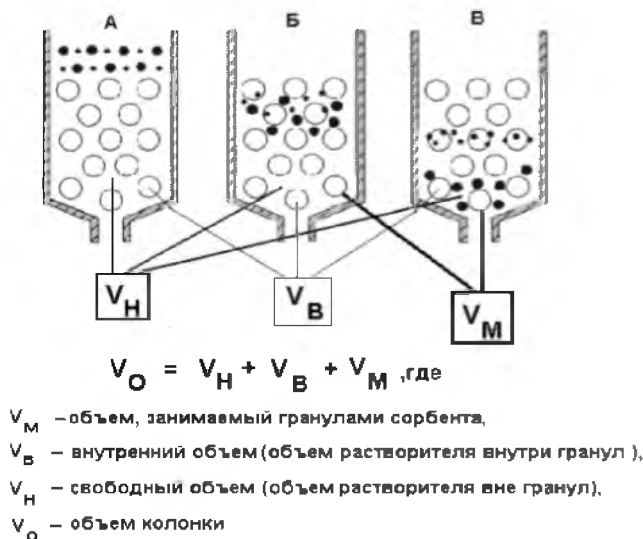


Рис. 3. Разделение веществ с сефадексом

В результате, при продолжающейся подаче растворителя зона крупных молекул (хроматографическая зона) перемещается по колонке с большей скоростью, чем хроматографическая зона мелких молекул (рис. 3), движение которых постоянно тормозится диффузией в неподвижную фазу (жидкость внутри гранул геля). Для молекул промежуточных размеров доступна только часть объема пор неподвижной фазы, поэтому зона таких молекул будет мигрировать быстрее, чем мелкие, но медленнее, чем крупные. 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. 4).

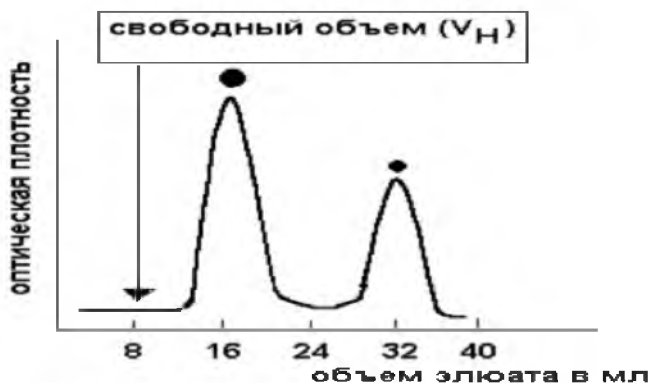


Рис.4. График элюции белков с различной молекулярной массой

Основные параметры хроматографической колонки. Колонка (рис. 2), наполненная набухшим сорбентом, имеет два вида объёмов: «внутренний» и «наружный». Внутренним объемом или объемом неподвижной фазы называют объем растворителя внутри гранул (V_B). Наружный объем или свободный объем колонки - это объем растворителя вне гранул (V_H). Следовательно, объем колонки (V_O) равен $V_B + V_H + V_M$, где V_M —объем занимаемый гранулами сорбента. При пропускании растворенного вещества белок выходит в элюате после того, как выйдет объем, равный V_H , а низкомолекулярные компоненты после того, как выйдет $V_H + V_B$. Наружный объем рассчитывается из уравнения:

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

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

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

$$K_P = (V_E - V_H) / V_B$$

V_E - элюиционный объем, равный объему элюанта, вышедшему с колонки за время от нанесения белка на колонку до выхода его с колонки (если наносится маленький объем) или до половины высоты поднимающейся части пика элюции (если наносится большой объем образца). Чем выше молекулярная масса белка, тем ниже его элюиционный объем, поэтому, сначала выходят белки с большей молекулярной массой, затем с более низкой (рис. 4) и т.д.

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 с– 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).

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. 5).

Ход набивки колонки:

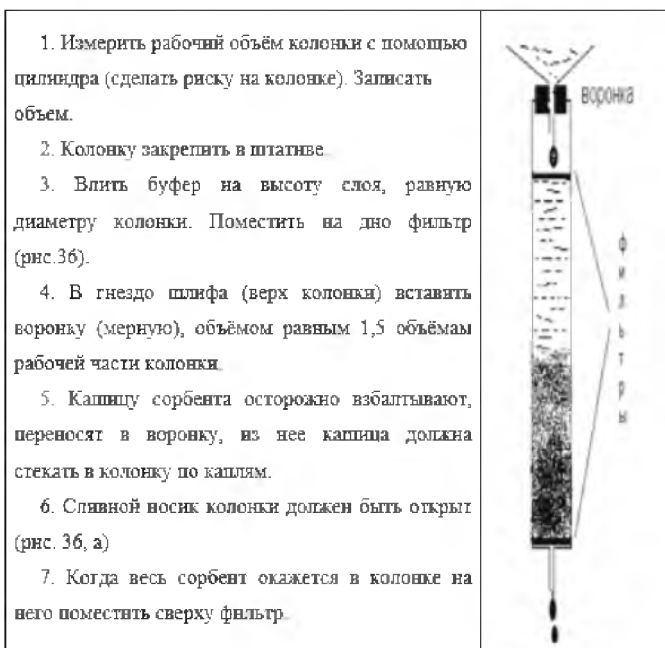


Рис. 5. Процесс заполнения колонки к работе

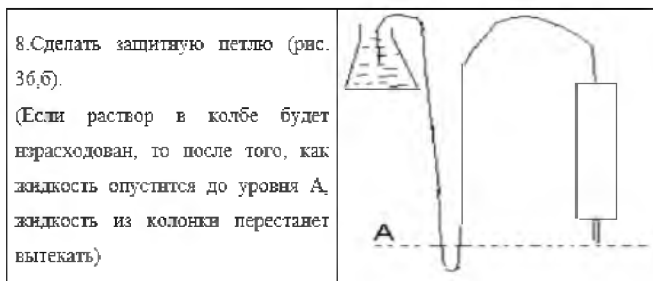


Рис.6. Устройство защитной петли

5. Буфер следует прокачивать через колонку до тех пор, пока уровень сорбента не опустится до стационарного положения (рис.6-- 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: $V_0 = S \cdot h$ 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 $-V_H$. 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. 7, 1 - двухвершинный пик), а другие располагаются на достаточном расстоянии (рис. 7, 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 $[\Delta X]$ в см на ленте самописца (или мл) к ширине второго пика у его основания $[\Delta Y]$,



Рис. 7. График элюции белков

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:

$$\sqrt{L_2} / \sqrt{L_1} = R_{S2} / R_{S1}, \text{ отсюда } L_2 / L_1 = R_{S2}^2 / R_{S1}^2, \text{ следовательно,}$$

$$L_2 = L_1 \times (R_{S2}^2 / R_{S1}^2).$$

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 трисбуфером 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. 8), 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. 8), если $R_S >$ или < 1 , оптимизировать условия фракционирования для минимальной степени разрешения, т.е. $R_S=1$

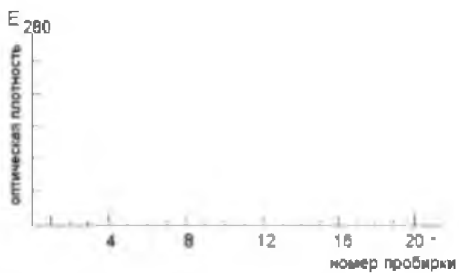
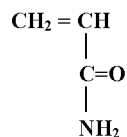


Рис.8 Параметры графика элюции

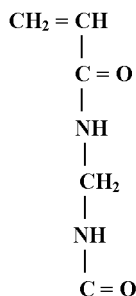
Лабораторная работа №4. Разделение и анализ белков сыворотки крови электрофорезом в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель в виде поддерживающей среды при проведении электрофореза использовал Раймонд и Вейнтрауб (S. Raymond and L. Weintraub) в 1959 году. Теорию метода разработали Орнштейн (Ornstein L., 1964) и Дэвис (Davis B., 1964).

Для получения полиакриламидного геля используют акриламид и какой-либо агент, образующий поперечные сшивки – обычно N,N'-метилденбисакриламид (сокращенно – бисакриламид).



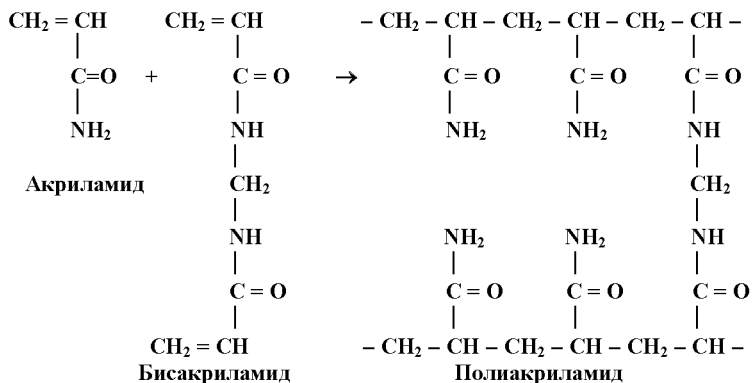
Акриламид



Бисакриламид

Реакция полимеризации протекает по свободнорадикальному механизму и требует наличия свободных радикалов акриламида. В качестве инициаторов реакции полимеризации используют вещества, разрушающиеся с образованием свободных радикалов, которые затем взаимодействуют с молекулами акриламида и запускают (инициируют) полимеризацию. Наиболее широко в качестве инициатора процесса полимеризации используют персульфат аммония ($\text{NH}_4\text{-SO}_4\text{-SO}_4\text{-NH}_4$) или калия, образующий в водном растворе за счет гомолитического разрыва связи радикалы ($\text{NH}_4\text{-SO}_4^\bullet$). Рибофлавин также может служить инициатором полимеризации: при освещении его водного раствора видимым светом (445 нм) он присоединяет водород и восстанавливается до лейкорибофлавина, который легко окисляется растворенным в воде

кислородом, образуя перекись водорода. За счет разложения перекиси продуцируются гидроксильные радикалы (HO[•]), инициирующие цепную реакцию полимеризации акриламида. Поскольку реакция полимеризации акриламида – медленный процесс, то для ускорения процесса полимеризации в качестве катализатора обычно используют N,N,N',N' – тетраметилэтилендиамин (CH₃)₂ – N – CH₂ – CH₂ – N – (CH₃)₂ (ТЕМЭД).



Возможно использование следующих пар катализаторов и инициаторов:

1. Персульфат аммония + ТЕМЭД
2. Персульфат аммония + ДМАПН (3-диметиламинопропионнитрил)
3. Рибофлавин + ТЕМЭД (фотополимеризация)
4. Перекись водорода + сульфат железа + аскорбиновая кислота

Поскольку персульфат аммония неустоек в водном растворе, его часто заменяют персульфатом калия.

Плотность геля (размер пор)

Для характеристики полиакриламидного геля необходимо указывать процентное содержание мономеров. Стандартно используют следующие обозначения:

T – процентное отношение суммарной массы обоих мономеров к объему раствора,

C – процентное отношение массы бисакриламида к общей массе обоих мономеров. (T = акриламид + мономер, образующий сшивки) и количество сшивающего агента в процентах от общего количества мономеров (C):

$$T = (a + b)/m \times 100 \%$$

$$C = b/(a + b) \times 100 \%$$

a – количество акриламида;

b – количество мономера, образующего сшивки (бисакриламида);

m – объем буфера, мл.

T обычно варьируется в пределах 3-30%, а C 1-5%. Выбор значений C и T определяется диапазоном фракционирования белков и ограничивается механическими и адсорбционными свойствами геля. Для крупнопористых гелей необходимо увеличивать степень сшивки (повышать C до 3-5%), для мелкопористых гелей величина C не должна превышать 1-2%.

На первый взгляд чем больше T, тем мельче поры, но это не всегда так, поскольку ПААГ не является регулярной пространственной решеткой с жесткими ячейками определенного среднего размера. При малых значениях C он представляет собой скорее длинные нити, заполняющие весь объем и лишь в отдельных точках случайно сшитые между собой. Такая система не может быть внутренне жесткой. Поэтому мигрирующие в геле макромолекулы, по-видимому, могут раздвигать гибкие длинные участки линейных полимеров акриламида, при этом миграция молекул замедляется и происходит своеобразное трение их о гель. Однако жестких ограничений на размер мигрирующих молекул такая система не накладывает, и это очень существенно.

Чем выше концентрация заполимеризованного акриламида, тем меньше размер пор в геле: $p = 1,5 d / \sqrt{c}$

где p – размер пор в ангстремах

c – объемная концентрация акриламида

d – диаметр молекулы акриламида

Чем больше содержание акриламида (а величина T, в основном, определяется им), тем гуще нити полимера, меньше промежутки между ними и

сильнее трение. Увеличение содержания «сшивки» (С) сначала повышает жесткость геля, т.к. средняя длина свободных участков нитей уменьшается. Трение при этом увеличивается, а миграция биополимеров в геле замедляется. Однако далее картина меняется, экспериментально показано, что с увеличением С выше 10% тормозящий эффект геля (при одних и тех же значениях Т) ослабляется. При С>15% гель ведет себя как крупнопористый даже при высоких значениях Т. Внутренняя структура геля в этом случае приобретает, по-видимому, совсем иной характер. Благодаря частым сшивкам оказывается энергетически выгодным и вероятным многократное связывание нескольких параллельно идущих нитей в своего рода пучки, которые также образуют хаотически спитую пространственную сетку. Эта сетка оказывается действительно жесткой – нити в пучках раздвинуть невозможно. Зато между пучками полимерных нитей образуются достаточно большие пустоты, заполненные жидкой фазой геля, по которым могут свободно мигрировать молекулы биополимеров. Поэтому содержание сшивки С в геле должно быть в пределе 2-5%.

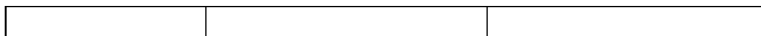
Соотношение между акриламидом и сшивающим агентом определяют механические и физические свойства геля. Для гелей с концентрацией Т 5 – 15 % С рекомендуется выбирать в пределах 2-4 %. Для выбора С была предложена следующая эмпирическая формулы:

$$C (\%) = 6,5 - 0,3 T (\%)$$

$$\text{Бисакриламид, мг} = 1300 / \text{акриламид, г}$$

Концентрация полиакриламидных гелей, используемых для разделения макромолекул с различными молекулярными массами

Концентрация геля Т, %	Концентрация бисакриламида С, %	Пределы разделения, дальтоны
15-20	0,2	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$
10-15	0,3	$4 \times 10^4 - 1 \times 10^5$
5-10	2 – 3	$1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$
5	5	$3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$
2-5	6	выше 5×10^5



Связь между подвижностью белков и концентрацией геля

Электрофоретическая подвижность – это скорость движения частицы (обычно выражаемая в см/с) при напряженности электрического поля в 1 В/см. Эта величина имеет размерность $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$, а её знак совпадает со знаком суммарного заряда макромолекулы.

Рассмотрим изолированную частицу, взвешенную в идеальном диэлектрике. Если приложить равномерное электрическое поле, то на частицу будет действовать сила, равная произведению общего заряда частицы на напряженность этого поля. При наложении электрического поля скорость движения частицы (биологической макромолекулы) довольно быстро увеличивается до тех пор, пока электрическую силу, действующую на частицу со стороны электрического поля, не уравновесит сила трения. После этого частица будет двигаться с постоянной скоростью.

В случае реального электрофореза макромолекул, процесс происходит не в диэлектрике, а в растворе электролита. При этом вокруг заряженной частицы будет существовать ионная атмосфера. Частица при этом будет окружена диффузным облаком ионов, заряд которых противоположен заряду частицы. На значительных расстояниях от частицы суммарный заряд в любом элементе объема, достаточно большом по сравнению с атомными размерами частицы, равен нулю. Присутствие же ионной атмосферы вокруг частицы приводит к тому, что её электрофоретическая подвижность оказывается меньше, чем это предсказывается уравнением. Это обуславливается тремя причинами. Во-первых, потенциал на поверхности частицы снижается из-за снижения её эффективного электростатического заряда. Во-вторых, электрическое поле действует также и на ионы, окружающие макромолекулярную частицу. Поскольку знак заряда ионного облака противоположен знаку заряда частицы, облако будет смещаться в направлении, противоположном движению частицы, замедля тем самым её миграцию (эффект электрофоретического трения). В-третьих, имеет место замедляющий эффект другого рода, связанный с тем, что

в электрическом поле одни ионы при перемещении приближаются к частице, а другие удаляются от неё. Вследствие этого в ионной атмосфере происходит непрерывное замещение ионов, что вызывает нарушение её сферически симметричной формы, так как для вновь входящих ионов требуется определённое время, чтобы найти своё место в поле макромолекулы и прийти в равновесие с её окружением. В результате двойной электрический слой позади частицы растягивается. Действие тормозящей силы такого типа носит название релаксационного эффекта.

Подвижность макромолекул в полиакриламидном геле обратно пропорциональна среднему размеру пор (формула Фергюсона):

$$Lg U = lg U_0 - K_r T$$

K_r – коэффициент задержки;

U – подвижность макромолекул в геле;

U_0 – подвижность макромолекул в свободном растворе;

T – плотность геля (концентрация мономеров)

Электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия

Электрофоретическая подвижность каждого белка зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации и от жесткости упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно меняться в зависимости от условий фореза. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белков надо исключить влияние всех остальных.

Одним из наиболее популярных методов является электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия (ДСН), который позволяет фракционировать белки в зависимости от значения только одного параметра – их молекулярной массы. Основной принцип метода – снижение влияния заряда макромолекулы на ее электрофоретическую подвижность. В этом случае должна наблюдаться пропорциональность между молекулярной массой

макромолекулы и ее сопротивлением трения (коэффициентом задержки). Для этого белки обрабатывают избытком ДСН, который примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДСН с 1 мг белка. Избыток остатков сульфокислоты делает несущественным собственный заряд белка, а постоянство соотношения детергент/белок делает практически одинаковым отношение отрицательного заряда к массе для любого белка. Кроме того, при обработке белка ДСН полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жесткого эллипсоида вращения, размер большой оси вращения которого линейно связан с числом аминокислотных остатков, а следовательно, с молекулярной массой белка.

Электрофоретическая подвижность (u') жесткого комплекса белок-ДСН оказывается связанной с молекулярной массой белка (M_r) простым соотношением: $u' = A - B \lg M_r$, где A и B – коэффициенты, зависящие от пористости геля, температуры и других условий эксперимента. Величину u' удобнее представлять в относительных единицах, выражающих отношение путей миграции белка и лидирующего красителя за время электрофореза, т.е. в значениях введенной ранее величины R_f . Для определения коэффициентов A и B одновременно с фракционированием исследуемой смеси необходимо провести электрофорез набора белков-«маркеров», молекулярные массы которых точно известны. По окончании фореза, измерив пути миграции лидирующего красителя (бромфенолового синего) и каждого из маркеров, можно рассчитать значения R_f и, зная молекулярные массы маркеров, построить экспериментальную зависимость $\lg M_r$ от R_f . Если пористость геля выбрана удачно, то такая зависимость будет линейной. Определив теперь R_f для интересующего нас белка, из графика можно найти для него величину $\lg M_r$ и рассчитать M_r .

При данной пористости (концентрации) геля описанная выше линейная зависимость имеет место только для белков, молекулярные массы которых лежат в определенном интервале. Для ориентировки можно назвать примерное

значение концентрации акриламида в зависимости от молекулярной массы белков:

T, %	5	10	15
Mг, кДа	18-330	10-100	10-60

Наиболее широко используемым вариантом электрофореза с добавлением ДСН является диск-электрофорез по Лэммли [3]. Этот метод позволяет значительно улучшить разделение фракционируемых белков за счет введения дополнительного так называемого «формирующего» крупнопористого геля, в котором белки не фракционируются, а только концентрируются в виде очень узких полос перед переходом в разделяющий гель. Система Лэммли позволяет хорошо разделять белки с $M_r = 15-200$ кДа. Для анализа низкомолекулярных белков и пептидов наиболее широко используется система предложенная Шаггером [4].

Цель работы: Проведение анализа различных искусственно приготовленных смесей белков и интегральных микробиологических объектов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Задачи практической части:

1. Приготовление необходимых растворов и буферов (согласно протоколу метода):
 - а) Приготовление раствора для заливки концентрирующего геля
 - б) Приготовление раствора для заливки разделяющего геля
 - в) Приготовление раствора персульфата аммония
 - д) Дегазация растворов для заливки концентрирующего и разделяющего геля
2. Полимеризация полиакриламидных гелей:
 - а) Собрать систему для заливки гелей, отметить маркером границы заливки разделяющего геля
 - б) Добавить персульфат в раствор и залить разделяющий гель
 - в) Осторожно наслить примерно 100 мкл воды на гель для устранения пузырей

d) Дождаться пока гель застынет и появится четкая граница между водой и гелем - удалить наслоенную ранее воду

e) В раствор для концентрирующего геля добавляем персульфат

f) Вставляем гребенку и заливаем концентрирующий гель

3. Сборка аппарата для проведения электрофореза:

a) Собираем систему для проведения электрофореза (закрепляем стекло с залитым гелем на камере, с другой стороны камеры ставим заглушку)

b) Вынимаем гребенку из застывшего концентрирующего геля и заливаем катодный буфер в верхнюю часть камеры

4. Подготовка и нанесение образцов

a) Готовим образцы для электрофореза: смешиваем анализируемые пробы с буфером для образцов в соотношении 1:1 и кипятим 5 мин

b) В полученные «карманы» геля осторожно наносим пробы, которые из-за разности в плотности с катодным буфером опускаются на дно кармашков

c) В нижнюю часть камеры заливаем анодный буфер

5. Проведение электрофореза

a) Полностью собираем систему для проведения электрофореза и подключаем ее к источнику тока: сначала фореz ведется при токе 15 мА, после перехода лидирующего красителя из концентрирующего в разделяющий гель силу тока увеличивают до 30 мА (в случае использования стабилизации по напряжению – 50 В и 120 В, соответственно)

b) Выключаем систему, после того как полоса лидирующего красителя дойдет до нижней границы геля

6. Фиксация и окраска геля

a) Гель снимаем со стекол и помещаем в фиксирующий раствор

b) Затем гель окрашиваем и отмываем от избыточного фона краски согласно протоколу метода

7. Анализ результатов

a) Фотографируем гель, используя систему гель-документирования

b) Анализируем полученные результаты, используя специальные программы

Стоковые растворы:

Замечания:

Для всех растворов необходимо использовать либо бидистиллированную либо деионизированную (milliQ) воду.

Все растворы готовить только на Трис (а не Трис-НСl); рН доводить концентрированной соляной кислотой (не доводить рН NaOH ни в коем случае!!! – это приводит к увеличению ионной силы буфера и образующийся NaCl сильно влияет на силу тока при э/ф).

Стоки, содержащие акриламид и бисакриламид необходимо растворять при постоянном перемешивании (на вортексе), после доведения объема обязательно профильтровать. Хранить при +4°C не более 3-х месяцев.

Концентрат геля (30, 8% Т, 2,7% С):

Акриламид – 30 г

Бисакриламид – 0,8 г

Растворить и довести объем до 100 мл, обязательно профильтровать.

Хранить при +4°C не более 3-х месяцев

Буфер для концентрирующего геля (4-х кратный):

0,5 М Tris-НСl, 0,4% SDS, рН 6,8.

Объем: 200 мл.

рН доводить перед добавлением SDS. Хранить при +4°C.

Буфер для разделяющего геля (4-х кратный):

1,5 М Tris-НСl, 0,4% SDS, рН 8,8.

Объем: 200 мл.

рН доводить перед добавлением SDS. Хранить при +4°C.

Буфер для э/ф:

0,025 М Tris-НСl (3 г)

0,192 М глицин (24,4 г)

0,1% SDS (1 г)

рН ~8,3.

Объем: 1000 мл.

pH не доводить. Хранить при +4°C.

Буфер для образцов (2-х кратный):

0,02 М Tris-HCl

0,0021 М ЭДТА

2% SDS

10% 2-меркаптоэтанол

20% глицерин

0,002% бромфенолового синего

pH 8,0.

Хранить при -20°C не более 6 месяцев.

Заливка геля:

Концентрирующий гель:

650 мкл концентрата геля

1250 мкл концентрирующего буфера

5 мкл ТЕМЕД

3 мл воды

дегазировать

50 мкл 10% персульфата аммония
аммония

Объем: 5 мл

Разделяющий гель (10%):

3,3 мл концентрата геля

2,5 мл разделяющего буфера

10 мкл ТЕМЕД

4,09 мл воды

дегазировать

100 мкл 10% персульфата

Объем: 10 мл

Персульфат аммония (10% раствор): 30 мг персульфата аммония + 270 мкл воды (каждый раз готовится свежий раствор или приготовленный 10% раствор хранят при -20°C не более 1 месяца).

Подготовка образцов: 20 мкл белка +20 мкл буфера для образцов, кипятить 5 мин.

Раствор для фиксации и окрашивания геля:

125 мл изопропанола

50 мл уксусной кислоты

325 мл воды

1,25 г Кумасси R-250

Объем: 500 мл.

Краску профильтровать. Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

Раствор для отмывки:

50 мл уксусной кислоты

50 мл изопропанола

400 мл воды

Объем: 500 мл.

Хранить в плотно закрытой бутылке под тягой.

Вопросы:

1. Электрофорез как метод разделения биологических макромолекул.
2. Виды электрофореза, их сравнение, преимущества и недостатки.
3. Использование электрофореза в полиакриламидном геле для разделения молекул белков и пептидов в соответствии с их молекулярной массой.

Лабораторная работа №5. 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-Hoechst 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, затем из 1 пробирки взять (см. рис. 9) 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.

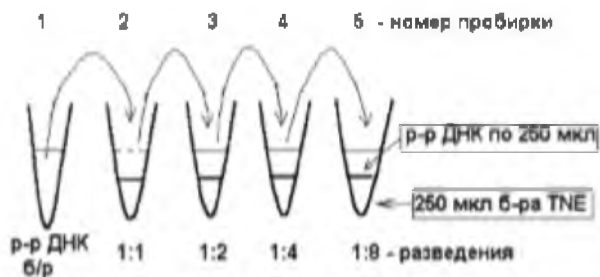


Рис. 9. Приготовление разведений стандартных растворов ДНК

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).

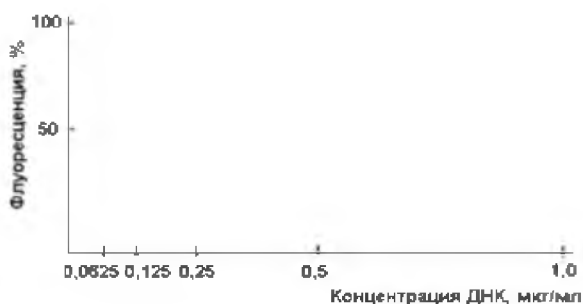


Рис. 10. Калибровочный график для определения концентрации ДНК

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 - F_k . 6.2. Затем исходную сыворотку или плазму развести буфером TNE Hoechst (красителем) 1:100. Выдержать 5 мин, измерить уровень флуоресценции. Показания самописца записать. Это значение - F_0 . 7. Определить уровень флуоресцентного ответа исследуемых образцов (%) по формуле: $F = F_0 - F_k$, где F_0 – среднее арифметическое значение

флуоресценции образца с красителем, а F_k – 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.

Лабораторная работа № 6. Разделение двуспиральной высокополимерной РНК в растворе хлористого лития методом центрифугирования

Высокоэффективным методом разделения нуклеиновых кислот, широко используемым при их очистке, является центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия. В этом случае высокая ионная сила буферного раствора в центрифужных пробирках способствует диссоциации комплексов белков и нуклеиновых кислот, и разделение макромолекул происходит на основании их различий в плавающей плотности. Перемещение макромолекул во время центрифугирования происходит до тех пор, пока они не достигнут зоны раствора CsCl с плотностью, равной их плавающей плотности. В этой зоне происходит их концентрирование. Метод центрифугирования в градиенте плотности CsCl в присутствии бромистого этидия используется в генной инженерии для получения векторных плазмид в препаративных количествах. Он позволяет отделять суперскрученные молекулы ДНК от релаксированных и линейных, так как их плавающие плотности заметно различаются из-за разного количества молекул бромистого этидия, интеркалированного в эти топологические изомеры плазмидной ДНК. В практической генной инженерии для очистки векторных плазмид центрифугирование в градиенте плотности CsCl используется редко. В целях обычного применения рекомбинантных ДНК, в том числе для молекулярного клонирования, построения рестрикционных карт и определения последовательности нуклеотидов (секвенирования), разработаны методы минипрепаративного выделения. В одном из них суперскрученные молекулы рекомбинантных плазмидных ДНК легко отделяются от линейных молекул хромосомной и плазмидной ДНК в процессе щелочной денатурации с последующей быстрой нейтрализацией раствора. При этом в основном успевают денатурировать только суперскрученные молекулы ДНК, так как две их цепи остаются физически связанными друг с другом в процессе денатурации. Образовавшийся комплекс денатурированной ДНК и белков отделяется от плазмидной ДНК центрифугированием, а от основной

массы РНК освобождаются пересаживанием в присутствии высокой концентрации LiCl.

Осаждение LiCl имеет преимущества перед другими методами осаждения РНК, в которых не происходит эффективного удаления ДНК, белок или углеводы. Другое преимущество состоит в том, что литиевое осаждение эффективно удаляет несвязанные нуклеотидфосфаты, которые учитываются при количественном анализе концентрации методом спектрофотометрии.

Цель работы: разделить двуспиральную высокополимерную РНК в растворе хлористого лития методом центрифугирования.

Материалы и оборудование:

Ход работы:

1. Растворить образец ткани в буфере D (4М гуанидин изотиоционат, 30 мМ цитрат натрия, 30 мМ β-меркаптоэтанол, рН 7.0–7.5).
2. Поместить пробирку на лёд. Добавить один объём фенола и перемешать. Добавить 1/5 объёма смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и перемешать образец. Перемешать на вортексе ещё 4 раза по 1 мин. Между перемешиваниями пробирки инкубировать на льду.
3. Открутить на максимальной скорости при 4 °С в течение 30 мин. Верхнюю (водную) фазу перенести в новую пробирку.
4. Добавить 1 мкл соосадителя и 2 объёма 96 % этанола. Перемешать на вортексе и немедленно открутить на максимальной скорости при RT в течение 10 мин.
5. Промыть осадок 80 % этанолом и высушить на воздухе до исчезновения следов спирта. Не пересушивать!!!
6. Растворить осадок в 100 мкл деионизованной воды. Добавить равный объём 12М LiCl и охладить раствор в течение 30 мин при –20 °С.
7. Открутить на максимальной скорости 15 мин при комнатной температуре. Промыть осадок 0.8 мл 80 % этанола.
8. Осадок высушить, как описано ранее, и растворить в 40 мкл деионизованной воды, свободной от РНКаз.

9. Определить концентрацию и чистоту полученного препарата РНК.

Комментарии к методике:

1) Объем ткани не должен превысить 1/5 объема буфера D. Чтобы избежать деградации РНК, гомогенизация ткани должна быть выполнена так быстро и полностью, насколько возможно.

2) При выделении РНК может происходить загрязнение геномной ДНК. Однако, если ее количество не превышает по свечению РНК в агарозном геле с бромистым этидием, такое загрязнение не является критичным и дает возможность использовать полученный препарат РНК в дальнейшем.

3) Для хранения выделенной РНК, добавьте 0.1 объема 3М ацетата натрия и 2.5 объемов 96 % этанола к РНК в воде и смешайте полностью. Образец может быть сохранен в течение нескольких лет в -20°C .

Лабораторная работа №7. Определение чистоты биополимеров. Диализ

Диализом называют процесс разделения высокомолекулярных веществ (например, белков) и низкомолекулярных (например, солей) с помощью полупроницаемых мембран.

Полупроницаемыми называют мембраны, диаметр пор которых позволяет проходить только низкомолекулярным соединениям. Примером естественных полупроницаемых мембран могут быть капсулы Боумена—Шумлянскогo почек. Широко используют искусственные полупроницаемые мембраны: целлофан, коллодий, на основе которых созданы диализаторы, в том числе «искусственная почка».

Метод диализа используют в научных лабораториях, в промышленности, в клинической практике.

Цель работы

Доказать, что низкомолекулярное соединение NaCl проходит через полупроницаемую мембрану, а высокомолекулярный белок не проходит и остается в диализируемом растворе.

Принцип метода

Метод основан на том, что низкомолекулярные вещества легко диффундируют через полупроницаемые мембраны в чистый растворитель, образуя диализат. Диффузия будет продолжаться, пока не произойдет выравнивание концентраций диффундируемого вещества между диализируемым раствором и диализатом. Процесс возобновится, если диализат заменить чистым растворителем или, если эта смена будет происходить постоянно (проточный диализ).

Ход работы

Подготовка диализатора: полупроницаемой мембраной могут быть диализные трубки или целлофановые диализные мешочки. Целлофан (квадрат 10x10 см) смачивают дистиллированной водой, делают в нем углубление и получают диализный мешочек.

Приготовление диализируемого раствора: в диализный мешочек помещают 20 капель разведенного яичного белка в 5 % растворе NaCl (белок одного яйца разводят в 300 мл 5% раствора NaCl) и перемешивают. Края целлофана зажимают между двумя стеклянными палочками, скрепленными между собой резиновыми кольцами.

Диализ. Мешочек с солевым раствором белка помещают в стакан с дистиллированной водой так, чтобы часть мешочка с раствором белка была полностью погружена в воду. Сразу же, на просвет можно заметить струйки солевого раствора, опускающиеся из мешочка на дно стакана, что обусловлено изменением рефракции воды.

Анализ результатов диализа. Через 60 мин после начала диализа проводят качественные пробы на белок (биуретовую реакцию) и на NaCl (с AgNO₃) в соответствии с таблицей.

<i>Реактивы</i>	<i>Проба на белок в диализате</i>	<i>Проба на белок в диализируемой жидкости</i>	<i>Проба на ионы Cl⁻ в диализате</i>
Диализат	10 капель	–	10 капель
Диализируемый раствор	–	10 капель	–
10 % NaOH	5 капель	5 капель	–
1 % CuSO ₄	1 капля	1 капля	–
10 % HNO ₃	–	–	1 капля
1 % AgNO ₃	–	–	1 капля
Наблюдения			

Вопросы:

1. В чем суть диализа? Расскажите принцип данного метода.
2. Какие мембраны используют при проведении диализа?

Лабораторная работа №8. Введение чужеродной ДНК в клетки дрожжей и бактерий

Цель работы: дать представление о различных методах введения чужеродной ДНК в клетки-мишени. Получение экспериментальных навыков по созданию генетически модифицированных организмов на примере клеток *E. coli* и дрожжей.

Задача работы: провести эксперимент по трансформации клеток *E. coli* и дрожжей рекомбинантным челночным вектором pPZA двумя различными способами – химической трансформацией и электропорацией, продемонстрировать связи ДНК→РНК→белок→свойство организма.

Трансформация – применительно к доставке чужеродной ДНК в клетку в самом общем значении термин обозначает процесс введения свободной ДНК в клетку. В более узком значении, как метод доставки ДНК, термин применяется в основном по отношению к бактериям, обозначая процесс поглощения рекомбинантной ДНК компетентными клетками, индуцированный температурным фазовым переходом клеточной мембраны. *E. coli* является самым распространенным организмом при работе с рекомбинантными ДНК, и чтобы обеспечить внедрение в клетки плазмидной ДНК, клетки выдерживают с ледяным раствором CaCl₂ и ДНК, а затем подвергают тепловому шоку при 42 °С в течение ~1 мин. По-видимому, в результате такой обработки происходит локальное разрушение клеточной стенки. Эффективность трансформации, которая определяется как число трансформантов на 1 мкг добавленной ДНК, при этом составляет примерно 10⁵–10⁷. Эффективность этого метода невысока, приблизительно менее 0,1 % клеток оказываются трансформированными, но этот недостаток компенсируется применением схем отбора, позволяющих быстро идентифицировать нужные клоны.

Клетки, способные поглощать чужеродную ДНК, называются компетентными. Доля компетентных клеток в популяции обычно очень мала, но ее можно повысить, используя специальную питательную среду, условия культивирования и химические индукторы компетентности (подобранные, как

правило, эмпирически). Часто этапом подготовки компетентных клеток идет получение сферопластов – клеток, частично или полностью (протопласты) лишенных наружной ригидной клеточной стенки. Например, только таким способом была осуществлена эффективная трансформация многих грамположительных бактерий родов *Bacillus*, *Listeria*, *Streptomyces* и др. Некоторые методики трансформации дрожжей также включают стадии ферментативного удаления оболочки дрожжевой клетки с помощью глюкозидаз. Для организмов, устойчивых к химическим индукторам компетентности или не обладающих природной компетентностью, применяются другие системы доставки ДНК. Одним из популярных методов введения нуклеиновых кислот в клетку микроба является электропорация – временное создание пор в бислойной липидной мембране под кратким воздействием электрического поля. Это универсальный физический метод трансформации, методика которого разработана практически для всех типов клеток. Для многих типов клеток служит единственным способом высокоэффективной трансформации. При работе с *E. coli* подготовленную клеточную суспензию (~50 мкл) и ДНК помещают между электродами и подают единичный импульс тока длительностью ~4,5 мс при напряжении 1,8 кВ, расстояние между электродами 1 мм. После такой обработки эффективность трансформации повышается до 10^9 – 10^{11} для малых плазмид (~3–6 тпн) и до 10^6 для больших (~135 тпн). Аналогичные условия используют для введения в *E. coli* вектора ВАС. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (12–18 кВ/см), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1-2 кВ/см. Электропорация – наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки, требующий, однако, специального прибора электропоратора.

Материалы и методы:

- термостатируемый шейкер-инкубатор Exella E-24, «New Brunswick» (CA) для выращивания клеточных культур;
- бокс-ламинар БАВнп-01-"Ламинар-С"-1,2 производства «Ламинарные системы» (Россия) , I класс защиты (рис. 2.8);
- микроцентрифуга для пробирок «Eppendorf» 5417R (США) с ротором для микропробирок 1,5–2,0 мл (см. работу 2.1);
- лабораторный шейкер-вортекс «Вортекс V-1» фирмы «BioSan» (см. работу 2.1);
- термостат модель KB53, «Binder» (Германия);
- универсальный электропоратор «GenePulser Xcell» фирмы «Bio-Rad» (США) с одноразовыми кюветами для электропорации;
- водяная баня-термостат WB-4MS фирмы «BioSan»;
- замороженные химически компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue; химически компетентные клетки метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*;
- электрокомпетентные клетки дрожжей *Pichia pastoris*; раствор плазмидной рекомбинантной ДНК челночного экспрессионного вектора pPZA с блеомициновой устойчивостью, несущего вставку чужеродного гена;
- реагенты для химической трансформации дрожжей *Pichia pastoris* с LiCl;
- агар на LB среде;
- антибиотик блеомицин 100 мг/мл;
- чашки Петри;
- стерильная одноразовая пластиковая посуда (наконечники, микропробирки), шпатели для растирания культур;
- пластиковые пробирки Eppendorf;
- контейнер со льдом, водяная баня (42 °С), термостат (37 °С).

Химическая трансформация клеток *E. Coli*

Ход работы:

1. Подписать две пластиковые пробирки +ДНК и –ДНК.

2. В ламинарном боксе стерильно отобрать по 50 мкл суспензии компетентных клеток в трансформационном буфере в каждую пробирку. Поместить пробирки в ледяную баню.
3. В пробирку +ДНК внести 1 мкл раствора плазмидной ДНК. В пробирку – ДНК внести такое же количество буфера без ДНК. Выдержать обе смеси на льду 20 мин.
4. Расплавить агар в микроволновой печи и залить чашки с антибиотиком и без него. Конечная концентрация блеомицина для клеток *E. coli* 25 мкг/мл, для дрожжевых клеток 100 мкг/мл.
5. Высушить залитые агаром чашки под UV-облучением в ламинарном боксе.
6. Провести процедуру теплового шока. Для этого обе пробирки поместить в водяную баню (42 °С) на 25 с (строго!), после чего быстро перенести их опять на лед. Выдержать 2–3 мин.
7. Пробирки вынуть из льда, добавить по 250 мкл свежей LB-среды (стерильно!) и инкубировать при 37 °С в течение 30 мин.
8. Высеять полученные клетки на соответствующие чашки с агаром. Для этого отобрать по 100 мкл клеточной суспензии и перенести ее на поверхность агара. Растереть стерильной стеклянной петлей досуха, закрыть чашки, перевернуть и поместить в термостат (37 °С) на ночь.
9. Проанализировать полученные результаты. Сравните количество выросших колоний на чашках с антибиотиком и без.
10. Определите эффективность трансформации по формуле.
Эфф. трансф. = число колоний на чашке / кол-во ДНК на чашку (мкг).

Трансформация клеток *E. coli* электропорацией

Ход работы:

1. Подписать две пластиковые пробирки +ДНК и – ДНК.

2. В ламинарном боксе стерильно отобрать по 80 мкл суспензии электрокомпетентных клеток в воде в каждую пробирку. Поместить пробирки в ледяную баню.
3. В пробирку +ДНК внести 1 мкл раствора плазмидной ДНК в воде. В пробирку – ДНК внести такое же количество буфера без ДНК. Перемешать.
4. Перенести смесь клеток с ДНК в электропорационную кювету 0,1 мм.
5. Провести процедуру электропорации при 1800 кВ пульсе согласно инструкции к прибору.
6. Сразу же добавить к клеткам SOC-среду и поместить их в термостат на 30 мин при 37 °С, лучше с перемешиванием.
7. Высеять полученные клетки на соответствующие чашки с агаром. Для этого отобрать по 100 мкл клеточной суспензии и перенести ее на поверхность агара.
8. Растереть стерильной стеклянной петлей досуха, закрыть чашки, перевернуть и поместить в термостат (37 °С) на ночь.
9. Проанализировать полученные результаты. Сравнить количество выросших колоний на чашках с антибиотиком и без.
10. Определить эффективность трансформации аналогично п. 10 задачи 2.1.1 и сравнить ее с полученной для химически компетентных клеток.

Вопросы:

1. Что такое генетическая трансформация?
2. Что такое компетентные клетки? Как вы себе представляете процесс проникновения плазмидной ДНК внутрь клеток в момент температурного шока?
3. Каков процесс проникновения молекул рекомбинантной ДНК внутрь клеток в процессе электропорации?
4. Почему для проведения генетических модификаций чаще всего используют клетки *E. coli*? Какие еще организмы используются в биотехнологии?
5. Какова эффективность проведенной вами трансформации? От чего она зависит?

Лабораторная работа №9. Процедура очистки геномной ДНК из лука

Цель этой лабораторной работы состоит в том, чтобы преподать вам личный опыт "общения" с ДНК, очищая её из растительной ткани. Вы начнете с целой луковички и закончите относительно чистой ДНК, содержащей буквально миллионы генов. Очищенная ДНК может быть сохранена в спирте или высушена.

Задачи:

1. Познакомиться с физическими свойствами ДНК, выделив её из живой ткани.

2. Изучить каждый шаг процедуры выделения, поскольку это касается физических и биохимических особенностей генетического материала. Материалы и оборудование.

Материалы и оборудование:

Материалы	Оборудование
1. Буфер для гомогенизации 100 мл (додецил сульфат натрия-5г, хлорид натрия-0.877г, цитрат натрия-0.41г, ЭДТА-0.029г.)	1. Блендер/гомогенизатор 2. 60°C водяная баня 3. Ёмкость со льдом, 4. Весы (0.1-граммовая шкала)
2. Средняя луковичка 3. 95%-ый этанол выдержанный при -20°C.	5. Перчатки, нож, воронка, марля (4 слоя) 6. Цилиндр на 100 мл (для этанола), 7. Стакан на 250 мл, стакан на 500 мл 8. Стакан на 100 мл, стеклянная палочка

Прежде, чем выделить ДНК из ядер клеток тканей лука, клеточные стенки, плазматические и ядерные мембраны должны быть разрушены. Этот результат достигается гомогенизацией тканей лука в блендере. При этом, детергент, содержащийся в гомогенизационном буфере, разрушает клеточную мембрану и превращает в эмульсию липиды и белки клетки, разрушая полярные и гидрофобные взаимодействия, которые скрепляют клеточную мембрану. Далее, ДНК может быть отделена от хромосомных белков химическими компонентами, содержащимися в буфере для гомогенизации, которые осаждают белки из раствора.

Методика выделения геномной ДНК из тканей лука для качественного анализа.

1. Наденьте перчатки, порежьте луковицу среднего размера на кубики, не более 3 см шириной. Перчатки предотвращают попадание ферментов дезоксирибонуклеазы с Ваших рук в образец ДНК и не допускают разрушения ДНК на маленькие фрагменты.

2. Взвесьте 50 г нарезанного кубиками лука. Перенесите весь взвешенный материал в стакан объёмом 500 мл.

3. Добавьте 100 мл буфера для гомогенизации к нарезанному кубиками луку и инкубируйте стакан на водяной бане в течение 15 минут (не больше!). Эта термообработка смягчает ткань лука и делает возможным проникновение буфера для гомогенизации. Эта процедура также денатурирует многие ферменты, которые могли бы помешать процедуре выделения.

4. Быстро охладите ваш образец до 15-20о С в ледяной ёмкости (в смеси льда и воды). Эта процедуру нужно проводить приблизительно 6 минут для предотвращения ДНК денатурации.

5. Вылейте свой охлажденный образец в блендер или оставьте в этом же стакане на 500 мл (если блендер без стакана) и закройте крышкой. Гомогенизируйте в течение 45 секунд на низкой скорости, затем 30 секунд на высокой скорости. Гомогенизация разрушает клеточную мембрану и освобождает содержимое клеток (углеводы, белки, жиры, и нуклеиновые кислоты).

6. Вылейте гомогенат из блендера в стакан на 250 мл. Оставьте его в ледяной ёмкости на 15-20 минут.

7. Пропустите гомогенат через четыре слоя марли в новый стакан на 100 мл, следя за тем, чтобы пена осталась на марле.

Осаждение ДНК. Гомогенат должен содержать только ДНК и компоненты среды для гомогенизации. Из компонентов, находящихся в гомогенате, только ДНК не растворима в этаноле выдержанном в морозильной камере. Поэтому, когда этот «ледяной» этанол добавляется к гомогенату, все

компоненты гомогената растворяются – кроме ДНК. Если инструкциям следовали тщательно, и молекулярная структура ДНК осталась неповрежденной, генетический материал должен выпасть в осадок как толстая, волокнистая, белая масса, которую можно намотать на стеклянную палочку или железную петлю.

Если же ДНК была повреждена, она также выпадет в осадок, но как белая, бесформенная масса, которая не может быть собрана на стеклянную палочку.

8. Поместите свой стакан с отфильтрованным гомогенатом в ёмкость со льдом. Оставьте его охлаждаться, пока температура гомогената не достигнет 10-15о С (приблизительно 10- 15 минут).

9. Отмерьте 80 мл этанола (охлаждённого предварительно в морозилке при –20о С) в мерный охлаждённый цилиндр на 100 мл. Медленно добавляйте этанол по краю стакана на 100 мл или мензурки, пока белая, волокнистая ДНК не выпадет в осадок.

Возможно, не потребуются всех 80 мл спирта, чтобы осадить ДНК. 10. Попробуйте намотать волокнистую ДНК на стеклянную палочку, вращая ее в стакане только в одном направлении.

11. Полученную ДНК можно хранить в холодильнике для демонстрации качественного выделения ДНК. Также с этой ДНК можно провести электрофорез на агарозном геле и продемонстрировать отличие геномной от плазмидной ДНК.

Методы разделения и очистки биополимеров (учебное пособие) /
Л.Р. Лебедев, М.Ю. Чепрасова, Н.В. Волкова. – Барнаул, 2019.-52с.

Составители: Леонид Рудольфович Лебедев,
Марина Юрьевна Чепрасова,
Наталья Вячеславовна Волкова.

Пособие предназначено для студентов дневного отделения, обучающихся по программе «Разработка биофармацевтических препаратов на основе рекомбинантных технологий» в рамках направления подготовки 04.04.01 Химия.

Подписано в печать 28.05.2019.

Формат 60x84 1/16. Усл.-печ. л. 3,02.

Тираж 100 экз. Заказ 289.

Типография Алтайского государственного университета
656099 Барнаул, ул. Димитрова, 66