

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ПЕТРА ВЕЛИКОГО

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАБОТЫ С БЕЛКАМИ.
ПРОТОКОЛЫ**

Учебное пособие

Санкт-Петербург

2020

Авторы:

Я.А. Забродская, А.А. Шалджян, В.В. Егоров, А.Л. Коневега

Биофизические основы работы с белками. Протоколы : учебное пособие / Я. А. Забродская [и др.]. – СПб., 2020. – 83 с.

Учебное пособие соответствует образовательному стандарту высшего образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по направлениям подготовки магистров: 16.04.01 «Техническая физика» по дисциплинам «Методы исследования структуры белков», «Физические основы ядерной медицины», «Физика радиоизотопной медицины» и 12.04.01 «Приборостроение» по дисциплине «Физические основы получения и обработки экспериментальных данных», а также соответствует основной профессиональной образовательной программе подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ по направлению 03.06.01 «Физика и астрономия» (профиль 03.01.02 «Биофизика»).

Пособие может быть использовано для обучения бакалавров, магистров и аспирантов Высшей школы биомедицинских систем и технологий ИБСиБ СПбПУ, студентов и аспирантов других учебных заведений биохимического, биофизического и медико-биологического профиля, а также молодых учёных и специалистов, проходящих обучение современным методам биофизики и молекулярной биологии.

© Забродская Я.А., Шалджян А.А., Егоров В.В.,
Коневега А.Л., 2020

© Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Раздел 1. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле	6
§ 1.1 ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии додecilсульфата натрия.....	9
§ 1.2 Двумерный ЭФ в ПААГ	18
§ 1.3 Нативный синий	25
§ 1.4 Трициновый ЭФ в ПААГ	27
Раздел 2. Окрашивание гелей после ЭФ в ПААГ.....	31
§2.1 Окрашивание серебром	31
§ 2.2 Окрашивание коллоидным раствором Кумасси G250.....	33
§ 2.3 Окрашивание Кумасси R250 (система «уксус-этанол»).....	34
§ 2.4 Экспресс-окрашивание Кумасси G250	35
Раздел 3. Определение концентрации белков.....	36
§ 3.1 Метод Лоури в модификации Сандермана и Стромингера	36
§ 3.2 Метод Брэдфорда	40
§ 3.3 По поглощению на длине волны 280 нм.....	42
Раздел 4. Иммунодетекция	44
§ 4.1 Вестерн блоттинг	45
§4.2 Полусухой перенос	49
§4.3 Дот-блоттинг.....	50
§4.4 Иммунодетекция антигена на мембране.....	51
§4.5 Хемилюминесценция (реакция люминол-кумаровая кислота)	53
§4.6 Окрашивание при помощи DAB.....	54
§ 4.7 Иммуноферментный анализ.....	55

§ 4.8 Аффинная хроматография в объёме.....	59
§ 4.9 Иммунопреципитация.....	62
Раздел 5. Пробоподготовка к масс-спектрометрии	64
§ 5.1 Ферментативный гидролиз в геле трипсином	65
§ 5.2 Ферментативный гидролиз в растворе трипсином	69
§ 5.3 Обессаливание на ZipTip.....	70
§ 5.4 Приготовление матриц для MALDI масс-спектрометрии.....	73
§ 5.5 Получение изотопно меченых стандартов.....	74
ПРИЛОЖЕНИЯ	77
Приложение А. Лизирование клеток.....	77
Приложение Б. Физические Свойства Радиоизотопов	78
Приложение В. Физические характеристики нуклеозидтрифосфатов и дезоксинуклеотидтрифосфатов.....	79
Приложение Г. Температурная зависимость рН раствора 50 мМ Трис-НСl	80
Список литературы.....	81

ВВЕДЕНИЕ

Данное методическое пособие призвано помочь молодым исследователям разобраться в основах экспериментальных биофизических методов работы с белками. Помимо общего описания принципа методов в пособии приведены подробные протоколы проведения экспериментов.

Разобраны наиболее распространённые методики исследования белковых молекул: электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, различные методы окрашивания полученных гелей, определение концентрации белков в растворе, вестерн блоттинг, иммуноферментный анализ, некоторые способы выделения антигенов из растворов (аффинная хроматография в объёме, иммунопреципитация). Также в последнем разделе приведены некоторые методики, позволяющие подготовить белки к масс-спектрометрической идентификации.

При постановке экспериментов, описанных в данном пособии, необходимо соблюдать технику безопасности и правила поведения в биохимической и биофизической лаборатории: надевать перчатки, защитные очки и халат, при работе с летучими веществами, кислотами и щелочами – работать в вытяжке. Необходимо предварительно изучить правила работы со всеми используемыми реактивами на сайте производителя или в инструкции.

РАЗДЕЛ 1. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Белки в растворе, в зависимости от их аминокислотной последовательности, можно охарактеризовать двумя параметрами: заряд и молекулярная масса (ММ). Метод электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) основан на способности заряженных молекул, или ионов (в данном случае – белков или пептидов), двигаться к электродам под действием электрического тока. Скорость такого движения будет зависеть от массы молекулы, её формы и заряда.

Для того, чтобы белки не просто двигались под действием электрического поля, но и разделялись и фиксировались в пространстве в соответствии с их массой, формой и зарядом, этот процесс в методе ЭФ в ПААГ происходит внутри геля, образованного двумя типами молекул в процессе их сополимеризации: акриламидом и бисакриламидом (Рис. 1.1). В результате, в зависимости от исходной концентрации данных молекул, полиакриламидный гель будет содержать поры определённого размера. При этом, акриламид формирует вытянутые полимерные нити, а бисакриламид, в свою очередь, образует поперечные сшивки между ними. Размер пор регулируется концентрацией акриламида и бисакриламида (при этом, концентрация бисакриламида всегда примерно в 30 раз меньше, чем акриламида). Для того, чтобы в обозримом будущем произошёл процесс полимеризации, к раствору, содержащему смесь акриламида и бисакриламида, добавляют катализаторы – персульфат аммония и TEMED (тетраметилэтилендиамин). Причём, в растворе образуются свободные радикалы персульфата, которые активируют четвертичный амин TEMED, а он, в свою очередь, уже активирует полимеризацию мономеров акриламида. Следует помнить, что раствор акриламида токсичен до тех, пор, пока не произошла полимеризация, поэтому необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности, чтобы раствор не попал на кожу или слизистые носа,

рта, глаз. После того, как гель полимеризовался – никакой опасности он уже не представляет.

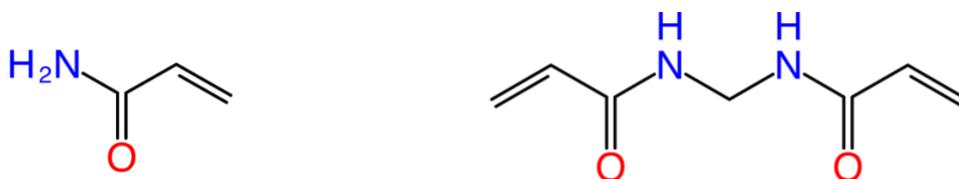


Рисунок 1.1 – Структура акриламида (слева) [1] и бисакриламида (справа) [2]

В зависимости от диаметра пор белки с разной молекулярной массой (и, соответственно, с разными гидродинамическими радиусами) будут двигаться с разной скоростью. Малые белки (по сравнению с радиусом пор) будут слабо замедлять своё движение через поры большого размера и будут двигаться относительно беспрепятственно. И, наоборот, если поры малы по сравнению с белком – его скорость будет существенно снижаться, вплоть до того, что белок в принципе не сможет двигаться под действием электрического поля. В свою очередь, чем больше суммарный заряд белковой молекулы – тем быстрее она будет двигаться к противоположно заряженному электроду.

Существует множество вариаций данного метода, в частности ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulphate, SDS) или SDS-ЭФ в ПААГ, трициновый ЭФ в ПААГ (для разделения небольших полипептидов), нативный ЭФ в ПААГ (разделение белков при максимально возможном сохранении их нативной пространственной структуры) и так далее. Однако, схема эксперимента будет общая.

Образец в соответствующем буфере наносят на верхний край геля (в специально сформированные из геля лунки, Рис. 1.2). Предварительно, собирают камеру для ЭФ, заполняют её катодным и анодным буферами. После того, как образец нанесён, включают электрический ток, в результате чего белки мигрируют под действием электрического поля. Надо чётко понимать, белки какого заряда будут разделяться методом ЭФ в ПААГ, поскольку от

этого зависит полярность прикладываемого напряжения. В случае SDS-ЭФ в ПААГ (см. §1.1) молекулы белков в растворе заряжены отрицательно за счет образования комплексов с анионным детергентом SDS и, таким образом, будут двигаться от катода к аноду. При использовании вместо SDS катионного детергента, например, СТАВ, движение белков будет осуществляться в противоположном направлении и полярность подключения камеры к источнику тока следует поменять. При нативном ЭФ в ПААГ направление движения молекул белков зависит от значений pH буферной системы и изоэлектрических точек компонентов белковой смеси. Существует множество вариантов постановки нативного ЭФ в ПААГ и выбор конкретного варианта зависит, прежде всего, от особенностей исследуемого материала.

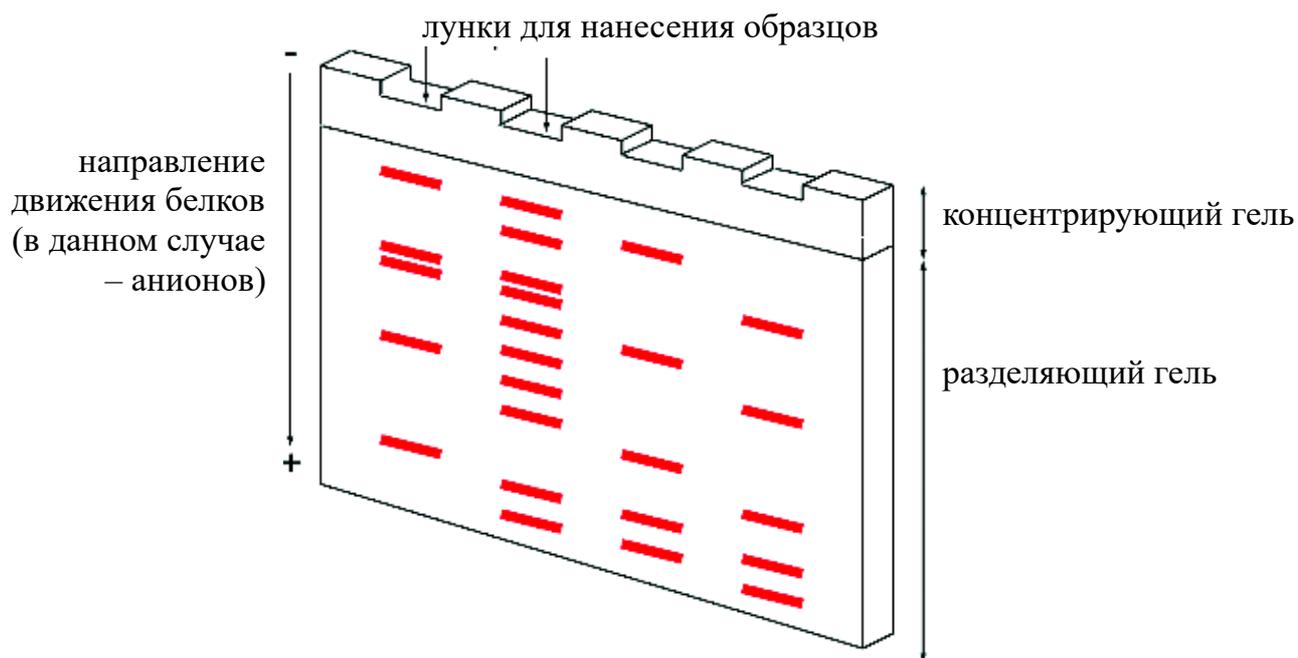


Рисунок 1.2 – Схематическое изображение ПААГ (адаптировано из [3]).

Красным обозначены разделившиеся под действием электрического тока белки, сконцентрировавшиеся по зонам

В результате ЭФ в ПААГ белки разделяются на узкие зоны в соответствии с их молекулярной массой, зарядом и размером. Для того, чтобы визуализировать разделённые белковые зоны используют различные методы

окрашивания (Раздел 2), или же выявляют конкретные белки при помощи специфических антител методом вестерн блоттинга (Раздел 3, § 3.1). Если белки неизвестны, то после окрашивания их можно идентифицировать при помощи метода масс-спектрометрии.

§ 1.1 ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия

SDS-ЭФ в ПААГ является наиболее распространённой методикой разделения белков и используется для проверки чистоты выделенного белка, наличия в нём примесей, либо для предварительного разделения смеси белков для оценки их распределения по массам или же дальнейшего выявления конкретного белка (например, методом вестерн блоттинга при взаимодействии со специфическими антителами или идентификация неизвестного белка из зоны ПААГ методом масс-спектрометрии).

Данная вариация метода ЭФ в ПААГ позволяет нивелировать эффект формы и заряда исследуемых белков, и провести их разделение только в соответствии с молекулярной массой. Для этого используется додецилсульфат натрия, SDS (Рис. 1.3, а) – детергент, который обладает отрицательным зарядом. В процессе денатурации белка (в данном случае – путём кипячения) SDS связывается с ним, сообщая белку большой отрицательный заряд, в связи с чем исходный заряд становится незначительным. Одна молекула SDS связывается примерно с двумя аминокислотными остатками белка. Для того, чтобы белок окончательно потерял нативную конформацию и представлял собой полностью денатурированную цепь из аминокислотных остатков, к нему добавляют восстанавливающие агенты – бэтамеркаптоэтанол (β МЭ) или дитиотреитол (DTT), которые разрушают дисульфидные связи в белке.

Исследуемые белки после денатурации и восстановления наносят на верхний край геля (в специально сформированные из геля лунки, Рис. 1.2). Для того, чтобы оценить молекулярную массу белков в геле после разделения, в

одну из лунок наносят смесь стандартных белков с известными молекулярными массами (или же, в случае коммерческих стандартов, это могут быть не белки, а синтетические полиаминокислоты).

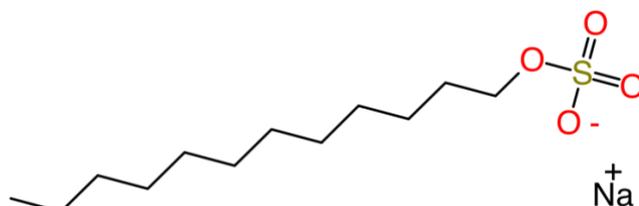


Рисунок 1.3 – Строение SDS [4]

Окончание электрофоретического разделения оценивают по синему фронту красителя бромфеноловый синий, который также добавляют в буфер для образцов. Ниже этого красителя (то есть, ближе к аноду) белков нет, в связи с этим, когда окрашенный фронт достигает нижней части геля, электрофоретическое разделение белков прекращают.

Приведённый ниже протокол основан на публикации Лэммли [5]. Данная методика позволяет разделять белки с молекулярной массой от 6 до 500 кДа, однако максимально эффективна для разделения белков с ММ > 30 кДа [6].

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
30% acrylamid mix (AAmix) (AA : бисАА как 29 : 1) (хранить при +4°C)			
Акриламид	100% (порошок)	29 г	29%
Бисакриламид	100% (порошок)	1 г	1%
H ₂ O	---	до 100 мл	---
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 * (хранить при +4°C)			
Tris base	121.14 г/моль	2.423 г	1.0 M
H ₂ O	---	до 20 мл	---

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 * (хранить при +4°C)			
Tris base	121.14 г/моль	18.171 г	1.5 M
H ₂ O	---	до 100 мл	---
10% SDS (хранить при RT**)			
SDS	100% (порошок)	0.1 г	10%
H ₂ O	---	до 10 мл	---
10% APS (не хранится)			
APS	100% (порошок)	0.1 г	10%
H ₂ O	---	до 10 мл	---
4x буфер для образцов (буфер Лэммли)			
Разаликворить и хранить при -20°C. Размороженную пробирку при +4°C			
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 M	2.5 мл	100 mM
βМЭ***	14.3 M	0.7 мл	400 mM
SDS	100% (порошок)	1 г	4%
Бромфеноловый синий	100% (порошок)	0.05 г	0.2%
Глицерол	87%	5.8 мл	20%
H ₂ O	---	до 10 мл	---
10x Трис-глициновый буфер (с SDS), TGS (хранить при RT)			
Tris base	121.14 г/моль	30.2 г	250 mM
Глицин	75.07 г/моль	188 г	2.5 M
SDS	100% (порошок)	10 г	1 %
H ₂ O	---	до 1000 мл	---

* необходимо подведение pH раствором концентрированной HCl. Для этого сначала воду добавляют не до конечного объёма буфера, а меньше, затем порционно добавляют HCl, до тех пор, пока pH не достигнет нужного значения, после чего добавляют воду до расчётного объёма буфера.

** RT – комнатная температура (room temperature).

*** можно заменить на DTT с в два раза меньшей молярной концентрацией (βМЭ нельзя использовать, если в дальнейшем планируется окрашивание серебром)

➤ Заливка геля

Вариант I: концентрирующий и разделяющий гели

В данной системе используется ПААГ, состоящий из двух частей. Меньшая часть (верхняя) – с низким процентом геля (обычно 5%). Здесь происходит концентрирование образца в узкую зону (что особенно актуально при большом объеме наносимого образца), поскольку основная часть белков не задерживается такими большими порами ПААГ. Большая часть (нижняя) – с более высоким процентом. Здесь уже происходит непосредственное разделение белков в соответствии с молекулярными массами. Ниже представлена таблица, на которую можно ориентироваться при выборе процента разделяющего геля в зависимости от желаемого диапазона разделения молекулярных масс белков.

ММ белка, кДа	36-205	24-205	14-205	14-66	10-45
Процент ААmix разделяющего геля	5%	7.5%	10%	12.5%	15%

1) Собрать форму для вертикальной полимеризации геля: наложить друг на друга толстое и тонкое стёкла (либо два стекла, между которыми вставить спейсеры), вставить в зажим и поместить в подставку на резиновую прокладку. Проверить, что стекла выровнены относительно друг друга по нижнему краю и плотно прижаты к резиновой прокладке, иначе раствор вытечет снизу, не успев полимеризоваться.

Стёкла должны быть сухими и чистыми (без пыли и разводов), в противном случае зоны белков могут быть искажены. Для этого стёкла моют с мылом, смывают его водой, а затем ополаскивают этанолом, который высыхает быстро и без разводов.

2) Приготовить разделяющий гель согласно таблице.

Персульфат аммония и TEMED добавляют в последнюю очередь, поскольку после этого начинается полимеризация. Она происходит не

мгновенно, поэтому есть достаточно времени, чтобы залить гель. Следует учитывать, что скорость полимеризации возрастает с увеличением температуры окружающей среды. Раствор перемешивают, аккуратно переворачивая пробирку, иначе из-за SDS образуется много пены.

Компоненты	Объём компонентов (мл) в расчёте на 5 мл геля %:			
	6%	9%	12%	15 %
H ₂ O	2.6	2.1	1.6	1.1
30% AAmix	1.0	1.5	2.0	2.5
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.3	1.3	1.3	1.3
10% SDS	0.05	0.05	0.05	0.05
10% APS	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.004	0.003	0.002	0.002

NB! Выбор процента геля определяется той областью молекулярных масс белков, которые необходимо разделить наилучшим образом. Чем больше процент – тем более мелкие белки будут эффективно разделены. Обычно, для белков максимальный используемый процент геля – 20%, минимальный – 5%. Если гель менее 5%, то с ним очень трудно манипулировать, он очень нежный, мягкий и легко повреждается. Если нужно разделить более мелкие белки, соответственно, нужен процент геля более 21% (максимально возможный процент геля, который можно получить с использованием 30% AAmix), то можно приготовить **40% AAmix**, сохранив соотношение акриламида и бисакриламида. В таком случае, максимально возможный процент геля – 28%.

3) Залить разделяющий гель между стёкол. Уровень геля должен быть примерно на 1 см ниже длины зубчиков гребёнки. Следует принять во внимание, что, когда гель застынет, но его объём немного уменьшится.

4) Сверху геля (ещё жидкого) налить пару капель бутанола (высотой ~ 2 мм), чтобы выровнять верхний край геля и избавиться от пузырьков воздуха.

5) После того, как гель застыл, необходимо промыть его от бутанола дистиллированной водой (несколько раз залить воду между стёкол и стряхнуть её оттуда). Оставшиеся капли воды между стёкол аккуратно убрать фильтровальной бумагой, так чтобы не повредить гель.

Как определить, что гель уже полимеризовался:

- дождаться полимеризации геля, оставшегося в пробирке;
- если между бутанолом и гелем появился чёткий раздел фаз;
- для уверенности лучше выждать полчаса.

6) Приготовить концентрирующий гель:

Объём компонентов, (мл)	H ₂ O	30% AAmix	1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	10% SDS	10% APS	TEMED
на 2 мл геля	1.4	0.33	0.25	0.02	0.02	0.002
на 5 мл геля	3.5	0.825	0.625	0.05	0.05	0.005

7) Залить концентрирующий гель поверх разделяющего, «с горкой». Вставить гребёнку. Толщина гребёнки должна соответствовать расстоянию между стёклами. Если наливать «с горкой» и удалять сверху пузырьки воздуха, тогда лунки, сформированные гребёнкой, получатся ровные.

8) Пока гель застывает – подготовить пробы.

Вариант II: градиентный гель

1) Вместо заливки двух гелей можно залить один градиентный гель, в этом случае возможно одинаково хорошо разрешить на геле как маленькие, так и большие массы белков. Для этого надо приготовить два геля: минимальной и максимальной процентности на основе разделяющего геля. Часто используют градиент от 5% до 20% или от 8% до 16% (также, руководствуются диапазоном желаемых масс). Гели меньшей процентности готовят в большем объёме. Необходимый итоговый объём рассчитывается из размера геля и их

количества, например, на один гель размерами 7 на 10 см и толщиной 1 мм необходимо 5 мл геля меньшей процентности и 3 мл – большей.

На **10 мл** растворов:

Компоненты		H ₂ O	30% AAmix	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	10% SDS	10% APS	TEMED
Объём компонентов (мл)	5%	5.5	1.7	2.6	0.1	0.1	0.008
	8%	4.5	2.7	2.6	0.1	0.1	0.006
	16%	1.9	5.3	2.6	0.1	0.1	0.004
	20%	0.3	6.7	2.6	0.1	0.1	0.004

2) В смеситель для заливки градиентного геля (Рис. 1.4) поместить растворы: большей концентрации в ближний к вентелю отсек, меньшей – в дальний. При заполнении отсеков перемычка между ними должна быть закрыта. Объём растворов рассчитывается из тех соображений, что после этого этапа заливки граница геля должна достигать воображаемого низа гребёнки.

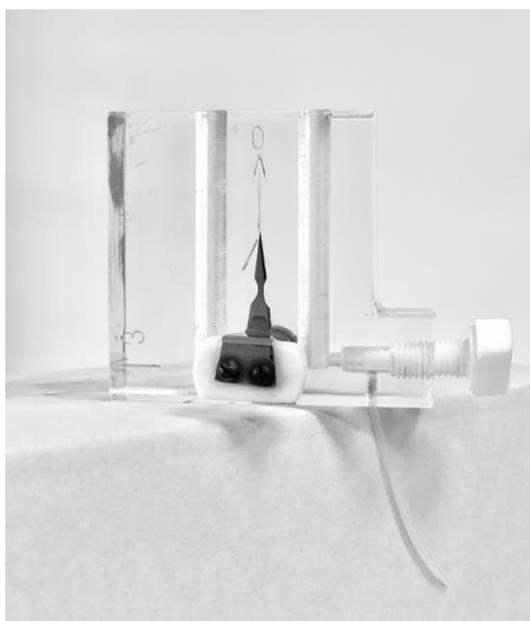


Рисунок 1.4 – Смеситель для заливки градиентного геля

3) Открыть перемычку между отсеками и убедиться, что в перемычке раствор, а не пузырёк воздуха. Если он там есть – выпустить его, аккуратно наклоняя смеситель вправо-влево.

4) Открыть вентиль для подачи геля, и с помощью трубочки залить его между стёклами. В результате внизу будет наибольшая процентность геля, а вверху – наименьшая.

5) Оставшийся до верха объём (который должна занимать гребёнка) аккуратно долить гелем меньшей процентности, не дожидаясь полимеризации. Вставить гребёнку.

6)

NB!

- Растворы из смесителя должны вылиться до конца, иначе градиент будет заканчиваться большей концентрацией, чем рассчитывалось.
- После заливки геля быстро промыть смеситель, иначе гель полимеризуется прямо в трубке, а после этого извлечь его оттуда практически невозможно.

➤ **Подготовка проб**

1) Разбавить 4х-кратный буфер Лэммли образцом, содержащим исследуемые белки, в 4 раза (то есть, 1 часть буфера Лэммли, например 5 мкл, и 3 части образца, например, 15 мкл). Концентрация белка в образце зависит от дальнейшего способа визуализации белков.

2) Прокипятить пробы при 100°C в течение 3-5 минут (или при 70 °C в течение 20 минут, если того требует буфер образца).

3) Дождаться, пока образцы остынут, встряхнуть на Вортексе и открутить (осадить пену и сконденсировавшуюся на крышке воду).

4) Нанести образец в лунки ПААГ (см. далее). Лунки, не занятые белком, так же должны быть заполнены, чтобы фронт белков был ровным: каждую свободную лунку заполняют буфером Лэммли, разбавленным водой вместо образца.

NB! Чем меньший объём пробы наносится на гель, тем более аккуратными и узкими в итоге получатся белковые зоны. То есть вместо 20 мкл разбавленного образца лучше наносить 5 мкл, но более концентрированного (несмотря на то, что нанесённое на гель количество белка в итоге будет одинаковым).

➤ **Сборка электрофоретической ячейки. Запуск ЭФ**

- 1) Проверить, что гель застыл, и достать гребёнку. Промыть, как и после бутанола, гель под проточной дистиллированной водой. Вытряхнуть воду из лунок, фильтровальной бумагой не вытирать.
- 2) Собрать электрофоретическую ячейку. Если гель только один, то вместо второго поставить заглушку. Стекла с гелем ставить лунками в сторону внутренней части аппарата.
- 3) Приготовить 1х TGS (разбавить 10-кратный TGS в 10 раз). Выбирать объём в соответствии с используемой электрофоретической ячейкой. В данной системе катодный и анодный буфер одинаков – это TGS.
- 4) Заполнить буфером внутреннюю часть аппарата (со стёклами), так чтобы он покрыл лунки, и еще на 2-3 мм выше (катодный буфер). Проследить, чтобы буфер наполнил каждую лунку. Если где-то образовался пузырёк воздуха, и буфер не зашёл – пипетировать эту лунку.
- 5) Залить буфер в наружную часть аппарата (анодный буфер).
- 6) Заполнить лунки подготовленными пробами с белком, маркером молекулярных масс и, при наличии пустых лунок, буфером Лэммли. Маркер добавляется в отдельную лунку.
- 7) Надеть крышку, правильно совмещая разъёмы электродов. Установить параметры электрофоретического разделения:
 - Первый вариант – проводить ЭФ в ПААГ при поддержании постоянного значения тока ~20-30 мА на гель (то есть, на один гель, например, 25 мА, тогда на два геля – 50 мА и так далее). При этом, напряжение не должно превышать 220 В, чтобы гель не перегревался.

- Второй вариант – при поддержании постоянного значения напряжения: в концентрирующем геле использовать ~ 10 В/см, в разделяющем – 180 В.

8) ЭФ проводить до тех пор, пока фронт не достигнет низа (бромфеноловый синий идёт вместе с фронтом, ниже него белков нет).

9) После окончания процедуры аккуратно достать стекла и отделить их лопаточкой друг от друга (гель останется на одном из стёкол).

NB! Для того, чтобы не перепутать ориентацию геля, следует его пометить, например, отрезать всегда нижний левый угол. Также, при возможности, следует наносить маркер в лунки несимметрично (то есть, если лунок 15, не следует наносить его в лунку №8, или же одновременно в 3 и 13 лунки). В этом случае, если гель перевернулся в процессе отмывки, окрашивания или какой-либо инкубации на качалке, можно будет легко восстановить его правильную ориентацию.

Далее гель либо окрашивают, либо проводят вестерн блоттинг.

1x TGS из верхней части аппарата (катодный буфер) можно хранить в холодильнике и повторно использовать (уже только в качестве анодного буфера).

§ 1.2 Двумерный ЭФ в ПААГ

Двумерное электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле предполагает две стадии разделения: изоэлектрофокусирование и вертикальное SDS-ЭФ в ПААГ. Первый этап заключается в разделении белков по изоэлектрической точке. Боковые радикалы некоторых аминокислотных остатков содержат $-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_2$ группы, которые, в зависимости от pH среды, способны приобретать отрицательный или положительный заряд соответственно ($-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$). Такой pH среды, при котором суммарный заряд белка становится равным нулю, называют изоэлектрической точкой. В случае, если белок под действием

электрического тока движется по среде (гелю) с градиентом рН, то когда он достигнет значения рН, соответствующего его изоэлектрической точке, его заряд станет равным нулю, и движение под действием электрического тока прекратится (Рис. 1.5).

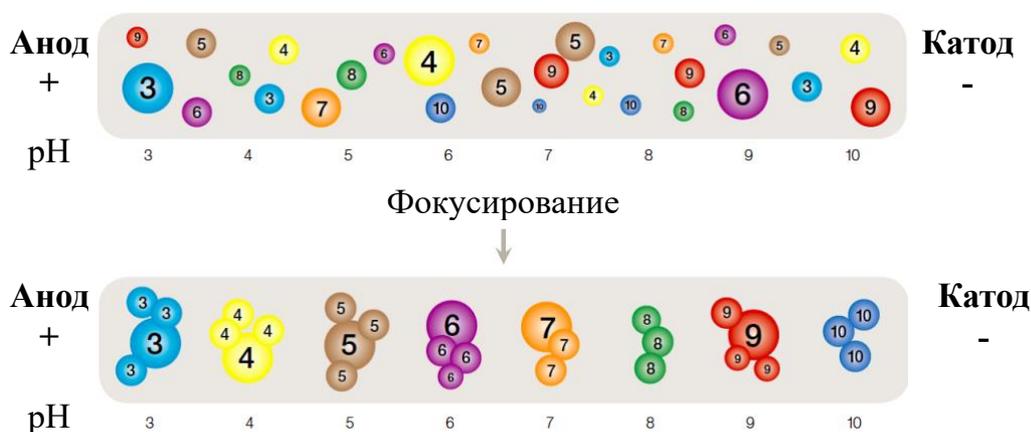


Рисунок 1.5 – Схема изоэлектрофокусирования (адаптировано из [7]). Смесь белков разделяется в градиенте рН под действием электрического поля в соответствии с изоэлектрической точкой белков и независимо от их размера. Движение белков продолжается до тех пор, пока они не достигнут рI

Первый этап разделения проходит с использованием ПААГ, со сформированным заданным градиентом рН, полимеризованным либо в виде длинной тонкой трубки, либо узкой и тонкой полоски, наклеенной на пластиковую основу (стрип).

Второй этап разделения заключается в классическом ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях (см. §1.1), при котором вместо образца в лунках на верхний край ПААГ помещается трубочка геля после ИЭФ или стрип. В результате, по горизонтали белки разделяются согласно их изоэлектрической точке, а по вертикали – согласно их молекулярной массе (Рис. 1.6, а), при этом вместо бэндов белки формируют пятна (Рис. 1.6, б).

Первое разделение –
изоэлектрофокусирование (в соответствии с pI)

Низкий pH ————— Высокий pH

Второе разделение –
SDS-ЭФ в ПААГ
(разделение по ММ)

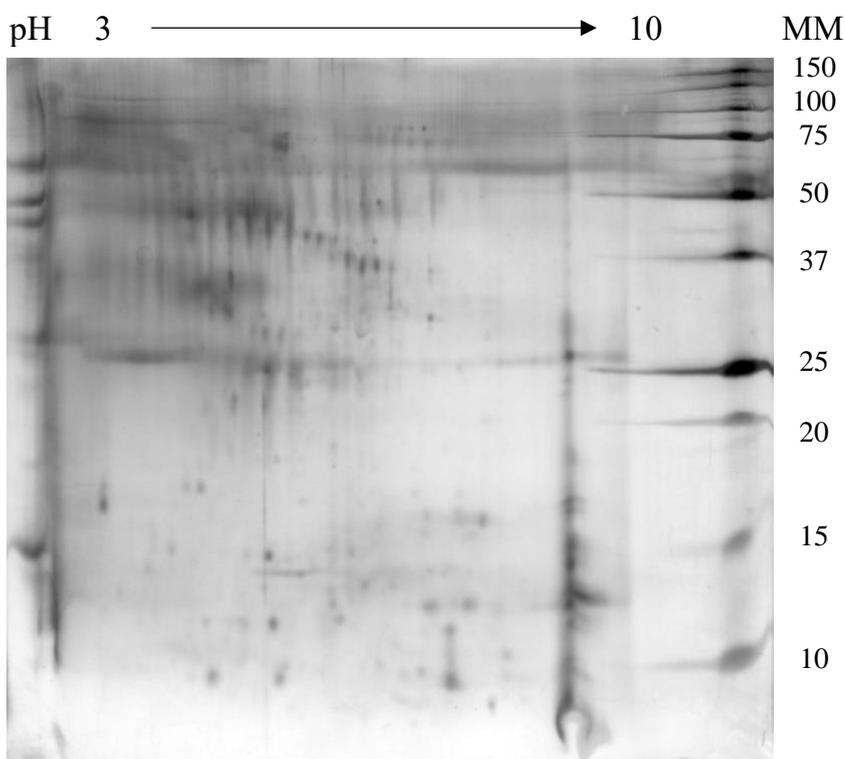
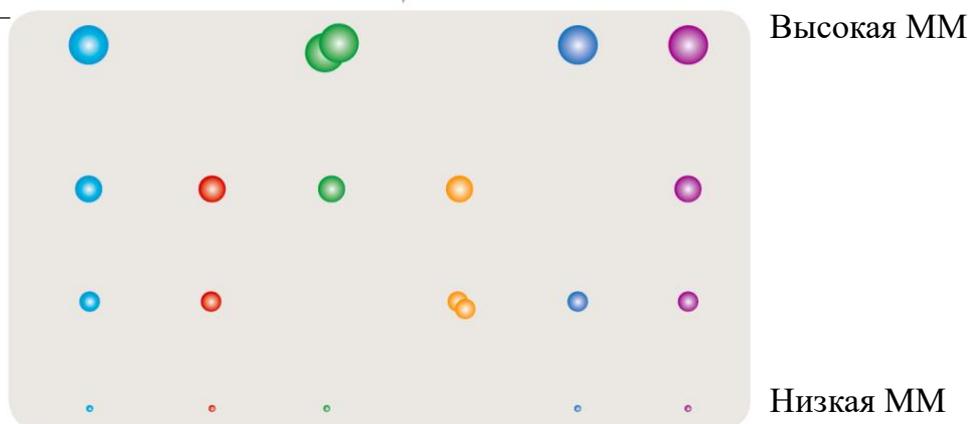


Рисунок 1.6 – (а) Общая схема разделения белков при 2D-ЭФ в ПААГ (адаптировано из [7]). Белковые пятна образуются в результате двухэтапного разделения: по изоэлектрической точке (изоэлектрофокусирование) и по молекулярной массе (SDS-ЭФ в ПААГ). (б) Пример 2D-ЭФ в ПААГ смеси белков, окрашенного серебром

Приведённый протокол основан на инструкции по 2D-ЭФ Biorad [7].

➤ **Приготовление растворов**

Компонент	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Буфер для регидратации (хранить на +4°C)			
Мочевина	60.07 г/моль	4.8 г	8 М
CHAPS*	100% (порошок)	0.2 г	2%
DTT	1.0 М	0.5 мл	50 мМ
Амфолиты**	40%	50 мкл	0.2%
Бромфеноловый синий	100% (порошок)	0.001 г	0.01%
H ₂ O	довести до 10 мл		
Уравновешивающий буфер I			
Мочевина	60.07 г/моль	7.21 г	6 М
SDS	100% (порошок)	0.4 г	2%
Tris-HCl (pH 8.8) (см. §1.1)	1.5 М	5 мл	0.375 М
Глицерин	87%	4.6 мл	20%
DTT***	1.0 М	2.6 мл	130 мМ
H ₂ O	До 20 мл		
Уравновешивающий буфер II			
Мочевина	60.07 г/моль	7.21 г	6 М
SDS	100% (порошок)	0.4 г	2% (w/v)
Tris-HCl (pH 8.8) (см. §1.1)	1.5 М	5 мл	0.375 М
Глицерин	87%	4.6 мл	20%
H ₂ O	Довести до 20 мл		
Йодацетамид***	184.96 г/моль	0.5 г	2.5% (w/v) 135 мМ
Агароза (готовить непосредственно перед использованием)			
Агароза	100%	0.01 г	0.5%
1x TGB (см. §1.1)	---	2 мл	---
Бромфеноловый синий	100% (порошок)	0.001 г	0.01%

* 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate – цвиттер-ионный детергент;

** смесь амфолитов-носителей, например, “BioLyte 3-10” рН3-рН10, используется с полосками с соответствующим градиентом рН. При использовании полосок с другим диапазоном рН должна быть добавлена соответствующая смесь амфолитов для приготовления буфера;

*** указанные компоненты добавляются только **непосредственно перед использованием**. Буферы без них можно хранить на +4°C.

➤ I этап. Изоэлектрофокусирование

1) Подготовить исследуемый образец: необходимо смешать в отдельной пробирке белковый образец с буфером для регидратации с учётом длины используемых стрипов (IPG полоска) и дальнейшего метода окраски геля после второго этапа разделения.

Длина IPG полоски		7 см	11 см	17 см
Объём буфера для регидратации		125 мкл	200 мкл	300 мкл
Количество белка в зависимости от метода окрашивания	Кумасси	50-100 мкг	100-200 мкг	200-400 мкг
	Серебро	5-20 мкг	20-50 мкг	50-80 мкг

Максимальная загрузка: 7 см – 500 мкг, 11 см – 1 мг, 17 см – 3 мг.

2) Поместить электроды в трей для ИЭФ, подходящий для стрипов выбранной длины.

3) Пипеткой равномерно нанести весь объем образца по всей длине лунки, исключая по 1 см с каждого края. Следить, чтобы не образовывались пузырьки.

4) Используя пинцет, снять защитную плёнку с IPG полоски. Аккуратно поместить полоску в лунку, стороной с гелем вниз (надписи «+» и рН должны быть видны и находится с левой стороны). Чтобы избавиться от пузырей и равномерно распределить образец под стрипом, можно несколько раз поднять

и опустить полоску, держа пинцетом за один край. Левая часть полоски должна упираться в специальное возвышение.

5) Сверху полоски налить минеральное масло, чтобы в процессе ИЭФ образец не испарился. Для стрипов разной длины наносят: *7 см – 4 мл масла, 11 см – 5 мл, 17 см – 7 мл*. Можно немного меньше, главное, чтобы весь стрип был хорошо покрыт маслом, при этом, чтобы оно не выливалось через край.

6) Нанести таким же образом все исследуемые образцы. Если их несколько – нанести половину образцов в первые лунки, а половину – в последние.

7) Вставить ячейку в аппарат (до щелчка). Сверху, чтобы стрипы не всплывали и были плотно прижаты к электродам, поместить фиксаторы (пластиковые гребёнки): со стороны катода и анода.

8) Закрывать аппарат и запрограммировать протокол: учитывается длина стрипа, диапазон рН, линейный или ступенчатый (NL) градиент рН в полоске, быстрое (rapid, R) или постепенное (gradual, G) разделение. Первые три параметра определяются ещё на этапе выбора стрипа. Стандартные программы можно посмотреть в руководстве. Поскольку перед ИЭФ будет проходить регидратация прямо в камере, то необходимо указать это после выбора протокола. Регидратацию проводят в течение 12 часов.

NB! Начальный этап разделения может сильно затянуться, если образцы изначально находились в буфере с высокой ионной силой. В этом случае, величина напряжения не будет подниматься до указанной в программе до тех пор, пока все электролиты не пройдут через стрип. На это может уйти несколько часов. Рекомендовано не превышать концентрацию соли в **40 mM**.

9) После окончания ИЭФ пинцетом достать полоски из трей, дать стечь маслу (можно промокнуть стрип аккуратно о бумажное полотенце) и поместить в трей для отмывки (см. этап II). Часть полосок (дублирующих образцы) можно сразу окрасить серебром или Кумасси, чтобы проверить разделение.

➤ II этап. SDS-ЭФ в ПААГ

Помимо стандартного 1x TGB для ЭФ и 1.5M Tris-HCl, pH 8.8 необходимо приготовить два уравнивающих буфера и расплавленную агарозу.

1) Подготовить гели для ЭФ: залить самостоятельно, с использованием специальной гребёнки для стрипов или просто выровняв верх геля бутанолом, либо использовать предзалитые гели. Когда гели застынут, промыть дистиллированной водой.

2) Отмыть стрипы (которые только что достали из камеры для ИЭФ) в течение 10 мин первым уравнивающим буфером (для 7 см стрипа рекомендовано добавлять 2.5 мл буфера, для 11 см – 4 мл, для 17 см – 6 мл).

3) Слить первый буфер и отмыть полоски 10 мин вторым уравнивающим буфером. Подготовить в отдельной посуде 1x TGB для дальнейшей отмывки стрипов (см. §1.1): лучше использовать цилиндр, по высоте больший или равный длине стрипов.

4) Пока стрипы отмываются во втором буфере расплавить агарозу:

- приготовить 0.5% раствор агарозы в 1x TGB
- расплавить в микроволновой печи (раствор должен стать прозрачным); агароза будет сильно пениться, так как буфер содержит SDS, поэтому греть с перерывами через 10-15 секунд
- когда агароза готова, добавить в неё пару крупинок бромфенолового синего (чтобы в дальнейшем был виден фронт).

5) Удалить излишек воды с подготовленных гелей фильтровальной бумагой. Положить гели плашмя, коротким стеклом вверх.

6) Обмакнуть полоску в 1x TGB, чтобы смыть второй уравнивающий буфер. и положить **над** лункой на большое стекло гелем вверх, протолкнуть в лунку, касаясь только пластиковой части стрипа, до геля.

7) Разместить стекло вертикально, заполнить лунку расплавленной агарозой. Следить, чтобы не образовывались пузырьки (особенно между

стрипом и гелем), иначе белки из полоски не попадут в гель. Пинцетом трогать можно только пластиковую часть полоски, гель не задевать.

8) Если есть белковый маркер, залитый в гель, то его следует тоже поместить в агарозу сбоку от полоски (достаточно кусочка шириной 2 мм).

9) После того, как агароза застыла (15-30 минут), провести SDS-ЭФ в ПААГ в стандартных условиях (см. §1.1).

§ 1.3 Нативный синий

Нативное электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле позволяет разделять белки в естественном, нативном состоянии, после чего они могут сохранять свою функциональную активность, в том числе ферментативную. Существует множество систем, позволяющих разделять белки в нативном состоянии, причём электрофоретическая подвижность, в том числе, направление движение белков определяется их зарядом.

Данная модификация нативного ЭФ в ПААГ предполагает добавление в сам образец и в катодный буфер красителя Кумасси бриллиантовый синий G250, который обеспечивает сдвиг заряда белков, а также аминокaproновой кислоты, которая улучшает растворимость мембранных белков.

Протокол основан на публикациях [8] и [9].

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
49.5% acrylamid mix (AAmix) (AA : бисAA как 48 : 1.5)			
Хранить при +7-+10°C			
Акриламид	100% (порошок)	48 г	48%
Бисакриламид	100% (порошок)	1.5 г	1.5%
H ₂ O	---	до 100 мл	---

3x буфер для геля, рН 7.0 (хранить при +4°C)			
б-аминокапроновая кислота	131.17 г/моль	19.7 г	1.5 М
Bis-tris	209.24 г/моль	3.14 г	150 мМ
H ₂ O	---	до 100 мл	---
10% APS (не хранится)			
APS	100% (порошок)	0.01 г	10%
H ₂ O	---	до 1 мл	---
10x Буфер для образцов			
Кумасси G250	100%	0.05 г	5%
б-аминокапроновая кислота	131.17 г/моль	0.098 г	750 мМ
H ₂ O	---	до 1 мл	---
Катодный буфер, рН 7.0 (хранить при +4°C)			
Трицин	179.17 г/моль	8.96 г	50 мМ
Bis-tris	209.24 г/моль	3.14 г	15 мМ
Кумасси G250	100% (порошок)	0.2 г	0.02 %
H ₂ O	---	до 1000 мл	---
Анодный буфер, рН 7.0 (хранить при +4°C)			
Bis-tris	209.24 г/моль	10.46 г	50 мМ
H ₂ O	---	до 1000 мл	---

Подводить буферы при необходимости соляной кислотой

➤ **Заливка геля**

- 1) Залить разделяющий градиентный гель (6-13% для белков с ММ от 100 до 1000 кДа, 7-16.5% для белков с меньшей молекулярной массой). После его полимеризации сверху залить 4% концентрирующий гель (см. таблицу ниже).
- 2) Заполнить камеры электрофоретической ячейки катодным и анодным буферами.
- 3) Образец разбавить в 10 раз буфером для образцов и нанести в лунки.

Компоненты	Объём компонентов (мл) для геля % (на 9 мл):				
	4%	6%	13%	7%	16.5%
H ₂ O	5.27	4.91	0.78	4.73	0.14
AAmix	0.73	1.09	2.36	1.27	3.0
Буфер для геля (3x)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Глицерол (99%)	---	---	3.6 г (~2.86 мл)	---	3.6 г (~2.86 мл)
10% APS	0.072	0.039	0.030	0.034	0.029
TEMED	0.0072	0.0039	0.003	0.0034	0.0029

4) ЭФ в ПААГ проводить при +4-+7°C. Начальное напряжение установить в 100 В на протяжении всего времени, пока образец находится в концентрирующем геле, затем увеличить до 500 В. В этом случае, разделение будет идти 3-6 часов. Другой вариант – установить напряжение 200 В в градиентном геле, в этом случае ЭФ в ПААГ длится около 16 часов.

§ 1.4 Трициновый ЭФ в ПААГ

Трициновый ЭФ в ПААГ, в основном, используют для разделения пептидов и белков, с молекулярной массой менее 30 кДа. Схема проведения эксперимента аналогична SDS-ЭФ в ПААГ по Лэммли (см. §1.1), однако состав используемых буферов отличается.

Приведённый ниже протокол основан на публикации [6].

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
49.5% acrylamid mix (AAmix-3) (AA : бисAA как 48 : 1.5)			
Для белков более 5 кДа, хранить при +7-+10°C			
Акриламид	100% (порошок)	48 г	48%
Бисакриламид	100% (порошок)	1.5 г	1.5%
H ₂ O	---	до 100 мл	---

49.5% acrylamid mix (AAmix-6) (AA : бисАА как 46.5 : 3), для белков менее 5 кДа, хранить при +7-+10°C			
Акриламид	100% (порошок)	46.5 г	46.5%
Бисакриламид	100% (порошок)	3 г	3%
H ₂ O	---	до 100 мл	---
10% APS (не хранится)			
APS	100% (порошок)	0.01 г	10%
H ₂ O	---	до 1 мл	---
3x буфер для геля, pH 8.45 (хранить при RT)			
Tris base	121.14 г/моль	36.34 г	3 М
HCl (конц.)	10 М (37%)	10 мл	1 М
SDS	100%	0.3 г	0.3 %
H ₂ O	---	до 100 мл	---
1.0 М Tris-HCl, pH 7.0 (хранить при +4°C)			
Tris base	121.14 г/моль	1.211 г	1.0 М
H ₂ O	---	до 10 мл	---
4x буфер для образцов			
Разаликворить и хранить при -20°C. Размороженную пробирку при +4°C			
Tris-HCl, pH 7.0	1.0 М	1.5 мл	150 mM
βМЭ*	14.3 М	0.6 мл	6 %
SDS	100% (порошок)	1.2 г	12%
Кумасси G250	100% (порошок)	0.005 г	0.05%
Глицерол	99%	3 г	30% (wt)
H ₂ O	---	до 10 мл	---
10x катодный буфер, pH 8.25 (подводить не надо) (хранить при RT)			
Tris base	121.14 г/моль	121.1 г	1 М
Трицин	179.17 г/моль	179.2 г	1 М
SDS	100% (порошок)	10 г	1 %
H ₂ O	---	до 1000 мл	---

10x анодный буфер, pH 8.9 (хранить при RT)			
Tris base	121.14 г/моль	121.14 г	1 М
HCl (конц.)	10 М (37%)	22.5 мл	225 mM
H ₂ O	---	до 1000 мл	---

Где необходимо – pH подводит соляной кислотой

* добавлять только для проведения ЭФ в восстанавливающих условиях

➤ **Протокол**

1) Аналогично SDS-ЭФ в ПААГ по Лэммли, залить двухуровневый гель: вниз залить разделяющий гель (16%), сверху (после полимеризации разделяющего геля) залить концентрирующий гель (4%). Если планируется разделение пептидов массой от 1 до 5 кДа, то для лучшего разделения между этими гелями можно залить ещё один 10% слой геля по ширине примерно равный концентрирующему гелю. Состав гелей представлен ниже. АAmix-3 используется для разделения белков с MM > 5 кДа, АAmix-6 – менее 5 кДа.

Процент геля	Объём компонентов, мл					
	H ₂ O	АAmix	Буфер для геля	Глицерол	10% APS	TEMED
4%	2	0.25	0.75	---	0.0225	0.0023
10%	1.16	0.6	1	0.3 г (0.24 мл)	0.015	0.0015
16%	2.27	3	3	0.9 г (0.73 мл)	0.030	0.003

2) Подготовить образцы: смешать буфер для образцов и сами образцы как 1 : 3. Инкубировать при 37°C в течение 15 минут (вплоть до 60 минут – для образцов, которые были в центрифугированы в плотный осадок).

NB!

- Не превышать температуру в 50°C, иначе мембранные белки в присутствии SDS могут необратимо выпасть в осадок.

- Если образец имеет высокую плотность (например, белок выделен в градиенте сахарозы), то буфер для образцов готовят без глицерина.
- 3) Катодный буфер помещают во внутреннюю камеру, анодный – во внешнюю.
 - 4) Провести ЭФ. На начальном этапе установить значение напряжения в 30 В. После того, как белки вошли в концентрирующий гель, увеличить напряжение для 0.75 мм гелей – до 190-200 В, для 1.5 мм – до 90 В. На последнем этапе разделения, чтобы ускорить процесс, можно установить 270-300 В (только для 10% и 16% геля толщиной ~ 0.75 мм соответственно).

РАЗДЕЛ 2. ОКРАШИВАНИЕ ГЕЛЕЙ ПОСЛЕ ЭФ В ПААГ

Для визуализации разделившихся белковых зон (бэндов) или пятен (в случае 2D-ЭФ в ПААГ) используют различные методы окрашивания, отличающиеся друг от друга чувствительностью и возможностью делать количественные оценки содержания белка в зависимости от интенсивности окрашивания.

Принципиально, все методы состоят из трёх этапов:

1. фиксация белков (для того, чтобы в процессе окрашивания и после него белок не вымывался из геля) и отмывка геля от SDS и других компонентов буфера для ЭФ в ПААГ;
2. непосредственно окрашивание
3. отмывка геля от не связавшегося с белками красителем (прекращение окрашивания) и хранение.

В общем случае, окрашивание серебром обладает более высокой чувствительностью, но меньшим динамическим диапазоном, чем окрашивание Кумасси. Следует иметь в виду, что при окрашивании серебром и Кумасси может отличаться не только интенсивность окрашивания белков, но и их набор.

§2.1 Окрашивание серебром

Данный метод окрашивания высоко чувствителен и составляет 0.1-1 нг белка на бэнд. Однако данный метод не является количественным, то есть интенсивность окраски не пропорциональна концентрации белка. Применяется для гелей, толщиной 0.75-1.0 мм.

При окраске серебром гель нельзя трогать даже в перчатках, иначе это приведёт к затемнению в этой области при проявке. Для инкубации геля во всех буферах использовать только чисто вымытую тару, по возможности, стеклянную.

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Раствор для отмывки (50 мл)			
Уксусная кислота	99%	5 мл	10%
H ₂ O	---	45 мл	---
Окрашивающий раствор (50 мл)			
AgNO ₃	100% (порошок)	0.05 г	0.1%
H ₂ O	---	50 мл	---
Проявляющий раствор (50 мл)			
Na ₂ CO ₃	99,9% (порошок)	1.5 г	30%
H ₂ O	---	50 мл	---
Формальдегид	37% (формалин)	150 мкл	0,1%
Тиосульфат Na	1%	20 мкл	0,0004%
Фиксирующий раствор (50 мл)			
Уксусная кислота	99%	5 мл	10%
H ₂ O	---	45 мл	---

Все растворы (кроме 0.1% нитрата серебра) можно приготовить заранее, хранить при комнатной температуре не более 3 месяцев. Нитрат серебра можно хранить в таких же условиях в виде стокового 5% раствора, и разбавлять в 50 раз (до 0.1%) непосредственно в день эксперимента.

➤ **Протокол**

- 1) Отделённый от стёкол гель отмыть в 10% уксусной кислоте (раствор для отмывки) 2 раза по 15 минут на качалке (по 25 мл на раз).
- 2) Отмыть в H₂O – 3 раза по 2 минуты.
- 3) Инкубировать в окрашивающем растворе – 30 минут.
- 4) Промыть H₂O – не более 20 секунд.
- 5) Добавить проявляющий раствор. Инкубировать гель, мягко покачивая

руками, до проявления. Необходимо очень внимательно следить за процессом проявления зон, так как в определенный момент фон начинает резко темнеть.

6) Как только прокрасились бэнды (или начал темнеть фон) – быстро слить проявляющий раствор и залить 50 мл фиксирующего раствора (10% уксусная кислота) – фиксация.

NB! Пока гель не залит уксусной кислотой, проявление будет продолжаться, даже если проявляющий раствор слит.

7) Через 10 минут слить фиксирующий раствор и хранить в H₂O.

§ 2.2 Окрашивание коллоидным раствором Кумасси G250

Окрашивание гелей с использованием красителя Кумасси, в том числе и данная методика, является количественным методом, то есть интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка. Данный протокол основан на публикации [10]. Чувствительность составляет до 1 нг белка / бэнд.

➤ Приготовление растворов

Добавлять компоненты необходимо *в строгой последовательности* и только после того, как предыдущий компонент *полностью растворился*. Использовать магнитную мешалку. На 1 л красителя:

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
H ₂ O	---	100 мл	---
Ортофосфорная кислота	100%	100 мл	10% (v/v)
Сульфат аммония	100% (порошок)	10 г	10% (w/v)
H ₂ O	Подливаем небольшое количество воды, чтоб сульфат аммония быстрее растворился (до 200 мл)		
Coomassie Blue G250	100% (порошок)	1.2 г	0.12% (w/v)
H ₂ O		до 800 мл	
Метанол	100%	200 мл	20% (v/v)

➤ **Окрашивание**

- 1) Отмыть гель в воде от SDS в течение 10-15 минут (на качалке).
- 2) Залить гель раствором Кумасси (чтобы раствор покрывал гель) и инкубировать на качалке до тех пор, пока бэнды не станут хорошо различимы (около 2 часов). Для лучшего окрашивания можно оставить гель в окрашивающем растворе на ночь (при +4°C).
- 3) Отмыть гель в дистиллированной воде до обесцвечивания фона.

§ 2.3 Окрашивание Кумасси R250 (система «уксус-этанол»)

Чувствительность данной разновидности окрашивания Кумасси чуть меньше коллоидного, и составляет около 5-10 нг на один бэнд.

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Фиксирующий раствор (хранить при RT)			
Уксусная кислота	100%	50 мл	10%
Этанол	100%	175 мл	35%
H ₂ O	---	до 500 мл	---
Окрашивающий раствор (хранить при RT, можно использовать повторно)			
Уксусная кислота	100%	50 мл	10%
Этанол	100%	125 мл	25%
Coomassie Blue R250	100% (порошок)	1.25 г	0.25% (w/v)
H ₂ O	---	до 500 мл	---
Отмывочный раствор (хранить при RT)			
Уксусная кислота	100%	50 мл	10%
Этанол	100%	125 мл	25%
H ₂ O	---	до 500 мл	---

➤ **Окрашивание**

- 1) Инкубировать гель на качалке 15 минут в фиксирующем растворе.
- 2) Инкубировать гель 15-30 минут в окрашивающем растворе на качалке.
- 3) Инкубировать в отмывочном растворе до обесцвечивания фона на качалке (через 15 минут раствор заменить на свежий). Перевести в воду.

§ 2.4 Экспресс-окрашивание Кумасси G250

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Окрашивающий раствор			
Coumassie Brilliant Blue G250	100%	0.5 г	1%
Этанол	---	50 мл	---
Раствор для отмывки (можно использовать повторно)			
Уксусная кислота	100%	50 мл	5% (v/v)
Этанол	95%	105 мл	10% (v/v)
H ₂ O	до 1000 мл		

➤ **Окрашивание**

- 1) После проведения ЭФ в ПААГ добавить к гелю раствор для отмывки так, чтобы он покрывал гель (на гель 7 на 10 см – примерно 30 мл).
- 2) Добавить 1-2 мл окрашивающего раствора.
- 3) Довести раствор с гелем до кипения в микроволновой печи, после чего инкубировать на качалке примерно 30 минут (до тех пор, пока не прокрасятся бэнды).
- 4) Слить окрашивающий раствор (можно использовать повторно), добавить раствор для отмывки и снова довести до кипения в микроволновой печи. Отмывать до обесцвечивания фона.

РАЗДЕЛ 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВ

§ 3.1 Метод Лоури в модификации Сандермана и Стромингера

Протокол основан методе, опубликованном в [11], который является модификацией метода Лоури (Фолина-Лоури) [12]. Метод основан на цветной биуретовой реакции, при которой ионы меди образуют координационные связи с $-NH$ группами пептидной связи, в результате чего $Cu(II)$ восстанавливаются до $Cu(I)$, что сопровождается цветной реакцией. Данная реакция усиливается при помощи реактива Фолина, в результате чего раствор белка окрашивается в сине-голубой цвет пропорционально концентрации белка. Максимум поглощения приходится на диапазон длин волн от 650 до 750 нм.

Для определения концентрации белка строят калибровочный график: зависимость оптической плотности раствора при выбранной длине волны от известной концентрации белка (Рис. 3.1). Неизвестную концентрацию белка определяют из уравнения прямой, приближающей калибровочный график, по измеренной величине оптической плотности.

NB!

- Зависимость оптической плотности от концентрации линейна не на всём диапазоне концентраций, поэтому для определения неизвестной концентрации белка необходимо, чтобы измеренная оптическая плотность попадала на линейный участок.
- Калибровочную кривую необходимо строить каждый раз при определении концентрации одного или нескольких белков, для каждого эксперимента, то есть измерение оптической плотности калибровочных растворов белков и неизвестных растворов белков должно проходить одновременно.

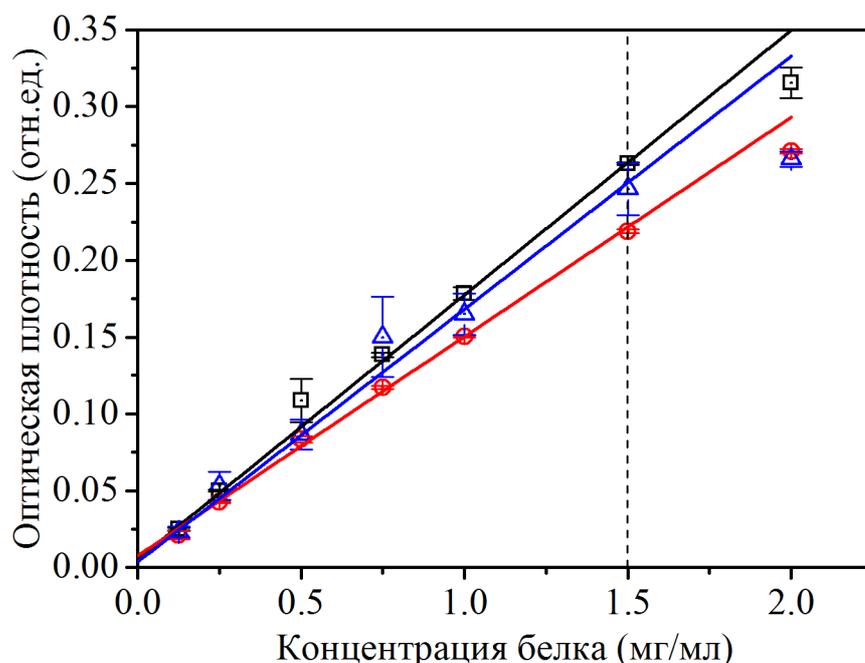


Рисунок 3.1 – Калибровочные графики для определения концентрации белка, полученные в трёх независимых экспериментах. Были использованы одни и те же растворы бычьего сывороточного альбумина для построения графиков, однако, кривые отличаются друг от друга, что может быть связано, например, с различным временем окрашивания растворов белков. В связи с этим необходимо строить калибровочную кривую одновременно с каждым измерением концентрации. Также можно заметить, что после концентрации 1.5 мг/мл калибровочный график теряет свою линейность

Важной особенностью метода является пропорциональность окраски и молекулярной массы белка, поскольку в биуретовой реакции непосредственно принимает участие пептидная связь, поэтому калибровочный белок следует брать если не тот же самый, то с близкой молекулярной массой.

Преимущество данного метода (модификации Сандермана и Стромингера) перед исходным методом Лоури заключается в наличии SDS в Реагенте А, что позволяет проводить анализ белка в присутствии практически любых детергентов (например, используемых при очистке поверхностных мембранных белков). Кроме того, SDS отделяет мембранные белки от

загрязняющих мембранных компонентов и денатурирует белки, что приводит к более воспроизводимым результатам.

➤ **Мешающие соединения [13]**

- Тирозин, триптофан, фенольные соединения
- Буферы (например, трис, хепес, глицин, гистидин, цитрат)
- Сахара (например, глюкоза, сахароза, глицерин)
- Фиколл, метризамид, поливинилпироллидон
- Тиольные соединения, восстановители
- ЭДТА
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Тритон X-100

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Реагент А			
Тартрат Na-K•4H ₂ O (или цитрат Na)	100% (порошок)	0.02 г	0.02%
Na ₂ CO ₃	100% (порошок)	2 г	2.00%
NaOH	40 г/моль	0.4 г	0.1 М
SDS(*)	100% (порошок)	1 г	1.00%
H ₂ O	Довести до 100 мл		
Реагент В			
CuSO ₄ •5H ₂ O	100% (порошок)	0.05 г	0.5%
H ₂ O	Довести до 10 мл		
Реагент С			
Реагент Фолина-Чокальтеу (**)	2 N	5 мл	1 N (1 моль/л по кислоте)
Вода	---	5 мл	---

Реагент D			
(готовить непосредственно перед использованием)			
Реагент А	---	25 мл	---
Реагент В	---	1 мл	---

(*) SDS добавляется в последнюю очередь, даже после воды.

(**) Фосфомолибденовая кислота с фенолом

➤ Калибровочная кривая

Бычий сывороточный альбумин (или другой белок подходящей молекулярной массы), растворённый в том же буфере, что и исследуемый белок, в следующих концентрациях:

2 мг/мл, 1.5 мг/мл, 1.25 мг/мл, 1.0 мг/мл, 0.75 мг/мл, 0.5 мг/мл, 0.25 мг/мл, 0.125 мг/мл, а также чистый буфер (условно **0 мг/мл**)

➤ Проведение анализа

1) В отдельные пробирки на 1.5 мл поместить образцы по 25 мкл: белок в неизвестной концентрации, калибровочные растворы белка и буфер. Для оценки погрешности определения концентрации каждый образец (в том числе и калибровочный) приготовить в трёх повторах. Если неизвестен примерный диапазон ожидаемой концентрации белка, то его следует приготовить в нескольких разведениях (например, пятикратных или десятикратных), чтобы оптическая плотность попала в линейный диапазон калибровочной кривой.

2) Приготовить непосредственно перед использованием реактив D и добавить по 1 мл в каждую пробирку. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.

3) Добавить 0.1 мл реагента С в пробирку, немедленно встряхнуть на вортексе. После этого переходить к следующей пробирке. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.

4) Регистрацию проводить на длине волны 620 нм, не позднее, чем через час после добавления реактива Фолина.

NB!

- Если для измерения используется не кюветный спектрофотометр, а планшетный сканер, то в лунки планшета следует помещать одинаковый объём образцов для того, чтобы длина оптического пути была постоянной.
- При использовании планшетного сканера не желательно помещать образцы в крайние лунки (верхнюю и нижнюю строки, первый и последний столбец) из-за возникновения краевых эффектов (ошибок) при измерении оптической плотности, что может привести к увеличению погрешности полученной концентрации.

➤ **Обработка результатов**

- 1) Вычесть из всех ячеек величину поглощения чистого буфера.
- 2) Построить калибровочную кривую и аппроксимировать прямой линейный участок.
- 3) Из полученного уравнения калибровочной кривой вычислить неизвестную концентрацию белка. Итоговые значения концентрации следует выбирать только на линейном участке калибровочной кривой. Если оптическая плотность раствора белка с неизвестной концентрацией попадает или очень близка к насыщению кривой, то эксперимент следует повторить, используя большее разведение образца.

§ 3.2 Метод Брэдфорда

Метод Брэдфорда основан на связывании красителя Кумасси с гидрофобными аминокислотными остатками (триптофан, тирозин, фенилаланин) и аргинином. Диапазон измерения концентрации составляет от 10 до 120 мкг/мл белка, однако, может использоваться и для определения более высоких концентраций (около 1 мг/мл) при увеличении количества добавляемого красителя.

Протокол основан на оригинальной статье Бредфорда [14].

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Кумасси G250	100% (порошок)	100 мг	0.01% (w/v)
Этанол	95%	50 мл	4.75% (v/v)
Фосфорная кислота	85% (w/v)	100 мл	8.5% (w/v)
H ₂ O	Довести до 1000 мл		

Добавлять реагенты в указанном порядке, после растворения предыдущего

➤ **Проведение анализа**

1) Для белков в концентрации **10-100 мкг/мл**: поместить 0.1 мл раствора белка в чистые пробирки, добавить 1.0 мл реагента-красителя. Аналогичным образом приготовить калибровочные растворы белка известной концентрации (например, БСА) в этом диапазоне концентраций: 10, 25, 50, 75 и 100 мкг/мл (см. § 3.1), а также чистый буфер (0 мкг/мл).

2) Для белков в концентрации **100-1000 мкг/мл**: поместить 0.1 мл раствора белка в чистые пробирки, добавить 5.0 мл реагента-красителя. Аналогичным образом приготовить калибровочные растворы белка известной концентрации (например, БСА) в этом диапазоне концентраций: 100, 250, 500, 750 и 1000 мкг/мл (см. § 3.1), а также чистый буфер (0 мкг/мл).

NB! Для получения достоверных результатов все образцы готовить в трёх повторах.

3) Хорошо перемешать. Инкубировать при комнатной температуре не менее 5 минут, но не более 1 часа.

4) Измерять оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм.

➤ **Обработка результатов**

1) Вычесть из полученных величин оптической плотности нулевую точку – краситель с буфером.

2) Построить калибровочный график – зависимость оптической плотности

белка известной концентрации от концентрации. Линейный участок графика аппроксимировать уравнением прямой. Примеры калибровочных графиков для двух диапазонов концентраций, а также соответствующие им уравнения представлены на Рис. 3.2.

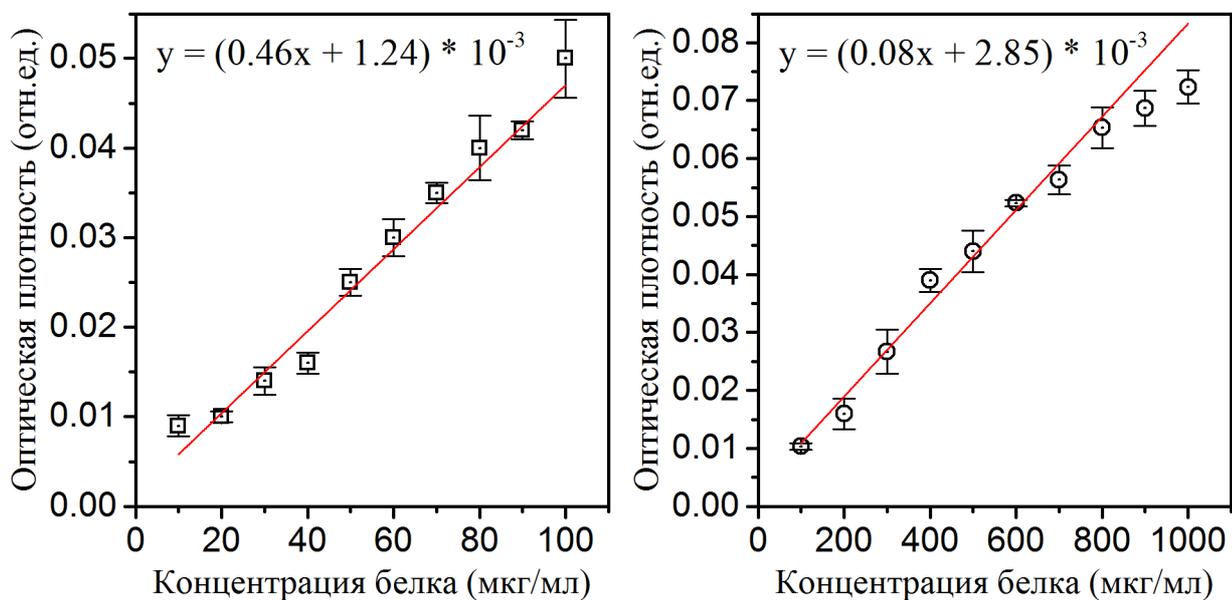


Рисунок 3.2 – Калибровочный график (зависимость оптической плотности раствора лизоцима при длине волны 595 нм от концентрации) для определения концентрации исследуемого белка в диапазоне (а) 10 – 100 мкг/мл и (б) 100 – 1000 мкг/мл. Было использовано по 10 калибровочных точек в указанных диапазонах с шагом 10 и 100 мкг/мл соответственно

3) Подставив в уравнение значения оптической плотности исследуемого белка – вычислить неизвестную концентрацию белка.

§ 3.3 По поглощению на длине волны 280 нм

Известно, что ароматические аминокислотные остатки (триптофан, тирозин и фенилаланин) поглощают с максимумом в диапазоне длин волн 250-280 нм (Табл. 3.1) [3]. Для определения концентрации чистого белка (C , [M]) с известной аминокислотной последовательностью (a , следовательно, с известным числом ароматических аминокислотных остатков) можно воспользоваться законом Ламберта-Бера:

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \cdot C \cdot l \quad (3.1)$$

A_{280} – оптическая плотность на длине волны 280 нм, ε_{280} – коэффициент молярной экстинкции [$M^{-1} \text{ см}^{-1}$], C – молярная концентрация [M], l – длина оптического пути [см].

Коэффициенты молярной экстинкции для ароматических аминокислотных остатков известны (Табл. 3.1). Однако, для того, чтобы не вычислять его вручную для белков с длинной последовательностью, суммируя коэффициенты молярной экстинкции от всех ароматических аминокислотных остатков, можно воспользоваться электронным калькулятором некоторых свойств белков, вычисленных по их последовательности <http://web.expasy.org/protparam/>.

Таблица 3.1 – Поглощение ароматических аминокислотных остатков

Аминокислота	Длина волны λ , нм	Коэффициент молярной экстинкции ε , $M^{-1} \text{ см}^{-1}$
Триптофан	279.8	5600
Тирозин	274.6	1420
Фенилаланин	257.4	197

Проведение измерения в денатурирующих условиях существенно увеличивает точность измерения концентрации, поскольку все ароматические аминокислотные остатки становятся доступны.

➤ **Протокол**

- 1) Измерить оптическую плотность раствора белка на длине волны 280 нм (поскольку триптофан вносит наибольший вклад в величину поглощения). Измерения проводить против буфера, в котором растворён образец.
- 2) Вычислить коэффициент молярной экстинкции по аминокислотной последовательности белка.
- 3) Рассчитать концентрацию белка по формуле (3.1).

РАЗДЕЛ 4. ИММУНОДЕТЕКЦИЯ

Данный раздел посвящён методам, основанным на специфическом взаимодействии антиген-антитело. Данные методы позволяют как выявлять антиген (вестерн-блоттинг – § 4.1-4.6, иммуноферментный анализ (ИФА) – § 4.7), так и выделять его из раствора (аффинная хроматография в объёме – § 4.8, иммунопреципитация – § 4.9).

Антитела (иммуноглобулины, IgG) – крупные глобулярные белки плазмы крови, относящиеся к суперсемейству иммуноглобулинов. Антитела продуцируются плазматическими клетками иммунной системы и играют ключевую роль в нейтрализации патогенов (бактерий, вирусов и так далее). Каждое антитело распознает специфический компонент патогена (антиген) посредством участка связывания антигена (F_{ab} , fragment antigen binding) (Рис. 4.1).

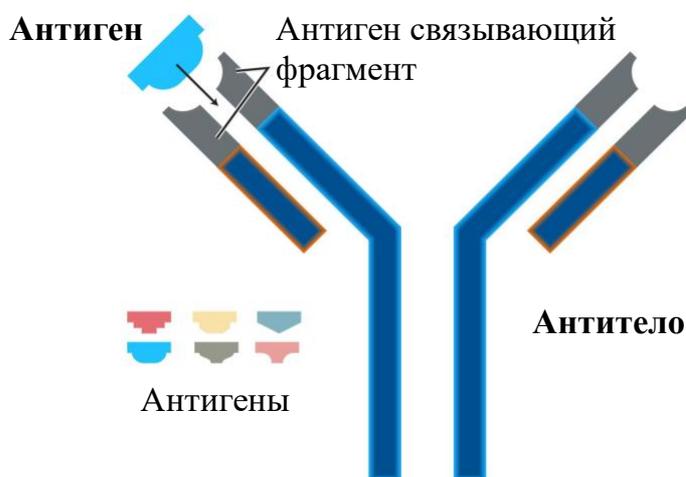


Рисунок 4.1 – Строение антител (адаптировано из [15]). Антитела состоят из двух тяжёлых (обведено голубым цветом) и двух лёгких цепей (обведено оранжевым цветом), соединённых между собой дисульфидными связями. Вариабельная часть аминокислотной последовательности антитела (выделена серым) отвечает за специфичное связывание с антигеном

Антитела, специфичные к конкретному антигену (например, к белку) можно получить, введя белок в организм животного и затем, отобрав кровь,

выделить смесь антител, содержащих в том числе различные антитела к целевому белку. Такая смесь называется поликлональными антителами.

Для получения антител, распознающих строго определенный фрагмент белкового антигена (эпитоп), плазматические клетки выделяют из организма иммунизированного животного и посредством слияния с клетками миеломы получают гибридомы – иммортализованные клетки, каждая из которых выделяет антитела к одному конкретному эпитопу. Полученные гибридомы культивируют в культуре клеток или в организмах лабораторных животных. Каждая гибридома и все её потомки производят идентичные антитела; такие антитела называют моноклональными.

Для очистки поли- и моноклональных антител чаще всего применяют аффинную хроматографию на сорбентах, содержащих белок А или белок G (либо рекомбинантный белок, несущий IgG-связывающий домен обоих этих белков), ковалентно пришитый к сефарозе или полимерному носителю.

§ 4.1 Вестерн блоттинг

Метод вестерн-блоттинга был впервые разработан Towbin и соавт. в 1979 [16], а далее протокол был слегка модифицирован в 1981 году [17], когда и получил название “Western blotting”. Назван он был так по аналогии с уже существующим протоколом переноса ДНК, разработанным Southern [18], чтобы сохранить географический стиль названия [19]. В свою очередь, перенос положительно заряженных белков после ЭФ в ПААГ (если при ЭФ в ПААГ используется не SDS, а бромид цетримония, сообщаемый белкам положительный заряд) назван “Eastern blotting” [20], а перенос на мембрану и детекция РНК – “Northern blotting” [21].

Метод вестерн-блоттинга позволяет детектировать антиген после ЭФ в ПААГ, обычно, в денатурирующих условиях в присутствии SDS. Условно, процедуру можно разделить на две части: перенос белков из геля на мембрану и иммунодетекция целевого антигена.

Для того, чтобы в процессе детекции белки не вымылись из геля, а также для удобства проведения анализа, белки после ЭФ в ПААГ **переносят** на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану, которые отличаются по своей способности сорбировать разные белки, сорбционной ёмкости (диапазону концентраций белка) и по гидрофобным свойствам. В частности:

- ✓ нитроцеллюлозная мембрана эффективнее сорбирует белки с низкой молекулярной массой (менее 20 кДа), а PVDF – более высокой, однако, по большому счёту, оба типа мембран можно применять для анализа широкого диапазона молекулярных масс белков;
- ✓ также мембрана PVDF обладает большей чувствительностью, но это приводит к большему фону, чем в случае использования нитроцеллюлозной мембраны;
- ✓ связывание белков с нитроцеллюлозной мембраной происходит благодаря гидрофобным взаимодействиям, в то время как белки с мембраной PVDF связываются как за счёт гидрофобных, так и за счёт диполь-дипольных взаимодействий;
- ✓ мембрана PVDF более гидрофобна, чем нитроцеллюлозная, поэтому блокирование свободной от белка после переноса части мембраны не требуется, как в случае с нитроцеллюлозной, однако это не позволяет использовать мембрану PVDF с другим методом сорбции белков, таким как дот-блоттинг (непосредственное нанесение раствора белка на мембрану без предварительного разделения методом ЭФ в ПААГ);
- ✓ мембрана PVDF более устойчива к химическим воздействиям, что, например, позволяет использовать её для повторной иммунодетекции перенесённых из геля белков (после десорбции в достаточно жёстких условиях антител и красителей, использовавшихся в ходе предыдущей иммунодетекции).

Резюмируя вышесказанное, вопрос использования того или другого типа мембран зависит не только от свойств конкретного белка и условий конкретного эксперимента, но и от личного удобства экспериментатора,

поскольку, в общем случае, оба этих типа мембран одинаково пригодны для переноса и иммунодетекции белков.

Наиболее распространённым способом переноса является так называемый полусухой перенос. Гель после электрофоретического разделения инкубируется в буфере для переноса, облегчающим связывание белков из геля с мембраной, сверху помещается мембрана, заранее также смоченная в буфере для переноса, после чего гель с мембраной располагают между слоями толстой фильтровальной бумаги, пропитанной этим же буфером. Полученный «сэндвич» помещают между широкими пластинами электродов, прижимают, и осуществляют перенос белков под действием электрического тока. Если перенос проводят SDS-ЭФ в ПААГ в денатурирующих условиях, при которых все белки приобретают отрицательный заряд, то мембрана помещается на сторону геля, ближнюю к положительно заряженному аноду, куда и будут двигаться белки (Рис. 4.2).

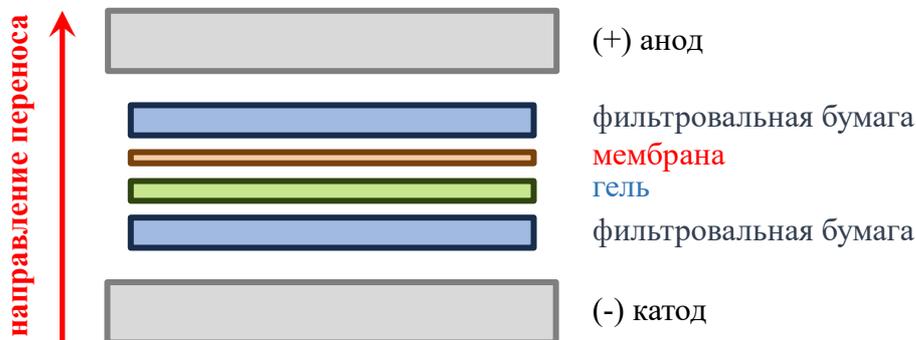


Рисунок 4.2 – Схема полусухого переноса белков после SDS-ЭФ в ПААГ

После того, как белки перенесли на мембрану, наступает второй этап – детекция целевого антигена при помощи специфических антител (**иммунодетекция**). Для этого мембрану инкубируют с раствором антител. Для того, чтобы антитела сами не связались с мембраной (в случае использования нитроцеллюлозной мембраны), предварительно её «блокируют» – занимают все оставшиеся свободными места на мембране растворами бычьего сывороточного альбумина (1%), казеина (1%), желатина

(1%) или молока (5%) (Рис. 4.3). Выбор блокирующего раствора выбирают исходя из природы используемых антител. Например, обезжиренное сухое молоко нельзя использовать с антителами, выявляющие фосфорилированные белки, а также оно может снизить эффективность взаимодействия специфических антител с полигистидиновым тЭГОМ.

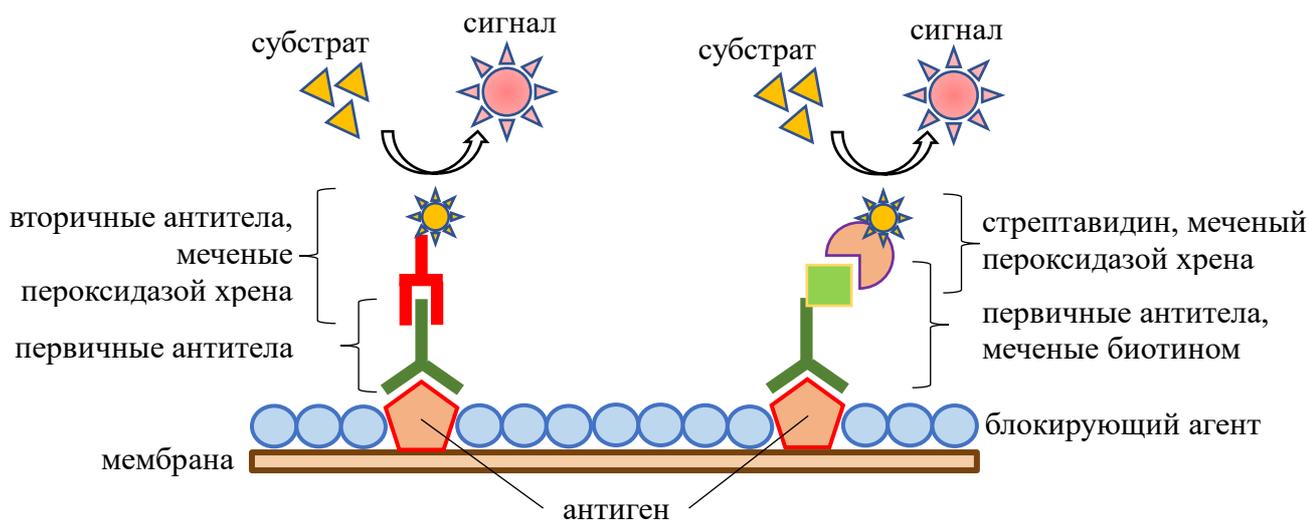


Рисунок 4.3 – Схема иммунодетекции. Пояснения в тексте

Выявление антител может проходить несколькими способами.

1) Антитела могут быть мечены биотином. Тогда после инкубации с «первичными антителами», то есть антителами, специфическими к целевому антигену, мембрану инкубируют со стрептавидином, меченым пероксидазой хрена. Стрептавидин – это белок, который специфически связывается с биотином. После этого, визуализация связывания происходит за счёт химической реакции с участием пероксидазы хрена, в основном, приводящей либо к окрашиванию мембраны (калориметрическое выявление), либо к хемилюминесценции.

2) Если первичные антитела не мечены биотином, тогда на втором этапе антитела инкубируют со «вторичными антителами», мечеными пероксидазой хрена. Обычно используют антитела, способные связываться со всеми антителами какого-то организма. Например, если первичные антитела –

мышинные, тогда в качестве вторичных используют антитела, полученные в козе, способные связываться с любыми иммуноглобулинами мыши. После связывания со вторичными антителами, как и в первом случае, визуализация происходит за счёт пероксидазы хрена.

Таким образом, метод вестерн блоттинга состоит из следующих этапов:

- 1) ЭФ в ПААГ (см. Раздел 1). При дальнейшем описании методики будет считаться, что были проведены или SDS-ЭФ в ПААГ (см. §1.1) или двумерное ЭФ в ПААГ (см. §1.2), что определяет отрицательный заряд белков.
 - 2) Перенос белков на мембрану (см. §4.2. Полусухой перенос).
- NB!** Вместо ЭФ в ПААГ и переноса белков можно непосредственно нанести раствор белков на нитроцеллюлозную мембрану (см. §4.3. Дот-блоттинг).
- 3) Иммунодетекция – связывание антигена и специфических антител (§4.4).
 - 4) Выявление связавшихся антител за счёт реакции с участием пероксидазы хрена – хемилюминесценция (см. §4.5) или калориметрическое выявление (см. §4.6).

§4.2 Полусухой перенос

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Буфер для переноса (не хранится), рН 9.2 (подводить не надо)			
Tris base	121.14 г/моль	1.16 г	47.9 mM
Глицин	75.05 г/моль	0.58 г	38.6 mM
SDS	10 % (w/v)	0.75 мл	0.0375 %
Этанол	95 %	42 мл	20 % (v/v)
H ₂ O (MilliQ)	Довести до 200 мл		

NB! С мембраной следует манипулировать очень аккуратно: не трогать поверхность с образцом; не гнуть и не переламывать мембрану; если её

необходимо переложить – то брать пинцетом за уголок в одном и том же месте, где точно нет образца. Во всех местах, где мембрана сильно согнулась или её потрогали, в дальнейшем могут появиться артефакты в процессе выявления связавшихся антител.

➤ **Полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану**

- 1) Вырезать мембрану и 2 куска фильтровальной бумаги для переноса под размер геля.
- 2) Инкубировать мембрану и гель в буфере для переноса 15-20 минут, бумагу для переноса – около 5 минут.
- 3) Расположить бумагу, гель и мембрану между двумя электродами в порядке, указанном на Рис. 4.2. Необходимо следить за тем, чтобы между слоями не образовывалось пузырей, иначе в этих областях перенос не произойдёт. После того, как бумага, мембрана и гель собраны, но ещё не накрыты верхним электродом, валиком прокатать получившийся «сэндвич» и аккуратно выдавить пузырьки воздуха, образовавшиеся между слоями.
- 4) Проводить перенос около одного часа, для геля 7 на 10 см значение напряжения устанавливать около 20 В (не превышать величины 5.5 мА на 1 см² геля и 25 В).

§4.3 Дот-блоттинг

Вместо ЭФ в ПААГ и полусухого переноса при необходимости можно провести дот-блот. В этом случае образец, с одной стороны, не будет разделён по молекулярным массам, однако, будет находиться в нативном, а не денатурированном, состоянии. Для непосредственного нанесения антигена можно использовать только нитроцеллюлозную мембрану, поскольку она более гидрофильна, чем PVDF, и способна без электрического тока сорбировать белки.

➤ **Методика нанесения антигена**

- 1) Отметить на мембране карандашом положение образцов (расстояние между точками около 1 см).
- 2) Смочить нитроцеллюлозную мембрану сначала в воде, а затем в 1х PBS (см. §4.4).
- 3) После того, как мембрана подсохла, нанести 1-2.5 мкл исследуемого белка на мембрану (наносить не непосредственно на отметку, а на 2-3 мм ниже).
- 4) Снова дождаться подсыхания мембраны.

§4.4 Иммунодетекция антигена на мембране

➤ **Приготовление растворов**

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
10-кратный фосфатный буфер (PBS) [22] (хранить при комнатной температуре)			
NaCl	58.44 г/моль	8 г	1370 mM
KCl	74.55 г/моль	0.2 г	27 mM
Na ₂ HPO ₄	141.96 г/моль	14.2 г	100 mM
KH ₂ PO ₄	136.09 г/моль	2.4 г	18 mM
H ₂ O	До 1000 мл		
PBST			
PBS	10-кратный	100 мл	1-кратный
Tween20	100%	1 мл	0.1%
H ₂ O	---	900 мл	---
Блокирующий раствор			
Сухое молоко (обезж.)	100%	20 г	5%
PBST	---	до 400 мл	---

➤ **Иммунодетекция на нитроцеллюлозной мембране**

- 1) Инкубировать мембрану после переноса 2 раза по 5 минут в PBST.
- 2) Инкубировать с блокирующим раствором в течение 1 часа при комнатной температуре на качалке (можно оставить на ночь при +4°C).
- 3) Отмыть два раза по 5 минут в PBST.
- 4) Добавить необходимое разведение первичных антител, приготовленное на блокирующем растворе. Инкубировать 1 час при комнатной температуре на качалке.
- 5) Отмыть 1 раз 15 минут и 1 раз 5 минут в PBST.
- 6) Инкубировать блот со вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена, в течение 1 часа при комнатной температуре или (в случае, если использовались меченые биотином первичные антитела) со стрептавидином, меченым пероксидазой хрена в течение 30 минут. Антитела и стрептавидин также разводят на блокирующем растворе.
- 7) Отмыть два раза по 5 минут в PBST на качалке.

NB!

При крайней нехватке антигена после выявления антител (см. § 4.6, 4.7) можно провести десорбцию связавшихся антител от мембраны, то есть разрушить все связи антиген-антитело и вернуть мембрану в состояние после полусухого переноса. Для этого необходимо:

- 1) Инкубировать мембрану в буфере Лэммли (см. § 1.1), но без добавления бромфенолового синего в течение 30 минут при 50°C.
- 2) Отмыть 3 раза по 5 минут в PBST на качалке.

§4.5 Хемилюминесценция (реакция люминол-кумаровая кислота)

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Раствор А (хранить при -32°C)			
пара-Кумаровая кислота	164.16 г/моль	0.004 г	68 mM
DMSO	---	358 мкл	---
Раствор В (разаликвотить по 1 мл, хранить при -32°C)			
Люминол	177.16 г/моль	0.007 г	1.25 mM
1.5M Tris-HCl, pH 8.8 (см. §1.1)	1.5 M	2.1 мл	0.1 M
H ₂ O	---	29.5 мл	---
3% H₂O₂ (готовить непосредственно перед использованием, не хранится)			
H ₂ O ₂	30%	10 мкл	3%
H ₂ O	---	90 мкл	---

➤ Окрашивание

- 1) Смешать раствор А, раствор В и 3% H₂O₂ как **1 : 100 : 5**. На одну мембрану (7 на 10 см) требуется около 2 мл проявляющего раствора, то есть **20 мкл : 2 мл : 100 мкл**.
- 2) Распределить раствор по мембране (PBST, в котором она до этого отмывалась – предварительно слить), подождать 30 с. Приподнять мембрану пинцетом за уголочек, дать раствору немного стечь.
- 3) Регистрировать хемилюминесценцию на специальной станции.

§4.6 Окрашивание при помощи DAB

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Трис солевой буфер (TBS), pH 7.5*			
Трис	121.14 г/моль	4.84 г	20 мМ
NaCl	58.44 г/моль	58.48 г	500 мМ
H ₂ O	---	2 л	---
Окрашивающий раствор (не хранится)			
DAB	100%	50 мг	0.05%
TBS	---	100 мл	---
H ₂ O ₂	30%	10 мкл	0.01%

* нужно подводить pH

➤ Окрашивание

- 1) Инкубировать мембрану с окрашивающим раствором 5-15 минут. Следить за тем, чтобы фон не потемнел.
- 2) Для остановки реакции слить окрашивающий раствор и отмыть мембрану дистиллированной водой 2 раза по 5 минут.

§ 4.7 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет выявлять антигены в растворе в нативном состоянии. Антигены можно выявлять в том числе в лизированных клетках или в сыворотке крови. В любом случае, требуется предварительная оптимизация условий проведения эксперимента: подбор оптимальных рабочих концентраций антител, концентрации/разбавления антигена, блокирующего раствора.

Существует четыре варианта ИФА (Рис. 4.4) [23]:

- 1) Прямой ИФА. Антиген (АГ) из раствора сорбируется в лунки специального планшета, после чего выявляется антителами (АТ), конъюгированными с ферментом (например, с пероксидазой хрена, или флуоресцентно меченые).
- 2) Непрямой ИФА. Как и в первом случае, антиген сорбируется в лунки планшета, выявляется первичными немечеными антителами, после чего первичные антитела выявляются вторичными антителами (или же, если первичные антитела были биотинилированы – то добавляется стрептавидин), конъюгированными с ферментом (аналогично процедуре иммунодетекции, см. § 4.4).
- 3) Сэндвич ИФА. В лунки планшета сорбируется не антиген, а антитело (так называемое, связанное антитело). После этого антиген из раствора связывается с иммобилизированным антителом. Данный комплекс далее выявляется антителами аналогично п.2. В данном способе детекции важно, чтобы два типа антител, используемых для сорбции и для детекции антигена, во-первых, были получены на разные эпитопы выявляемого антигена; во-вторых, были получены в разных организмах (если идёт выявление первичных антител вторичными), чтобы вторичные антителами не связались с сорбированными антителами, альтернативно – выявление должно происходить через систему стрептавидин-биотин.
- 4) Конкурентный ИФА. Предварительно, немеченые антитела инкубируются с раствором, содержащим антиген. Антитела добавляются в

избытке, поэтому часть антител остаётся свободной от антигена. В лунку планшета сорбируют антиген-ингибитор, который тоже способен связываться с этими же антителами. Далее к сорбированному АГ-ингибитору добавляют предварительно инкубированную смесь АТ и АГ. Свободные антитела связываются с АГ-ингибитором, в то время как АТ, занятые АГ в растворе, отмываются. Связавшиеся антитела далее детектируются, как описано выше. Конкуренционный ИФА может быть осуществлён как в прямом, так и в непрямом варианте.

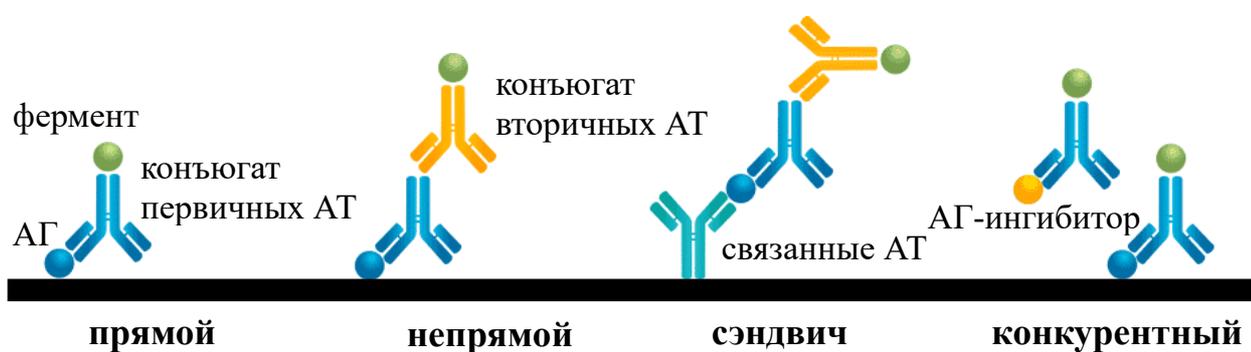


Рисунок 4.4 – Схематическое изображение вариантов проведения ИФА
(адаптировано из [23])

Для контроля работоспособности всех этапов эксперимента, необходимо наносить в отдельные лунки отрицательные контроли (чистый буфер, а также антиген/антитело, с которым точно не должно произойти связывания), а также положительные контроли (чистый антиген, чистые антитела и так далее), то есть то, с чем точно связывание должно произойти.

➤ **Приготовление растворов**

PBST (см. § 4.4)

Блокирующий раствор (см. § 4.4)

Однокомпонентный раствор ТМВ (смесь ТМВ и H_2O_2), коммерческий

2М H_2SO_4

➤ **Протокол (непрямой неконкурентный ИФА)**

1) Сорбировать антиген в лунки 96-луночного планшета для ИФА: нанести по 100 мкл образца, а также положительные и отрицательные контроли в PBS или КББ (карбонатно-бикарбонатном буфере). Инкубировать 1 час при комнатной температуре или оставить при +4°C на ночь.

Обычно, для сорбции используют от 0.5 до 5 мкг антигена. На этапе подбора оптимальных условий ИФА можно нанести несколько разведений антигена (например, 0.5 мкг, 1 мкг, 2.5 мкг и 5 мкг). Каждый образец должен быть нанесён в 5-6 повторах (минимум – в трёх повторах).

2) Удалить несвязавшиеся компоненты (аккуратно и быстро перевернуть и стряхнуть планшет в слив так, чтобы пробы не попали в соседние лунки). Перевернутый планшет обсушить фильтровальной бумагой (чтоб сверху не осталось капель) – просто положить его на сухую бумагу на пару секунд.

3) Отмыть 3 раза по 1 минуте 200 мкл PBST.

4) Инкубировать в 100 мкл блокирующего раствора в течение 1-2 часов на качалке.

5) Слить блокирующий раствор и отмыть 3 раза по 1 минуте 200 мкл PBST.

6) Добавить первичные антитела в рабочей концентрации, растворённые в блокирующем растворе, по 100 мкл на лунку. Инкубировать 1 час на качалке.

На этапе оптимизации условий на каждое разведение антигена приготовить серию разведений антител. Обычно, антитела работают в концентрации около 1 мкг/мл. Если примерная рабочая концентрация антител не известна, то делают двукратные разведения от 4-8 мкг/мл и меньше.

7) Слить первичные антитела и отмыть 3 раза по 1 минуте 200 мкл PBST.

8) Добавить вторичные антитела в рабочей концентрации (или стрептавидин, если использовали первичные биотинилированные антитела), меченые пероксидазой хрена, в объёме 100 мкл. Инкубировать от 30 минут до 1 часа на качалке.

9) Слить вторичные антитела (или стрептавидин) и отмыть 3 раза по 1 минуте 200 мкл PBST.

10) Добавить по 100 мкл проявляющего однокомпонентного раствора ТМВ, инкубировать 30 минут. Проявляющий раствор необходимо добавлять максимально одновременно во все лунки, то есть для дальнейшей адекватной оценки результатов лучше пользоваться многоканальным семплером.

11) Не сливая проявляющего раствора, добавить в каждую лунку по 50 мкл 1М H₂SO₄ для остановки реакции. Также желательно использование многоканального семплера.

12) Измерить оптическую плотность при длинах волн 450 нм и 655 нм не позднее, чем через 30 минут. При обработке результатов целевое значение оптической плотности вычислить как разницу между оптической плотностью при длинах волн 450 нм и 655 нм ($OD = OD_{450 \text{ нм}} - OD_{655 \text{ нм}}$).

Для реализации сэндвич-варианта ИФА на первом этапе сорбируется антитело, потом добавляется блокирующий раствор, потом проводится инкубация с раствором антигена, затем первичных антител и так далее.

При желании, с помощью ИФА можно оценивать количество антигена в растворе, например, в сыворотке крови. Для этого, помимо исследуемых образцов, содержащих антиген, необходимо добавлять антиген в известных концентрациях (аналогично построению калибровочной кривой, см. § 3.1 и 3.2). При этом (в случае сэндвич-варианта ИФА) условия эксперимента должны быть оптимизированы таким образом, чтобы:

- количество сорбированных антител было достаточным для связывания всего антигена из раствора;
- количество первичных антител было достаточным для выявления всего связавшегося антигена с сорбированными антителами;
- в результате концентрация антигена должна попадать на линейный участок калибровочной кривой.

§ 4.8 Аффинная хроматография в объёме

Аффинная хроматография в объёме и иммунопреципитация позволяют не просто детектировать наличие антигена в растворе, а выделить его в чистом виде за счёт связывания с антителом или другим специфичным лигандом. При этом антиген может быть получен в нативном состоянии. Для того, чтобы комплекс антиген-антитело выделить из раствора и очистить от примесных компонентов, антитела иммобилизируют на твёрдый носитель, например, на сефарозу или на магнитные частицы. В этом случае, после инкубации иммобилизованных антител и антигена, этот комплекс легко осаждается и отмывается от примесей. После получения чистого комплекса связь антител и антигена может быть разрушена путём закисления pH (до 2.5-3.5), высокой ионной силой раствора (2-4 М) или добавлением хаотропной соли, например, 1 М LiBr. Выбор одного из вариантов зависит от конкретной пары АГ-АТ.

Данные подходы могут быть использованы не только для очистки конкретного антигена при помощи специфических антител, а также для поиска неизвестных белковых партнёров среди клеточных белков. В этом случае, выделенный за счёт взаимодействия с сорбированным лигандом белок далее исследуют при помощи масс-спектрометрии для его идентификации.

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Активирующий буфер (хранить при 0-4°C)			
HCl	10 М (37%)	5 мкл	1 mM
H ₂ O	---	50 мл	---
Уравновешивающий/отмывочный буфер, pH 8.3*			
NaHCO ₃	84 г/моль	0.84 г	0.2 М
NaCl	58.4 г/моль	1.46 г	0.5 М
H ₂ O	---	до 50 мл	---

Блокирующий буфер I, pH 8.3 (подвести pH с 8.8 до 8.3)			
Tris-HCl (pH 8.8) (см. § 1.1)	1.5 М	3 мл	0.1 М
H ₂ O	---	42 мл	---
Блокирующий буфер II, pH 4 (можно подвести pH в диапазоне от 4 до 5)			
Ацетат Na	82 г/моль	0.41 г	0.1 М
NaCl	58.4 г/моль	1.46 г	0.5 М
H ₂ O	---	до 50 мл	---
Элюирующий буфер (вариант I), pH 2.0			
Глицин	75.1 г/моль	0.38 г	100 mM
H ₂ O	---	до 50 мл	---
Элюирующий буфер (вариант II)			
NaCl	58.4 г/моль	8.76 г	3 М
H ₂ O	---	до 50 мл	---

* обычно pH подводить не нужно

➤ **Иммобилизация антител** (на примере NHS- или CNBr-активированной сефарозы)

1) На первом этапе необходимо активировать смолу для связывания с антителами (или с другим белком, взаимодействующим с целевым). Если смола находится в суспензии (например, в 100% изопропанол), но необходимо отобрать изопропанол, если в лиофилизированном виде (в присутствии сахаров) – то взвесить нужное количество смолы. Затем добавить 1 mM HCl в количестве 10-15 объёмов смолы. Добавлять следует в несколько приёмов (например, по 4-5 объёмов за раз), осадить, отбирать и добавлять новую порцию 1 mM HCl. Время контакта необходимо минимизировать, однако, если смола была лиофилизована с сахарами, необходимо их полностью растворить и отмыть.

NB! Раствор соляной кислоты обязательно должен быть холодным, 0 - +4°C.

2) Отобрать раствор соляной кислоты и добавить раствор антител. Антитела можно добавлять в PBS, уравнивающим буфере или другом буфере с рН от 6 до 9. Количество добавляемых антител рассчитывается из ёмкости смолы. Инкубировать 2-4 часа при аккуратном помешивании. Можно оставлять на ночь при +4°C.

NB! Раствор антител обязательно должен быть холодным, 0 - +4°C

3) Отмыть излишек антител 5-10 объёмами буфера, в котором были растворены антитела. Отобрать буфер.

4) Для блокировки всех непрореагировавших групп добавить 5 объёмов блокирующего буфера I на 2 часа. Помимо 0.1 М Tris-HCl, рН 8.3 в качестве блокирующего буфера можно использовать 0.5-1 М этаноламин, 0.5 М NaCl, рН 8.3.

5) Отмывку смолы с антителами проводить чередованием буферов с низким и высоким рН. То есть, отмыть блокирующим буфером II (3 объёма смолы), затем отмыть блокирующим буфером I (3 объёма смолы). Повторить от 3 до 6 раз.

6) Хранить в 20% этаноле или в уравнивающим буфере (или PBS) с добавлением 0.01% азида натрия.

➤ **Выделение антигена**

1) Отмыть и уравновесить смолу (5-10 объёмов) буфером, в котором растворён антиген.

2) Добавить раствор антигена и инкубировать 30-60 минут при аккуратном перемешивании. По возможности, не следует излишне разбавлять смолу раствором антигена (оптимальное соотношение смола : раствор антигена как 1 : 0.5-2).

3) Отобрать несвязавшийся образец и отмыть три раза 5 объёмами отмывочного буфера.

4) Далее добавить элюирующий буфер, равный одному объёму смолы. (можно, например, элюировать путём закисления рН, а также высокой ионной

силой раствора, например, хлоридом натрия или калия, солями аммония). Инкубировать несколько минут, затем отобрать надосадок. Если элюция проводится закислением рН, то затем его нужно нейтрализовать, например, добавлением 1/10 объёма 1.5 М Tris-HCl, рН 8.8 (см. § 1.1).

NB! Если в дальнейшем требуется только проведение SDS-ЭФ в ПААГ или вестерн блоттинг (а чистый белок в растворе не требуется), то можно обойтись без этапа элюирования, а после п.3 добавить непосредственно в отмытую смолу буфер Лэммли, после чего проводить дальнейшую пробоподготовку и денатурацию белков как обычно.

Для контроля иммобилизации антител и выделения антигена целесообразно провести SDS-ЭФ в ПААГ и нанести исходный раствор антител, раствор антител после иммобилизации, исходный раствор антигена, раствор антигена после иммобилизации и раствор антигена после элюирования.

§ 4.9 Иммунопреципитация

Основной отличительной особенностью иммунопреципитации по сравнению с аффинной хроматографией в объёме является то, что антиген выделяется из среды в комплексе с антителами. Основным принципом иммунопреципитации является иммобилизация специфических антител на твёрдой фазе, которая далее инкубируется с раствором, содержащим целевой белок, после чего твёрдая фаза осаждается, а несвязавшиеся компоненты отмываются. Затем связь антител и твёрдой фазы разрушается, в результате чего происходит элюирование антигена в комплексе со специфическими антителами.

В качестве твёрдой фазы часто используют сефарозу с иммобилизованным белком А или белком G. Данные белки имеют бактериальное происхождение, причём известно, что они специфично

связываются с антителами. Белок А преимущественно связывает человеческие иммуноглобулины, а белок G – мышьиные иммуноглобулины.

Протокол иммунопреципитации аналогичен приведённому выше протоколу выделения антигена (см. § 4.8), за исключением того, что на первом этапе проводят связывание антител и белка А/G.

➤ **Протокол иммунопреципитации**

- 1) Отмыть и уравновесить смолу (5-10 объёмов) буфером, в котором растворены антитела (например, PBS или 0.2М NaHCO₃, 0.5М NaCl, см. § 4.8).
- 2) Добавить антитела и инкубировать 30-60 минут при аккуратном перемешивании.
- 3) Отобрать несвязавшиеся антитела и отмыть смолу 10 объёмами отмывочного буфера. Уравновесить, если антиген растворён в другом буфере.
- 4) Добавить раствор антигена в уравнивающий буфер и инкубировать 30-60 минут.
- 5) Отобрать раствор несвязавшегося антигена и отмыть смолу 10 объёмами отмывочного буфера.
- 6) Элюировать одним объёмом смолы, аналогично § 4.8.
- 7) Смолу для хранения отмыть 5 объёмами уравнивающего буфера, 2 объёмами воды и хранить в 20% этаноле в воде.

РАЗДЕЛ 5. ПРОБОПОДГОТОВКА К МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Метод масс-спектрометрии позволяет идентифицировать неизвестные белки в растворе (при получении чистого белка) или после предварительного ЭФ в ПААГ. По сути, масс-спектрометры – это приборы, которые с высокой точностью определяют массу биомолекул, находящихся в образце (если точнее – определяют отношение массы к заряду m/z ионов, получающихся в результате ионизации биомолекул, находящихся в образце). При этом, в общем случае, чем меньше масса биомолекулы, тем точнее может быть определено m/z соответствующего ей иона. Всё вышесказанное является одной из причин, по которой белки для их масс-спектрометрической идентификации предварительно обрабатываются специальными ферментами – протеазами (например, трипсин, химотрипсин, GlyC и так далее), которые гидролизуют пептидную связь в белке по определённым правилам (например, трипсин разрезает пептидную связь после аргинина и лизина, если за ними не следует пролин). В результате, полноразмерный белок разрезается на определённый набор коротких пептидов, m/z которых может быть измерены масс-спектрометрически с высокой точностью. В ходе идентификации, полученный экспериментально набор m/z сравнивается с теоретическим набором m/z , рассчитанным для известных белков из баз данных (например, ncbi.nlm.nih.gov или uniprot.org) при обработке аналогичным ферментом. При достаточном уровне соответствия белок считается идентичным найденному в базе данных.

Гидролиз белков можно проводить в прямо в геле после ЭФ в ПААГ (§ 5.1) или в растворе (§ 5.2). Если гидролиз проводили в растворе, или в случае исследования белков или пептидов в каких-либо солевых буферах, то перед проведением масс-спектрометрического исследования их необходимо обессолить (§ 5.3). MADLI масс-спектрометрия предполагает использование матриц, которые помогают пептидам ионизоваться или перейти в газовую фазу (§ 5.4).

Интенсивность сигнала в масс-спектрометрии не однозначно соответствует концентрации пептидов в образце, она также зависит от способности пептида к ионизации, которую невозможно предсказать. Для проведения количественных масс-спектрометрических измерений используют изотопно-меченые стандарты – молекулы такой же химической структуры, в которых обычные изотопы кислорода, водорода, азота, заменены на ^{18}O , D , ^{15}N . В § 5.5 приведена методика приготовления изотопно меченых стандартов из пептидов и белков путём прямого введения ^{18}O в карбоксильные группы аминокислотных остатков.

§ 5.1 Ферментативный гидролиз в геле трипсином

Ферментативный гидролиз белков в геле состоит из двух этапов: отмывка от красителя (серебра или Кумасси) и, непосредственно, сам гидролиз. Следует отметить, что использовать можно не только трипсин, но и другие протеазы, гидролизующие пептидную связь по известному закону. Гели для ферментативного гидролиза должны быть окрашены без использования сшивающих агентов (например, глутарового альдегида), в противном случае идентифицировать белки будет невозможно. Все протоколы окрашивания ПААГ, приведённые в данном методическом пособии (см. Раздел 2), совместимы с масс-спектрометрией.

Протокол основан на [24] и [25].

➤ Подготовка растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Буфер для гидролиза (хранить на +4°C)			
NH_4HCO_3	79.064 г/моль	0.4 г	100 мМ
H_2O	---	50 мл	---

Отмывочный буфер (хранить на +4°C)			
NH_4HCO_3	100 мМ	15 мл	30 мМ
Ацетонитрил	100%	20 мл	40%
H_2O	---	15 мл	---
Раствор ДТТ (не хранится)			
ДТТ	154 г/моль	0.007 г	10 мМ
NH_4HCO_3	100 мМ	4.5 мл	100 мМ
Раствор йодацетамида (не хранится)			
Йодацетамид	185 г/моль	0.05 г	55 мМ
NH_4HCO_3	100 мМ	4.9 мл	100 мМ
Раствор трипсина (не хранится, использовать в течение 5 минут)			
Трипсин	0.5 мг/мл в 50 мМ уксусной кислоте	2 мкл	0.02 мг/мл
NH_4HCO_3	100 мМ	25 мкл	50 мМ
H_2O	---	23 мкл	---
10% трифторуксусная кислота (ТФУ) (хранить на +4°C)			
ТФУ	100%	5 мл	10%
H_2O	---	45 мл	---
Терминирующий буфер (хранить на +4°C)			
ТФУ	10%	50 мкл	0,5%
Ацетонитрил	100%	100 мкл	10%
H_2O	---	850 мкл	---
30 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (хранить на +4°C)			
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	329 г/моль	0.49 г	30 мМ
H_2O	---	50 мл	---
100 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (хранить на +4°C)			
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$	248 г/моль	1.24 г	100 мМ
H_2O	---	50 мл	---

Отмывочный буфер для гелей, окрашенных серебром (не хранится)			
$K_3Fe(CN)_6$	30 мМ	5 мл	15 мМ
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	100 мМ	5 мл	50 мМ

➤ **Гидролиз**

NB! Работать надо в перчатках, которые в том числе защитят образец от кератина, ничего лишнего раз не трогать. Если пыль или частички кожи попадут на этапе гидролиза в образцы, то в дальнейшем на спектре будет только кератин. Пробирки также должны быть непосредственно из пакета. Лучше всего работать в ламинаре.

- 1) Вырезать фрагменты геля из интересующих белковых зон, объёмом 1-3 мкл и поместить их в **чистые** пробирки на 200 мкл. Для этого можно использовать надетый на семплер обрезанный наконечник (так, чтобы его диаметр составлял примерно 1.5 мм) или скальпель. Отобрать лишнюю жидкость.
- 2) Добавить **100-200 мкл** отмывочного буфера в зависимости от размера и окрашенности образца. Оставить на **20-30 мин** пока не смывается краситель.
- 3) Отобрать жидкость. Добавить **100 мкл** отмывочного буфера. Оставить на **5-15 мин**. Повторить ещё раз, если гель не отмылся.
- 4) Отобрать жидкость. Добавить **100 мкл** ацетонитрила. Оставить на **5-15 мин**. Гель должен высохнуть и стать белым и непрозрачным. На этом этапе при необходимости гель можно оставить при +4°C на неделю.
- 5) Центрифугировать пробирки на вортексе, чтобы осадить ацетонитрил. Отобрать ацетонитрил досуха и дать **полностью** испариться ацетонитрилу (около 10 минут) с открытыми пробирками.

NB! Ацетонитрил должен полностью испариться, в противном случае реакция ферментативного гидролиза не пройдёт (ацетонитрил ингибирует ферментативную активность трипсина).

- 6) Приготовить раствор трипсина (если гель окрашивался не Кумасси, а серебром, то концентрацию трипсина следует взять в полтора раза меньше) и

добавить к обезвоженным фрагментам геля. Объём добавляемого трипсина должен примерно равняться исходному (не обезвоженному) объёму геля, чтобы весь трипсин впитался (на 1 мм³ геля ~ 2,5 мкл трипсина, на 2 мм³ ~ 4 мкл).

7) Инкубировать не менее 3 часов при 37°C. Можно оставить на ночь.

8) Добавить терминирующий буфер (равный 1.5 объёмам трипсина). Инкубировать при комнатной температуре 15 минут. Хранить при -20°C (после заморозки/разморозки пептиды эффективнее элюируются в буфер).

NB!

- Если гели прокрасились серебром насквозь, то перед началом гидролиза необходимо: 1) добавить **5-10 мкл** отмывочного буфера для серебра к гелю; 2) инкубировать **10-15 минут** (гели должны пожелтеть); 3) промыть гели в **100 мкл** воды **4-5 раз** по **5-15 мин**, пока они не станут прозрачными. Далее следовать протоколу обычного триптического гидролиза.

- При необходимости можно провести восстановление дисульфидных связей и их модификацию йодацетамидом. Для этого после п.5: 1) гель инкубировать со 100 мкл раствора DTT в течение 45 минут при 56°C; 2) охладить до комнатной температуры, отобрать DTT и инкубировать со 100 мкл раствора йодацетамида в течение 30 минут при RT в темноте; 4) отмыть 2 раза по 100 мкл отмывочного буфера; 5) повторить п.5.

- Вместо п.9 можно провести полную экстракцию пептидов из геля. Для этого: 1) добавить к гелю 50 мкл 1% ТФУ, инкубировать 20 минут при комнатной температуре, центрифугировать 16,000g в течение 10 минут, отобрать супернатант, содержащий пептиды; 2) добавить к гелю 50 мкл раствора 0.1% ТФУ, 50% ацетонитрила (см. §5.3, элюирующий буфер), инкубировать 20 минут, центрифугировать аналогичным образом, отобрать супернатант (добавить его к предыдущей порции); 3) добавить к гелю 50 мкл 100% ацетонитрила, инкубировать 20 минут, центрифугировать, отобрать супернатант с пептидами.

§ 5.2 Ферментативный гидролиз в растворе трипсином

Протокол основан на инструкции к трипсину [26] и публикации [25].

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Буфер для денатурации (хранить при комнатной температуре без βМЭ)			
Мочевина	60.06 г/моль	0.4 г	6 М
Tris-HCl (pH 8.0) (см. § 1.1)	1.5 М	400 мкл	50 мМ
H ₂ O	---	до 12 мл	---
βМЭ*	14.3 М	5 мкл	6 мМ
Буфер для гидролиза (хранить на +4°C)			
NH ₄ HCO ₃	100 мМ	500 мкл	50 мМ
H ₂ O	---	500 мкл	---

* добавлять непосредственно перед использованием

➤ Трипсинолиз в растворе

- 1) Осадить 1-10 мг белков в 80% ацетоне при -20°C в течение ночи. Центрифугировать при 16,000g в течение 10 минут. Отобрать супернатант.
- 2) К осадку добавить буфер для денатурации в объёме до 1 мл (минимальный реакционный объём 25 мкл). Инкубировать при 95°C в течение 15-20 минут (или минимально при 60°C в течение 45-60 минут). Дать остыть.
- 3) Добавить буфер для гидролиза в таком объёме, при котором концентрация мочевины будет менее 1 М.
- 4) Добавить трипсин (0.5 мг/мл в 50 мМ уксусной кислоте) до конечного соотношения с белком как от 1 : 20 до 1 : 100. Инкубировать не менее 3 часов при 37°C.

5) Останавливать реакцию добавлением 10% ТФУ (см. § 5.1) до достижения $\text{pH} < 3$, конечная концентрация ТФУ при этом составляет, обычно, от 0.1 до 1% (v/v).

NB!

- Для лучшего масс-спектрометрического анализа полученный раствор пептидов лучше обессолить с помощью ZipTip.
- Одним из вариантов проведения «экспресс» трипсинолиза является непосредственное добавление раствора трипсина к белку (таким образом, чтобы конечная концентрация NH_4HCO_3 составляла 50 мМ, а соотношение трипсин : белок составляло от 1 : 100 до 1 : 20) и дальнейшая инкубация при 60°C от 1 до 2 часов. Реакция останавливается аналогичным образом. При этом, трипсинолиз проходит менее эффективно, однако, в большинстве случаев, этого достаточно для предварительной оценки наличия или отсутствия целевого белка в образце.

§ 5.3 Обессаливание на ZipTip

Если проводился ферментативный гидролиз белков в растворе, или же исследуются белки и пептиды, растворённые солевых буферах (например, в PBS), то перед измерением образцы лучше обессолить. В этом случае, ионизация при MALDI будет проходить более эффективно, а также можно будет использовать матрицы, не совместимые с присутствием солей в образцах (например, HCCA – см. § 5.5).

Поскольку образцы для масс-спектрометрии обычно готовятся в небольшом объёме, то используют метод обессаливания на основе ZipTip – наконечник для сэмплера, с иммобилизованной внутри твёрдой фазой, при помощи которого проводится микроаналог обратно-фазной хроматографии. На первом этапе образцы, закисленные трифторуксусной кислотой до $\text{pH} < 4$,

сорбируются на твёрдой фазе, промываются, а затем элюируются смесью трифторуксусной кислоты и ацетонитрила. Для очистки пептидов обычно используют ZipTip C18, подходящий также для очистки белков с молекулярной массой до 50 кДа. При желании, однако с меньшей эффективностью, можно проводить обессаливание белков вплоть до 100 кДа.

Использование ZipTip позволяет также концентрировать образец (если элюировать пептиды или белки в меньшем объёме), а также разделять пептиды при элюции по степени гидрофобности, варьируя концентрацию ацетонитрила в элюирующем буфере.

Приведённый ниже протокол основан на инструкции к ZipTip C18, Millipore [27].

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Смачивающий буфер			
Ацетонитрил	100%	1 мл	100%
Уравновешивающий буфер / Отмывочный буфер			
ТФУ (см. § 5.1)	10%	10 мкл	0.1%
H ₂ O	---	990 мкл	---
Элюирующий буфер			
ТФУ	10%	10 мкл	0.1%
Ацетонитрил	100%	500 мкл	50%
H ₂ O	---	490 мкл	---

➤ Протокол

1) Добавить в раствор исследуемого белка трифторуксусную кислоту (ТФУ) до 0.1%, в результате чего рН раствора снизится до < 4. При необходимости, для снижения рН до нужного уровня, концентрацию ТФУ можно увеличивать вплоть до 1%.

- 2) Набрать сэмплером, с надетым наконечником ZipTip, 10 мкл смачивающего буфера, затем выпустить буфер в сброс. Повторить ещё раз.
- 3) Набрать 10 мкл уравнивающего буфера, выпустить в сброс. Повторить.
- 4) Аккуратно пипетировать 10 мкл раствора пептидов или белков 7-10 раз для его сорбции в наконечнике. Выпустить раствор.
- 5) Набрать сэмплером 10 мкл отмывочного буфера, выпустить в сброс. Повторить как минимум ещё один раз.
- 6) Элюировать пептиды пипетированием в элюирующем буфере как минимум 3 раза, избегая попадания воздуха. Максимальная эффективность элюции достигается при использовании объёма элюирующего буфера в количестве 5 мкл, однако, если образец необходимо сконцентрировать, то можно снизить объём буфера вплоть до 1 мкл.

NB!

- Если необходимо, помимо обессаливания, разделить пептиды, то вместо п.6 (элюирования 0.1% ТФУ, 50% AcN), можно провести серию элюирований с постепенным увеличением концентрации ацетонитрила в элюирующем буфере: 5%, 10%, 20%, 30%, 50% ацетонитрила в 0.1% ТФУ. Тогда необходимо: элюировать пептиды 1-3 мкл буфера 0.1% ТФУ, 5% AcN; один раз промыть соответствующим буфером; перейти к следующей точке ступенчатого градиента концентрации ацетонитрила.
- Образец можно элюировать в присутствии матрицы (например, HCCA, см. § 5.5 – для непосредственного нанесения на мишень для дальнейшей MALDI масс-спектрометрии.
- Если образец не элюируется в присутствии 50% AcN, то концентрацию последнего можно увеличить до 75-90%.
- Если образец плохо растворяется в AcN, то концентрацию последнего можно снизить до 20-40% в 0.1% ТФУ.

§ 5.4 Приготовление матриц для MALDI масс-спектрометрии

Выбор матрицы для проведения экспериментов определяется теми биомолекулами, которые планируется исследовать методом MALDI масс-спектрометрии. В общем случае, образец и матрицу смешивают и наносят на металлическую пластину (мишень), где они сокристаллизуются. Мишень далее помещают в MALDI масс-спектрометр и ионизируют образец под действием импульса лазера.

Наиболее распространёнными матрицами для исследования белков считаются DHB (2,5-дигидроксibenзойная кислота) и HCCA (α -цианокоричная кислота), чуть в меньшей степени SA (синапиновая кислота) и sDHB или super-DHB (смесь DHB и DHB и 2-гидрокси-5-метоксибензойной кислоты как 9 к 1 по массе). Матрица DHB требует более высокой интенсивности лазера, испаряющего образец при ионизации, чем HCCA, и кристаллизуется неравномерно, из-за чего в разных местах образца могут получаться немного отличающиеся спектры, однако DHB способна ионизоваться даже в присутствии солей. HCCA требует меньшей интенсивности лазера и распределена равномерно, то есть ионизация происходит более мягко и воспроизводимо.

DHB считается универсальной матрицей, её используют для пептидов и белков (также для липидов и органических молекул), особенно в солевых буферах. HCCA, в основном, используют для пептидов, растворённых в ацетонитриле или воде. SA подходит как для пептидов, так и для белков (а также для дендримеров и фуллеренов). Матрица sDHB используется для получения спектров гликозилированных пептидов и гликанов.

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
DHB (sDHB)			
DHB (sDHB)	100%	4 мг	10 мг/мл
Ацетонитрил	100%	100 мкл	25% (v/v)

ТФУ (см. § 5.1)	10% (v/v)	25 мкл	0.5% (v/v)
H ₂ O		275 мкл	
НССА			
НССА	100%	5 мг	10 мг/мл
Ацетонитрил	100%	300 мкл	75% (v/v)
ТФУ	10% (v/v)	20 мкл	0.5% (v/v)
H ₂ O		80 мкл	
SA			
SA	100%	4 мг	10 мг/мл
Ацетонитрил	100%	100 мкл	30% (v/v)
ТФУ	10% (v/v)	30 мкл	0.3% (v/v)
H ₂ O		200 мкл	

§ 5.5 Получение изотопно меченых стандартов

Метод масс-спектрометрии не позволяет напрямую из интенсивности зарегистрированных ионов определить концентрацию пептидов, иными словами интенсивность ионов не пропорциональна концентрации соответствующих им пептидов в образце, поскольку она зависит, в том числе, от способности пептида к ионизации. Однако, показано, что соотношение интенсивностей для изотопов одного и того же элемента (например, ¹²C и ¹³C) пропорционально соотношению их концентраций. Таким образом, если сравнивать интенсивность пептида и его изотопно меченого стандарта известной концентрации, то можно определить концентрацию первого по формуле:

$$C_{\text{пептида}} = \frac{I_{\text{пептида}}}{I_{\text{стандарта}}} \times C_{\text{стандарта}}$$

C – концентрация пептида или стандарта, I – суммарная интенсивность ионов, соответствующих пептиду или стандарту, то есть суммарная площадь под кривой, соответствующей спектру пептида или стандарта (Рис. 5.1).

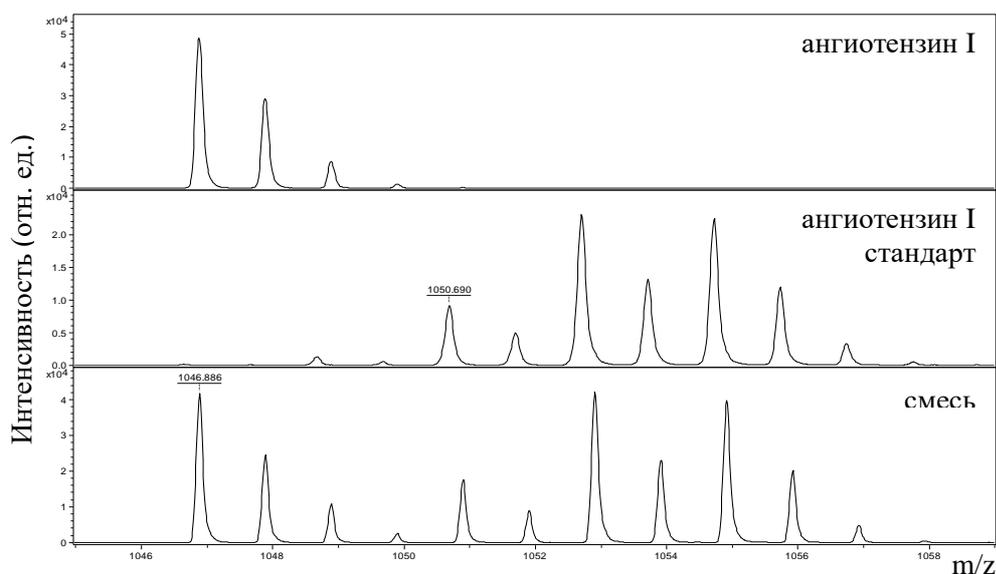


Рисунок 5.1 – Фрагмент MALDI масс-спектра ангиотензина I (сверху), его изотопно меченого стандарта (посередине) и их смеси (снизу)

Каждый пептид на масс-спектре представлен не одним пиком, а группой пиков. В связи с этим, суммировать необходимо площади под всеми пиками, соответствующими данному пептиду.

Получать изотопно меченые пептиды или белки можно разными способами. Например, при получении рекомбинантного белка в среду для бактерии добавляют только меченые ^{15}N вещества. Данный протокол основан на публикации [28], описывающей методику, позволяющую заменять изотопы ^{16}O на ^{18}O по карбоксильным группам аминокислотных остатков в присутствии ТФУ. Преимуществом данного метода является то, что его можно осуществить с любым пептидом, белком или белковой смесью, и он не требует проведения сложных и многоступенчатых химических реакций.

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Пептид	сухой	1-10 нмоль	10^{-4} - 10^{-3} М
ТФУ	100%	5 мкл	10% (v/v)
H_2^{18}O	>95%	45 мкл	85.5 %

➤ **Изотопный обмен**

- 1) Пептид или белок, в котором необходимо провести изотопный обмен, должен быть высушен. Если имеется только раствор белка или пептида в воде, то его предварительно необходимо высушить, например, на вакуумном концентраторе при 45°C.
- 2) К сухому пептиду добавить 50 мкл 10% ТФУ в H₂¹⁸O (готовить непосредственно перед использованием) и инкубировать при 70°C в течение 0.5-4 часов. Время инкубации зависит от желаемой степени обмена изотопов кислорода. В среднем, достаточно 1-1.5 часов.
- 3) Реакцию остановить повторным высушиванием.
- 4) Высушенный стандарт перерастворить в воде перед использованием.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Лизирование клеток

Данный протокол лизирования клеток предназначен для клеток млекопитающих или бактерий, не обладающих клеточной стенкой.

➤ Приготовление растворов

Компоненты	Исходная концентрация	Добавляемое количество	Итоговая концентрация
Раствор PMSF			
PMSF	174.19 г/моль	0.348 г	200 мМ
Этанол (или DMSO)	95% (100%)	до 10 мл	---
Раствор EDTA, pH 8.0			
Натриевая соль EDTA	372.24 г/моль	1.86 г	0.5 М
H ₂ O	---	до 10 мл	---
Лизирующий буфер			
Tris	121.14 г/моль	0.024 г	20 мМ
Nonidet-40 (NP-40)*	100%	50 мкл	0.5 % (v/v)
PMSF	200 мМ	100 мкл	2 мМ
EDTA	0.5 М	40 мкл	2 мМ
H ₂ O	---	до 10 мл	---
RIPA-буфер			
NaCl	58.44 г/моль	0.088 г	150 мМ
EDTA	0.5 М	100 мкл	5 мМ
Nonidet-40 (NP-40)*	100%	0.1 мл	1 % (v/v)
Дезоксихолат натрия	100%	0.05 г	0.5 %
SDS	100%	0.01 г	0.1 %
H ₂ O	---	до 10 мл	---

* можно заменить на Triton X100 или Tween20

➤ **Протокол**

- 1) Клетки центрифугировать при 1000g в течение 10 минут, отобрать надосадочную жидкость. Ресуспендировать в PBS. Повторить ещё дважды.
- 2) Отобрать PBS и ресуспендировать осадок в лизирующем или RIPA-буфере. Заморозить.
- 3) Разморозить клетки и инкубировать 2 часа при 37°C. Альтернативно, после заморозки/разморозки клетки разрушают ультразвуком.
- 4) Центрифугировать при 15-16,000g в течение 15 минут. Для дальнейшего исследования белков использовать **надосадочную жидкость**.

Приложение Б. Физические Свойства Радиоизотопов

Таблицы приложений Б-Г основаны на каталоге [29].

Радиоизотоп	Период полураспада	Молярная активность, МБк/ммоль
^{32}P	14,3 дня	до 10^7
^{33}P	25,4 дня	до 10^7
^{35}S	87,4 дня	до 10^7
^{131}I	8,1 дня	до 10^5
^{125}I	60 дней	до 10^7
^{14}C	5730 лет	до 10^3
^3H	12,4 года	до 10^6

Единицы измерения активности радиоактивного источника

1 Беккерель (Бк) = 1 радиоактивный распад в секунду = $2,7 \times 10^{-11}$ Кюри (Ки)

1 Ки = $3,7 \times 10^{10}$ Бк = 37 ГБк = $2,22 \times 10^{12}$ радиоактивный распад в минуту (dpm)

1 мКи = 37 МБк = $2,22 \times 10^9$ dpm

1 мкКи = 37 кБк = $2,22 \times 10^6$ dpm

1 ГБк = 27 мКи

1 МБк = 27 мкКи

1 кБк = 27 нКи

Приложение В. Физические характеристики нуклеозидтрифосфатов и дезоксинуклеотидтрифосфатов

Соединение	ММ, Да (кислая форма)	λ_{max}^* , нм	ϵ , М ⁻¹ × см ⁻¹
АТР	507	259	15400
СТР	483	271	9000
GTP	523	253	13700
УТР	484	262	10000
dATP	491	259	15200
dCTP	467	271	9300
dGTP	507	253	13700
dTTP	482	267	9600

*определяют при рН 7.0

Преобразования физических характеристик олигонуклеотидов

- *Молекулярная масса*

$$MW = 333 \times N$$

- *Концентрация олигонуклеотидов*

$$C \text{ (мкМ или пмоль/мкл)} = A_{260} / (0,01 \times N)$$

$$C \text{ (нг/мкл)} = (A_{260} \times MW) / (0,01 \times N)$$

MW – молекулярная масса

A₂₆₀ – оптическая плотность при 260 нм

N – количество оснований

Преобразования ДНК/белок

1000 пар оснований (kb) ДНК = 333 аминокислоты ≈ 37 кДа

10 кДа белок ≈ 0.27 kb ДНК

30 кДа белок ≈ 0.81 kb ДНК

50 кДа белок ≈ 1.32 kb ДНК

100 кДа белок ≈ 2.70 kb ДНК

Преобразования физических характеристик нуклеиновых кислот

Молярные преобразования			
Фаговая / Плазмидная ДНК	Пар оснований	Количество	
		мкг	пмоль
ДНК	1000	1.00	1.52
		0.66	1.00
pUC18/19 ДНК	2686	1.00	0.57
		1.77	1.00
pBR322 ДНК	4361	1.00	0.35
		2.88	1.00
SV40 ДНК	5243	1.00	0.29
		3.46	1.00
ФХ174 ДНК	5386	1.00	0.28
		3.54	1.00
M13mp18/19 ДНК	7250	1.00	0.21
		4.78	1.00
ДНК фага λ	48502	1.00	0.03
		32.01	11.00

Спектрофотометрические преобразования			
Нуклеиновая кислота	A ₂₆₀	мкг/мл	мМ (в нуклеотидах)
дцДНК	1.0	50	0.15
оцДНК	1.0	33	0.10
оцРНК	1.0	40	0.12
дцДНК	6.7	335	1.00
оцДНК	10.0	330	1.00
оцРНК	8.3	332	1.00

мМ азотистого основания дезоксирибонуклеотида = 333 Да

мМ азотистого основания рибонуклеотида = 340 Да

мМ пары азотистых оснований дезоксирибонуклеотида = 650 Да

Приложение Г. Температурная зависимость рН раствора 50 мМ Трис-НСl

	рН раствора 50 мМ Трис-НСl													
4°C	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9	9.0	9.1	9.2	9.3	9.4
25°C	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5	8.6	8.7	8.8
37°C	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acrylamide | C₃H₅NO - PubChem [Electronic resource] // PubChem CID: 6579. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6579> (accessed: 09.04.2020).
2. N,N'-Methylenebisacrylamide | C₇H₁₀N₂O₂ - PubChem [Electronic resource] // PubChem CID: 8041. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8041> (accessed: 09.04.2020).
3. Whitford D. Proteins : structure and function. J. Wiley & Sons, 2005. 528 p.
4. Sodium dodecyl sulfate | C₁₂H₂₅O₄S.Na - PubChem [Electronic resource] // PubChem CID: 3423265. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3423265> (accessed: 09.04.2020).
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
6. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE // Nat. Protoc. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 1, № 1. P. 16–22.
7. Biorad. PROTEAN® i12™ IEF System. 72 p.
8. Schägger H., von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form // Anal. Biochem. Academic Press, 1991. Vol. 199, № 2. P. 223–231.
9. Wittig I., Schägger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE // Proteomics. 2005. Vol. 5, № 17. P. 4338–4346.
10. Candiano G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis // Electrophoresis. 2004. Vol. 25, № 9. P. 1327–1333.
11. Sandermann H., Strominger J.L. Purification and properties of C 55 - isoprenoid alcohol phosphokinase from Staphylococcus aureus // J. Biol. Chem. 1972. Vol. 247, № 16. P. 5123–5131.
12. Lowry O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.

13. Досон Р. et al. Справочник биохимика: пер. с англ. Мир. Москва, 1991. 466–467 p.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* Academic Press, 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
15. Antibody | Talking Glossary of Genetic Terms | NHGRI [Electronic resource]. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Antibody> (accessed: 28.04.2020).
16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
17. Burnette W.N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A // *Anal. Biochem.* 1981. Vol. 112, № 2. P. 195–203.
18. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // *J. Mol. Biol.* Academic Press, 1975. Vol. 98, № 3. P. 503–517.
19. Kurien B.T., Scofield R.H. Western blotting // *Methods.* 2006. Vol. 38, № 4. P. 283–293.
20. Buxbaum E. Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins // *Anal. Biochem.* Academic Press Inc., 2003. Vol. 314, № 1. P. 70–76.
21. Alwine J.C., Kemp D.J., Stark G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences,* 1977. Vol. 74, № 12. P. 5350–5354.
22. Phosphate-buffered saline (PBS): // *Cold Spring Harb. Protoc.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2006. Vol. 2006, № 1. P. pdb.rec8247.
23. Four Types of ELISA-CUSABIO [Electronic resource]. URL:

- <https://www.cusabio.com/c-20659.html> (accessed: 22.04.2020).
24. Jensen O.N. et al. Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1999. Vol. 112. P. 513–530.
 25. Målen H. et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // *Proteomics*. 2007. Vol. 7, № 10. P. 1702–1718.
 26. Corporation P. Sequencing Grade Modified Trypsin Product Information #9PIV511. 1998.
 27. Millipore. User Guide for Reverse-Phase ZipTip: PR02358, Rev. A, 02/07. 2007.
 28. Козьмин Ю.П. et al. Прямое введение изотопов O-18 в пептиды и белки для количественного анализа методом масс-спектрометрии // *Биоорганическая химия*. 2011. Vol. 37, № 6. P. 793–806.
 29. Fermentas. MBI Fermentas catalogue. 2005. 538–540 p.