

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

Н.В. Юнусова, Д.И. Кузьменко, Е.В. Кайгородова,  
А.К. Сомов, В.Ю. Серебров

# **ПРАКТИКУМ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

учебное пособие  
для студентов медико-биологического факультета

ТОМСК  
Издательство СибГМУ  
2017

УДК 577.2(075.8)

ББК 28.070я73

П 691

Авторы:

Н.В. Юнусова, Д.И. Кузьменко, Е.В. Кайгородова, А.К. Сомов,  
В.Ю. Серебров

П 691

Практикум по молекулярной биологии: учебное пособие /  
Н. В. Юнусова, Д. И. Кузьменко, Е. В. Кайгородова и др. –  
Томск: Издательство СибГМУ, 2017. – 65 с.

Практикум включает описание методов очистки и разделения белков, определения молекулярной массы белков, методов препаративного центрифугирования, ультрацентрифугирования, получения экзосом и их применения в области молекулярной биологии.

В пособии дана характеристика методов культивирования клеток животных и человека, использования клеточных культур при изучении процессов роста, деления, опухолевой трансформации, эпителиально-мезенхимального перехода, опухолевой прогрессии и гибели клеток.

Настоящий практикум включает описание современного молекулярного метода *in situ* гибридизации и его основного варианта FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация), который позволяет обнаружить любые генетические нарушения в клетке.

Практикум подготовлен в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия. Пособие также может быть использовано студентами медицинских и биологических специальностей.

УДК 577.2(075.8)

ББК 28.070я73

**Рецензент:**

**Акбашева О.Е.** – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

*Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 01.03.2017).*

© Издательство СибГМУ, 2017

© Юнусова Н.В., Кузьменко Д.И., Кайгородова Е.В.,  
Сомов А.К., Серебров В.Ю., 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	4
<b>ТЕМА 1. Методы очистки и фракционирования белков</b> .....	6
<b>Занятие 1</b> .....	6
Лабораторная работа № 1. Обессоливание белковых растворов фильтрованием через гель сефадекса G-25 .....	13
<b>Занятие 2</b> .....	16
Лабораторная работа № 2. Разделение смеси белков методом ионообменной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе .....	18
<b>Занятие 3</b> .....	21
Лабораторная работа № 3. Высаливание белковых фракций. Фракционирование протеасом с определением химотрипсиноподобной активности 26S и 20S пулов протеасом .....	25
<b>ТЕМА 2. Молекулярные основы <i>in situ</i> гибридизации</b> .....	28
<b>Занятие 1</b> .....	28
Лабораторная работа № 4. Определение наличия амплификации гена Her2/neu в опухолевых клетках методом FISH .....	34
<b>ТЕМА 3. Межклеточный информационный поток – внеклеточные РНК и внеклеточные везикулы</b> .....	41
<b>Занятие 1</b> .....	41
Лабораторная работа № 5. Получение препарата внеклеточных везикул – экзосом из биологических жидкостей методом ультрацентрифугирования с ультрафильтрацией .....	45
<b>ТЕМА 4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ</b> .....	48
Лабораторная работа № 6. Определение молекулярной массы белков фильтрованием через гель сефадекса G-100 .....	50
<b>ТЕМА 5. Основы культивирования клеток</b> .....	55
<b>Занятие 1</b> .....	55
Лабораторная работа № 7. Основы культивирования клеток. Работа с адгезивными и суспензионными культурами. Подсчет клеток при культивировании .....	59
<b>Литература</b> .....	64

## ВВЕДЕНИЕ

**Молекулярная биология** – комплекс биологических наук, изучающих механизмы хранения, передачи и реализации генетической информации, строение и функции нерегулярных биополимеров (белков и нуклеиновых кислот). Молекулярная биология изучает строение и функции нуклеиновых кислот, принципы и механизмы реализации наследственной информации, а также молекулярные основы структуры и функций клеток, процессы роста, развития, деления и гибели клеток.

**Цель дисциплины:** формирование у студентов современных знаний об основных молекулярно-генетических и клеточных механизмах функционирования организма и их применение в клинической практике.

Формирование у студентов устойчивых знаний по курсу «Молекулярная биология» невозможно без приобретения определенных практических навыков. Поэтому настоящее учебно-практическое пособие включает описание методов очистки и разделения белков, методов оценки молекулярной массы белков, основы центрифугирования и ультрацентрифугирования, препаративное центрифугирование и получение препарата внеклеточных везикул – экзосом.

Культивирование клеток животных и человека применяется во многих отраслях науки, имеет отношение ко многим медицинским биотехнологиям. Однако часто только использование клеточных культур позволяет решить такие задачи молекулярной биологии, как изучение процессов роста, деления, опухолевой трансформации, эпителиально-мезенхимального перехода, опухолевой прогрессии и гибели клеток. Поэтому данное пособие включает раздел «Основы культивирования клеток».

Настоящее учебно-практическое пособие включает описание современного молекулярного метода *in situ* гибридизации и его основного варианта FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация), который позволяет обнаружить любые генетические нарушения в клетке.

Авторы приносят большую благодарность старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии Томского НИМЦ к.б.н. Булдакову М.А. и старшему научному сотруднику лаборатории биохимии опухолей к.м.н. Шацовой Е.Е. за консультативную поддержку при написании разделов «Основы культивирования клеток» и «Методы очистки и разделения белков», а также практическую помощь в проведении занятий по данным направлениям.

# ТЕМА 1. МЕТОДЫ ОЧИСТКИ И РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

## Занятие 1

**Цель практического занятия:** освоить способ очистки белковых растворов методом их обессоливания на колонке с сефадексом G-25. Научиться определять внутренний и наружный (свободный) объемы хроматографической колонки, элюционный объем.

### Теоретическая часть

Разделение смеси молекул по их размерам и форме с помощью хроматографических методов основано на эффекте **молекулярного сита**. Этот эффект свойствен многим пористым материалам. В хроматографии для этих целей применяют различные органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой, придающей им свойства геля. Материал гелей химически инертен ко всем реагентам и компонентам разделяемой смеси.

Разделение смеси веществ при помощи гелей, основанное на различиях размеров молекул, образующих смесь, называется **гель-фильтрацией** (синонимы: гель-проникающая хроматография, молекулярно-ситовая хроматография). Все виды разделения молекул, основанные на принципе молекулярного сита, относятся к **проникающей хроматографии**.

Проникающая хроматография – термин из классификации хроматографических методов, в основу которой положен принцип фракционирования при котором молекулы смеси разделяются в зависимости от их молекулярной массы и силуэта молекул (близкого к глобулярной или вытянутой, фибриллярной формам).

Принцип молекулярного сита реализуется следующим образом. Крупные молекулы, не проникающие внутрь пор геля (размер молекул  $>$  размера пор), проходят между частицами геля. В то же время мелкие молекулы (размер молекул  $\leq$  размера пор) входят во внутреннее пространство пор геля и через некоторое время выходят из него. В силу этих явлений крупные молекулы движутся вдоль колонки быстро. Их скорость практически равна скорости движения фронта подвижной фазы (буфер, которым элюируют колонку). Мелкие молекулы, вследствие их «задержки» во внутреннем пространстве пор геля, движутся вдоль колонки со скоростью заведомо меньшей, чем фронт подвижной фазы. Благодаря этим процессам из хроматографи-

ческой колонки первыми выйдут молекулы, обладающие максимальным размером, последними – молекулы с минимальным размером.

### **Применение гель-фильтрации**

- очистка высокомолекулярных биологических соединений;
- разделение смеси низкомолекулярных соединений: возможно отделять аминокислоты от пептидов, фракционировать пептиды (после частичного гидролиза белков) или нуклеотиды (после гидролиза нуклеиновых кислот), выделять низкомолекулярные декстраны из растительных масел;
- определять молекулярную массу (существует линейная зависимость между десятичным логарифмом молекулярной массы белка и его элюционным объемом);
- концентрировать растворы высокомолекулярных соединений;
- обессоливать растворы.

Помимо гель-фильтрации на колонке, существует **тонкослойная гель-фильтрация**. В этом варианте гель наносится тонким слоем на стеклянную пластинку. Гранулы геля прилипают к поверхности стекла без каких-либо закрепляющих химических агентов, образуя неподвижную фазу. Подвижная фаза – буферный раствор, который постоянно должен смачивать слой геля.

Процедуру фильтрации проводят, поместив пластину с гелем в специальную герметическую камеру. Пробу наносят в виде пятна или полосы.

Преимущество тонкослойной гель-фильтрации над таковой на колонке состоит в том, что она позволяет хроматографировать одновременно несколько проб и разделять очень малые количества материала. Эти обстоятельства способствовали распространению тонкослойной гель-фильтрации в современной клинической биохимии.

### **Достоинства гель-фильтрации**

Этот вид хроматографии незаменим для разделения молекул, отличающихся по молекулярному весу. Фракционирование в геле подавляющего большинства веществ не зависит от температуры, рН, ионной силы и состава буфера. Разделение можно проводить почти в любых условиях, явление адсорбции при этом практически отсутствует. Последнее обстоятельство очень важно для сохранения нативного состояния таких лабильных соединений, как ферменты. Кроме того, величина элюционного объема находится в прямой зависимости от молекулярной массы белков.

## Материалы для проникающей хроматографии

- Гели: – декстраны с поперечными сшивками (сефадекс);  
– агарозные гели (сефароза, биогель А, сагавак);  
– полиакриламидный гель (биогель Р);  
– полистиролы (био-бидзS).

Применяются также пористые стеклянные шарики (биоглас) и пористый кварц (порасил).

Сефадекс (существует 8 его типов) производит фирма Pharmacia Chemicals уже более 35 лет. Сефадекс – декстран, полисахаридные цепочки которого имеют поперечные сшивки с помощью эпихлоргидрина. Благодаря такой модификации декстран, исходно растворимый в воде, становится водонерастворимым. При этом декстран сохраняет свои гидрофильные свойства и способность к быстрому набуханию в водной среде. Для удобства наполнения колонок трехмерная молекулярная сетка геля сформирована в виде гранул (шариков).

Гели сефадекса стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабокислых средах. В сильнокислых растворах возможен гидролиз 1,6-гликозидных связей матрицы геля. Во влажном состоянии гель сефадекса может быть подвергнут стерилизации (автоклавирование при 100 °С в течение 40 мин).

В зависимости от числа поперечных сшивок получено несколько типов сефадексов, различающихся степенью пористости, что позволяет применять их для разделения смесей веществ, имеющих молекулы различного размера. Наиболее мелкопористый сефадекс – G-10, наиболее крупнопористый – G-200. Чем крупнее поры, тем больше воды связывается в гранулах при набухании геля. Номер в маркировке сефадекса характеризует его пористость: он означает количество воды в мл, которое связывают 10 г сухого геля. Область разделения различных типов сефадексов по молекулярному весу пептидов и глобулярных белков: для G-25 составляет 100-5000 Д, для G-200 – 5000-600000 Д.

Каждый тип сефадекса характеризуется **величиной поглощения воды (W, см. ниже)**. Этот параметр означает количество граммов воды, поглощенной одним граммом сухого сефадекса, после завершения процесса набухания геля

## Процесс гель-фильтрации. Некоторые элементы теории

Способность молекул разделяемой смеси (или анализируемого соединения) проникать в растворитель, заполняющий внутреннее пространство пор набухшего геля, зависит от:



- степени пористости частиц геля;
- размеров молекул.

Распределение вещества вдоль колонки, заполненной набухшим гелем, определяется:

- объемом растворителя, вошедшего внутрь частиц геля;
- объемом растворителя, оставшегося снаружи частиц геля.

В связи с этим следует рассмотреть **статические** и **динамические** параметры колонки.

### Статические параметры колонки

**V<sub>t</sub>** – общий (total) объем колонки. Для его определения в колонку, до помещения туда геля, заливают воду и измеряют ее объем, либо вычисляют, зная внутренний диаметр колонки и ее длину.

**V<sub>o</sub>** – внешний (out) объем колонки или свободный объем колонки. Это объем растворителя, заполняющего пространство между гранулами геля (вне гранул). **V<sub>o</sub>** определяется пропусканием через колонку специального окрашенного вещества с большой молекулярной массой, например, «голубой декстран» («Bluedextran», производства фирмы Pharmacia Chemicals) среднее значение его молекулярной массы =  $2 \times 10^6$  Д.

**V<sub>g</sub>** – объем гранул (granula) геля.

Тогда общий объем колонки будет определяться:

$$\mathbf{V_t = V_o + V_g}$$

Поскольку гель – трехмерная сетка, в которую включен растворитель, то:

$$\mathbf{V_g = V_m + V_i}$$

где: **V<sub>m</sub>** – объем матрикса (matrix), то есть самого вещества геля; **V<sub>i</sub>** – объем растворителя внутри (in) гранул геля или внутренний объем.

Объем растворителя внутри гранул геля (**V<sub>i</sub>**) можно определить также, если известны: вес сухого геля (**a**) и величина поглощенной сухим гелем воды в результате его набухания (**W**):

$$\mathbf{V_i = aW}$$

### Динамические параметры колонки

**V<sub>e</sub>** – элюционный объем или объем выхода. Это сумма объемов порций элюата, собранных с момента внесения декстрана голубого на колонку (порция № 1) до момента достижения его максимальной концентрации в элюате (порция № 13), то есть в тринадцати порциях элюата. Элюционный объем определяют эмпирически (рис.1):

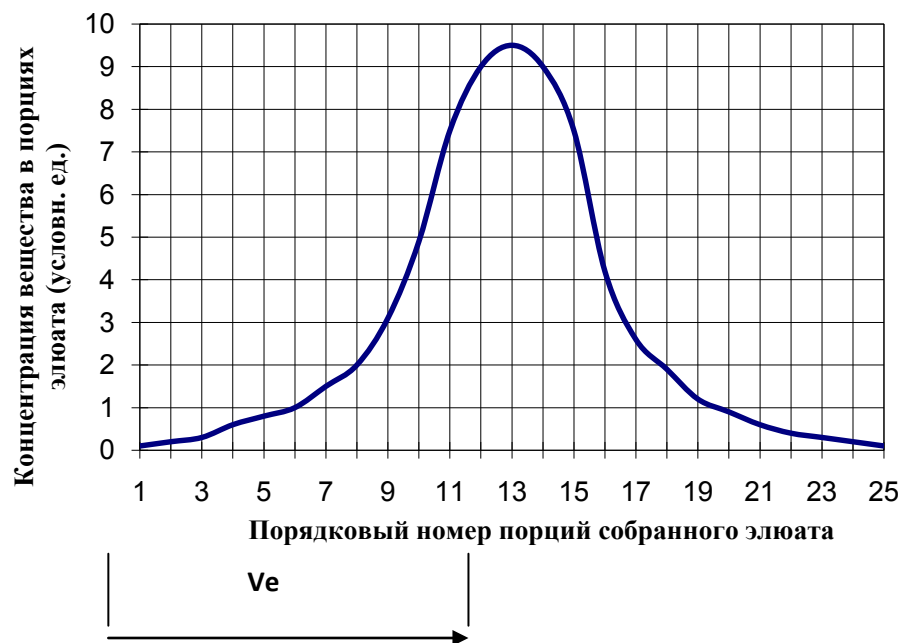


Рис. 1. Принцип определения элюционного объема ( $V_e$ )

Элюционный объем определяется внешним объемом ( $V_0$ ), коэффициентом распределения вещества ( $Kd$ ) и объемом растворителя внутри гранул геля ( $V_i$ ). Отсюда:

$$V_e = V_0 + (Kd \cdot V_i)$$

$Kd$  – выражает распределение вещества между объемом растворителя внутри гранулы и объемом растворителя вне гранулы, то есть во внешнем объеме колонки ( $V_0$ ):

$$Kd = \frac{C_{\text{вещества внутри гранулы}}}{C_{\text{вещества вне гранулы}}}$$

где:  $C$  – концентрация вещества в соответствующих объемах

При гель-фильтрации неподвижная фаза – растворитель, заполнивший внутренний объем частиц геля. Подвижная фаза – тот же растворитель, заполняющий пространство между гранулами геля (вне гранул геля).

Рассмотрим элементарные случаи подачи на колонку молекул различных размеров:

Случай 1:  $Kd = 0$ , если молекулы крупные и не проникают внутрь частиц геля. Их концентрация в объеме растворителя внутри гранулы = 0. Тогда:  $V_e = V_0$ .

Случай 2:  $Kd = 1$ , если размеры молекул вещества хорошо соотносятся с размерами пор частиц геля, вследствие чего вещество свободно проникает в их внутреннее пространство. Эти молекулы будут равномерно распределяться между подвижной и неподвижной фа-

зами. Тогда:  $V_e = V_0 + V_i$

Случай 3: Рассмотрим вещество, размеры молекул которого имеют промежуточное значение (меньше, чем в случае 1, но больше, чем в случае 2). Для этих молекул, благодаря статистическому распределению размеров пор геля (размеры пор все же варьируют в некотором небольшом диапазоне), окажется доступной только часть объема внутри частиц геля. В этом случае будет:

$$0 < K_d < 1.$$

Если  $K_d$  – величина постоянная, не зависящая от геометрии колонки, то численное значение  $V_e$  варьирует в зависимости от размеров колонки. Величина  $V_e$  не зависит от концентрации белка, ионной силы раствора и только для некоторых белков зависит от температуры. Фракционируются только те вещества, для которых  $0 < K_d < 1$ .

### **I. Подготовка к анализу:**

#### **Выбор сефадекса**

Для разделения смеси белков можно использовать сефадекс G-100.

Для разделения смеси низкомолекулярного и высокомолекулярного белков либо для обессоливания раствора белка можно использовать сефадекс G-25 и G-50.

#### **Геометрия колонки (соотношение длины и диаметра)**

Для разделения смеси двух веществ, значительно отличающихся по молекулярному весу (обессоливание раствора белка), следует использовать короткие колонки с относительно большим внутренним диаметром – соотношение длина колонки : диаметр колонки  $\leq 10:1$ .

Для разделения смеси белков (хроматографическое фракционирование) колонка должна быть длинной с относительно малым внутренним диаметром – соотношение длина колонки : диаметр колонки = 100 : 1. Известно, что разрешающая способность хроматографической колонки пропорциональна квадратному корню ее длины.

Любые хроматографические колонки не должны иметь «мертвого пространства». Для предотвращения его образования на дно колонки, до внесения туда набухшего геля, помещают подкладку из пропиленовых или капроновых нитей. Они, в отличие от фильтровальной бумаги, никогда не закупорят колонку снизу.

#### **Набухание сефадекса**

Время набухания сефадекса G-50 – 8–10 часов; G-100 – 2 суток; G-200 – 3 суток. Процесс можно ускорить нагреванием геля в водяной бане до 90 °C: набухание сокращается для G-50 до 1 часа; для G-

100 – до 3 часов; для G-200 – до 5 часов. Вода над слоем набухшего сефадекса должна быть чистой и прозрачной, то есть не содержать разбитых гранул геля.

### **Заполнение колонки, нанесение изучаемого образца и установление скорости прохождения раствора через колонку**

Аккуратно заполнить колонку набухшим сефадексом и дать осесть суспензии в течение 15 мин под действием силы тяжести. В колонке не должно быть пузырьков воздуха.

Объем вносимой пробы при разделении смеси белков не должен превышать 3 % от общего объема колонки ( $V_t$ ). При обессоливании раствора белка объем вносимой пробы должен составлять не более 20–30 % от общего объема колонки. Концентрация вещества во вносимом объеме не должна превышать 20 мг/мл. Вязкость пробы не должна превышать вязкость буферного раствора более чем в 2 раза. Проба должна быть плотнее буфера. Плотность пробы можно увеличить с помощью сахарозы, однако ее концентрация не должна превышать 3–5%.

Скорость прохождения раствора через колонку должна составлять 1 каплю в 10–15 сек. При промывании колонки недопустимо искусственно увеличивать гидростатическое давление на колонку. Это приведет к раздавливанию гранул геля, что недопустимо.

С поверхности геля удаляют буфер или физраствор, так, чтобы остался слой жидкости толщиной 1–2 мм. Сразу же вносят образец. Как только он всасывается в гель, начинают пропускать элюирующий раствор. Он медленно подается на стенку колонки, так, чтобы горизонтальная поверхность геля не нарушилась.

Сбор элюата, выходящего из колонки, начинается с первой капли после нанесения образца на колонку. Это важно для точного определения элюиционного объема ( $V_e$ ).

### **Студент должен знать:**

1. Принцип метода гель-фильтрации.
2. Статические и динамические параметры хроматографической колонки.
3. Материалы, используемые для хроматографических методов.
4. Принцип выбора геля в зависимости от цели исследования.
5. Технические особенности колоночной хроматографии.

### **Студент должен уметь:**

1. Правильно выбрать геометрию колонки и материал для ее за-

- полнения (сефадекс и др.), исходя из целей работы.
2. Правильно заполнить колонку и подготовить ее к работе.
  3. Правильно нанести пробу на колонку и собрать фракции элюата.
  4. Начертить график зависимости элюционного объема от логарифмов молекулярной массы белков.

### **Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. Назовите статические параметры колонки.
2. Назовите динамические параметры колонки.
3. Что выражает коэффициент распределения  $K_d$ ? Для чего необходимо знать этот коэффициент?
4. Что означают случаи:  $K_d=0$  и  $K_d=1$ ?
5. В чем состоят отличия ультрафильтрации и гель-фильтрации?
6. На каких принципах основаны адсорбционная, ионообменная и распределительная хроматография?
7. Какие методы обессоливания белковых растворов Вы знаете? В чем состоят преимущества и недостатки каждого из них?
8. Какие методы определения молекулярной массы белков Вы знаете? В чем состоят преимущества и недостатки каждого из них?
9. Каков принцип разделения смеси белков и обессоливания белковых растворов с помощью сефадекса?
10. Что представляет собой сефадекс как «молекулярное сито», его виды?
11. Какие материалы (носители) используются в хроматографии?
12. Как влияют температура, скорость движения фаз и количество наносимого на колонку образца на эффективность разделения компонентов смеси?

### **Лабораторная работа № 1**

#### **Обессоливание белковых растворов фильтрованием через гель сефадекса g-25**

##### **Реактивы:**

1. 1 % Водный раствор декстрана голубого.
2. 1 % Водный раствор бихромата калия ( $K_2Cr_2O_7$ ).
3. Солевой раствор белка: 1 % раствор альбумина, в качестве растворителя используется 0,9 % раствор NaCl.
4. 1 % Водный раствор азотнокислого серебра.

### **Оборудование:**

1. Колонка для хроматографии соответствующей геометрии: короткая колонка с относительно большим диаметром.
2. Штативы с держателями для колонок.
3. Штативы для пробирок.
4. Химические пробирки.
5. Пипетки.
6. Фотоэлектроколориметр.

### **Ход работы:**

1. Определение наружного (внешнего, свободного) объема колонки –  $V_0$ .

Для этого в колонку вводят раствор вещества с большой молекулярной массой – декстран голубой ( $M.в. = 2 \times 10^6$ ). Синяя окраска соединения позволяет легко проследить за его движением вдоль колонки. Свободный объем колонки соответствует объему элюата, собранному с момента нанесения декстрана до выхода фракции элюата с максимальной концентрацией соединения. Об относительной концентрации декстрана голубого в порциях элюата можно судить по оптической плотности голубой окраски, которую измеряют на фотометре при длине волны 650 нм против дистиллированной воды.

2. Определение внутреннего объема ( $V_i$ ).

**Первый способ.** Параметр определяют путем расчета по формуле:

$$V_i = a \cdot W$$

где:  $a$  – вес сефадекса в сухом виде, г;

$W$  – вес воды (г), поглощенной сефадексом, при набухании геля. Для различных сефадексов величина  $W$  имеет следующие значения: G-25 – 2,5 г/г; G-50 – 5,0 г/г; G-75 – 8,0 г/г; G-100 – 10,0 г/г.

**Второй способ.** Общий объем колонки вычисляют по формуле:

$$V_t = \pi r^2 h$$

где:  $\pi$  – 3,14

$r$  – внутренний радиус стеклянной колонки, см

$h$  – высота колонки (высота столбика геля в колонке, считая от ее основания), см.

Результат выражают в мл, поскольку  $1 \text{ см}^3 = 1 \text{ мл}$ .

Внутренний объем колонки вычисляют путем вычитания внешнего объема ( $V_0$ ) из общего объема ( $V_t$ ) колонки:

$$V_i = V_t - V_0$$

3. Проведение процесса обессоливания.

Воде в колонке дают профильтроваться до поверхности геля. За

это время устанавливают такую скорость элюирования, при которой из колонки выходит 5–7 капель за 1 мин. Затем на поверхность геля наслаивают солевой раствор белков (пробу). Для того чтобы обессоливание прошло с оптимальным результатом (то есть элюирование белка не совпало с таковым для солей), не следует перегружать колонку. С учетом этого требования объем пробы, вносимый на колонку, не должен превышать 1/10 общего объема ( $V_t$ ) или 1/3 наружного объема ( $V_o$ ). С учетом этого требования объем вносимой пробы будет составлять 0,5–1,0 мл.

Как только проба профильтруется в гель, стенки колонки ополаскивают небольшим количеством воды. Далее колонку начинают элюировать водой: ее постепенно и очень аккуратно добавляют по стенке колонки небольшими порциями. Фракции элюата собирают в стеклянные пробирки по 3,0 мл в каждую (удобно использовать конические стеклянные центрифужные пробирки с делениями). Элюирование проводят до тех пор, пока из колонки сначала не выйдет весь белок, а затем и соли.

Наличие белка в порциях элюата определяют биуретовым методом либо спектрофотометрически – по степени поглощения УФ-излучения раствором белка, благодаря присутствию ароматических аминокислот, имеющих максимум поглощения в области 280 нм. В последнем случае оптическую плотность каждой порции элюата измеряют в кварцевых кюветах толщиной 10,0 мм при двух длинах волн: 280 и 260 нм. Это необходимо для корректного вычисления концентрации белка, поскольку в элюате возможно присутствие нуклеиновых кислот, которые имеют сильное поглощение в области 260 нм. Для вычисления концентрации белка в порциях элюата используют формулу:

$$\text{Концентрация белка, мг/мл} = 1,45 \times E_{280} - 0,74 \times E_{260}$$

где:  $E_{280}$  и  $E_{260}$  – экстинкции элюата при соответствующих длинах волн.

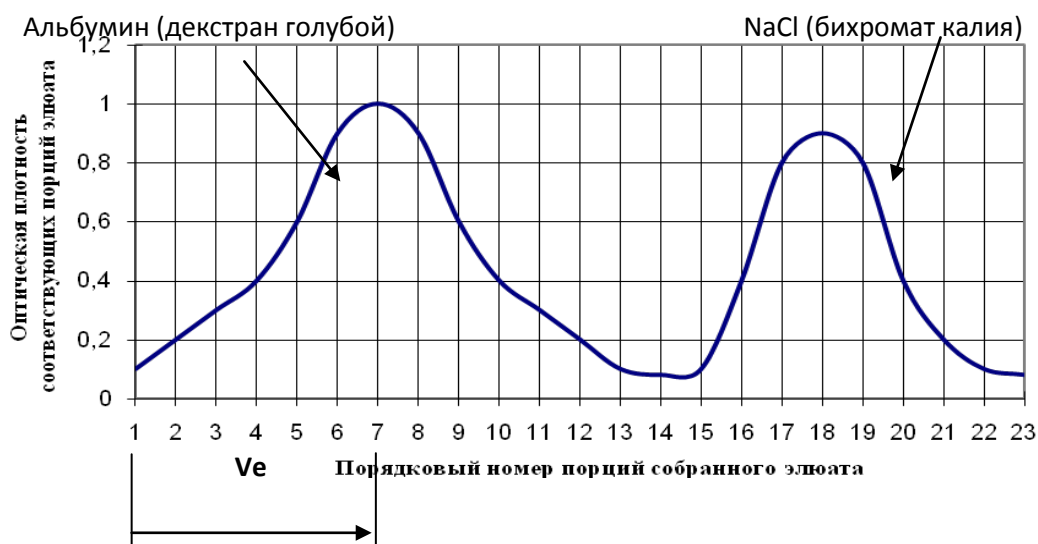
Появление в порциях элюата хлористого натрия (присутствие ионов  $Cl^-$ ) обнаруживают при помощи реакции с азотно-кислым серебром: проба мутнеет в результате образования нерастворимого в воде хлорида серебра.

Для наглядности протекания процесса обессоливания раствора высокомолекулярного соединения на сефадексе G-25 можно провести опыт с использованием голубого декстрана и окрашенную в желтый цвет соль: бихромат калия.

В пробирке смешивают 1 мл раствора декстрана и 1 мл раствора бихромата калия. На колонку вносят 0,5 мл смеси. Исходно смесь имеет зеленый цвет, но за время прохождения по колонке с сефадексом она разделяется на две фракции: голубого и желтого цветов. Обе фракции собирают в пробирки порциями элюата по 3 мл каждая.

С помощью ФЭК определяют моменты появления, нарастания и исчезновения окраски: сначала голубой, затем желтой. Поглощение растворов декстрана голубого измеряют при длине волны 650 нм; поглощение бихромата калия – при длине волны 400 нм. Толщина кюветы: 5–10 мм против дистиллированной воды.

Строят график, отражающий процесс обессоливания белкового раствора, используя измеренные величины оптической плотности (рис. 2):



$V_e$  - элюционный объем фракции альбумина (декстрана голубого).

**Рис. 2.** Последовательность выхода фракций альбумина (декстрана голубого) и соли (хлорид натрия/бихромата калия) в процессе обессоливания растворов белка/декстрана голубого

## Занятие 2

**Цель практического занятия:** ознакомить с колоночным вариантом метода ионообменной хроматографии, освоить операции по подбору условий для разделения смеси белков, построить элюционную кривую.



## Теоретическая часть

**Принцип метода:** хроматографическое разделение смесей белков на специальных ионообменных смолах (ионообменниках) основано на различных значениях изоэлектрических точек белков и на различиях в размерах белковых молекул.

Емкость ионообменников на основе целлюлозы определяется величиной внутреннего объема его частицы, доступного для белковых молекул. Благодаря этому, чем меньше молекула белка, тем больше его адсорбируется. Более крупные белки могут присоединиться только к поверхности частицы ионообменника, в связи с чем емкость для таких белков будет существенно меньше. Белки с М.м.  $> 10^6$  Д не задерживаются (исключаются) большинством целлюлозных ионообменников. Известно, что ионообменник, уже «насыщенный» крупными молекулами белка, все еще способен связывать молекулы белков малого размера, при условии, что поры частиц ионообменника стерически не блокированы крупными белковыми молекулами. Иными словами, имеет место довольно близкая аналогия с эффектом «молекулярного сита» при гель-фильтрации.

Существует два типа ионообменников: катионообменники и анионообменники. Карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) является одним из лучших катионообменников. КМ-целлюлоза – модифицированная целлюлоза, в которой группы  $-CH_2OH$  заменены на группы  $-CH_2OCH_2COO^-$ . В ее частицах сохраняется волокнистая структура и большинство функциональных групп расположены на поверхности волокон, благодаря чему они легко доступны для макромолекул. КМ-целлюлоза применяется для хроматографического фракционирования щелочных и нейтральных белков. Разделяемую смесь белков наносят на колонку в буферных растворах с низкой ионной силой. Элюирование проводят тем же буфером (имеющим ту же величину рН), но с большей ионной силой.

Одним из наиболее эффективных анионообменников является диэтиламиноэтил-целлюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза), которая используется для фракционирования кислых белков.

Отработанные ионообменные смолы можно использовать повторно, для чего их подвергают регенерации. Катионообменные смолы регенерируют, промывая колонку 1 н. раствором HCl. Затем колонку промывают водой до полного удаления регенерирующего вещества, после чего колонка готова к работе.

## **Лабораторная работа № 2**

### **Разделение смеси белков методом ионообменной хроматографии на карбоксиметилцеллюлозе**

#### **Реактивы:**

1. Ацетатный буфер 1,0 М (рН 5,6):

Раствор А: 136,09 г уксусно-кислого натрия (трехводного) растворить в 1,0 л дистиллированной воды;

Раствор Б: 57,0 мл ледяной уксусной кислоты довести до 1,0 л дистиллированной водой.

Буфер готовят путем смешивания 910,0 мл раствора А и 90,0 мл раствора Б.

2. Хлорид натрия – 1,0 М водный раствор.

3. Сахароза – 10% водный раствор.

4. Белковые препараты: альбумин – 1 % водный раствор

рибонуклеаза – 1% водный раствор.

5. 10 % раствор NaOH.

6. 1 % раствор CuSO<sub>4</sub>.

7. Порции ацетатного буфера с повышающейся ионной силой:

I порция: смешивают 5 мл ацетатного буфера и 1 мл 1 М хлорида натрия;

II порция: смешивают 5 мл ацетатного буфера и 2 мл 1 М хлорида натрия;

III порция: смешивают 5 мл ацетатного буфера и 5 мл 1 М хлорида натрия.

#### **Ход работы:**

1. Подготовка и заполнение колонки.

Колонку устанавливают строго вертикально, закрывают нижний кран, на дно колонки помещают капроновые нити или кусочек поролона. В колонку наливают дистиллированную воду, так, чтобы она заполнила колонку примерно на  $\frac{1}{4}$ . Через воронку или по стеклянной палочке в колонку заливают густую, тщательно взмученную взвесь КМ-целлюлозы, так, чтобы взвесь стекала по стенке и не увлекала в толщу смолы пузырьков воздуха. Взвеси КМ-целлюлозы дают осесть в течение несколько минут. Затем открывают кран и продолжают заполнение колонки взвесью, постепенно подливая следующие порции. Заполнив колонку до нужной высоты, закрывают нижний кран и дают взвеси осесть. Для того чтобы наполнитель колонки не подсыхал, над верхним слоем КМ-целлюлозы всегда должен сохраняться слой

буфера. При правильном заполнении колонки верхний слой наполнителя имеет гладкую горизонтальную поверхность. Над верхним слоем помещают кружок поролона или тонкий слой сефадекса G-25.

Заполненную колонку закрывают пробкой, в середине которой проходит стеклянная трубка, соединенная с резервуаром, содержащим элюирующий раствор (буфер). Через колонку пропускают ацетатный буфер до тех пор, пока не произойдет уравнивание: рН вносимого буфера должен сравняться с рН буфера, вытекающего из колонки.

Приготовление исследуемого образца (смеси белков): в пробирке смешивают 0,5 мл 1 % р-ра альбумина, 0,5 мл 1 % р-ра рибонуклеазы и 0,5 мл 10 % р-ра сахарозы. Сахароза применяется для увеличения плотности смеси.

## 2. Нанесение исследуемого материала на колонку.

Первый способ. Это простейший способ внесения образца: жидкость с поверхности сорбента удаляют, оставляя слой 1–2 мм. Пипеткой вносят образец и, открыв нижний кран, дают раствору впитаться (оставив слой в 1 мм). Остатки образца смывают небольшой порцией растворителя. После того как буферный раствор впитается поверхностью сорбента, добавляют новые порции буфера и соединяют колонку с резервуаром, содержащим элюирующий раствор (буфер).

Второй способ. При этом способе избыток растворителя не удаляется из колонки, но увеличивают плотности раствора образца: в него добавляют сахарозу до концентрации 0,5 М. Такой образец вводят под слой растворителя над поверхностью сорбента и образец быстро впитывается в верхний слой сорбента.

## 3. Процедура элюирования.

После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, устанавливая необходимую скорость протекания элюирующего раствора и начинают сбор фракций элюата в пробирки по 2,0–3,0 мл. Начинать сбор элюата следует с момента внесения образца на колонку.

Элюирование начинают с помощью ацетатного буфера. Объективным критерием для смены режима элюирования является выход из колонки первого белка. Им является альбумин. Выход альбумина будет выражаться в прохождении максимума концентрации белка в порциях элюата: обычно максимум приходится на 4–6 порций элюата. Как только наметилось явное снижение концентрации белка в последующих порциях элюата, следует изменить

режим элюирования. Для этого используют порции ацетатного буфера с повышающейся концентрацией хлорида натрия (порции I, II и III). Через колонку последовательно пропускают упомянутые порции буфера: I→II→III. Этот прием позволяет без изменения величины рН буфера увеличивать его ионную силу, что необходимо для вымывания из ионообменника второго белка смеси – рибонуклеазы.

Для оперативной оценки динамики концентрации белка в собираемых порциях элюата белок следует определять серийно: сразу в 5–6 порциях элюата. Можно использовать полуколичественный метод определения белка. Для этого в отдельных пробирках смешивают 0,5 мл исследуемого элюата, 1,0 мл р-ра NaOH и добавляют 2 капли р-ра CuSO<sub>4</sub>. Смеси дают постоять 15 мин. Оптическую плотность проб измеряют на фотометре при длине волны 540 нм против контроля, в котором элюат заменяют 0,5 мл дистиллированной воды.

### **Явления, обуславливающие разделение смеси альбумина и рибонуклеазы на ионообменнике из КМ-целлюлозы**

Перед нанесением смеси белков на колонку с КМ-целлюлозой ионообменник уравнивают ацетатным буфером (рН 5,6). Изоэлектрическая точка альбумина (рI) равна 4,6. Следовательно, при рН 5,6, которая обеспечивается ацетатным буфером, его молекула будет нести на своей поверхности сравнительно небольшой отрицательный электрический заряд. Электростатическое взаимодействие молекул альбумина с ионогенной группой КМЦ-целлюлозы будет выражаться во взаимном отталкивании одноименных зарядов. Иными словами, молекула альбумина не будет связываться с ионогенной группой, в результате чего альбумин будет двигаться вдоль колонки практически со скоростью движения элюата и выйдет из колонки первым. В то же самое время с ионогенными группами КМ-целлюлозы будут связываться положительно заряженные молекулы рибонуклеазы и удерживаться на них благодаря силам электростатического притяжения разноименных зарядов. рН рибонуклеазы составляет 7,8. Благодаря этому в буфере с рН 5,6 поверхность ее молекулы несет избыток положительных зарядов. Для вымывания рибонуклеазы из ионообменника используется следующий прием. В буфер, который используется для элюирования колонки, вносят повышающиеся концентрации соли (хлорида натрия), что увеличивает ионную силу буфера. Его рН при этом не меняется. Существенное повышение концентрации ионов натрия оказывается достаточным для того, чтобы на ионогенной группе произошла замена молекулы рибонуклеазы на положительно заряжен-

ный ион натрия, который присутствует в избытке по сравнению с рибонуклеазой. Освободившиеся молекулы рибонуклеазы покидают колонку, благодаря чему этот белок выходит из колонки во вторую очередь.

Результат лабораторной работы оформляют в виде графика зависимости концентрации разделяемых белков в порциях собранного элюата (рис. 3).



**Рис. 3.** График распределения альбумина и рибонуклеазы в порциях собранного элюата

Римскими цифрами обозначены порции раствора NaCl, вносимые для удаления из колонки рибонуклеазы.

Пунктирная линия отражает нарастание концентрации NaCl в колонке.

### Занятие 3

**Цель практического занятия:** познакомиться с методом высаливания белков. Выполнить фракционирование протеасом из ткани опухоли, определить химотрипсиноподобную активность 20S и 26S пулов протеасом по гидролизу флюорогенного субстрата.

#### Теоретическая часть

Метод осаждения белков хорошо растворимыми солями органических и минеральных кислот — высаливание — практикуют более 130 лет.

Принцип метода — среди молекул растворенных веществ существует определенная конкуренция за молекулы растворителя, которые необходимы для сольubilизации. Хорошо растворимыми веще-

ствами с высокой плотностью заряда и связанной с этим способностью к сольбулизации (гидратации, если растворитель – вода) являются соли. Белки имеют небольшую плотность заряда (огромная молекула, имеющая небольшой заряд, обусловленный способностью к ионизации только у 5 из более чем 20 аминокислотных остатков). При достижении определенной концентрации хорошо растворимая соль вытесняет из раствора белки, которые выпадают в осадок – преципитируют.

При плавном повышении концентрации соли первыми высаливаются хуже растворимые белки, как правило, высокомолекулярные (глобулины), затем – средние по размеру молекулы, затем – наилучшим образом растворимые низкомолекулярные белки (альбумины). Эффективность высаливания убывает в ряду Гофмейстера: цитрат > сульфат > фосфат > хлорид > нитрат. Сульфаты более удобны для высаливания белков из-за лучшей растворимости, низкой стоимости и стабилизирующего влияния на большинство белков при концентрации выше 0,5 М.

Факторы, влияющие на растворимость белков:

1. Ионная сила. Ионная сила – параметр раствора, характеризующий суммарную концентрацию и заряд всех входящих в его состав ионов. При высокой ионной силе ( $>0,2$ ). Ионная сила 1М  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4 = 3$  – это высокая ионная сила – растворимость белка понижается из-за обезвоживания, она падает экспоненциально с повышением ионной силы  $I$ .

$$\lg S = \beta - K_s I,$$

где  $S$  – растворимость белка, г/л;  $\beta$  и  $K_s$  – константы,  $I$  – ионная сила раствора.

2. рН и температура раствора. При высоких концентрациях сульфата аммония растворимость повышается при повышении рН, так как при низких рН сульфат-ион взаимодействует с положительно заряженными группами и «уплотняет» молекулу белка. Поэтому лучше проводить высаливание при  $\text{pH} < \text{pI}$ . Повышение температуры вызывает понижение  $\beta$  и, соответственно, уменьшение растворимости белка.

3. Начальная концентрация белка может влиять на растворимость, но это индивидуальная особенность белков.

Наиболее важную роль в деградации белков клетки играет протеасомная система, представляющая собой внутриклеточный ферментативный комплекс, отвечающий за специфический протеолиз белков. Протеасома обладает трипсиноподобной, химотрипсиноподобной, каспазной активностями. Выделяют 20S и 26S пулы протеасом. Пол-

ный протеолиз происходит в 26S протеасоме, однако каталитической активностью обладает также 20S пул. Узнавание белков-мишеней, подлежащих расщеплению, осуществляется компонентами, не принадлежащими протеолитическому комплексу, а именно убиквити-нами и белками, их переносчиками. 26S протеасомы осуществляют убиквитин- и АТФ-зависимый протеолиз благодаря наличию в их составе 19S субчастицы, способной распознавать убиквитинированные белки, расплетать и удерживать их, а также проталкивать в протеолитическую камеру. 20S протеасомы гидролизуют белки, главным образом, с поврежденной третичной структурой независимо от убиквити-на.

Протеасомы играют важную роль в поддержании функциональной активности клеток, в частности в регуляции работы сигнальных систем, которые активируются при взаимодействии ростовых факторов с соответствующими рецепторами. Нарушение в функционировании протеасомного комплекса связано со многими патологиями и имеет большое значение в развитии онкологических заболеваний.

**Фракционирование протеасом** растворами сульфата аммония – наиболее распространенный подход к изоляции 20S и 26S пулов протеасом. Корректность фракционирования обычно подтверждается методом Вестерн блоттинг.

**Активность многих ферментов** определяют по гидролизу соответствующих флюорогенных субстратов, которые достаточно специфичны. Принцип действия флуориметра основан на оптическом явлении флуоресценции – свечении вещества в момент воздействия возбуждающим светом. Поток излучения источника проходит через диафрагмы, кварцевый конденсор, первичный светофильтр и попадает в кювету с измеряемым раствором. Под воздействием возбуждающего излучения раствор флуоресцирует, причём интенсивность флуоресценции зависит от концентрации исследуемого вещества. Поток излучения флуоресценции через диафрагму и вторичный светофильтр попадает на фотоэлемент.

Фотоэлемент преобразует энергию флуоресценции в электрический сигнал, поступающий на вход усилителя. Сигнал с выхода усилителя подается на аналого-цифровой преобразователь (АЦП). С выхода АЦП результат измерения поступает на цифровое табло, показывающее результат измерений в процентах. Результат измерений представляет собой отношение интенсивностей флуоресценции измеряемого раствора и градуировочного раствора. Существуют кювет-

ные (А) и планшетные (Б) варианты флюориметров (рис.4).



Рис. 4. Флюориметры

**Студент должен знать:**

1. Принцип метода высаливания белков из сложных смесей.
2. Основные факторы, влияющие на высаливание белков.
3. Эффективность высаливания в ряду Гофмейстера.
4. Принцип работы флюориметра.

**Студент должен уметь:**

1. Приготовить осветленный гомогенат ткани.
2. Правильно определить соотношение гомогената и требуемое количество сульфата аммония для высаливания белковых фракций.
3. Правильно составить реакционную смесь для определения активности пулов протеасом, произвести измерение белка в выделенных белковых фракциях.
4. Уметь работать на флюориметре, рассчитать ХТПА пулов протеасом.

**Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. Назовите принцип метода высаливания и основные факторы, влияющие на высаливание белков из сложных смесей.
2. Назовите соли, использующиеся для высаливания белков?



3. Состав и пулы протеасом, варианты протеолитической активности протеасом.

### Лабораторная работа № 3

#### Высаливание белков и белковых фракций. Фракционирование протеасом, определение химотрипсиноподобной активности 20S и 26S пулов протеасом

##### Реактивы:

*Буфер А.* 30 mM Tris-HCl-буфер (pH=7,5). 1,42 г Tris растворить в 300 мл воды, оттитровать до нужного (pH=7,5) соляной кислотой и внести следующие добавки:

- 1,75 г NaCl
- 111 мг ЭДТА
- 45 мг дитиотрейтола
- 30 мл глицерина
- 305 мг хлорида магния

*Буфер В.* 20 mM Tris-HCl-буфер (pH=7,5). 242 мг Tris растворить в 100 мл воды, оттитровать до нужного (pH=7,5) соляной кислотой и внести следующие добавки:

- 37 мг ЭДТА
- 15,3 мг дитиотрейтола
- 20 мл глицерина
- 102 мг хлорида магния

АТФ добавить Extemporo по 10 мкл разведенного АТФ на 250 мкл буф В.

##### Реакционная смесь на ХТПА 26S протеасом:

20 mM Tris-HCl-буфер (pH=7,5). 242 мг Tris растворить в 100 мл воды, оттитровать до нужного (pH=7,5) соляной кислотой и добавить:

- 15,3 мг дитиотрейтола
- 102 мг хлорида магния
- Субстрат (Suc-LLVY-AMC) ex tempore
- Ингибитор MG132 ex tempore
- АТФ – ex temporo

**Реакционная смесь на ХТПА 20S протеасом не содержит хлорида магния и АТФ.**

##### Реактивы для определения белка по Лоури:

*Реактив 1:* приготовить раствор 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на 0,1 N NaOH; приготовить 1 % водный раствор  $\text{CuSO}_4$  и 2 % водный раствор тартата.

Ех temporo на 6 проб смешать 25 мкл 1 % водного раствора  $\text{CuSO}_4$  с 25 мкл 2 % водного раствора тартата и 2,5 мл раствора 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на 0,1 N NaOH.

*Реактив 2:* коммерческий реактив Фолина развести пополам дистиллированной водой исходя из расчета 33 мкл р-ва на пробу.

### **Оборудование:**

1. рН-Метр с магнитной мешалкой для приготовления буферных растворов.
2. Флюориметр «Hitachi-850» либо кюветный флюориметр другой модели.
3. Фарфоровые ступки и жидкий азот для гомогенизации тканей.
4. Высокоскоростная центрифуга с функцией охлаждения.

### **Ход работы:**

**Если не указано иначе, все этапы работы проводят при 4 °С.**

*Этап 1.* Приготовление осветленных гомогенатов ткани опухоли. Фракционирование протеасом.

Навеску ткани около 100 мг измельчить на холоде, добавить жидкий азот, перетереть в ступке до порошкообразного состояния и ресуспендировать в 600 мл буфера А (соотношение ткань: буфер равно 1:6).

Гомогенат центрифугировать 30 минут при 13600 об/мин. В это время сделать навески соли для высаливания: для 26S фракции – 0,145 г, для 20S – 0,063 г (для определения массы навесок соли для другого объема гомогената использовать дидактические материалы к лабораторной работе № 3).

**Высаливание 26S пула протеасом**, добавляется соль до полного растворения соли (для улучшения растворения можно использовать различные виды мешалок), ц/ф – 20 мин при 4 °С, 12500 об/мин, в осадке получается 26S фракция. Надосадок слить для высаливания 20S фракции, а осадок ресуспендировать в 150 мкл буфера В. Из гомогената отлить 35 мкл на белок, провести определение белка по Lowry.

**Высаливание 20S**, весь надосадок перелить в эппендорфы, добавить соль в течение 20 мин до полного растворения соли, ц/ф – 20 мин. При 4 °С, 12500 об/мин, в осадке получается 20S фракция. Надосадок выбросить, а осадок ресуспендировать в 150 мкл буфера В. Из гомогената отлить 35 мкл на белок, провести определение белка по Lowry.

*Этап 2.* Содержание белка в гомогенатах и сыворотках опреде-

лялось по методу Лоури. К 70 мкл гомогената добавляли 33 мкл реактива 2, 330 мкл реактива 1 и 400 мкл H<sub>2</sub>O. Через 30 минут измеряли концентрацию белка на спектрофотометре на красном светофильтре ( $\lambda=750$  нм) в кювете толщиной 10 мм. Для расчета белка использовали данные калибровочной кривой.

**Этап 3.** Постановка реакции для определения ХТПА пулов протеасом.

Приготовить 2 ряда пробирок, умножив количество проб на 2, пробирки подписать. Прилить по 5 мкл каждой фракции протеасом в оба ряда. Для приготовления реакционной смеси на 26S протеасомы взять 2 мл готовой реакционной смеси, добавить 20 мкл предварительно размороженного флюорогенного субстрата и 40 мкл АТФ. Реакционную смесь разлить в первый ряд по 500 мкл на пробу. Затем к остатку добавить 10 мкл ингибитора протеасом MG132 и разлить по 500 мкл во второй ряд. Для PC на 20S протеасомы – аналогично, но АТФ добавлять не нужно. Пробы перемешать и поставить на инкубацию 20 минут 37 °С. В это время нужно включить и прогреть флюориметр. Остановить реакцию добавлением во все пробирки SDS-Na.

Измерить флуоресценцию в пробах с субстратом и ингибитором  $\lambda_1=380$  (длина волны возбуждения),  $\lambda_2=440$  (длина волны испускания).

**Этап 4.** Расчет удельной ХТП активности 20S и 26S пулов протеасом по формуле:

$$A=(D_s-D_I)\times 10^6/600\times [C], \text{ где}$$

A – удельная активность протеасом, у.е.

$D_s-D_I$  – разница между флуоресценцией пробы с субстратом и пробы с субстратом и ингибитором

C – концентрация белка в пробе, г/л.

## ТЕМА 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ *in situ* ГИБРИДИЗАЦИИ

### Занятие 1

**Цель практического занятия:** ознакомить с методом *in situ* гибридизации, освоить оценку наличия амплификации гена методом FISH.

#### Теоретическая часть

Гибридизация *in situ* – это молекулярный метод, позволяющий обнаружить любые генетические нарушения в клетке. В основе лежит реакция между искусственно созданным меченым ДНК или РНК-зондом и комплементарной ему нуклеотидной последовательностью исследуемой нуклеиновой кислоты. В случае если интересующей мишенью является ДНК, то в начале проводится денатурация цепи. После денатурации ДНК-зонд гибридизуется с комплементарной ему нуклеотидной последовательностью и может быть обнаружен при помощи детектирующей системы. Обнаружение РНК в клетке позволяет оценить активность генов либо выявить чужеродную нуклеиновую кислоту, например вируса.

В зависимости от метки, которая присоединена к зонду, и способа детекции выделяют флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) и хромогенную (CISH), в которой в качестве метки использует фермент, который впоследствии, расщепляя хромоген, дает окраску.

Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) был создан для определения конкретных последовательностей ДНК непосредственно на цитологических и гистологических препаратах. Данный метод позволил перейти от изучения морфологии хромосом к анализу последовательностей ДНК, входящих в их состав.

ДНК-зонд – это главный элемент при постановке FISH, так как определение хромосомной аномалии возможно только при наличии соответствующего зонда. Впервые *in situ* гибридизация с радиоактивным зондом, меченым изотопом  $^{32}\text{P}$ , была описана в 1969 году. Впоследствии были разработаны нерадиоактивные флуоресцентные метки, что сделало метод *in situ* гибридизации безопасным, простым в исполнении и менее трудоемким при обработке результатов. Развитие технологий цифровой записи и архивирования микроскопических изображений, а также компьютерных систем для их анализа позволило создать принципиально новые подходы к решению задач по ви-

зуализации и идентификации хромосомного материала. В настоящее время можно выделить следующие основные подходы, которые широко используются в современной молекулярной цитогенетике:

1. Идентификация материала протяженных хромосомных районов и целых хромосом.

2. Детекция конкретной последовательности ДНК в определенном районе хромосомы.

3. Анализ нарушения баланса отдельных хромосомных районов.

Современный ДНК-зонд представляет собой нуклеотидную последовательность ограниченного размера, которая комплементарна определенному участку ядерной ДНК исследуемого цитогенетического препарата. Зонд несет «метку», то есть содержит нуклеотиды, связанные с флуорофором (молекула, способная к флуоресценции). В последнее время большое распространение получили зонды, меченные напрямую, в которых молекула флуорофора присоединяется при помощи ковалентной связи *непосредственно* к нуклеотидам зонда. Как правило, к каждому зонду присоединяют сразу несколько молекул флуорофора, чтобы, в конечном счете, получить качественную флуоресценцию.

Существует три типа ДНК-зондов, принципиально отличающихся друг от друга.

**Хромосом-специфичные (центромерные) зонды** – CEP (Chromosome Enumeration Probe) – предназначены для идентификации центромерных регионов хромосом и выявления количественных нарушений кариотипа (анеуплоидии) как в интерфазе, так и в метафазе. Они содержат относительно короткие нуклеотидные последовательности, комплементарные многочисленным хромосом-специфическим  $\alpha$ -сателлитным ДНК-повторам, локализованным в центромерном участке хромосом. Существуют пан-центромерные зонды, которые позволяют выявить одновременно центромерные регионы всех хромосом. Такие зонды используются для детекции анеуплоидии, полиплоидии, дицентрических хромосом и других комплексных аберраций. Можно также использовать и индивидуальные центромерные зонды к определенным хромосомам, если исследуемая патология связана с количественными нарушениями этих хромосом (моносомии, трисомии, нулисомии).

**Ген-специфические зонды** – LSI (Locus Specific Identifiers) – гибридизуются с уникальными (неповторяющимися) последовательностями ДНК. Они предназначены для выявления диагностически и

прогностически значимых хромосомных aberrаций при различных патологических состояниях.

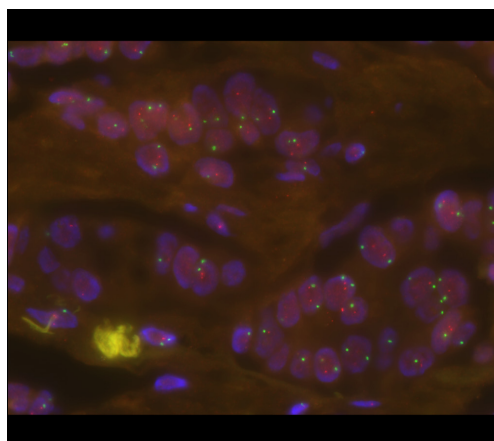
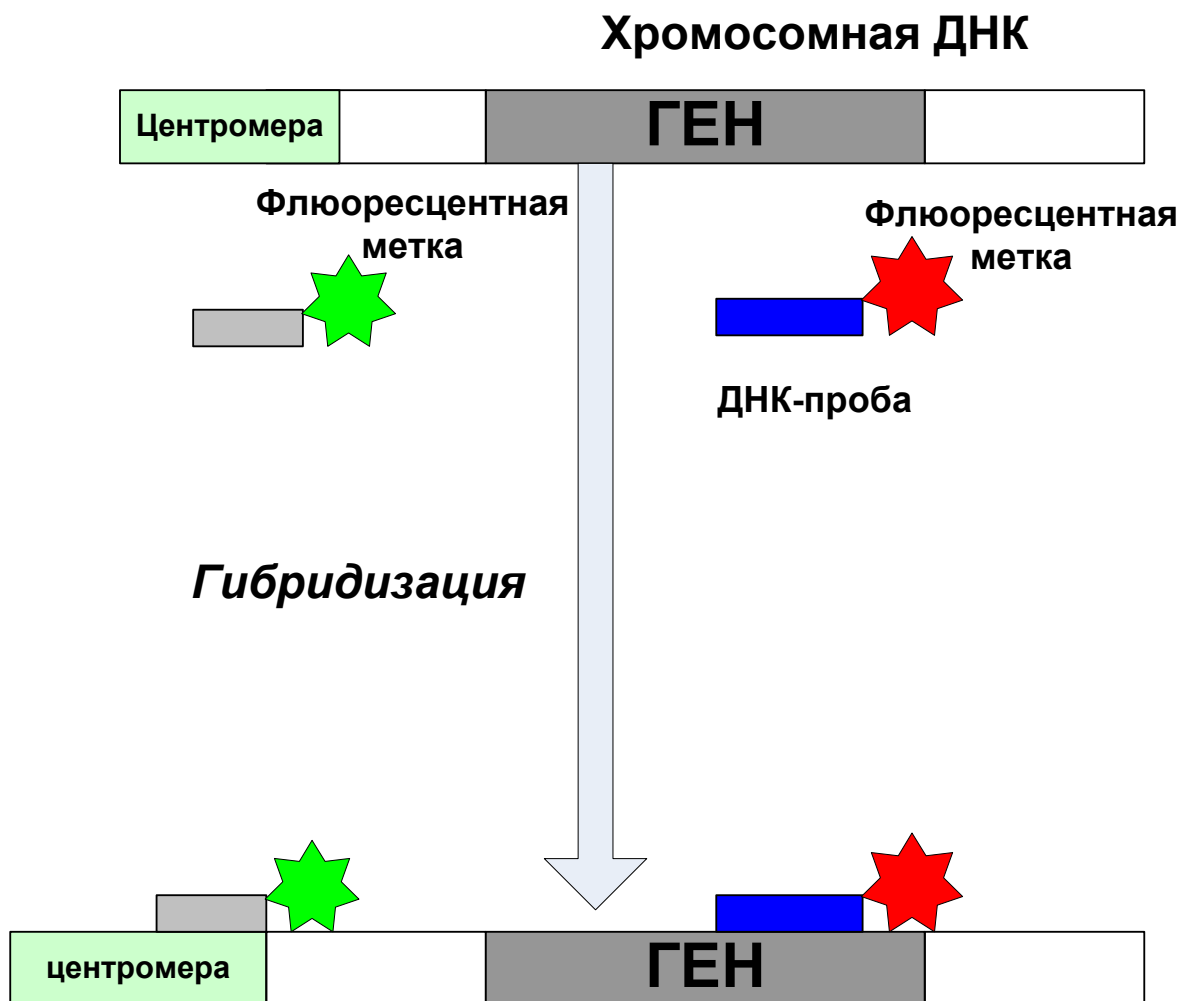
**ДНК-зонды к теломерным участкам хромосом** – TEL (Telomeric Probe) – предназначены для выявления делеций и перестроек, затрагивающих концевые участки плеч хромосом. Такие зонды специфичны для р- или q-плеч хромосом (р – короткое плечо, q – длинное) и комплементарны участку длиной около 300 тысяч нуклеотидных пар от конца хромосомы. Как правило, ДНК-зонды для коротких и длинных плеч хромосом связаны с разными флуорофорами, что позволяет выявлять на одном препарате оба теломерных участка хромосомы. Чтобы облегчить дифференциальную диагностику делеций и моносомий, предлагают использовать еще и ДНК-зонд к центромерному участку исследуемой хромосомы (СЕР), связанный с флуорофором, отличным от флуорофоров теломерных ДНК-зондов.

Особенностью FISH-метода, принципиально отличающей его от классического цитогенетического анализа, является то, что данный метод применим как для метафазных, так и для интерфазных ядер. На основе интерфазного FISH-анализа происходит интеграция молекулярной цитогенетики с другими методами диагностики. В качестве исходного материала для этого исследования можно использовать не только цитогенетические препараты, но и стандартно окрашенные мазки крови, костного мозга или отпечатки лимфоузлов, а также архивный гистологический материал, хранящийся в виде парафиновых блоков. Комбинация FISH с морфологическими методами исследования позволяет напрямую сравнивать цитогенетические и морфологические особенности клеток.

### **Принцип FISH-метода**

В основе FISH-метода лежит реакция гибридизации между искусственно созданным ДНК-зондом и комплементарной ему нуклеотидной последовательностью ядерной ДНК. Молекула ДНК представляет собой две спирально соединенные нуклеотидные цепи, а гибридизация возможна только в том случае, если цепи разойдутся. Чтобы разъединить нуклеотидные цепи ДНК, прибегают к денатурации (для последующей гибридизации денатурированной должна быть как ДНК в ядрах исследуемого образца, так и сам ДНК-зонд). После денатурации ДНК-зонд гибридизуется с комплементарной ему нуклеотидной последовательностью и может быть обнаружен при помощи флуоресцентного микроскопа.

На рисунке 5 представлен пример двухцветного FISH-метода.



**Рис. 5.** Принцип FISH-реакции

Таким образом, общий вид протокола для постановки FISH можно представить в следующем виде:

#### 1. Подготовка гистологического или цитологического препарата.

Подготовка гистологического препарата осуществляется по стандартной схеме: вырезка, маркировка, проводка, заливка, микротомия, помещение среза на предметное стекло и депарафинизация. При подготовке цитологического препарата используются специальные осаждающие растворы и центрифугирование, что позволяет получить концентрированную суспензию клеток.

#### 2. Предварительная обработка (если необходимо).

Препарат обрабатывается протеазами, чтобы исключить присутствие белков, которые затрудняют гибридизацию.

#### 3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация.

Для того чтобы денатурировать зонд и ДНК образца, их обрабатывают формамидом и нагревают до температуры около 85–90 °С.

#### 4. Гибридизация.

После денатурации препарат охлаждают до определенной температуры (37 °С в случае клинических исследований) и инкубируют во влажной камере в течение нескольких часов (продолжительность инкубации указана в каждом конкретном протоколе). В настоящее время для денатурации и гибридизации используют автоматические гибридайзеры.

#### 5. Промывка.

После того как гибридизация завершена, необходимо отмыть не связавшиеся зонды, которые, в противном случае, создадут фон, затрудняющий оценку результатов FISH-анализа. Для промывки обычно используют раствор, содержащий цитрат и хлорид натрия (SSC).

#### 6. Контрокрашивание.

При помощи флуоресцентных красителей (DAPI – 4,6-диамидин-2-фенилиндол; йодид пропидия) проводится окраска всей ядерной ДНК.

#### 7. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа.

### **Преимущества FISH-метода**

В качестве основных преимуществ FISH можно выделить следующие:

1. Возможность исследования генетического материала в интерфазных ядрах.

2. Получение объективных результатов по принципу «да/нет» – это количественный метод.

3. Относительно простая интерпретация результатов.

4. Высокая разрешающая способность.



## **Недостатки FISH-метода**

Как и любой другой метод, FISH имеет определенные недостатки:

1. Флуоресцентные красители быстро «выцветают».
2. Для анализа результатов необходим высококачественный флуоресцентный микроскоп.

### **Студент должен знать:**

1. Принцип метода *in situ* гибридизации.
2. Основные особенности FISH- и CISH-методов.
3. Типы ДНК-зондов, применяемые в FISH.
4. Преимущества и недостатки FISH-метода.
5. Общий вид протокола для постановки FISH.
6. Основные правила оценки количества сигналов двух цветов при визуализации FISH.

### **Студент должен уметь:**

1. Правильно выполнить предварительную обработку препарата перед гибридизацией.
2. Правильно нанести ДНК-зонд на препарат.
3. Правильно поместить пробы в аппарат для гибридизации.
4. Правильно выставить необходимые температуры и время на аппарате для денатурации и гибридизации.
5. Правильно приготовить послегибридизационный промывочный буфер.
6. Правильно произвести подготовку препарата для его оценки на флуоресцентном микроскопе.

### **Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. Назовите принцип метода FISH.
2. Каковы отличительные особенности метода CISH от FISH?
3. Назовите преимущества и недостатки метода CISH.
4. Назовите преимущества и недостатки метода FISH.
5. Какие зонды лучше использовать для выявления наличия полисомии в клетке?
6. Какие зонды используются для выявления амплификации генов?
7. Назовите флуоресцентные красители для окраски ядерной ДНК.
8. При помощи какого флуоресцентного красителя проводится окраска всей ядерной ДНК, если используется LSI-зонд с синей меткой?
9. Какие внешние факторы могут повлиять на процесс гибридизации?
10. Назовите области применения FISH.

## **Лабораторная работа № 4**

### **Определение наличия амплификации гена Her2/neu в опухолевых клетках методом fish**

#### **Реактивы:**

1. ДНК-зонды LSI HER-2/neuSpectrumOrange (вектор E. coli с небольшим количеством копий) / CEP 17 SpectrumGreen (плазмида E. coli).
2. DAPI (4,6-диамидин-2-фенилиндол) краситель.
3. NP-40.
4. Соли 20X SSC.
5. Раствор для предварительной обработки (NaSCN). Количество: 5x50 мл.
6. Протеаза (пепсин (2500-3000 ед/мг)). Количество: 5x25 мг.
7. Буфер для протеазы (раствор NaCl, pH 2). Количество: 5x50 мл.
8. Промывочный буфер (2X SSC, pH 7). Количество: 2x250 мл.
9. Дистиллированная или деионизованная вода.
10. Этанол, 96 %.
11. Ксилол или его заменители.
12. Иммерсионное масло для флуоресцентного микроскопа. Хранить при комнатной температуре.

#### **Оборудование:**

Пипетки переменного объема  
Фильтровальная бумага  
Термометр (37–100 °С)  
Покровные стекла (22x22 м)  
Пинцет  
Вытяжной шкаф  
Гибридайзер  
Стекла с адгезивным покрытием (полизиновые или SuperFrostPlus)  
Влажная камера  
Таймер (возможность отсчета в интервале 2–15 минут)  
Водяная баня с крышкой (от 65 (±2) °С до 99(±2) °С)  
Термостойкие контейнеры и штативы  
Флуоресцентный микроскоп

#### **Ход работы:**

##### **1. Подготовка рабочих реагентов**

20X SSC (3M хлорид натрия, 0,3M цитрат натрия, pH 5,3)

Для приготовления 20X SSC pH 5,3 смешайте:

66 г            20X SSC  
200 мл        очищенной воды  
Итоговый объем 250 мл.

Тщательно перемешайте. С помощью pH-метра измерьте pH при комнатной температуре. Доведите pH до 5,3 с помощью концентрированной HCl. Доведите общий объем до 250 мл с помощью очищенной воды. Профильтруйте через фильтр с порами размером 0,45 мкм. Хранить при комнатной температуре до 6 месяцев.

Раствор для денатурации (70 %-ный формамид / 2X SSC, pH 7,0–8,0)

Для приготовления раствора для денатурации смешайте:

49 мл            формамида  
7 мл             20X SSC, pH 5,3  
14 мл            очищенной воды  
Итоговый объем 70 мл.

Тщательно перемешайте. С помощью pH-метра со стеклянным электродом измерьте pH при комнатной температуре, чтобы убедиться, что она в пределах 7,0–8,0. Раствор можно использовать в течение 1 недели. Проверяйте pH перед каждым использованием. Хранить при температуре при 2–8 °C в плотно закрытом контейнере.

Буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3% NP-40)

Смешайте:

100 мл        20X SSC, pH 5,3  
847 мл        очищенной воды  
3 мл            NP-40

Итоговый объем 1000 мл.

Тщательно перемешайте. С помощью pH-метра измерьте pH при комнатной температуре. Доведите pH до 7,0–7,5 с помощью 1N NaOH. Доведите общий объем до 1 л с помощью очищенной воды. Профильтруйте через фильтр с порами размером 0,45 мкм.

## **2. Подготовка препаратов из фиксированных в формалине, залитых парафином тканей**

Для подготовки препаратов из фиксированных в формалине, залитых парафином тканей можно применять следующую методику:

1. С помощью микротомы приготовьте парафиновые срезы ткани толщиной 4–6 мкм.
2. Поместите срезы в водяную баню, не содержащую белков, с температурой 40 °C.
3. Поместите срез на ту сторону предметного стекла, которая по-

крыта органосиланом.

4. Просушите стекла на воздухе.
5. Оставьте стекла на ночь при температуре 56 °С.

### **3. Предварительная обработка предметных стекол**

- Погрузите стекла в 0,2N HCl на 20 минут.
- Погрузите стекла в очищенную воду на 3 минуты.
- Погрузите стекла в промывочный буфер на 3 минуты.
- Погрузите стекла в раствор для предварительной обработки на 30 минут при 80 °С.
- Погрузите стекла в очищенную воду на 1 минуту.
- Погрузите стекла в промывочный буфер на 5 минут. Повторите.

### **4. Обработка протеазой**

- Удалите избыток буфера, промокнув края стекол о бумажное полотенце.
- Погрузите стекла в раствор протеазы на 10 минут при 37 °С.
- Погрузите стекла в промывочный буфер на 5 минут. Повторите.
- Высушите стекла на нагревателе для стекол в течение 2–5 минут при 45–50°С.

### **5. Фиксация образцов**

- Погрузите стекла в нейтральный раствор формалина в буфере комнатной температуры на 10 минут.
- Погрузите стекла в промывочный буфер на 5 минут. Повторите.
- Высушите стекла на нагревателе для стекол в течение 2–5 минут при 45–50°С.

### **6. Денатурация ДНК в образце**

Подготовка растворов зондов должна быть согласована по времени с денатурацией ДНК в образцах так, чтобы все было подготовлено для этапа гибридизации в одно и то же время.

1. Заранее подогрейте до 37 °С увлажненную камеру для гибридизации (воздухонепроницаемый контейнер с кусочком влажной промокательной бумаги или бумажного полотенца размером примерно 1 x 3 дюйма, прикрепленным к стенке контейнера), поместив ее перед подготовкой препаратов в инкубатор с температурой 37 °С. Смачивайте промокательную бумагу или бумажное полотенце водой перед каждым использованием камеры для гибридизации.

2. Перед использованием раствора для денатурации убедитесь, что его рН составляет 7,0–8,0 при комнатной температуре. Налейте раствор для денатурации в емкость Коплина и поместите на водяную баню с температурой  $72\pm 1$  °С по крайней мере на 30 минут или пока раствор не нагреется до  $72\pm 1$  °С. Проверьте температуру раствора перед использованием.
3. Отметьте области гибридизации с помощью алмазного резца.
4. Проведите денатурацию ДНК в образце, погрузив подготовленные стекла в раствор для денатурации с температурой  $72\pm 1$  °С ( $\leq 6$  стекол на 1 емкость Коплина) на 5 минут. Не проводите денатурацию более 6 препаратов в одной емкости Коплина одновременно. С помощью пинцета извлеките стекла из раствора для денатурации и сразу погрузите их в промывочный раствор 70 %-ного этанола комнатной температуры. Поболтайте стекло для удаления формамида. Оставьте стекла в этаноле на 1 минуту.
5. Извлеките стекла из 70 %-ного этанола. Повторите этап 5 с 85 %-ным этанолом, а затем – 100 %-ным этанолом.
6. Удалите со стекла избыток этанола, приложив его нижний край к промокательной бумаге, и вытрите обратную сторону стекла лабораторной салфеткой.
7. Просушите стекла на нагревателе для стекол в течение 2–5 минут при 45–50 °С.

## **7. Подготовка зондов**

1. Дайте раствору зондов прогреться до комнатной температуры, пока его вязкость не уменьшится достаточно для точного пипетирования.
2. Перемешайте на вортексе. Отцентрифугируйте каждую пробирку в течение 2–3 с с помощью настольной микроцентрифуги, чтобы содержимое пробирки стекло на дно пробирки. Снова аккуратно перемешайте на вортексе.

## **8. Гибридизация**

1. Нанесите 10 мкл смеси зондов на отмеченную область-мишень стекла. Сразу накройте эту область покровным стеклом размером 22 x 22 мм и дайте смеси равномерно распределиться под покровным стеклом. Пузырьки воздуха мешают гибридизации, поэтому не допускайте их образования. Оставшийся раствор зондов следует заморозить сразу после использования.
2. Закрепите покровное стекло резиновым герметиком следующим

образом. Наберите герметик в шприц на 5 мл. Выдавите его небольшое количество по краям покровного стекла, захватывая и покровное, и предметное стекла, формируя таким образом изолирующий слой вокруг покровного стекла.

3. Поместите стекла в предварительно нагретую увлажненную камеру для гибридизации. Плотнo закройте камеру крышкой и инкубируйте при 37 °С в течение ночи (14–18 часов).

## **9. Промывка после гибридизации**

1. Налейте буфер для промывки после гибридизации (2X SSC/0,3 % NP-40) в емкость Коплина. Подогрейте буфер, поместив емкость Коплина на водяную баню с температурой 72±1 °С по крайней мере на 30 минут или пока раствор не нагреется до 72±1 °С. Налейте буфер для промывки после гибридизации во вторую емкость Коплина и оставьте при комнатной температуре. Оба промывочных раствора можно использовать в течение 1 суток.
2. Удалите герметик с первого стекла, аккуратно потянув его пинцетом.
3. Погрузите стекла в буфер для промывки после гибридизации комнатной температуры до удаления с них покровных стекол.
4. После этого удалите избыток жидкости, промокнув край стекол, и погрузите их в буфер для промывки после гибридизации с температурой 72±1 °С на 2 минуты (≤6 стекол на 1 емкость).
5. Извлеките каждое стекло из промывочной бани и высушите их на воздухе в темноте в вертикальном положении. (Подойдет закрытый ящик или полка внутри закрытого шкафа.)
6. Нанесите 10 мкл красителя DAPI на отмеченную область стекла и накройте покровным стеклом. До проведения подсчета храните препараты в темном месте.

## **10. Оценка приемлемости препарата**

Приемлемость препарата оценивается по следующим критериям:

- Интенсивность сигнала зонда: сигнал должен быть ярким, четким и легко оцениваемым. Сигналы должны быть в форме либо яркого овала с четкими границами, либо вытянутого овала с расплывчатыми границами.
- Фон: фон должен быть темным или черным и относительно свободным от флуоресцирующих частиц или помутнений.

## 11. Подсчет сигналов

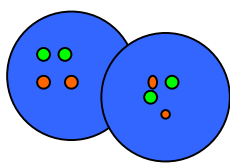
Осмотрите несколько участков опухолевых клеток с помощью объектива 40X для оценки возможной гетерогенности. Выберите участок с отдельным расположением ядер; по возможности избегайте мест со слабым гибридационным сигналом. Используя объективы 63X или 100X, начните анализ с верхнего левого квадранта выбранного участка и, просматривая клетки слева направо, подсчитайте количество сигналов, находящихся внутри границ ядер в каждой доступной интерфазной клетке, в соответствии с рекомендациями, описанными ниже.

- Меняйте фокус для обнаружения всех сигналов, присутствующих в ядре.
- Два сигнала одинакового размера, находящиеся друг от друга на расстоянии, равном или меньшем их диаметру, считаются как один сигнал.
- Не учитывайте ядра, сигналы в которых отсутствуют, или с сигналами только одного цвета. Учитывайте только ядра с одним или более FISH-сигналом каждого цвета.
- Внесите полученное количество сигналов в таблицу, подобную приведенной ниже.

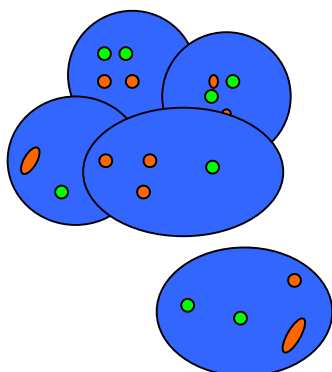
Продолжайте эту процедуру, пока не проанализируете 60 ядер.

HER-2	CEP 17											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10+	Всего
0												
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11-15												
16-20												
21+												
Всего												

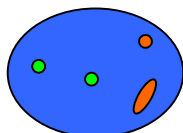
## Руководство к оценке количества сигналов двух цветов



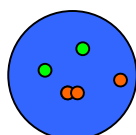
Ядра накладываются друг на друга, границы обоих ядер не видны полностью, однако сигналы находятся в тех регионах ядер, которые не накладываются друг на друга. Считается как два оранжевых и два зеленых сигнала в каждом ядре.



Не подсчитывается. Ядра накладываются друг на друга, границы ядер не видны полностью и некоторые сигналы находятся в тех регионах ядер, которые накладываются друг на друга.



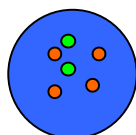
Считается как два оранжевых сигнала и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал расплывчатый.



Считается как два оранжевых и два зеленых сигнала. Один оранжевый сигнал раздвоенный.



Считается как два оранжевых сигнала и один зеленый сигнал



Считается как четыре оранжевых сигнала и два зеленых сигнала.

- Зеленый зонд, CEP 17
- Оранжевый зонд, LSI HER-2/*neu*

Подсчитайте соотношение HER2/CEN17 (общее количество красных сигналов/общее количество зеленых сигналов).

В образцах, где данное соотношение больше или равно 2, наблюдается амплификация.

В случае результатов подсчета, находящихся в «пограничной» области (1,8–2,2), следует подсчитать сигналы еще в 20 ядрах.



# ТЕМА 3. МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОТОК – ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ РНК И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

## Занятие 1

**Цель практического занятия:** получить представление о препаративном центрифугировании, получить препарат экзосом из плазмы крови или других биологических жидкостей, получить навыки работы на высокоскоростных охлаждаемых центрифугах и ультрацентрифуге, научиться работать с номограммой Доула и Котцина для расчета центробежного ускорения.

### Теоретическая часть

Экзосомы представляют собой микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 40–100 нанометров, секретлируемые различными клетками, основной функцией которых является передача межклеточных сигналов. Кроме этой важной функции полагают, что экзосомы участвуют в горизонтальном переносе РНК и белков, оказывают иммуномодулирующее действие, участвуют в презентации антигенов и неклассической секреции белков, транспорте лекарств, в патогенезе болезней, связанных с расстройствами метаболизма, в прогрессии злокачественных опухолей.

Основными методами выделения экзосом являются различные варианты ультрацентрифугирования (в сочетании с дифференциальным центрифугированием, ультрафильтрацией, ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы).

Разделение веществ с помощью центрифугирования (ц/ф) основано на разном поведении частиц в центробежном поле. Суспензию частиц, помещённую в пробирку, загружают в ротор, установленный на валу привода центрифуги. В центробежном поле частицы, имеющие разную плотность, форму и размеры, осаждаются с разной скоростью. Скорость седиментации зависит от центробежного ускорения ( $G$ ), прямо пропорционального угловой скорости ротора ( $\omega$ , в рад\*с<sup>-1</sup>) и расстоянию между осью вращения и частицей ( $r$ , в см):

$$G = \omega^2 r$$

Центробежное ускорение обычно выражается в единицах  $g$ . Для определения значения  $G$  пользуются номограммой Доула и Котцина и соединяют прямой линией значения радиуса и скорости вращения в об/мин на крайних точках (рис. 6). Точка пересечения этой прямой со

средней шкалой дает искомую величину центробежного ускорения  $G$ . Необходимо учесть, что левая сторона шкалы  $G$  соответствует левой стороне шкалы «об/мин», правая – правой. С помощью данной номограммы возможно решение и обратной задачи: с целью создания определенного числа  $G$  рассчитать число об/мин для ротора известного радиуса.

Выделяют **препаративное и аналитическое центрифугирование**. Препаративное ц/ф – ц/ф с целью получения препарата (препарата) определенной, достаточно чистой субклеточной или внеклеточной фракции, например, препарата ядер, митохондрий, экзосом. Цели аналитического ц/ф – определение молекулярных весов, оценка чистоты препаратов, исследование конформационных изменений в макромолекулах.

Принципиально выделяют **дифференциальное центрифугирование и центрифугирование в градиенте плотности**. Дифференциальное центрифугирование – метод разделения субклеточных частиц и сложных биологических жидкостей (стабилизированная кровь, спинно-мозговая жидкость, асцит, слюна), основанный на различных коэффициентах седиментации субклеточных частиц, клеточного дебриса, клеточных фракций, которые приблизительно пропорциональны размеру. Клеточные экстракты последовательно ц/ф с возрастающей скоростью. Большие частицы, такие как ядра и митохондрии, осаждаются при относительно низких скоростях; для осаждения мелких частиц, таких как рибосомы, требуются более мощные центробежные силы. Для осаждения микросомальной фракции (фрагменты ЭПС) требуется ультрацентрифугирование при 100 000 g.

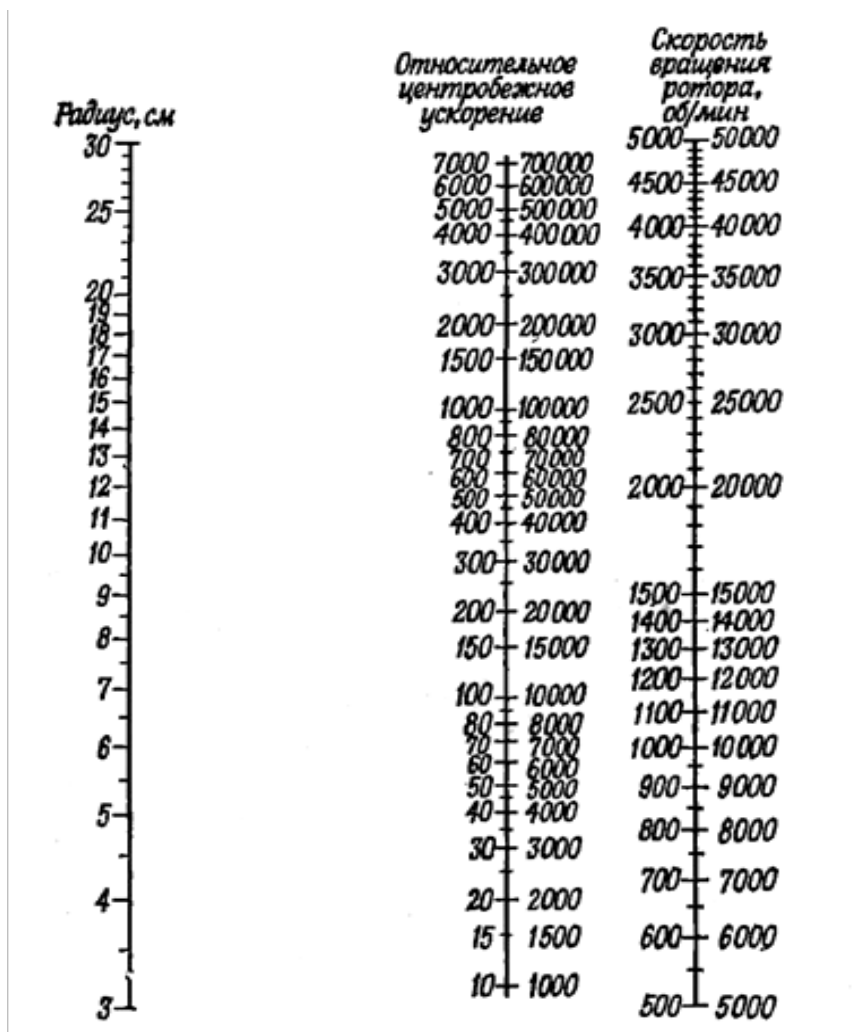


Рис. 6. Номограмма Дула и Котцина

При проведении исследований методом ц/ф в градиенте плотности центрифужную пробирку наполняют раствором, плотность которого уменьшается в направлении от дна к мениску. Для создания градиента при фракционировании вирусов растений (для выделения экзосом) наиболее часто используют сахарозу. Перед началом центрифугирования частицы вируса могут быть либо распределены во всем объеме раствора, либо нанесены на вершину градиента. Когда усредненное значение плавучей плотности биологического объекта сравняется с данной плотностью раствора сахарозы, биологический объект формирует зону. При данном виде центрифугирования осадков не образуется. Биологические объекты при ц/ф находятся в пробирке в соответствующей зоне.

Усредненные значения плавучей плотности основных биологических объектов в растворах сахарозы ( $\text{г/см}^3$ ) представлены в таблице 1:

Усредненные значения плавучей плотности основных биологических объектов в растворах сахарозы (г/см<sup>3</sup>)

РНК	1,49
Хлоропласты	1,21
ДНК	1,42
Рибосомы	1,41
Митохондрии	1,19
Лизосомы	1,21
Белки	1,24-1,32
Мембраны	1,13-1,18

**Ультрацентрифугирование** – метод разделения и исследования высокомолекулярных соединений, вирусов и субклеточных частиц с помощью ультрацентрифуги.

**Варианты ультрацентрифугирования:**

1. Осаждение без использования специальных веществ.
2. Выделение в градиенте плотности (сахарозы, фиккола).
3. Осаждение частиц с помощью солей лития, цезия, спирта и др. растворителей.

**Типы центрифуг:**

1. Центрифуги общего назначения ( $V_{max}=6000$  об/мин,  $G=6000g$ ).
2. Высокоскоростные центрифуги ( $V_{max}=25000$  об/мин,  $G=6000-89000g$ ), в основном с функцией охлаждения.
3. Ультрацентрифуги ( $V_{max}=75000$  об/мин,  $G=90.000-500.000g$ ) – вакуумная камера, охлаждение.

**Основные типы использующихся роторов:**

1. Роторы с подвесными стаканами.
2. Угловые роторы.
3. Бакет-роторы.

**Условия для ц/ф:** выбор центрифуг, выбор ротора, выбор объема бакетов или подвесных стаканов, температуры, расчет скорости, времени, выбор среды для центрифугирования.

**Студент должен знать:**

1. Отличия препаративного и аналитического центрифугирования.
2. Принципы дифференциального ц/ф и ц/ф в градиенте плотности.
3. Ультрацентрифугирование и его виды.
4. Основные типы центрифуг и роторов.

### **Студент должен уметь:**

1. Научиться работать с номограммой Доула и Котцина для расчета центробежного ускорения.
2. Получить навыки работы на высокоскоростных охлаждаемых центрифугах и ультрацентрифуге.
3. Получить препарат экзосом из плазмы крови, слюны или асцитической жидкости, освоить метод ультрафильтрации биологических жидкостей.

### **Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. Назовите отличия препаративного и аналитического центрифугирования.
2. Чем различаются дифференциальное ц/ф и ц/ф в градиенте плотности?
3. В каких случаях используют ультрацентрифугирование?
4. Для чего существуют различные типы роторов к центрифугам?
5. Принцип ультрафильтрации.

### **Лабораторная работа № 5**

#### **Получение препарата внеклеточных везикул – экзосом из биологических жидкостей методом двойного ультрацентрифугирования с ультрафильтрацией**

**Биологический образец:** стабилизированная кровь, слюна, асцитическая жидкость. Особенности забора: кровь, слюну и асцит забирали в вакутейнеры с  $K_3$  ЭДТА и хранили на холоде максимально короткое время.

#### **Реактивы и расходные материалы:**

1. Фосфатно-солевой буфер (10 мм фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5) (ФБ).
2. Фильтры с диаметром пор 220 нм и 100 нм (Minisarthighflow, 16553-K, Sartorius).
3. Пробирки для ультрацентрифугирования ultra-clear.

#### **Оборудование:**

1. Высокоскоростные центрифуги для работы с различными объемами жидкости.
2. Ультрацентрифуга Beckman I–8 m.

### **Ход работы:**

1. Самостоятельная работа с номограммой для расчета центробежного ускорения Доула и Котцина (номограммы 10 шт. и линейки).

Задания:

А) Рассчитать число оборотов для создания центробежного ускорения 900 g на охлаждаемой скоростной центрифуге с радиусом 9,5 см.

Б) Рассчитать число оборотов для создания центробежного ускорения 100000 g на охлаждаемой ультрацентрифуге с радиусом 11 см (бакет ротор).

### **Выделение экзосом**

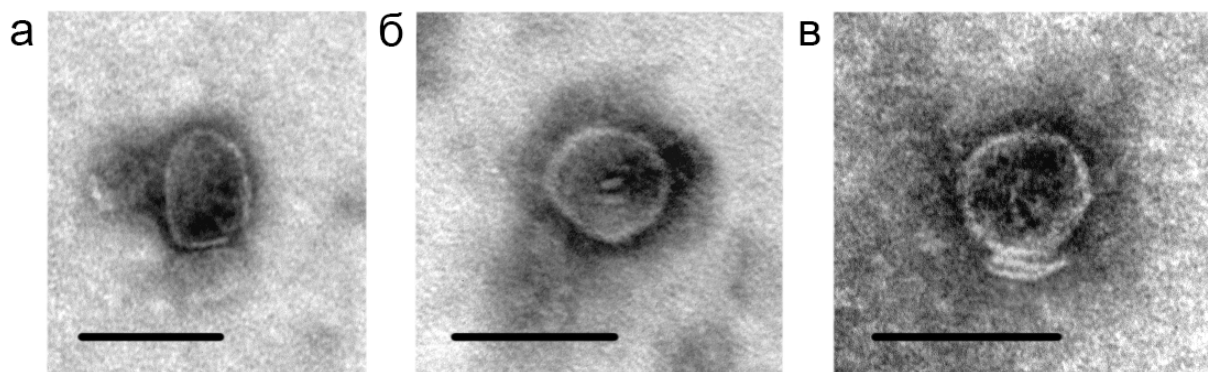
– Форменные элементы крови или асцитической жидкости (9 мл), собранной в вакутейнеры с  $K_3$  ЭДТА, осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 900 g и 4 °С.

– Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы и бесклеточной части асцита центрифугировали при 17 000 g и 4 °С в течение 20 мин. Слюну, предварительно разведенную в 2 раза ФБ, сразу центрифугировали при 17 000 g и 4 °С в течение 20 мин.

– Для удаления везикул более 100 нм супернатант разводили в 5 раз фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5) (ФБ) и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм (Minisarthighflow, 16553-K, Sartorius). Пробы слюны подвергали ультрафильтрации сначала через фильтр 220 нм, а затем через фильтр 100 нм.

– Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием (100 000 g, 90 мин, 4°С), осадок ресуспендировали в 10 мл ФБ и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С.

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул препараты должны исследоваться методами трансмиссионной электронной микроскопии (форма, размеры частиц, сохранность мембраны) (рис. 7), а также на наличие специфических экзосомальных белков методами проточной цитометрии или Вестерн блоттинга.



**Рис. 7.** Трансмиссионная электронная микроскопия экзосом

Экзосомы плазмы крови: а – здоровых доноров; б – больных колоректальным раком; в – больных раком молочной железы. Длина масштабной линии соответствует 100 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорно-вольфрамовой кислотой.

## ТЕМА 4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКОВ

**Цель практического занятия:** познакомится с наиболее часто используемыми методами определения молекулярной массы белков.

### Теоретическая часть

Основными методами определения молекулярной массы остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.). На практике наиболее часто используются методы седиментационного анализа, гель-хроматография и гель-электрофорез. Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа (вариант аналитического центрифугирования) проводят в ультрацентрифугах, в которых удается создать центробежные ускорения (g), превышающие в 200000 и более раз ускорение земного притяжения. Обычно вычисляют молекулярную массу по скорости седиментации молекул белка или седиментационному равновесию. По мере перемещения молекул от центра к периферии образуется резкая граница растворитель-белок (регистрируется автоматически). Оптические свойства растворителя и белка используются при определении скорости седиментации; последнюю выражают через константу седиментации  $s$ , которая зависит как от массы, так и от формы белковой частицы:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r},$$

где  $v$  – скорость перемещения границы растворитель-белок, см/с;  $\omega$  – угловая скорость ротора, рад/с;  $r$  – расстояние от центра ротора до середины ячейки с раствором белка, см. Константа седиментации имеет размерность времени (ее выражают в секундах). Величина константы седиментации, равная  $1 \times 10^{-13}$  с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S). Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.

Для вычисления молекулярной массы (M), помимо константы седиментации, необходимы дополнительные сведения о плотности растворителя и белка и другие согласно уравнению Сведберга:



$$M = \frac{R \cdot T \cdot s}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

где  $R$  – газовая постоянная, эрг/(моль•град);  $T$  – абсолютная температура (по шкале Кельвина);  $s$  – константа седиментации;  $\rho$  – плотность растворителя;  $\bar{v}$  – парциальный удельный объем молекулы белка;  $D$  – коэффициент диффузии.

Определение молекулярной массы белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и сложной и дорогостоящей аппаратуры. Поэтому в последние годы разработаны два более простых метода (гель-хроматография и электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли).

#### **Студент должен уметь:**

1. Правильно выбрать геометрию колонки и материал для ее заполнения (сефадекс и др.), исходя из целей работы.
2. Правильно заполнить колонку и подготовить ее к работе.
3. Правильно нанести пробу на колонку и собрать фракции элюата.
4. Начертить график зависимости элюционного объема от логарифмов молекулярной массы белков.

#### **Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. Назовите статические параметры колонки.
2. Назовите динамические параметры колонки.
3. Что выражает коэффициент распределения  $K_d$ ? Для чего необходимо знать этот коэффициент?
4. Что означают случаи:  $K_d=0$  и  $K_d=1$ ?
5. В чем состоят отличия ультрафильтрации и гель-фильтрации?
6. На каких принципах основаны адсорбционная, ионообменная и распределительная хроматография?
7. Какие методы обессоливания белковых растворов Вы знаете? В чем состоят преимущества и недостатки каждого из них?
8. Какие методы определения молекулярной массы белков Вы знаете? В чем состоят преимущества и недостатки каждого из них?
9. Каков принцип разделения смеси белков и обессоливания белковых растворов с помощью сефадекса?
10. Что представляет собой сефадекс как «молекулярное сито», его виды?
11. Какие материалы (носители) используются в хроматографии?

## **Лабораторная работа № 6**

### **Определение молекулярной массы белков фильтрованием через гель сефадекса g-100**

**Цель практического занятия:** ознакомить с методом определения молекулярной массы белков гель-фильтрацией через сефадекс G-100. Освоить операции по работе с хроматографической колонкой для фракционирования смеси белков, построить элюционную кривую и калибровочный график зависимости элюционных объемов от десятичного логарифма молекулярной массы белков. Освоить спектрофотометрический метод определения белка в порциях элюата.

#### **Реактивы:**

1. 1% Водный раствор декстрана голубого.
2. 1% Водный раствор альбумина (М.м. = 67000; lg М.м. 4,826).
3. 1% Водный раствор рибонуклеазы (М.м. = 12640; lg М.м. 4,017).
4. 1% Водный раствор белка X (его М.м. меньше, чем у альбумина, но больше, чем у рибонуклеазы).
5. 0,1 М Раствор хлорида натрия.

#### **Оборудование:**

1. Колонка для хроматографии соответствующей геометрии: длинная колонка с относительно малым диаметром.
2. Штативы с держателями для колонок.
3. Штативы для пробирок.
4. Химические пробирки.
5. Пипетки.
6. Спектрофотометр.

#### **Ход работы:**

1. Подготовка сефадекса.

В стеклянном стакане с 0,1 М раствором хлорида натрия суспендируют сефадекс и оставляют на несколько часов для набухания геля. Раствор хлорида натрия заменяют на дистиллированную воду. Гель взбалтывают и дают осесть основной массе гранул. Воду с неосевшими поврежденными гранулами сливают. Эту процедуру повторяют несколько раз для полного отделения неосевших частиц.

2. Заполнение хроматографической колонки.

Стеклянную колонку устанавливают строго вертикально. Над колонкой укрепляют стеклянную воронку, соединенную с колонкой с

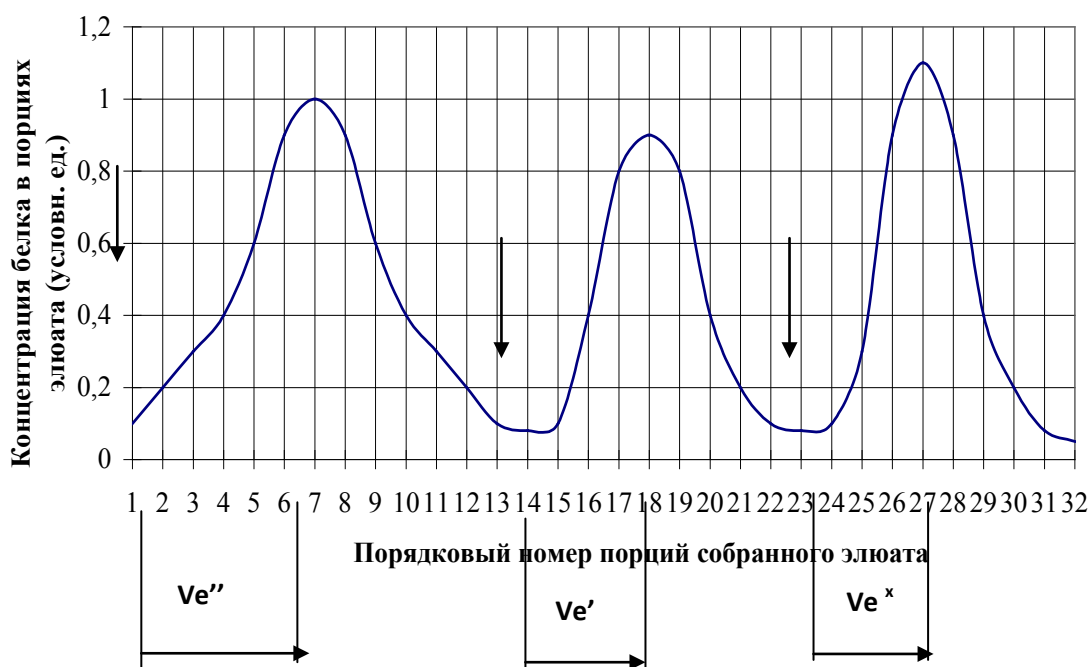
помощью стеклянной трубки и пробки. Приготовленный гель вносят в колонку единой порцией. Гелю дают отстояться под действием силы тяжести. Затем жидкость над гелем декантируют, оставляя слой толщиной  $\frac{1}{4}$  от объема осевшего геля. Над сефадексом всегда должен находиться слой жидкости. В колонке не должно быть пузырьков воздуха. Поверхность геля в колонке должна быть горизонтальной, без перекосов. Для проверки равномерности заполнения колонки через нее можно пропустить окрашенный раствор декстрана голубого. Если колонка заполнена качественно, то окрашенная зона должна выглядеть компактной и двигаться вдоль колонки в виде ровной (без перекосов) и узкой горизонтальной полосы.

3. Проведение процедуры определения молекулярной массы белка.

Элюирование осуществляют дистиллированной водой. Сначала через колонку последовательно проводят два раствора разных белков, молекулярная масса которых известна. Если пробы этих белков содержат менее 5 мг белка, то плотность проб повышают путем добавления в них 5 мг сахарозы. Затем через колонку пропускают исследуемый раствор белка с неизвестной молекулярной массой. Фракции элюата собирают в стеклянные пробирки по 3,0 мл в каждую (удобно использовать конические стеклянные центрифужные пробирки с делениями). Содержание белка в них определяют спектрофотометрическим методом.

*Поскольку растворы белков наносят на колонку последовательно, то элюционные объемы ( $V_e$ ) каждого из трех белков будут соответствовать объемам элюата, собранных с момента нанесения пробы каждого белка, до выхода фракции элюата с максимальной концентрацией белка (см. схему в нижеследующем разделе 4).*

Необходимо построить график, отражающий связь между концентрацией белка в различных порциях элюата и величиной элюционных объемов для фракций разделяемых белков (рис. 8):



**Рис. 8.** Схема определения элюционных объёмов белков с известной молекулярной массой и белка с искомой молекулярной массой

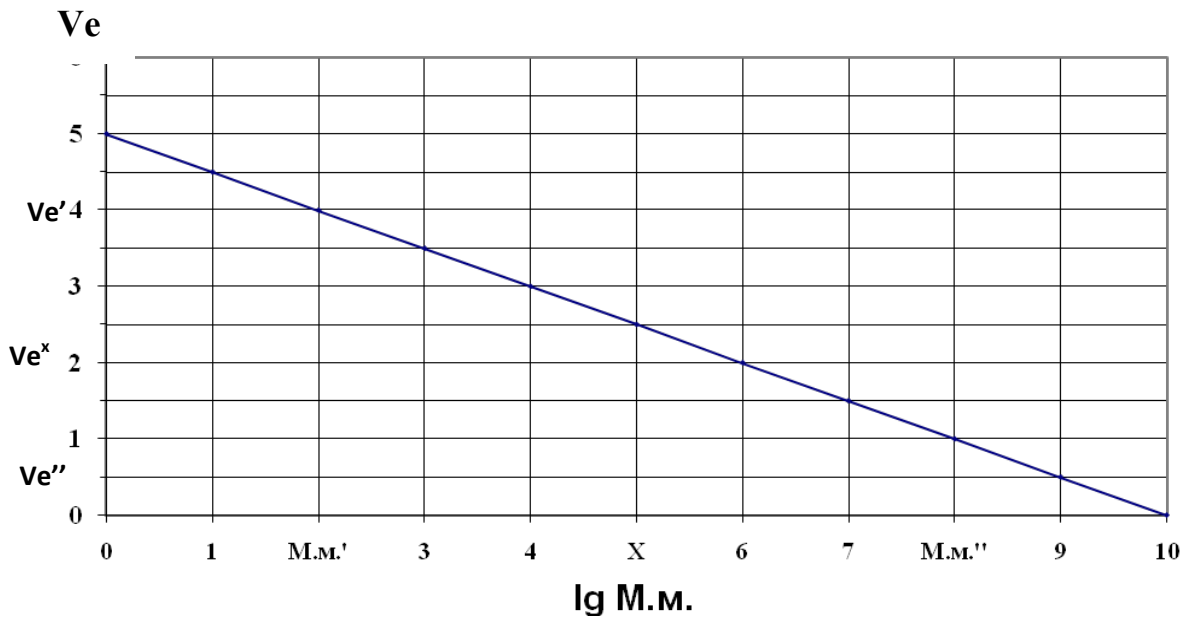
$Ve'$  и  $Ve$  – элюционные объёмы первого и второго белков с известными молекулярными массами (калибровочных белков);

$Ve^x$  – элюционный объём белка с неизвестной молекулярной массой. Стрелками показаны моменты внесения соответствующих белков.

##### 5. Построение калибровочного графика.

После определения  $Ve$  белков с известной молекулярной массой необходимо вычертить график зависимости  $Ve$  от десятичного логарифма молекулярной массы белков (рис. 9). Зная  $Ve$  исследуемого белка, по этому графику находят его молекулярную массу:

По оси абсцисс откладывают десятичные логарифмы молекулярных масс белков. По оси ординат – элюционные объёмы соответствующих белков.



**Рис. 9.** Калибровочный график для определения молекулярной массы белка

## 6. Спектрофотометрический метод определения белка.

### Принцип метода.

Растворы белка поглощают УФ-излучение благодаря присутствию ароматических аминокислот: триптофана и тирозина и, в меньшей степени, фенилаланина. Водные растворы белков имеют два хорошо выраженных пика поглощения при 200–220 нм и при 260–280 нм.

Для количественного определения белка в растворе обычно измеряют его поглощение при длине волны 280 нм. Однако при этой длине волны в поглощение существенный вклад вносят нуклеиновые кислоты, хотя максимум их поглощения приходится на длину волны 260 нм. С учетом этого обстоятельства в данном методе проводится последовательное измерение поглощения одного и того же образца при двух длинах волн: при 260 нм и при 280 нм. Оптимальный диапазон концентрации белка в растворе для данного метода составляет 0,2–2,0 мг/мл.

### Измерение.

В кювету спектрофотометра, толщиной 1,0 см, помещают исследуемый раствор белка (образец) и последовательно измеряют его поглощение при двух вышеуказанных длинах волн против контроля, в качестве которого используется соответствующий растворитель.

### Вычисление результата:

Содержание белка в растворе (X, мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$X = 1,45 * E_{280} - 0,74 * E_{260}$$

где:  $E_{280}$  и  $E_{260}$  – экстинкции исследуемого раствора, измеренные

при соответствующих длинах волн.

*Примечание.* Данный метод недостаточно специфичен для белка, поскольку, помимо белков, в этой части спектра существенное поглощение дают также: свободные ароматические аминокислоты, пептиды, пуриновые основания и нуклеиновые кислоты. Метод не применим к материалу, где концентрация нуклеиновых кислот превышает 20 %. В таком случае ошибка определения концентрации белка будет очень высока.

К преимуществам метода относятся его простота и возможность использования раствора белка в последующей работе.

# ТЕМА 5. ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

## Занятие 1

**Цель практического занятия:** ознакомиться с материально-техническим оснащением лаборатории клеточных культур. Изучить основные принципы работы с клеточными культурами. Получить практические навыки работы с адгезионными культурами, подсчитать количество клеток в клеточной культуре с помощью камеры Горяева.

### Теоретическая часть

Основным объектом и средством исследования в клеточной инженерии является клеточная культура. Как и любой другой метод, метод клеточной культуры обладает рядом преимуществ и недостатков.

### Преимущества метода клеточных культур:

1. Прижизненное наблюдение за клетками, их морфологическими и биохимическими особенностями различными методами, в том числе с использованием световой микроскопии.

2. Возможность оценки состояния клетки «прижизненно», а не «postfactum», как в случае с опытами на животных.

3. Возможность изменения условий культивирования, что даёт широкие возможности в оценке факторов, влияющих на клеточный метаболизм.

4. Оценка и получение результатов при использовании небольшого количества клеточного материала, что снимает проблему использования большого количества животных.

5. Использование клеточной культуры снимает множество этических проблем, связанных как с использованием большого количества клинического материала, так и при тестировании потенциально опасных и токсических веществ.

6. Клеточная культура доступна для различных биохимических манипуляций, в том числе с ядами, гормонами, токсинами, радиоактивными соединениями и т.д.

7. При использовании клеточной культуры оценивается прямое воздействие исследуемого вещества, без опасения, что оно будет метаболизировано печенью или почками.

8. Становится возможным рассчитать точную концентрацию тестируемого вещества, вызывающего тот или иной эффект.

Для успешного проведения исследований с использованием кле-

точных культур и применением различных методик клеточной инженерии требуется выполнение ряда условий и наличие специального приборного парка. В лаборатории клеточных культур должны быть созданы рабочие зоны, предназначенные для каждой стадии работы с клеточными культурами:

1. *Зона работы персонала и обработки данных* предназначена для работы сотрудников, включает письменные столы, книжные шкафы, компьютеры и т. д.

2. *Помещение предбоксника* предназначено для переодевания в стерильную одежду, мытья рук и т.д. Здесь должны располагаться шкафы для сменной одежды и стерильных халатов, мойка и душевая.

3. *Стерильный бокс* предназначен для проведения манипуляций с клеточными культурами в стерильных условиях и культивирования клеточных культур. Здесь должны располагаться ламинарные шкафы, СО<sub>2</sub>-инкубаторы, термостаты, лабораторный стол со световым, инвертированным и люминесцентным микроскопами, шкаф с лабораторной посудой и холодильник.

4. *Кельвинаторная комната* предназначена для длительного хранения клеточных культур, питательных сред и реактивов. Здесь должны располагаться низкотемпературный морозильник на -152 °С, сосуды Дьюара для хранения культур клеток в жидком азоте, фармацевтический холодильник 0–...+5 °С.

5. *Автоклавная – моечная* предназначена для стерилизации инструментария, питательных сред, «убивки» клеточных культур. Здесь должны располагаться автоклав, сухожаровой шкаф, мойка.

### **Рекомендуемый комплект оборудования для оснащения лаборатории клеточных культур:**

1. Бокс биологической безопасности II или III класса защиты (соответствующая система вентиляции).

2. Центрифуга-вортекс до 2000 об/мин.

3. Центрифуга для пробирок 5–100 мл до 5000 об/мин.

4. Микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф до 12000–16000 об/мин.

5. Твердотельный хладотермостат для пробирок объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур -5...-100° С.

6. Вакуумный насос медицинский с колбой-ловушкой

7. Отдельный набор автоматических микродозаторов переменного объема.

8. СО<sub>2</sub>-инкубатор.



9. Термостат.
10. Световой микроскоп.
11. Инвертированный микроскоп.
12. Люминесцентный микроскоп.
15. Сосуд для хранения и перелива жидкого азота.
16. Фармацевтический холодильник 0...+5° С.
17. Паровой автоклав.
18. Сухожаровой шкаф.
19. Набор ультрафиолетовых бактерицидных ламп.
20. Наборы культуральных флаконов, одноразовых наконечников, штативов, одноразовых микроцентрифужных пробирок, ёмкостей с дезинфицирующими растворами и т. д.

Очень важным вопросом в клеточной инженерии является выбор соответствующей лабораторной посуды для культивирования клеточных линий. Здесь необходимо учитывать ряд факторов, таких как: растут ли клетки в суспензии или монослое, каков будет масштаб эксперимента, допустим ли газовый обмен с атмосферой или флаконы должны быть закупорены.

**Для диссоциации клеток и отделения их от монослоя используют растворы различных протеаз с хелатирующими агентами:**

1. Трипсин 0,25 % раствор. Используется для дезагрегации ткани и отделения клеток от монослоя.

2. Проназа-комплекс. Используется для получения первичных культур. Представляет собой смесь протеолитических ферментов, продуцируемых штаммом *Streptomyces griseus* K-1, содержит эндопептидазы, аминопептидазы и карбоксипептидазы, гидролизует 80–85 % пептидных связей в казеине и альбумине, катализирует гидролиз сложных эфиров.

3. Коллагеназа. Обладает минимальным повреждающим эффектом на клетки, используется для получения клональных клеточных культур.

4. ЭДТА. Хелатирующий агент, удаляет двухвалентные ионы, что приводит к диссоциации клеточного монослоя и перехода клеток в суспензию без использования протеаз.

Для роста и размножения культуры клеток, извлечённой из организма, необходимы особые внешние условия, которые должны максимально моделировать условия *in vivo*.

### **Внешние условия могут быть представлены:**

1. Жидкой питательной средой строго определённого состава. Основу жидкой среды составляет солевой раствор, минеральные компоненты которого подобраны таким образом, что поддерживается постоянный кислотно-щелочной баланс, постоянство рН и определённая буферная ёмкость. К минеральной основе добавляются различные компоненты биологического и фармакологического происхождения – плазма или сыворотка крови, тканевые экстракты, антибиотики, ростовые факторы и др.

2. Газообразной средой, имеющей строго определённый процентный газовый состав, температуру и влажность.

3. Твёрдым субстратом, основой, фазой, поверхностью субстрата. Разные клеточные линии предъявляют различные требования к поверхности субстрата.

### **Криоконсервация клеток**

При культивировании клеточных линий перед исследователями довольно часто возникает задача сохранения клеток в течение длительного времени. При долгом культивировании клеточной линии в клетках возникают разнообразные мутации, которые приводят в, конечном итоге, либо к гибели клеток, либо их превращению в злокачественные. При этом теряются характерные для клеток биохимические свойства, способность к продукции вторичных метаболитов и т. д. При исследовании совокупности морфофизиологических и биохимических особенностей клеток также необходимы стандартные клеточные линии. В связи с этими проблемами становится особенно важным метод криосохранения клеточных линий.

### ***Основные принципы криоконсервации, хранения и размораживания:***

1. Криоконсервированию подвергают клетки, находящиеся в виде суспензии, в концентрации 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> клеток/1 мл.

2. Клетки для замораживания отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой, так как клетки в стационарной фазе менее устойчивы к повреждающему действию криоконсервации.

4. В обязательном порядке применяются криопротекторы.

5. Процесс замораживания культуры клеток осуществляется по определённой программе. В результате замораживания возникают две противоречивые проблемы: с одной стороны, медленное замораживание приводит к образованию внеклеточного льда и, как результат, к

обезвоживанию и гибели клетки, с другой стороны, быстрая заморозка приводит к образованию кристаллов льда внутри клетки и к массивному повреждению внутриклеточных структур. Как правило, замораживание проводят в два этапа: на первом этапе производят охлаждение от  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$  со  $v = 10\text{ C/мин}$ , затем производят погружение в жидкий азот  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (мгновенная заморозка).

6. При температуре жидкого азота ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) клетки можно хранить в течение ряда лет без существенной потери жизнеспособности.

7. При размораживании следуют принципу как можно более быстрой разморозки клеточной культуры при температуре  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в культуральной среде для роста.

#### **Студент должен знать:**

1. Основные преимущества метода клеточных культур.
2. Что необходимо для культивирования клеток?
3. Классификация культуральных сред.
4. Основное оборудование лаборатории клеточных культур.

#### **Студент должен уметь:**

1. Выполнить трипсинизацию и пересев клеточных культур.
2. Подсчитать количество клеток в культуре несколькими методами.

#### **Вопросы для контроля базисного уровня знаний:**

1. В чем особенность посева клеток, взятых из криохранилища?
2. Различия адгезионных и суспензионных клеточных культур.
3. Перечислите различные источники получения клеточных культур.
4. Для чего используются антибиотики при культивировании клеток?

### **Лабораторная работа № 7**

**Основы культивирования клеток. Работа с адгезивными и суспензионными культурами. Подсчет клеток при культивировании**

**Реактивы и биологический материал:** культуры клеток, раствор трипсин-версен, трипсин-ЭДТА, питательные среды.

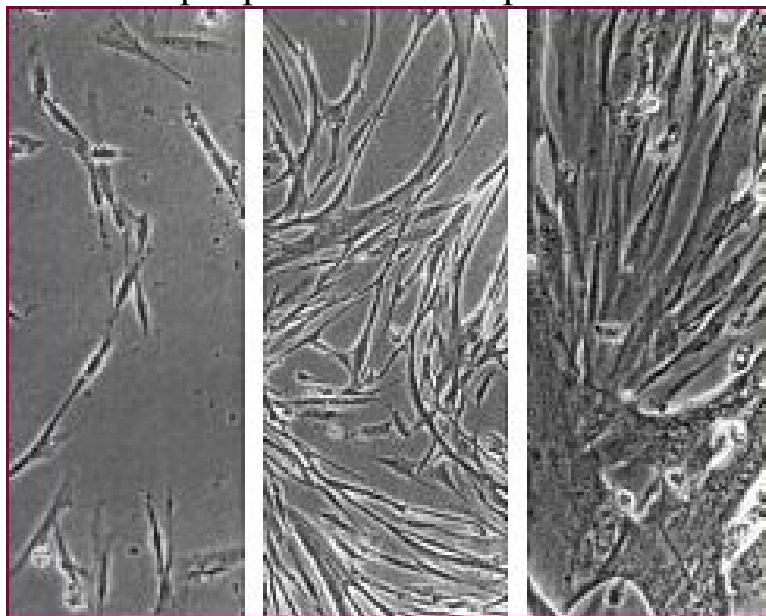
**Оборудование:** стандартное оборудование лаборатории клеточных культур.

#### **Ход работы**

Аликвоты культур клеток, замороженные в жидком азоте, необходимо разморозить на водяной бане при температуре  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В соот-

ветствии с рекомендациями по культивированию произвести первый посев (рис. 10).

Через 3–4 суток после первого посева вырастает плотный монослой клеток. Процесс образования монослоя можно наблюдать в инвертированный микроскоп.



**Рис. 10.** Рост миобластов в культуре

Клетки, достигшие состояния монослоя, нуждаются в пересеве. Этот процесс можно разделить на следующие этапы: **трипсинизация** и **рассев клеток**.

### **Трипсинизация**

**Реактивы:** раствор трипсин-версен трипсин-ЭДТА.

Необходимо убедиться в том, что на рабочем столе нет ничего лишнего, проверить правильность расположения посуды и инструментов на столе ламинара. Обработать резиновые пробки всех сосудов спиртом (распыление).

Процесс трипсинизации включает следующие стадии:

1. Слив старой питательной среды из чашек Петри с монослоем в емкость для слива.
2. Открывание бутылки с трипсином и забор 2–3 мл раствора.
3. Добавление трипсина в сосуд с клетками (раствор трипсина должен покрывать поверхность субстрата с клетками).

После 3-го этапа чашки Петри с культурой необходимо поместить в термостат на 1–2 мин при температуре 37 °С для трипсинизации.

## Рассев суспензии клеток

**Реактивы:** полная питательная среда (включает стандартную питательную среду с добавлением антибиотиков и 10 % инактивированной телячьей сыворотки).

Процесс посева включает следующие стадии:

1. Сбор содержимого чашки Петри с суспензионной культурой в стерильную пробирку.
2. Центрифугирование клеток при 1200 об/мин в течение 2–3 минут (рис. 11).



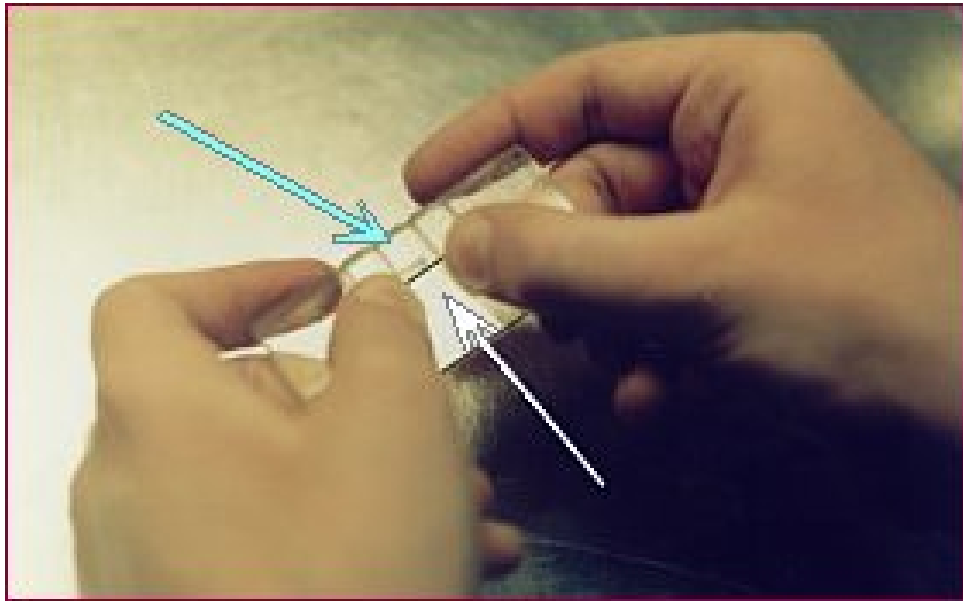
**Рис. 11.** Центрифугирование клеточной суспензии

3. Подсчет клеток в камере Горяева. После подсчета клеток необходимый объем суспензии переносится в новую чашку Петри с уже налитой питательной средой.

Для подсчета общего количества клеток, а также для оценки состояния клеточной культуры, т. е. с целью выявления мертвых и живых клеток, существует простой метод подсчета клеток в гемоцитометре (камере Горяева).

**Подготовка гемоцитометра.** К клеточной суспензии добавляют равный объем 0,1 %-ного трипанового синего. Этот краситель окрашивает только мертвые клетки.

Шлифованное покровное стекло притирают к предметному стеклу гемоцитометра (белая стрелка) до появления колец Ньютона, так, чтобы покрыть заштрихованные области (голубая стрелка) (рис. 12).

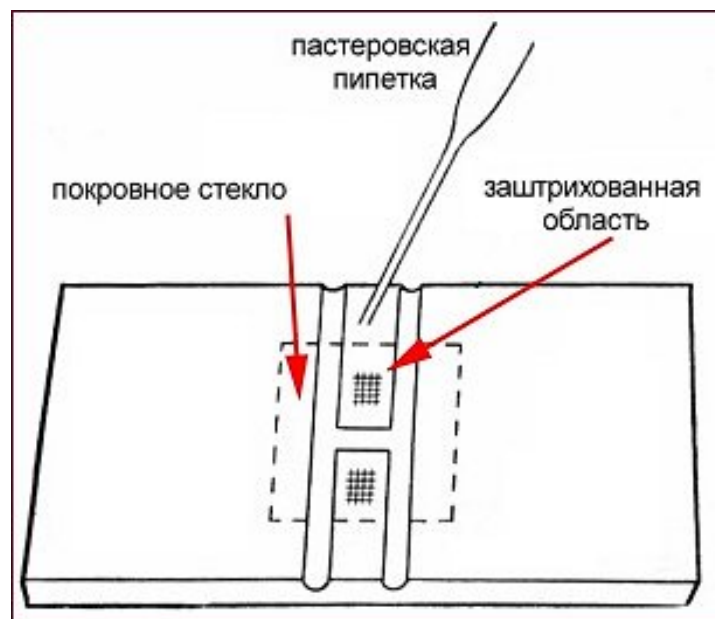


**Рис. 12.** Подготовка гемоцитометра

Это приводит к образованию камеры с фиксированным объемом, поскольку края предметного стекла подняты над заштрихованной поверхностью ровно на 0,1 мм.

Каждая заштрихованная область состоит из 9 больших квадратов размером 1x1, т. е. объем, ограниченный каждым большим квадратом, оказывается равным 1 мм x 1 мм x 0,1 мм = 0,1 мм<sup>3</sup>.

Отбирают часть окрашенной суспензии пастеровской пипеткой и заполняют счетную камеру гемоцитометра, используя капиллярное всасывание.



**Рис. 13.** Правильное заполнение камеры Горяева

### ***Подсчет живых клеток в гемоцитометре (по R.L.P. Adams)***

Подсчитывают количество клеток в четырех больших квадратах в углах каждой из двух заштрихованных областей.

Считают клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий.

Поскольку объем большого квадрата составляет  $0,1 \text{ мм}^3$ , то, умножив усредненное значение числа клеток в 1 квадрате на  $10^4$ , получают количество клеток в 1 мл суспензии.

## Литература

### Основная

1. Практикум по молекулярной биологии / А.С. Коничев, И.Л. Цветков, А.П. Попов и др. – М.: КолосС, 2012. – 151 с.
2. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / редакторы К. Уилсон, Дж. Уолкер; пер. с англ. – М.: БИНОМ; Лаборатория знаний, 2013. – 848 с.
3. Вечканов Е. М., Сорокина И. А. Основы клеточной инженерии: Учебное пособие. – Ростов-на-Дону, 2012. – 136 с.
3. Богомоллов А.Г., Карамышева Т.В., Рубцов Н.Б. Флуоресцентная гибридизация *in situ* ДНК-проб, полученных из индивидуальных хромосом и хромосомных районов // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48 (6). – С. 881.
4. Введение в молекулярную диагностику / под ред. М. А. Пальцева, Д.В. Залетаева. – М.: Медицина, 2011. – Т. 2. – С. 100–136.
5. Nayat M. A. Handbook of Immunohistochemistry and *in Situ* Hybridization of Hum. – Elsevier Science/Academic Press, 2004. – 556 с.
6. Bridger F. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) – Springer, 2010. – 410 p.

### Дополнительная

1. Химотрипсиноподобная активность и субъединичный состав протеасом в злокачественных опухолях человека / Кондакова И.В., Спирина Л.В., Коваль В.Д., Шашова Е.Е., Чойнзонов Е.Л., Иванова Э.В., Коломиец Л.А., Чернышова А.Л., Слонимская Е.М., Усынин Е.А., Афанасьев С.Г // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 444.
2. Перельмутер В.М., Васильев Н.В., Таширева Л.А., Савенкова О.В., Кайгородова Е.В., Жамгарян Г.С. Экспрессионный профиль и молекулярно-генетический анализ синовиальной саркомы и саркомы Юинга // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 2 (62). – С. 19–23.



Учебное издание

Авторы:

Юнусова Н.В.

Кузьменко Д.И.

Кайгородова Е.В.

Сомов А.К.

Серебров В.Ю.

# **ПРАКТИКУМ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

учебное пособие

для студентов медико-биологического факультета

Редактор И.А. Зеленская

Технический редактор С.Б. Гончаров

Обложка Е.В. Кайгородова

Издательство СибГМУ

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107

тел. 8(3822) 51-41-53

E-mail: [otd.redaktor@ssmu.ru](mailto:otd.redaktor@ssmu.ru)

---

Подписано в печать 20.06.17

Формат 60x84  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная.

Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 4. Авт. лист. 2,5

Тираж 50 экз. Заказ №

---

Отпечатано в Издательстве СибГМУ

634050, Томск, ул. Московский тракт, 2

E-mail: [lab.poligrafii@ssmu.ru](mailto:lab.poligrafii@ssmu.ru)