

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»

**ПРАКТИКУМ**  
**ПО МЕДИЦИНСКИМ БИОТЕХНОЛОГИЯМ**  
**С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ**

учебное пособие  
для студентов медико-биологического факультета

Под ред. проф. В. Ю. Сереброва

ТОМСК  
Издательство СибГМУ  
2017

УДК 577.1/.2(075.8)

ББК 28.07я73

П 691

**Авторы:**

В.Ю. Серебров, Е.В. Кайгородова, Н.В. Юнусова, А.К. Сомов,  
А.Э. Сазонов

П 691

Практикум по медицинским биотехнологиям с основами молекулярной биологии: учебное пособие / В. Ю. Серебров, Е. В. Кайгородова, Н. В. Юнусова и др.; под ред. проф. В. Ю. Сереброва. – Томск: Издательство СибГМУ, 2017. – 55 с.

Данный практикум призван ознакомить студентов с основными методиками проведения биотехнологического эксперимента. Освещён широкий круг возможных направлений использования живых организмов и их систем для продукции необходимого биологического материала, лабораторной диагностики, а так же участия в лечении ряда заболеваний.

В данном пособии представлены классические методы работы с рекомбинантной ДНК, такие как трансформация бактерий, выделение нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция, электрофорез. А также представлен спектр методик для молекулярно-биологической оценки белковой экспрессии.

Практикум рекомендован для освоения методов генной инженерии и медицинской биотехнологии студентам вузов медицинского и биологического профиля.

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 577.1/.2(075.8)

ББК 28.07я73

**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

© Серебров В.Ю., Кайгородова Е.В., Юнусова Н.В.,  
Сомов А.К., Сазонов А.Э., 2017

## Содержание

<b>Предисловие</b> .....	4
<b>Введение</b> .....	5
<b>ТЕМА 1. Получение рекомбинантных белков и клонированной ДНК с использованием микроорганизмов</b> .....	7
<b>Занятие 1. Методы трансформации</b> .....	7
Лабораторная работа № 1. Трансформация бактериальных клеток с использованием хлористого кальция.....	11
<b>Занятие 2. Методы выделения нуклеиновых кислот</b> .....	14
Лабораторная работа № 1. Выделение плазмидной ДНК с использованием органических растворителей .....	16
<b>Занятие 3. Методы проведения ПЦР и электрофореза</b> .....	20
Лабораторная работа № 1. Полимеразная цепная реакция .....	22
Лабораторная работа № 2. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	23
<b>ТЕМА 2. Молекулярно-биологические методы идентификации белковой экспрессии</b> .....	29
<b>Занятие 1. Методы оценки белковой экспрессии: иммуноферментный анализ, вестерн блоттинг, иммунопреципитация</b> .....	29
Лабораторная работа № 1. Определение лептина сыворотки крови (с использованием тест-системы Leptin ELISA, DBS, Канада).....	31
Лабораторная работа № 2. Приготовление супернатантов ткани для ИФА-анализа и Вестерн блоттинга. Приготовление гелей для Вестерн блоттинга и проведение электрофореза белков по Lemli.....	34
Лабораторная работа № 3. Получение экзосом из биологических жидкостей методом иммунопреципитации.....	36
<b>Занятие 2. Оценка белковой экспрессии методами иммуногистохимического окрашивания</b> .....	40
Лабораторная работа № 1. Определение уровня пролиферативной активности опухоли методом иммуногистохимии.....	45
<b>Ответы на тестовые задания</b> .....	52
<b>Рекомендуемая литература</b> .....	54

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Классические методы по работе с культурами клеток (культивирование, трансформация) и ДНК (выделение, полимеразная цепная реакция, электрофорез в агарозном геле) дополняются методиками более специализированных направлений (иммунно-ферментный анализ, иммуногистохимия, выделение экзосом), демонстрирующими студенту возможные сферы применения биотехнологии и практически неисчерпаемые возможности применения живых организмов и их функциональных частей (ферменты, антитела, нуклеиновые кислоты) в изучении, диагностике и лечении заболеваний.

Лабораторные занятия призваны продемонстрировать студенту максимально приближенные к реальности условия проведения эксперимента; показать важность и ответственность каждого шага и действия, выбора реагента, методики и объекта исследования; а также применение уже приобретённого теоретического опыта и нестандартных решений в процессе исследований. Надеемся, данное пособие станет полезным руководством для выполнения лабораторных работ, а так же способствует дальнейшему развитию студентов в научной сфере.

## ВВЕДЕНИЕ

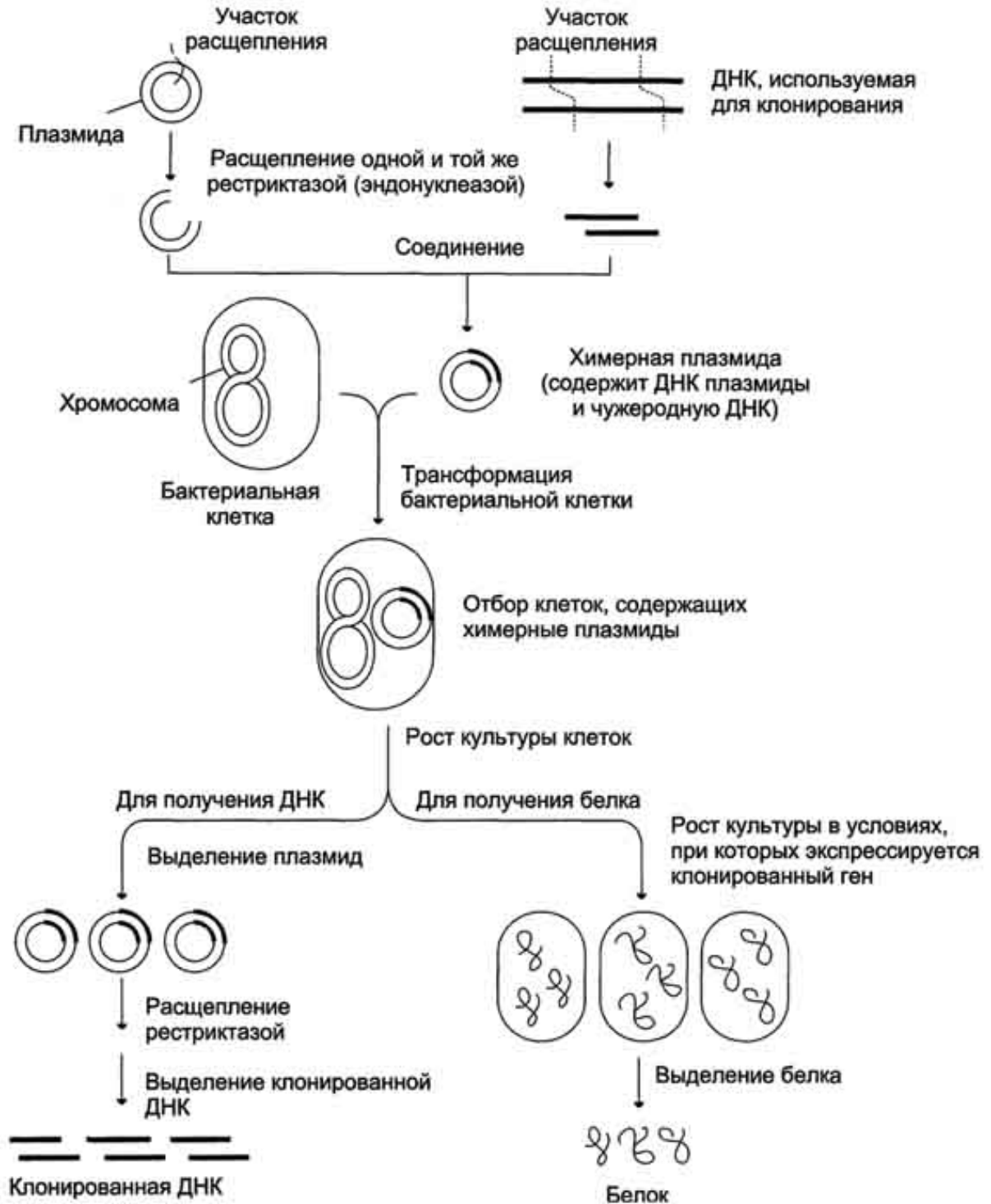
Медицинская биотехнология – это комплексная наука, изучающая использование живых систем, организмов, а также продуктов их жизнедеятельности с целью получения готового продукта или организмов с интересующими нас свойствами. Медицинская биотехнология строится на методах изучения и модификации живых систем и биологических объектов, интеграции биологического и технологического преимуществ. При помощи методов генной инженерии (методов целенаправленного изменения генома) были получены рекомбинантный инсулин, глюкагон, факторы свёртывания крови, интерфероны, различные вакцины, а также колоссальные объёмы информации о процессах, которые могут происходить и происходят в наших тканях, клетках, геноме. Генная терапия демонстрирует новые подходы к лечению таких генетических заболеваний, как гемофилия, тяжёлый комбинированный иммунодефицит (ТКИД) и лизосомные болезни.

Данный практический курс по медицинской биотехнологии и молекулярной биологии состоит из двух блоков.

Первый блок представляет собой развёрнутую схему получения рекомбинантного белка и клонированной ДНК с использованием микроорганизмов (*E. Coli*) (рис. 1). В этом блоке студент осваивает методы создания химерных плазмид, трансфекции бактериальных клеток, методики отбора целевых клонов, а также выделение и анализ интересующей последовательности ДНК. Знание основных этапов и применение таких методик, как выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, электрофорез является в современном научном мире скорее правилом, чем исключением.

Второй блок знакомит студентов с другой областью медицинской биотехнологии, а именно молекулярно-биологическими методами оценки белковой экспрессии: иммуноферментным анализом, вестерн блоттингом, иммунопреципитацией, а также методами иммуногистохимического окрашивания.

# ОБЩИЙ ПЛАН ПРАКТИЧЕСКОГО КУРСА ПО БИОТЕХНОЛОГИИ (ПЕРВЫЙ БЛОК)



**Рис. 1.** Общая схема получения белка и клонированной ДНК с применением биотехнологических методов (по данным В.Ю. Сереброва и соавт. (2017))

# ТЕМА № 1. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И КЛОНИРОВАННОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Лабораторные работы:

- I. Освоение методик трансформации бактериальной клетки.
- II. Освоение методов выделения ДНК.
- III. Освоение метода полимеразной цепной реакции.
- IV. Проведение электрофореза в качестве контроля правильности постановки ПЦР.

## Краткий обзор темы

Получение множества белков с различными свойствами и создание библиотек ДНК являются приоритетной задачей для исследователей. Для этих целей к настоящему времени разработаны методики доставки и выделения интересующих фрагментов ДНК с использованием микроорганизмов (чаще всего *E. coli*). Получение рекомбинантных белков или ДНК проводится по следующей схеме.

Для начала бактериальную и интересующую нас молекулы ДНК обрабатывают рестриктазой с образованием липких концов. Затем при помощи лигаз эти фрагменты сшиваются и транспортируются в геном бактерий в виде химерных плазмид. На следующем этапе проводится отбор клеток, содержащих химерные плазмиды. Происходит наращивание биомассы. После чего становится возможным выделение интересующих белков и/или ДНК.

Очень часто данная схема применяется также для создания геномных библиотек, или библиотек кДНК, что позволяет хранить и амплифицировать генетический материал *in vivo*.

## Занятие № 1. МЕТОДЫ ТРАНСФОРМАЦИИ

### Краткий обзор занятия

Компетентность клеток (способность к поглощению чужеродной ДНК из среды) индуцируется обработкой  $\text{CaCl}_2$ -буфера. Проводим трансформацию с плазмидным вектором и высееваем на среду с ампициллином. Размножаются только трансформированные клетки.

**Цель:** освоить метод подготовки компетентных клеток и способ трансформации плазмидной ДНК в клетки *E. coli*.

### Вопросы для самоподготовки:

1. Способы конструирования гибридных молекул ДНК *in vitro*.
2. Способы введения молекул ДНК в клетки.
3. Методы отбора гибридных клонов.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды – это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Плазмиды есть практически у всех бактерий. Одни из них содержат информацию, обеспечивающую их собственный перенос из одной клетки в другую (F-плазмиды), другие несут гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) или специфические наборы генов, ответственных за утилизацию необычных метаболитов (плазмиды деградации). Размеры плазмид варьируют приблизительно от ~1 до 500 тпн.

Как автономно реплицирующиеся генетические элементы, плазмиды обладают всеми основными свойствами, которые позволяют использовать их в качестве вектора для переноса клонируемой ДНК. Автономную репликацию обеспечивает сайт инициации репликации, называемый точкой *ori* или ориджином. Каждая плазида имеет постоянную определенную копийность в клетке – количество молекул на клетку. В зависимости от этого плазмиды делят на высоко- и низкокопийные. Специфичность ориджина определяет круг возможных хозяев, в которых может реплицироваться плазида. Некоторые плазмиды могут реплицироваться в клетках различных биологических видов. В одной клетке могут сосуществовать только плазмиды, принадлежащие к разным группам совместимости.

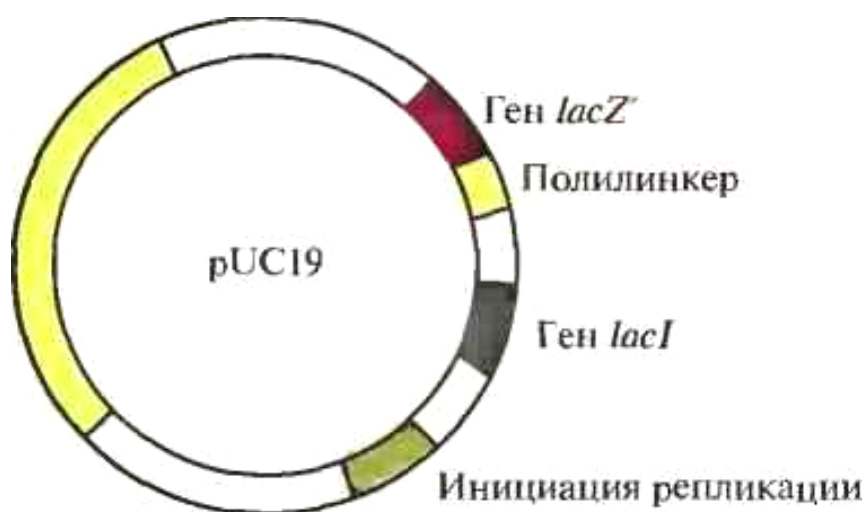
В качестве такого вектора может использоваться плазмидный вектор *pBR322*, созданный Ф. Боливаром и Р. Родригесом. Он имеет длину 4361 п. н. и несёт два гена устойчивости к антибиотикам (рис. 4.7), ампициллину ( $Amp^r$ ) и тетрациклину ( $Tet^r$ ), а также уникальные сайты рестрикции для *Bam*HI, *Hind*III и *Sal*I в гене  $Tet^r$ , один *Pst*I-сайт в гене  $Amp^r$ , один сайт для *Eco*RI, находящийся за пределами кодирующих последовательностей, и сигнал начала репликации, обеспечивающий репликацию исключительно в *E. coli*.

Для образования гибридных молекул *pBR322* и донорную ДНК, содержащую нужный ген, обрабатывают одной и той же рестриктазой, в результате чего у них образуются комплиментарные липкие хвосты. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой фага Т4 в присутствии АТФ для устранения разрывов. Также, во избежание связыва-



ния и плазмид и донорских ДНК между собой, исходные плазмиды обрабатываются щелочной фосфатазой.

Плазмида pUC19 длиной 2686 п. н. содержит: ген устойчивости к ампициллину; регулируемый сегмент гена *lacZ'* лактозного оперона *E. coli*; ген *lacI*, кодирующий репрессор, который контролирует экспрессию гена *lacZ'*; полилинкер – короткую последовательность с множеством уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *XmaI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SaiI*, *HincII*, *AccI*, *BspMI*, *PstI*, *SphI* и *HindIII*); точку начала репликации плазмиды pBR322.

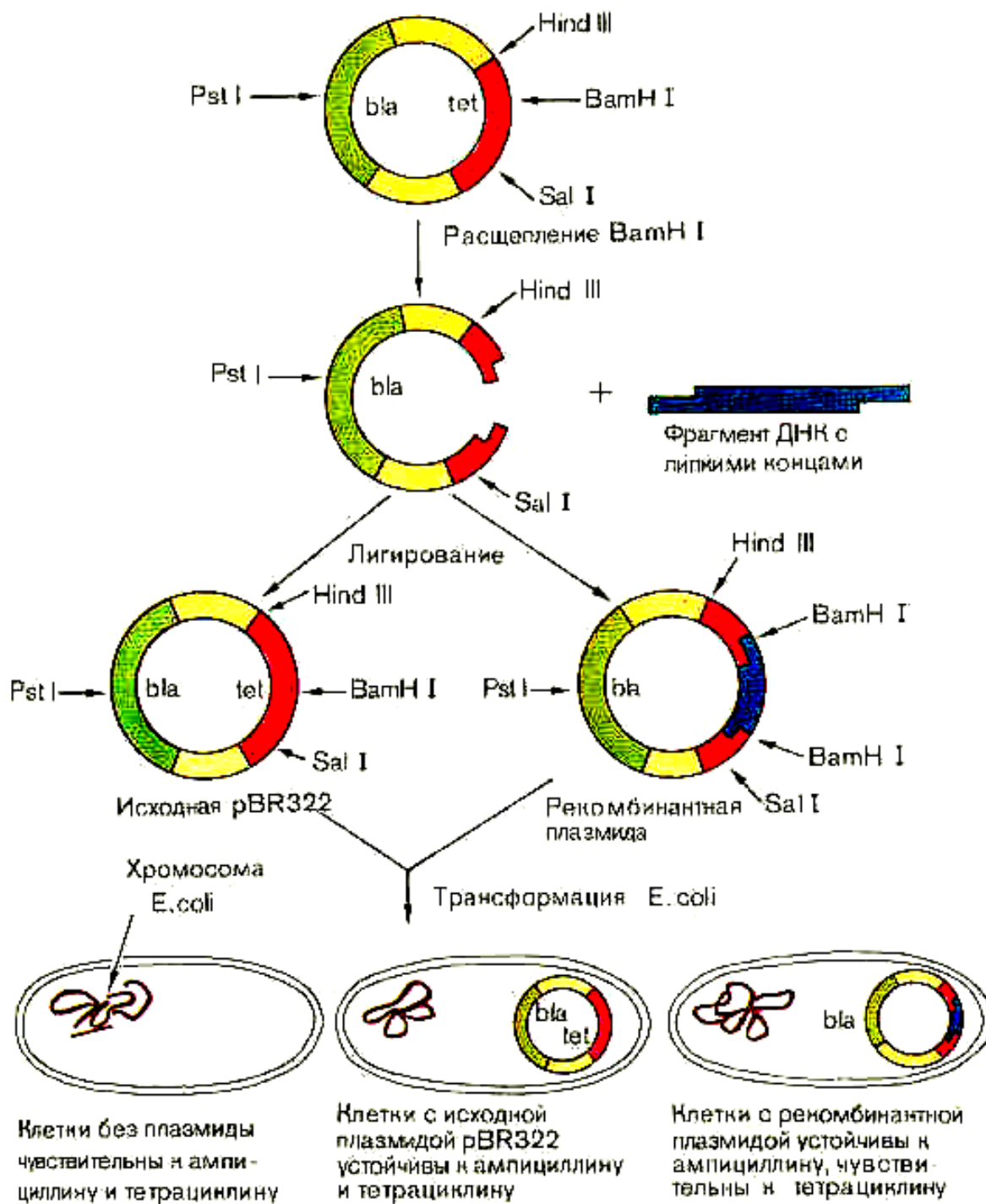


**Рис. 2.** Генетическая карта плазмидного вектора pUC19

([http://samlib.ru/o/oleg\\_w\\_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentyosnowygennojinzhenidljanchinajushihbiotehnologowrtf.shtml](http://samlib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentyosnowygennojinzhenidljanchinajushihbiotehnologowrtf.shtml))

При отборе трансформированных клеток руководствуются следующими соображениями. Если клетки, содержащие немодифицированную плазмиду pUC19, выращивать в присутствии изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), который является индуктором *lac*-оперона, то продукт гена *lacI* не сможет связаться с промоторно-операторной областью гена *lacZ'*, и как следствие будут происходить транскрипция и трансляция плазмидного фрагмента гена *lacZ'*. Продукт этого фрагмента свяжется с белком, кодируемым хромосомной ДНК, и в результате образуется активная  $\beta$ -галактозидаза. Последовательность с множеством сайтов рестрикции (полилинкер) встроена в ген *lacZ'* так, что она не влияет на продукцию функциональной  $\beta$ -галактозидазы, и если в среде присутствует ее субстрат 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид (X-Gal), то он будет гидролизоваться под действием этого фермента с образованием продукта синего цвета, окрашивающего колонии клеток, содержащих немодифи-

цированную плазмиду pUC19.



**Рис. 3.** Схема трансформации бактериальных клеток. ([http://samlib.ru/o/oleg\\_w\\_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentyosnowygennojinzhenridljanachinajushihbiotechnologowrtf.shtml](http://samlib.ru/o/oleg_w_m/cdocumentsandsettingsolegmoidokumentyosnowygennojinzhenridljanachinajushihbiotechnologowrtf.shtml))

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа № 1

#### **Трансформация бактериальных клеток с использованием хлористого кальция**

**Принцип метода:** метод основан на увеличении эффективности поглощения ДНК бактериальной клеткой в результате обработки хлористым кальцием. Выход трансформатов составляет  $10^5$ – $10^7$  на 1 мкг интактной плазмидной ДНК (для pBR322).

#### **Реагенты:**

- 1) Бакто-агар (Molecular biology grade);
- 2) дрожжевой экстракт (Molecular biology grade);
- 3) дистиллированная вода;
- 4) триптон (пептон) (Molecular biology grade);
- 5) ИПТГ (изопропил-бета-D-тиогактопиранозид) – индуктор lac-оперона;
- 6) X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолин-бета-D-галактопиранозид) – субстрат для образования окрашенного синего продукта;
- 7) антибиотик (ампициллин/тетрациклин);
- 8) фосфат натрия однозамещенный (ХЧ);
- 9) фосфат натрия двухзамещенный (ХЧ);
- 10) хлорид кальция (ХЧ);
- 11) хлорид натрия (ХЧ).

#### **Растворы и среды:**

1. LB-среда – триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, дистиллированная H<sub>2</sub>O – 1 л.
2. LB-бакто-агар – триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, бактериологический агар – 18 г, дистиллированная H<sub>2</sub>O – 1 л.
3. 10 мМ натрий – фосфатный буфер (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (pH 7,0).
4. трансформирующий буфер – 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис (pH 8,0).
5. 50 мг/мл ампициллина; 12 мг/мл тетрациклин.
6. 10 % X-Gal.
7. 1 М ИПТГ.

#### **Расходные материалы:**

1. Одноразовые пластиковые наконечники 200 мкл, 1000 мкл.
2. Эппендорфы.
3. Чашки Петри.

4. Одноразовые наконечники для пипеток.

**Оборудование:**

1. Спектрофотометр.
2. Спектрофотометрические кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.
3. Автоматический дозатор переменного объема 0,5–10 мкл, 10–50 мкл, 100–1000 мкл.
4. Мини центрифуга Eppendorf.
5. Лабораторная термостатируемая качалка.
6. Вортекс.
7. Термостат твердотельный настольный.
8. Термостат.
9. Холодильник.
10. Стеклоанная колба 500 мл.
11. Стеклоаннные пробирки.

**Биологический материал:**

1. Лабораторный штамм *E.coli*.
2. Плазмида pBR322.

**Ход работы:**

1. Одиочную колонию клеток *E. coli* из чашки перенести в 3 мл LB-среды и выращивать в течение ночи при 37 °С на лабораторной качалке при 200 rpm.
2. 400 мкл ночной культуры перенести в 4 мл LB-среды и инкубировать в течение ~2,5 часов при 37 °С на лабораторной качалке до плотности  $\sim 5 \times 10^7$  клеток/мл ( $OD_{550}=0,5$ ).
3. Культуру охладить на льду в течение 10 минут и центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин.
4. Надосадочную жидкость удалить, осадок клеток ресуспендировать в 1 мл охлажденного трансформирующего буфера.
5. Выдержать на льду 15 минут и центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин.
6. Удалить надосадочную жидкость, осадок клеток ресуспендировать в 200 мкл охлажденного трансформирующего буфера и выдержать на льду 2 часа.
7. Добавить 40 нг плазмиды, аккуратно перемешать и выдержать на льду 30 минут.

8. Далее инкубировать в течение 5 минут при 37 °С («хит-шок»). Добавить 1 мл LB-среды и инкубировать 1 час в термостате при температуре 37 °С.
9. Центрифугировать в течение 5 минут при 3000 об/мин, удалить 1100 мкл надосадочной жидкости, ресуспендировать осадок.
10. Высеять на чашки Петри с селективной средой - LB-агар (содержащей соответствующий антибиотик (50 мкг/мл ампициллина/12 мкг/мл тетрациклина), 0,01 % X-Gal, 1 мМ ИПТГ).
11. Через 16 часов инкубации засеянных чашек произвести подсчет трансформированных колоний синего цвета. Чашки поместить в холодильник (4 °С).

### **Интерпретация результатов**

Присутствие на чашке колоний синего цвета свидетельствует об успешности трансформации, т. е. о приобретении бактериальными клетками гена плазмиды устойчивости к антибиотику.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ**

1. Какие типы плазмидных векторов существуют?
2. Какие ферменты используются в процессе сборки плазмидного вектора?
3. Перечислите основные способы трансформации.
4. Расскажите о строении плазмиды pUC19.
5. Расскажите о новейших методах редактирования генома.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

#### **1. АМПИЦИЛЛИН И ТЕТРАЦИКЛИН – ЭТО**

- 1) анальгетики
- 2) антибиотики
- 3) штаммы
- 4) органические красители

#### **2. В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРОВ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ**

- 1) вирусы
- 2) плазмиды
- 3) фаги
- 4) бактерии

### 3. КОМПЕТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК – ЭТО

- 1) количество плазмидной ДНК в клетке
- 2) способность клеток к поглощению чужеродной ДНК из среды
- 3) способность клеток выживать под действием антибиотиков
- 4) характеристика взаимодействия генномодифицированной клетки с другими клетками

### 4. ИНДУКТОРОМ LAC-ОПЕРОНА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид
- 2) 5-бром-4-хлор-3-индолин-бета-D-галактопиранозид
- 3) ампициллин
- 4) pBR322

### 5. ДЛЯ «РАЗРЕЗАНИЯ» ДНК С ЦЕЛЬЮ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ВСТАВКИ В ВЕКТОР ПРИМЕНЯЮТСЯ

- 1) лигазы
- 2) рестриктазы
- 3) хеликаза
- 4) апираза

## **Занятие № 2. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

### **Краткий обзор занятия**

Выделение и очистка нуклеиновых кислот – это первый шаг в большинстве молекулярно-биологических исследований и во всех методиках, связанных с рекомбинантными ДНК.

Выделение ДНК является одной из основных методик, которыми должен владеть студент. Необходимость этого обусловлена высокой частотой использования ДНК в лабораторной и научной практике. В случае работы с трансформированными организмами часто появляется необходимость выделения уже не тотальной, а только плазмидной ДНК, которую можно будет использовать в будущем, для трансфекции и трансформации выбранных объектов. Для обеспечения максимальной чистоты и количества выхода ДНК создано множество методов ее выделения, которые продолжают модифицироваться и улучшаться. Создаются и совершенствуются наборы для выделения ДНК из различного типа биологического материала. На сегодняшний

день классическим методом можно считать метод выделения ДНК при помощи органических растворителей, таких как фенол-хлороформ.

**Цель:** освоить метод выделения плазмидной ДНК, с использованием органических растворителей.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Этапы выделения нуклеиновых кислот.
2. Основные методики очистки нуклеиновых кислот из клеточных экстрактов.
3. Спектральные характеристики молекул нуклеиновых кислот.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В середине XX в. в области естественных наук были совершены такие фундаментальные открытия, как установление комплементарной структуры ДНК, изучен механизм ее репликации и репарации, расшифровка генетического кода, установление механизма переноса генетической информации в клетке, механизмов работы и регуляция генов и др. Все эти открытия были бы невозможны без предварительного получения самого исследуемого материала. В настоящее время под геномом организма понимают суммарную ДНК гаплоидного набора хромосом и каждого из внехромосомных генетических элементов, содержащуюся в отдельной клетке зародышевой линии многоклеточного организма. В соответствии со структурной организацией генома, все живые организмы разделяют на два надцарства: прокариот и эукариот. Плазмиды найдены практически у всех исследованных бактерий, у некоторых до ~10 видов разных плазмид, каждая из них выполняет свои характерные функции. Плазмиды также обнаружены у некоторых эукариот, например, у дрожжей – три типа различных плазмид. Особенности процедуры выделения плазмидной ДНК обусловлены тем, что бактериальные плазмиды имеют небольшие размеры по сравнению с геномной ДНК, а также находятся в кольцевой замкнутой форме. Как и при выделении тотальной ДНК, выделение плазмидной ДНК начинается с разрушения клеточной стенки с последующим отделением от других высоко- и низкомолекулярных клеточных элементов. Для защиты ДНК от действия катион-зависимых нуклеаз используют ЭДТА, который способствует хелатированию ионов металлов. Для удаления клеточного дебриса и фрагментов бактериальной хромосомы используют центрифугирование или фильтрование.

### Другие наиболее популярные методы

Метод Бирнбойма, метод Доли основан на том, что в щелочных условиях (~рН 12,0–12,5) происходит денатурация линейных молекул ДНК, в то время как кольцевые замкнутые молекулы не денатурируют или денатурируют незначительно и обратимо. После этого проводят нейтрализацию клеточного экстракта – при высокой концентрации соли, белки, геномная ДНК и клеточная РНК осаждаются.

Для получения высокочистых препаратов небольших по размерам ДНК также часто используется метод очистки ДНК на колонках с фильтрами из стекла, кварца или силикагеля. ДНК обратимо сорбируется на поверхность стеклянной мембраны в растворе с высокой концентрацией хаотропной соли, примеси отмываются хаотропной солью и 70 % этанолом. Затем очищенная ДНК элюируется в буфере с низкой ионной силой.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа №1

#### Выделение плазмидной ДНК с использованием органических растворителей

В процессе выделения нуклеиновых кислот из биологического образца необходимо провести лизис клеток, инактивацию клеточных нуклеаз и собственно отделение нуклеиновых кислот от клеточной массы.

**Принцип метода:** метод выделения геномной ДНК основан на лизисе мембран детергентом додецилсульфатом натрия (SDS) с последующей экстракцией ДНК при помощи органических растворителей (фенола и хлороформа) (рис.4).



**Рис. 4.** Схема выделения ДНК при помощи органических растворителей (<http://kak.znate.ru/docs/index-49305.html>)



### **Оборудование:**

1. Термостат.
2. Термокачалка.
3. Микроцентрифуга.
4. Вортекс.
5. Автоматические пипетки.

### **Расходные материалы:**

1. Стерильные чашки Петри.
2. Стерильные стеклянные пробирки.
3. Эппендорфы.
4. Сменные носики для автоматических пипеток.

### **Реагенты:**

1. LB на 100мл: пептон –1 г, дрожжевой экстракт – 0,5 г, NaCl – 0,5 г.
2. Ампициллин сток 50 мг/мл (рабочая – 2 мкл/мл).
3. РНК-аза.
4. Раствор I: 8 % глюкоза, 20мМ трис-HCl, pH 8,0, 100мМ ЭДТА.
5. Раствор II: 0,2М NaOH, 1 % SDS.
6. Раствор III: 3М ацетат калия, pH 5,2.
7. Фенол.
8. Хлороформ.
9. 96 %, 70 % спирт.

### **Биологический материал:** колонии E.Coli

### **Ход работы:**

1. В пробирку с 3 мл среды LB, содержащей антибиотик, засеять одну трансформированную колонию E.Coli с чашки и оставить на ночь при 37 °С раскачиваться.
2. Осадить клетки в течение 1 минуты при максимальных оборотах, супернатант удалить, осадок клеток тщательно ресуспендировать в 100 мкл раствора I.
3. Добавить 200 мкл раствора II, перемешать переворачиванием, избегая сильного встряхивания, выдержать 5 минут;
4. Добавить 200 мкл раствора III, перемешать переворачиванием и снова инкубировать 10 минут.
5. Центрифугировать 10 мин при 12000 об/мин.
6. Супернатант аккуратно отобрать в эппендорф, добавить РНК-азу (1–100 от объёма) и прогреть 5 минут при 65 °С.

7. Добавить фенол-хлороформ (400:400), центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин.
8. Отобратить водную фазу в новую пробирку, добавить 400 мкл хлороформа, центрифугировать 10 минут при 10000 об/мин;
9. Снова отобрать водную фазу, переосадить 2–2,5 объёмами спирта, инкубировать 20 минут при -20 °С.
10. Центрифугировать 10 минут при 12000 об/мин. Осадок промыть 70 % этанолом, высушить и растворить в 20–30 мкл ТЕ буфера.

### **Интерпретация результатов**

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно рассчитать, измерив его оптическую плотность при длине волны 260нм. Так как белки поглощают при длине волны 280нм, отношение  $A_{260}/A_{280}$  используется для определения частоты нуклеиновых кислот. Отношение между оптическими плотностями для чистых препаратов ДНК и РНК на 260 и 280нм должно быть равно 1,8 и 2 соответственно. Поглощение на 230нм отражает загрязнение образца такими веществами, как углеводы, пептиды, фенолы или ароматические соединения. Отношение  $A_{260}/A_{230}$  в случае чистых образцов должно быть примерно 2,2.

Концентрацию рассчитывают по закону Бугера-Ламберта-Бера, используя формулу (1), принимая средний коэффициент экстинкции для двуцепочечной ДНК равным  $0,020 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

Контроль выделенной ДНК проводят также в агарозном 1,5 % геле, где можно выявить три формы плазмиды: суперскрученную, кольцевую и линейную.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ**

1. Какие существуют основные методы выделения ДНК из живых образцов?
2. В чём состоят основные различия при выделении ДНК на колонках и с использованием органических растворителей?
3. Какая методика используется для многократного увеличения интересующей нас области ДНК?
4. Опишите принцип спектрофотометрического анализа нуклеиновых кислот.

5. Охарактеризуйте раствор ДНК, имеющий отношение  $260/280 = 1,6$  и  $260/230 = 1,3$ .

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

1. ПРИНЦИП МЕТОДА СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ –

- 1) измерение вязкости раствора
- 2) измерение оптической плотности
- 3) измерение длины оптического пути
- 4) измерение ионной силы раствора

2. К ВЕЩЕСТВАМ, ИСПОЛЬЗУЮЩИМСЯ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ НУКЛЕАЗ В ПРОЦЕССЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК, ОТНОСЯТ

- 1) протеиназу К
- 2) колхицин
- 3) хаотропные соли
- 4) деионизованную воду

3. ЛИЗИС МЕМБРАН ПРОВОДЯТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ

- 1) стандартного солевого раствора
- 2) додецилсульфата натрия
- 3) фенола
- 4) этанола

4. СВОЙСТВО МОЛЕКУЛЫ ДНК, ПОЗВОЛЯЮЩЕЕ ПРИМЕНЯТЬ ФЕНОЛ-ХЛОРОФОРМНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ЕЁ ВЫДЕЛЕНИЯ, НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) гидрофобностью
- 2) гидрофильностью
- 3) спектральной характеристикой
- 4) ионной силой

5. СРЕДНИЙ КОЭФФИЦИЕНТ МОЛЯРНОЙ ЭКСТИНКЦИИ ДЛЯ ДВУЦЕПОЧНОЙ ДНК РАВЕН

- 1) 0,02
- 2) 0,2
- 3) 2
- 4) 0,002

## Занятие № 3. МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР И ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

### Краткий обзор занятия

Полимеразная цепная реакция является универсальным методом синтеза большого количества интересующей нас последовательности ДНК.

В настоящее время существует многообразие видов и разработано множество методик проведения ПЦР, применяющихся для различных задач. Среди них выделяют ПЦР с обратной транскрипцией, ассиметричную ПЦР, ПРЦ в реальном времени, виртуальная ПЦР (ПЦР *in silico*). В клинической диагностике ПЦР можно применять для решения различных задач, таких как:

1. Идентификация вирусной и бактериальной ДНК в составе ДНК человека.
2. Пренатальная диагностика наследственных заболеваний.
3. Выявление гетерозиготных носителей дефектных генов.
4. Идентификация дефектных генов, нарушающих регуляцию пролиферации клеток и вызывающих развитие опухолевых заболеваний.
5. Проведение анализа и идентификация дефектных генов, содержащих сильно деградированную ДНК (судебная экспертиза — идентификация личности).
6. Генетическое картирование.
7. Анализ уровня транскрипции.

**Цель:** освоить методику проведения полимеразной цепной реакции.

### Вопросы для самоподготовки:

1. Принцип метода полимеразной цепной реакции, основные этапы, условия, выбор праймеров для амплификации.
2. Модификации метода ПЦР и особенности использования ПЦР в лабораторной диагностике и медико-биологических исследованиях.
3. Правила организации и порядок проведения исследований в ПЦР лаборатории.
4. Возможные ошибки при проведении ПЦР.

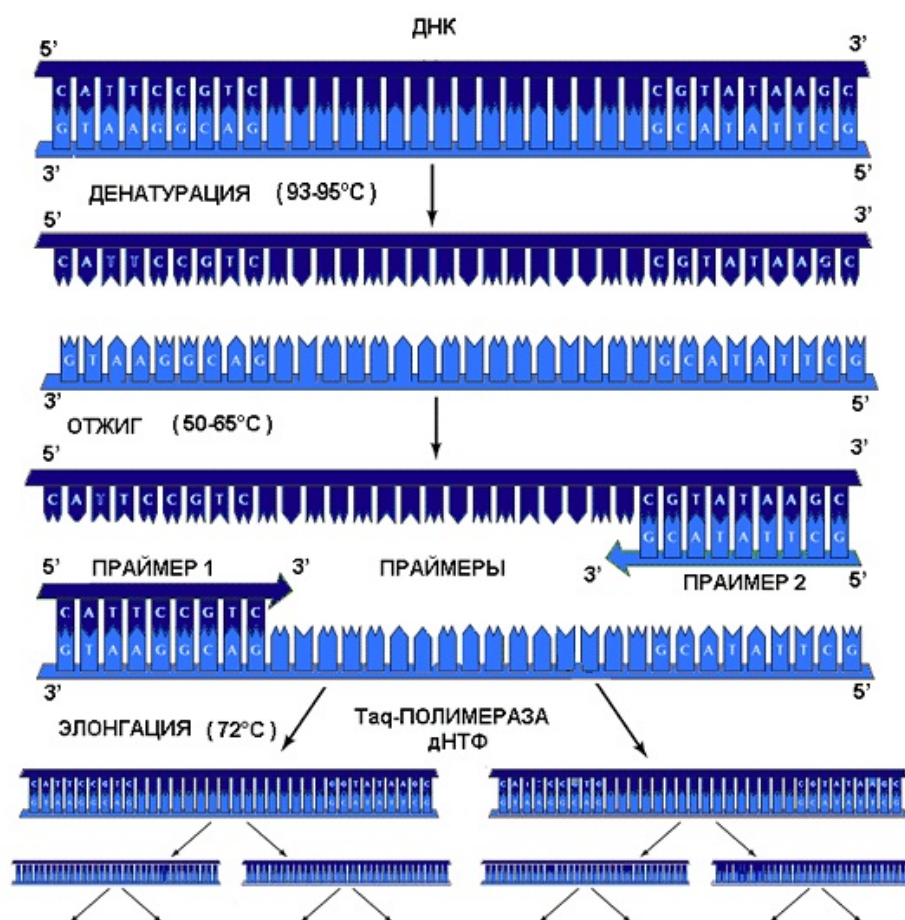
## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Основные этапы полимеразной цепной реакции

- I. Денатурация (94 °С): на этой стадии происходит разрушение водородных связей между двумя цепями молекулы ДНК. Температура денатурации подбирается с учетом следующих задач: «хорошо» денатурировать матрицу; не повредить матрицу и Taq полимеразу.
- II. Отжиг (57 °С): стадия присоединения праймеров к одноцепочечной матрице ДНК. Обычно выбирается температуру отжига на 1–5 °С меньше, чем температура плавления олигонуклеотидов.
- III. Элонгация (72 °С): процесс синтеза второй цепи ДНК от 5' к 3' концу, используя праймер в качестве затравки.

Количество циклов обычно составляет 25–35.

Стадия пост-ПЦР: несколько дополнительных (2–5) циклов без денатурации: только отжиг и удлинение, обеспечивающих превращение некоторого остаточного количества одноцепочечных матриц в двухцепочечные.



**Рис. 5.** Общая схема полимеразной цепной реакции (<http://lages-lab.ru/data/image/articles/im1.gif>)

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа №1

#### Полимеразная цепная реакция

**Принцип метода:** ПЦР позволяет избирательно синтезировать *in vitro* небольшие фрагменты ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, благодаря чередующимся стадиям денатурации, отжига и элонгации.

#### Оборудование:

1. Амплификатор ДНК – программируемый термостат, позволяющий задавать температурный режим, время, количество циклов.
2. Пипетки.
3. Наконечники для пипеток одноразовые.
4. Эппендорфы.

#### Реактивы:

1. Исследуемая ДНК.
2. Таq-полимераза – термофильная ДНК-полимераза, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках и потому устойчивых к действию высоких температур.
3. Дезоксирибонуклеотиды: дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ.
4. Два праймера к IFN- $\gamma$  – олигонуклеотиды длиной 20–30 п.н.
5. Буфер, содержащий  $Mg^{2+}$ .

#### Ход работы:

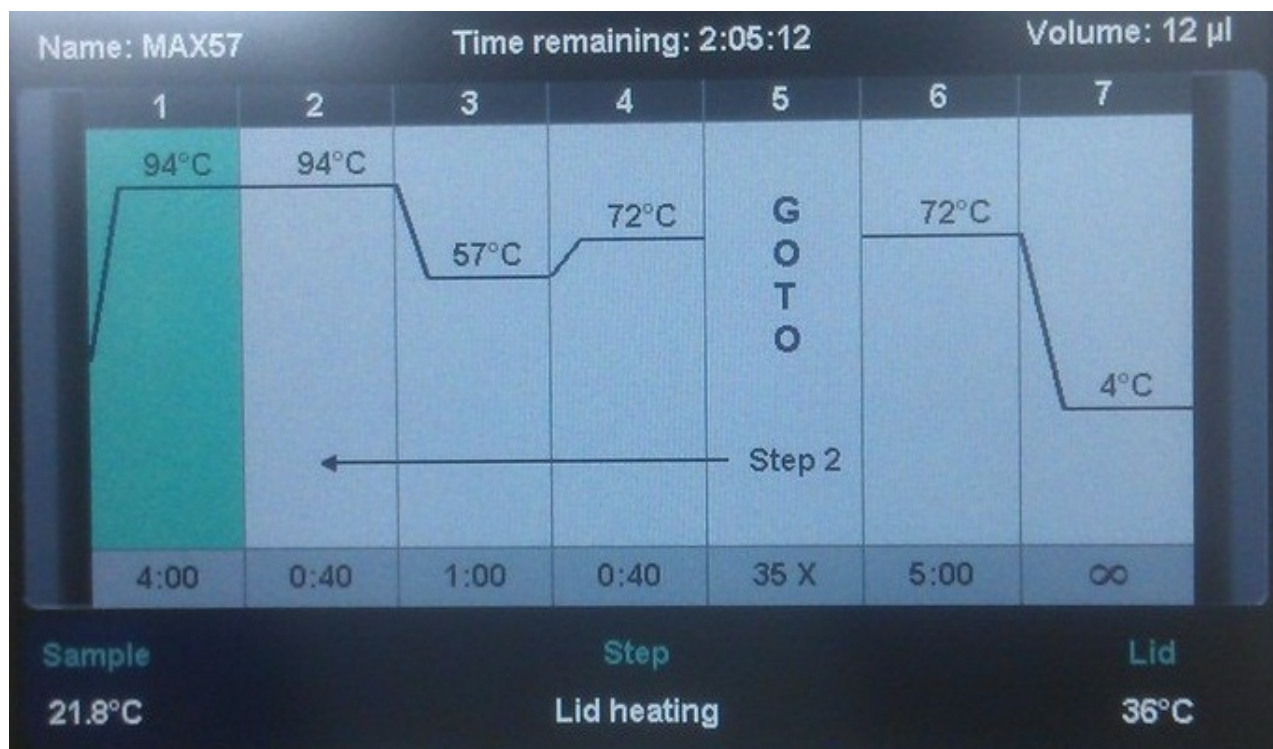
1. Приготовить ПЦР-смесь, согласно таблице 1.
2. Добавить к ПЦР-смеси образец исследуемой ДНК в объёме 1,1 мкл (в концентрации 50–80 нг/мкл).
3. Запрограммировать амплификатор, согласно схеме на рисунке 6.

Таблица 1

Схема приготовления ПЦР-смеси

Реагенты	Объём на одну пробу
Прямой праймер (10 мкМ)	0,36
Обратный праймер (10 мкМ)	0,36
Буфер	1,2
дНТФ (2,5 мМ)	0,8

MgCl <sub>2</sub> (25мМ)	0,8
Тaq-полимераза	0,1
H <sub>2</sub> O	7,4



**Рис. 6.** Схема программирования амплификатора (по данным В.Ю. Сереброва и соавт. (2017))

### Интерпретация результатов

Контроль результатов амплифицирования проводится с помощью электрофореза в агарозном геле.

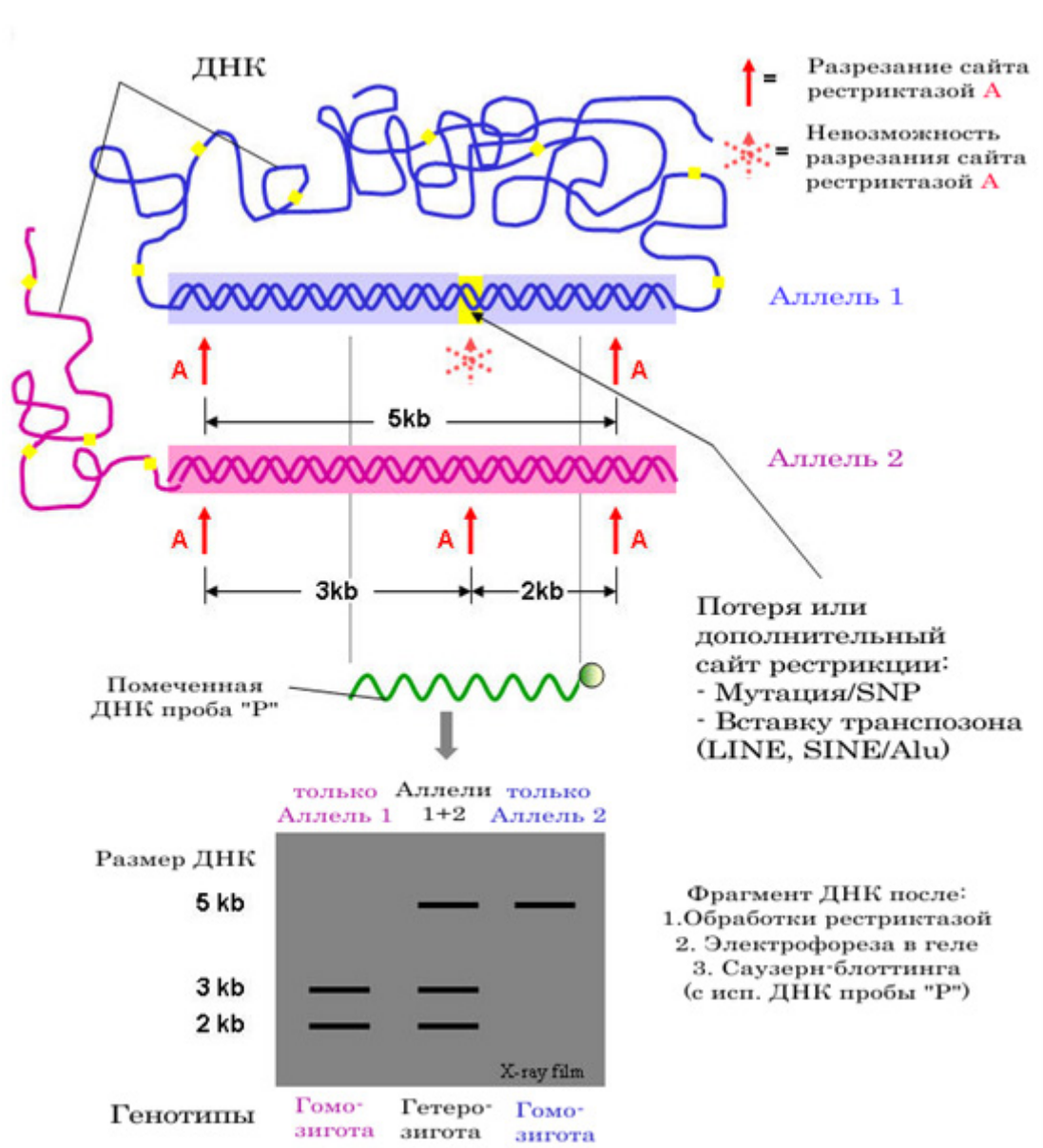
#### Лабораторная работа №2

### Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле с использованием бромистого этидия (EtBr) позволяет легко, обнаружить амплифицированную ДНК и определить её размер.

Одним из примеров применения электрофореза может являться ПДРФ-анализ (рис. 7).





**Рис. 7.** Применение электрофореза при ПДРФ-анализе (полиморфизм длины рестриционных фрагментов) (<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab17-Biol210.htm>)

Мутации, возникающие в участках узнавания определённых рестриктаз, делают эти участки ДНК нечувствительными к действию ферментов. Это может быть легко обнаружено по изменению длины рестриционных фрагментов ДНК. ПДРФ-анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, её рестриктирование специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию этих фрагментов путём блот-гибридизации по Саузерну. На электрофореграммах при отсутствии рестрикции в исследуемой ДНК выявляют один крупный фрагмент,



соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя соседними участками рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном участке на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным участком рестрикции и одним из ближайших постоянных участков рестрикции.

**Цель:** освоить метод проведения электрофореза в агарозном геле.

### **Вопросы для самоподготовки:**

1. Принцип работы гель-электрофореза.
2. Влияние компонентов электрофореза на ход реакции.
3. Области применения гель-электрофореза.

**Принцип метода:** разделение ДНК разной массы при помощи электрического тока. Так как молекула ДНК имеет в своём составе большое количество отрицательно заряженных фосфатных групп, то это способствует её передвижению в сторону анода. Разделение макромолекул зависит от двух переменных: заряда и массы. Линейная двухцепочечная ДНК перемещается через матрикс геля со скоростью, обратно пропорциональной десятичному логарифму ( $\lg$ ) числа нуклеотидных пар. Более крупные молекулы ДНК будут перемещаться медленнее, вследствие их большего сопротивления трения.

### **Оборудование:**

1. Ванна для электрофореза.
2. Трансиллюминар.
3. Автоматические пипетки.
4. Одноразовые наконечники для пипеток.

### **Реактивы:**

1. ТАЕ-буфер.
2. Агароза.
3. Дистиллированная вода.
4. При освещении ультрафиолетовым светом 1% раствор EtBr флюоресцирует оранжевым цветом. При связывании с ДНК интенсивность флюоресценции увеличивается примерно в 20 раз.
5. Библиотека ДНК.

### **Ход работы:**

1. Сварить агарозный гель.

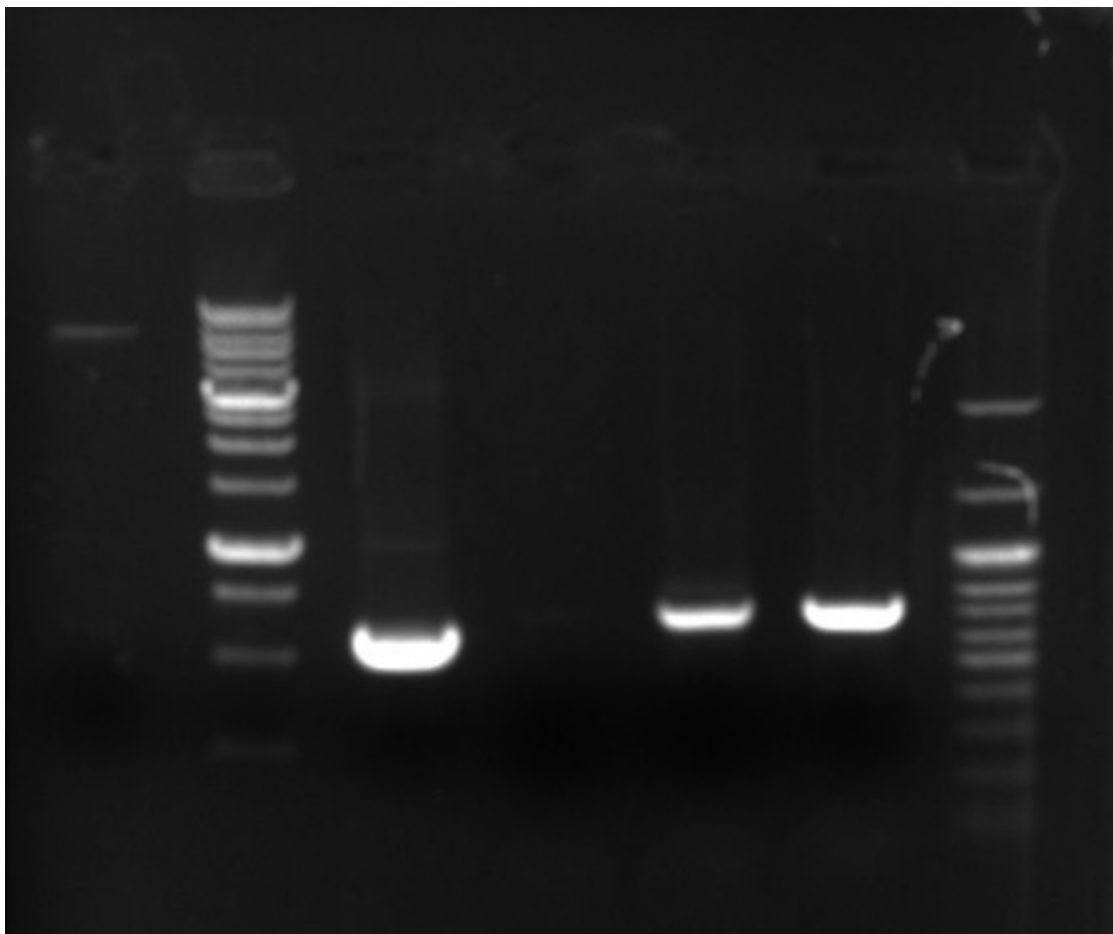
Для приготовления геля объёмом 100 мл нам нужно смешать 2 мл 50хТАЕ-буфера и 98мл воды, добавив туда 1,5 г агарозы. Затем

разогреть смесь в микроволновой печи до однородного состояния и исчезновения пузырьков. Немного охладить и добавить 8мкл бромистого этидия.

2. Залить в ванночку для электрофореза, предварительно вставив туда гребёнку для формирования лунок.
3. Залить 1xTAE-буфером.
4. Раскапать библиотеку и образцы в лунки, предварительно окрасив образцы бромфеноловым синим.
5. Включить установку на 30 мин при  $U=150\text{мВ}$ .
6. Поместить полученный гель в трансиллюминатор для получения результатов.

### **Интерпретация результатов**

После визуализации результатов электрофореза с помощью трансиллюминатора, мы получаем картину распределения ДНК по массе.



**Рис. 8.** Визуализация результатов электрофореза с помощью трансиллюминатора (по данным В.Ю. Сереброва и соавт. (2017))

## ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Состав реакционной смеси для ПЦР.
2. Факторы, влияющие на чувствительность и специфичность ПЦР.
3. Современные модификации ПЦР-метода.
4. Перспективные направления применения ДНК-диагностики на основе ПЦР.
5. Предложите как минимум три типа классификаций для разных типов электрофореза.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

### 1. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ ПРАЙМЕРОВ – ЭТО

- 1) температура, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с олигонуклеотидным праймером
- 2) температура, при которой разрушается половина водородных связей между двумя цепями ДНК
- 3) температура, при которой половина олигонуклеотидных праймеров денатурирует
- 4) температура синтеза олигонуклеотидных праймеров in vitro

### 2. В КАЧЕСТВЕ ВЕЩЕСТВ, СПОСОБНЫХ УВЕЛИЧИВАТЬ ВЫХОД И/ИЛИ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЦР, МОГУТ ПРИМЕНЯТЬСЯ

- 1) Бетаин Na
- 2) DMSO
- 3) BSA
- 4) Гепарин

### 3. ОБЫЧНО КОЛИЧЕСТВО ЦИКЛОВ ПРИ ПЦР СОСТАВЛЯЕТ

- 1) 5–7
- 2) 10–20
- 3) 25–35
- 4) 50–70

### 4. К ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМ ФЛУОРИСЦЕНТНЫМ АГЕНТАМ ОТНОСЯТ

- 1) TaqMan
- 2) SYBR Green
- 3) Molecular Beacons
- 4) LightCycler

5. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ УЧАСТКОВ ДНК С ЧАСТИЧНО ИЛИ ПОЛНОСТЬЮ НЕИЗВЕСТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ, НАЗЫВАЮТ

- 1) прямыми праймерами
- 2) обратными праймерами
- 3) вырожденными праймерами
- 4) праймерами с длиной более 300 п.н.

6. КРАСИТЕЛЕМ В МЕТОДЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) ТАЕ-буфер
- 2) агароза
- 3) EtBr
- 4) EDTA

7. ПДРФ-АНАЛИЗ ВКЛЮЧАЕТ

- 1) блот-гибридизацию
- 2) электрофоретическое разделение образцов ДНК
- 3) выделение ДНК
- 4) рестрикцию эндонуклеазами

8. ЛИНЕЙНАЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНАЯ ДНК ПЕРЕМЕЩАЕТСЯ ЧЕРЕЗ МАТРИКС ГЕЛЯ СО СКОРОСТЬЮ

- 1) равной скорости перемещения одноцепочечной ДНК
- 2) обратно пропорциональной десятичному логарифму ( $\lg$ ) числа нуклеотидных пар
- 3) равной десятичному логарифму ( $\lg$ ) числа нуклеотидных пар
- 4) 20 км/ч

9. ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ ДНК И КРАСИТЕЛЬ ДВИЖУТСЯ В СТОРОНУ

- 1) катода
- 2) анода
- 3) увеличения плотности геля
- 4) уменьшения плотности геля

## **ТЕМА № 2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БЕЛКОВОЙ ЭКСПРЕССИИ**

Лабораторные работы:

- I. Освоение методики определения лептина сыворотки крови (с использованием тест-системы Leptin ELISA, DBS, Канада).
- II. Освоение методов ИФА-анализа и вестерн блоттинга.
- III. Знакомство с методом иммунопреципитации.
- IV. Получение навыков работы с тканями на примере определения уровня пролиферативной активности опухоли методом иммуногистохимии.

### **Занятие № 1. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БЕЛКОВОЙ ЭКСПРЕССИИ: ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, ВЕСТЕРН БЛОТТИНГ, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ**

#### **Краткий обзор занятия**

Целью многих генно-инженерных исследований является создание рекомбинантных молекул ДНК, содержащих гены, которые должны экспрессироваться в клетках-реципиентах. Наиболее часто используемыми методами оценки продуктов экспрессии белков являются иммуноферментный анализ и вестерн блоттинг.

**Цель:** освоить метод твердофазного ИФА с использованием коммерческой иммуноферментной тест-системы, получить супернатанты ткани для выполнения ИФА-анализа и вестерн блоттинга, выполнить некоторые этапы вестерн блоттинга (пробоподготовка, приготовление концентрирующего и разделяющего гелей, электрофорез белков по Lemli), ознакомиться с основным оборудованием для вестерн блоттинга), выделить экзосомы из сыворотки крови или асцитической жидкости методом иммунопреципитации.

#### **Вопросы для самоподготовки:**

- 1 Что такое антиген, гаптен, антитело? Что такое первичные и вторичные антитела?
- 2 Принцип ИФА, Вестерн блоттинга, иммунопреципитации.
- 3 Какие из методов оценки белковой экспрессии являются качественными, полуколичественными, количественными?

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Любое вещество, обладающее свойствами антигена, полноценного или неполноценного (гаптена), можно количественно определить с применением иммуноферментного анализа (ИФА). Для проведения ИФА необходимо иметь очищенный или неочищенный антиген, специфическое антитело, фермент в качестве метки для антигена или антитела и средство для регистрации активности фермента.

Вестерн блоттинг – аналитический метод, используемый для определения специфичных белков в образце. В методе используется 1D-электрофорез белков в полиакриламидном геле для разделения денатурированных полипептидов по молекулярной массе с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную или PVDF мембрану с детекцией с помощью специфических антител. При использовании электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лемли обычно исходят из следующих допущений:

- белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;
- количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;
- собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.

Иммунопреципитация – метод выделения белка из сложных смесей, таких как клеточные лизаты, сыворотки, тканевые гомогенаты с помощью специфических к белку антител, сорбированных на гранулах. Ко-иммунопреципитация – это иммунопреципитация целого белкового комплекса, которая основана на использовании антитела, специфичного к одному из белков, входящих в состав комплекса. Связывая этот белок, антитело связывает весь комплекс. В результате появляется возможность идентифицировать все белки, входящие в состав комплекса. Иммунопреципитация часто дополняется вестерн блоттингом или ИФА-анализом.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа № 1

#### **Определение лептина сыворотки крови (с использованием тест-системы Leptin ELISA, DBS, Канада)**

**Принцип метода:** тест-система представляет собой набор реагентов для определения уровня лептина в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Моноклональные антитела к лептину иммобилизованы на 96-луночном планшете, планшет разборный, состоит из стрипов. Вторые моноклональные антитела, специфичные к другому эпитопу лептина, конъюгированы с биотином. На первом этапе лептин, присутствующий в образцах и стандартных пробах, образует «сэндвич» с иммобилизованными антителами и с биотинилированными антителами. Несвязавшиеся биотинилированные антитела удаляются при промывке. Далее добавляется стрептавидин, меченный пероксидазой. Далее добавляется субстрат для пероксидазы – тетраметилбензидин (ТМБ), дающий голубое окрашивание, пропорциональное количеству лептина. Химическая реакция останавливается добавлением стоп реагента (серная кислота), в результате чего окраска лунок меняется на желтый цвет. Интенсивность окраски считывается при 450 нм. Количество лептина в образце рассчитывается исходя из данных калибровочной кривой. При этом учитывается коэффициент разведения сыворотки крови. При построении калибровочной кривой учитываются предварительные данные по форме кривой, представленные в наборе.

Лептин – адипокин, гормон жировой ткани, находящийся в сыворотке крови. Уровень лептина повышен у больных с ожирением, с метаболическим синдромом. Определение лептина в сыворотке крови рекомендуется для контроля эффективности весо-редуцирующих лечебных и диетических мероприятий по снижению веса.

#### **Реактивы:**

1. Восемилуночные стрипы с иммобилизованными антителами к лептину.
2. Антитела другого эпитопа лептина, связанные с биотином (биотинилированные антитела).
3. Стрептавидин, связанный с пероксидазой хрена (конъюгат).
4. Субстрат для пероксидазы – ТМБ.

5. Две виалы с контрольными образцами лептина (высокий и низкий уровень лептина) – контроль качества; контрольные образцы предназначены для общей оценки качества выполнения данного ИФА-исследования.

6. Концентрат раствора для промывания стрипов и разведения конъюгата.

7. Стоп-реагент (серная кислота).

#### **Оборудование:**

1. ИФА-анализатор.
2. Вошер.
3. Термошейкер.

**Биологический материал:** сыворотка крови.

#### ***Приготовление реагентов***

Общие рекомендации – все реактивы набора, необходимые для выполнения лабораторной работы, должны быть комнатной температуры.

А. Достать планшет из холодильника, отделить нужное количество стрипов, остальные стрипы убрать в холодильник, оставшиеся стрипы необходимо защищать от попадания влаги.

Б. Приготовление раствора для промывания стрипов.

*Раствор для промывания стрипов готовят из концентрата. Для этого необходимо рассчитать объем концентрата, необходимый для промывки 1 стрипа. Далее этот объем необходимо умножить на 9. Развести концентрат дистиллированной водой в соотношении 1/10. При наличии в исходном растворе осадка солей его необходимо подогреть при температуре 37°C до полного растворения осадка. Оставшийся концентрат промывочного буфера хранить при  $T=(6\pm 2)^\circ\text{C}$  не более 1 месяца. Приготовленный раствор стабилен в течение 8 часов.*

В. Приготовление конъюгата из концентрата.

*Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимо отобрать из флакона концентрата конъюгата рассчитанное для покрытия выбранных стрипов количество концентрата и развести его Assay buffer. Остальной концентрат убрать в холодильник. Готовый раствор хранить не более 8 ч при  $T=(6\pm 2)^\circ\text{C}$ .*

Г. Приготовление калибровочных растворов.

*Калибровочные растворы готовы к применению.*

Д. Подготовка контрольных образцов.



*Контрольные образцы готовы к применению*

Е. Подготовка исследуемых сывороток.

*Исследуемые сыворотки крови для данного набора не требуют разведения. В случае получения результатов, не укладывающихся в калибровочную кривую, необходимо образец сыворотки развести Assay buffer и выполнить исследование снова.*

### **Ход работы:**

1. Стрипы закрепить в рамке. Приготовить все необходимые реактивы. В лунки стрипов внести раствор по 20 мкл стандартов, контрольных растворов и образцов сывороток крови. Стандартные растворы необходимо обязательно ставить в дублях.
2. Стрипы выдержать 1–2 мин при комнатной температуре. Затем во все лунки добавить по 80 мкл биотинилированных антител (готовы к применению) и инкубировать 1 час на термошейкере (комнатная температура, 200 rpm).
3. Лунки промыть трехкратно буфером для промывки на автоматическом промывателе. Остатки влаги удалить, постукивая перевернутыми стрипами по фильтровальной бумаге.
4. Пипетировать стрептавидиновый конъюгат по 100 мкл во все лунки, инкубировать 30 минут на термошейкере (комнатная температура, 200 rpm).
5. Лунки промыть трехкратно буфером для промывки на автоматическом промывателе. Остатки влаги удалить, постукивая перевернутыми стрипами по фильтровальной бумаге.
6. Пипетировать в лунки субстрат, инкубировать 10–15 минут при комнатной температуре.
7. Добавить стоп раствор (стоп-реагент – серная кислота).
8. Проконтролировать изменение цвета лунок и считать планшет на ИФА-анализаторе.

### **Регистрация и оценка результатов**

Учет результатов проводят с помощью анализатора колориметрического иммуноферментного. Регистрируют оптическую плотность в лунках планшетов при длине волны 450 нм. Исходя из предполагаемой формы калибровочной кривой, выбирают вариант построения реальной калибровочной кривой: уравнение линейной функции, логарифмической, экспоненциальной.

На основе данных калибровочной кривой рассчитывают данные уровня лептина в образцах сыворотки крови и контрольных образцах.

При получении уровня лептина более 100 нг/мл рекомендуется развести пробу в 8 раз assay buffer и выполнить новое исследование, при расчете результатов необходимо учесть фактор дилуции, равный 8.

## Лабораторная работа № 2

### **Приготовление супернатантов ткани для ИФА-анализа и вестерн блоттинга. Приготовление гелей для вестерн блоттинга и проведение электрофореза белков по Lemli**

**Принцип метода:** принцип получения супернатантов тканей для ИФА-анализа состоит в гомогенизации образца в жидком азоте до порошкообразного состояния, ресуспендировании его в буфере с последующим центрифугированием и выделением супернатанта. Принцип получения супернатантов тканей для вестерн блоттинга состоит в гомогенизации образца в жидком азоте с ресуспендированием его в SDS-буфере с глицерином и бромфеноловым синим с последующим центрифугированием и выделением супернатанта.

Одним из важных этапов вестерн блоттинга является электрофорез смеси денатурированных белков в полиакриламидном геле. Процент акриламида в разделяющем геле определяется молекулярной массой белка. При молекулярной массе белка 24–205 кДа процент акриламида составляет 7,5 %.

#### **Реактивы для приготовления супернатантов тканей для ИФА и вестерн блоттинга:**

1. 50 мМ трис-HCl-буфер (pH=7.5), содержащий 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ EDTA и 100 мМ хлорид натрия.
2. 2XSLB буфер с добавлением SDS и глицерина. Добавляется из расчета 50 мкл 2XSLB буфера на 100 мкл приготовленного супернатанта ткани (при условии, что концентрация белка в пробе составила 3–4 г/л).

#### **Реактивы для приготовления разделяющего и концентрирующего гелей для проведения электрофореза белков, буфера для проведения электрофореза:**

1. Состав разрешающего геля: вода дистиллированная – 2,72 мл, 30 % акриламид – 3,33 мл, трис-буфер (pH=8,8) – 3,75 мл, 10 % SDS–100мкл, персульфат аммония – 100 мкл, TEMED – 20 мкл;

2. Состав концентрирующего геля: вода дистиллированная 2,1 мл, 30 % акрил амид – 500 мкл, трис-буфер (pH=6,8) – 375 мкл, 10 % SDS –30 мкл, персульфат аммония –30 мкл, TEMED – 3 мкл.
3. Буфер для проведения электрофореза белков: 10XTGB-буфер: 30,3 г. трис основного, 144 г. глицина, 10 г. SDS на 1 литр дистиллированной воды. Хранить при 4 °С. Перед использованием необходимо развести водой в 10 раз.

### **Оборудование:**

1. Центрифуга с охлаждением типа Eppendorf.
2. Микродисмембратор.
3. Ячейка для электрофореза.
4. Термостат с функцией кипячения проб.

**Биологический материал:** человеческий биопсийный или операционный материал.

### **Ход работы:**

1. Получение супернатантов тканей для ИФА-анализа.

1.1. Замороженную ткань (около 100 мг) гомогенизировать в жидком азоте на микродисмембраторе, затем ресуспендировать в 300 мкл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 7.5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1мМ EDTA и 100 мМ хлорид натрия.

1.2. Гомогенат центрифугировать в течение 20 мин при 10000 g и 4 °С (центрифуга типа Эппендорф).

1.3. Аспирировать и аликвотировать полученный супернатант. Полученные супернатанты тканей пригодны для выполнения ИФА-анализа. Количество супернатанта, необходимое для добавления в лунку, необходимо подбирать экспериментально исходя из рекомендаций к набору и данных литературы.

2. Получение супернатантов тканей для вестерн блоттинг анализа.

2.1 Приготовить 2XSLB-буфер. Ранее приготовленные супернатанты тканей для ИФА-анализа (100 мкл) развести в 50 мкл 2XSLB-буфера. Супернатанты пригодны для Вестерн блоттинг анализа.

3. Денатурация белковых образцов.

3.1. Приготовленные SLB-пробы прогреть в термостате при 95 °С в течение 10 минут.

4. Приготовление разрешающего и концентрирующего гелей. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лемли. Оценка результатов.

4.1. Подготовить стекла для приготовления геля, залить разрешающий гель до метки.

4.2. Визуализировать полимеризацию геля, залить концентрирующий гель, вставить гребенку.

4.3. Визуализировать полимеризацию концентрирующего геля.

4.4. Убрать гребенку.

4.5. Залить в карманы денатурированные супернатанты.

4.6. Поместить гели в электрофоретическую камеру.

4.7. Камеру заполнить TGB-буфером и выбрать параметры для электрофореза.

4.8. Визуализировать прохождение электрофореза белков.

### Лабораторная работа № 3

#### **Получение экзосом из биологических жидкостей методом иммунопреципитации**

Экзосомы представляют собой микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 30–100 нанометров, секретлируемые различными клетками, детектируемые в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, слюна, моча, грудное молоко), в том числе и патологических (асцитическая жидкость) и способные нести белковые маркеры и генетическую информацию, участвуя в межклеточной коммуникации. Опухолевые экзосомы оказывают выраженное иммуномодулирующее действие, участвуя в опухолевой прогрессии.

**Принцип метода:** набор Echo Quick Exosome Precipitation представляет собой реагент для выделения экзосом из сыворотки крови или асцитической жидкости методом иммунопреципитации (вариант ко-иммунопреципитации).

**Биологический материал:** асцитическая жидкость, сыворотка крови. Не рекомендуется в данной работе использовать плазму крови, поскольку фибриноген мешает экстракции экзосом.

#### **Ход работы:**

1. К 250 мкл сыворотки прибавить 63 мкл Echo Quick Exosome Solution.
2. Смешать и инкубировать при 4 °С 30 минут.

3. Смесь центрифугировать при 1500 g при комнатной температуре в течение 30 минут.
4. Экзосомы после центрифугирования будут выглядеть в виде белого гомогенного осадка.

### **Интерпретация результатов**

Для подтверждения экзосомальной фракции необходимо провести типирование полученного препарата экзосом на наличие CD63 или CD9, например, методом вестерн блоттинг.

## **ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ**

1. ИФА – принцип метода. Основные ошибки при выполнении ИФА.
2. Качественный и количественный ИФА.
3. Гетерогенный ИФА. Конкурентный и неконкурентный.
4. Применение ИФА-анализа в медицинских и биологических исследованиях. Представление результатов ИФА.
5. Принцип вестерн блоттинга, основные этапы.
6. Подходы к визуализации результатов вестерн блоттинга.
7. Формы представления результатов вестерн блоттинга.
8. Хемилюминесцентный метод детекции в вестерн блоттинге.
9. Основные принципы электрофореза белков в полиакриламидном геле по Lemli.
10. Имунопреципитация, принцип метода. С какими другими методами наиболее часто сочетается иммунопреципитация?

## **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

### **1. ПРИНЦИП ИФА-АНАЛИЗА – ЭТО**

- 1) выявление тканевых антигенов с помощью специфичных антител, при этом один из участников иммунологической реакции конъюгирован с ферментом-меткой
- 2) выявление антигена с помощью специфичных антител, при этом один из участников иммунологической реакции конъюгирован с ферментом-меткой

3) выявление антигена с помощью специфичных антител, при этом один из участников иммунологической реакции конъюгирован с меткой-флюорохромом

2. ПРИ ИФА-АНАЛИЗЕ В КАЧЕСТВЕ ФЕРМЕНТА ОБЫЧНО ИСПОЛЬЗУЕТСЯ

- 1) щелочная фосфатаза
- 2) пероксидаза хрена
- 3) лигаза
- 4) супероксиддисмутаза

3. ИФА-АНАЛИЗОМ МОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ

- 1) гаптен
- 2) белок
- 3) антитело
- 4) белковый комплекс

4. МЕТОДОМ КО-ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ МОЖНО ВЫДЕЛИТЬ

- 1) гаптен
- 2) белок
- 3) антитело
- 4) белковый комплекс

5. ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ОБЫЧНО СОЧЕТАЕТСЯ С

- 1) проточной цитофлуориметрией
- 2) ИФА-анализом
- 3) иммуногистохимией
- 4) вестерн блоттингом

6. ИФА БЫВАЕТ

- 1) гомогенный
- 2) аллогенный
- 3) гетерогенный
- 4) конкурентный
- 5) неконкурентный

7. ИФА – ЭТО МЕТОД

- 1) качественный

- 2) полуколичественный
- 3) количественный

8. ВЕСТЕРН БЛОТТИНГ – ЭТО МЕТОД

- 1) качественный
- 2) полуколичественный
- 3) количественный

9. ВЕСТЕРН БЛОТТИНГ – ЭТО МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ

- 1) гаптенов
- 2) белков
- 3) нуклеиновых кислот

10. ТРАДИЦИОННО ПРИ ВЕСТЕРН БЛОТТИНГЕ ПРОВОДЯТ

- 1) 1D-электрофорез
- 2) 2D-электрофорез
- 3) 3D-электрофорез

11. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ПО LEMLI ПРОВОДЯТ

- 1) в агарозном геле
- 2) в полиакриламидном геле
- 3) на силикагеле
- 4) на целлюлозе

12. ИФА-АНАЛИЗОМ МОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ АНТИГЕНЫ В

- 1) сыворотке крови
- 2) моче
- 3) супернатанте ткани
- 4) экссудатах

13. ВТОРИЧНЫЕ АНТИТЕЛА В ВЕСТЕРН БЛОТТИНГЕ КОНЬЮГИРОВАННЫ

- 1) с пероксидазой хрена
- 2) с биотином
- 3) с флюорохромом
- 4) с радиоактивной меткой

#### 14. БЛОКИРОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СВЯЗЫВАНИЯ НА PVDF-МЕМБРАНЕ ДОСТИГАЕТСЯ

- 1) промывкой мембраны
- 2) инкубацией мембраны с блокирующими антителами
- 3) высушиванием мембраны
- 4) замачиванием мембраны в спирте
- 5) помещением мембраны в разбавленный раствор нежирного сухого молока с детергентом

#### 15. ВМЕСТЕ С ОБРАЗЦАМИ НА ГЕЛЬ НАНОСЯТ

- 1) структурный белок (актин)
- 2) белок-маркер молекулярной массы
- 3) очищенную ДНК

### **Занятие № 2. ОЦЕНКА БЕЛКОВОЙ ЭКСПРЕССИИ МЕТОДАМИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ**

#### **Краткий обзор занятия**

Иммуногистохимия является ценным исследовательским методом для получения информации, дополняющей стандартные морфологические окраски. Использование иммуногистохимии для изучения клеточных маркеров, определяющих специфический фенотип, представляет важную диагностическую и прогностическую информацию о статусе болезни и ее биологии.

Качественная морфология обеспечивается при изготовлении срезов с фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, что усложняет большинство клинических и других исследований. В 1968 г. была предложена пероксидазная методика, которая стала не только первым методом окраски антителами парафиновых срезов, но и сняла некоторые ограничения в более ранних флуоресцентных методиках. Эти передовые исследования с использованием ферментной метки вместо флуоресцентного красителя открыли новую эру современных иммуногистохимических методов.

**Цель:** освоить метод иммуногистохимического окрашивания опухолевой ткани из парафиновых блоков.

#### **Вопросы для самоподготовки:**

1. Основные принципы иммуногистохимического окрашивания.



2. Классы и строение иммуноглобулинов.
3. Сравнение поликлональных и моноклональных антител.
4. Критерии фермента наиболее подходящего для иммуногистохимической реакции.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Успешное применение иммуногистохимических методик на парафиновых срезах биопсийного материала стимулировало быстрый прогресс в этой новой развивающейся области и по цепочке привело к внедрению в практику метода иммунопероксидазных мостиков и пероксидазно-антипероксидазного (РАР) метода (рис. 9).

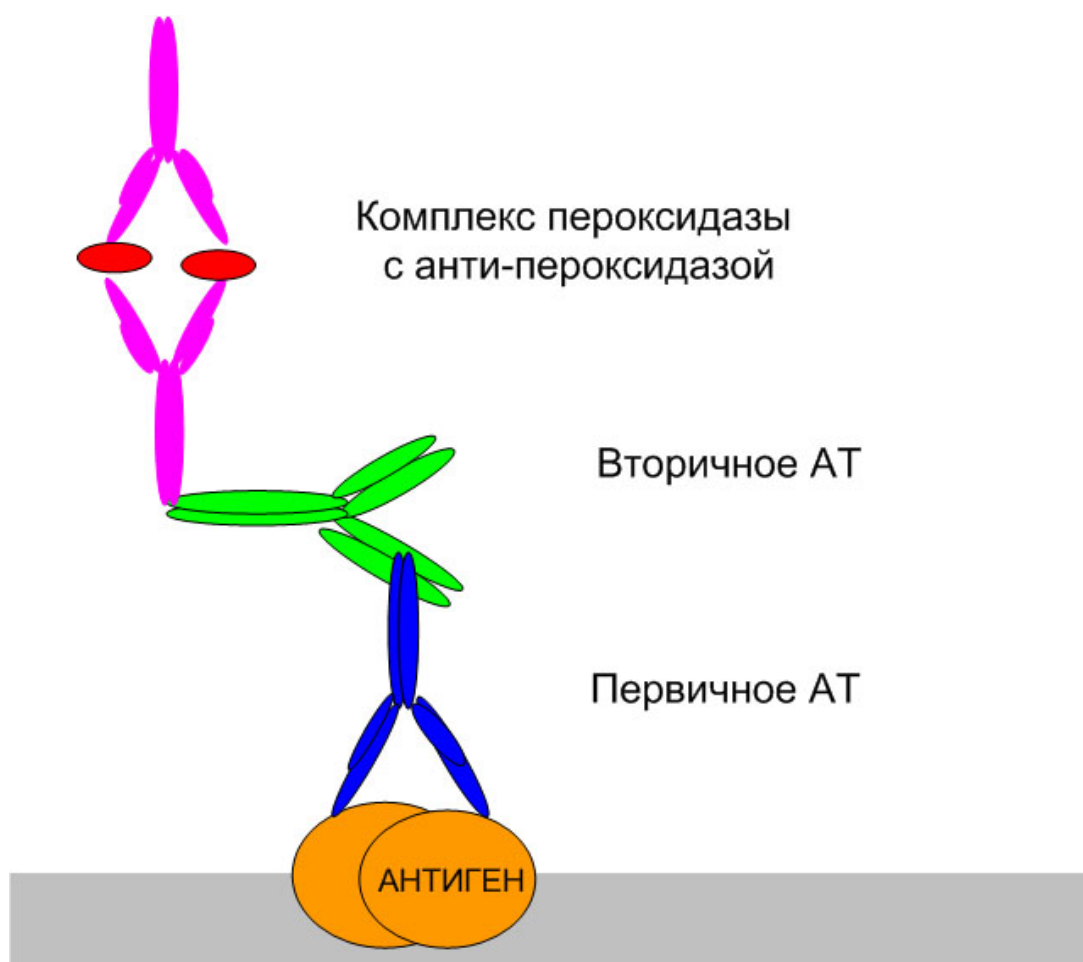


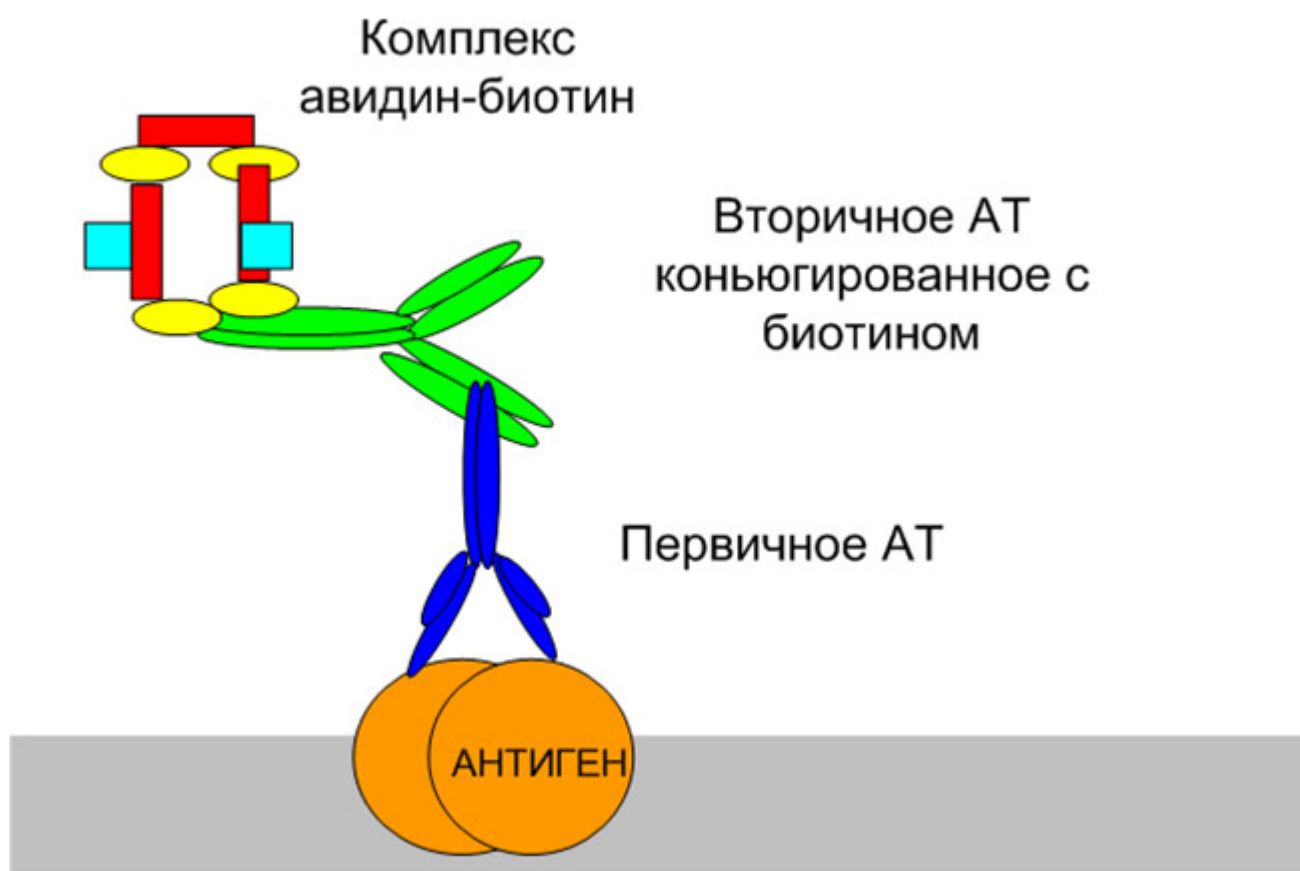
Рис. 9. Пероксидазно-антипероксидазный (РАР) метод (Е.В. Кайгородова, 2017)

### Авидин-биотиновая методика

В 1981 г. с распространением авидин-биотиновых методов появилось целое поколение иммуногистохимических методов, широко распространенных и сегодня. Все авидин-биотиновые методы осно-

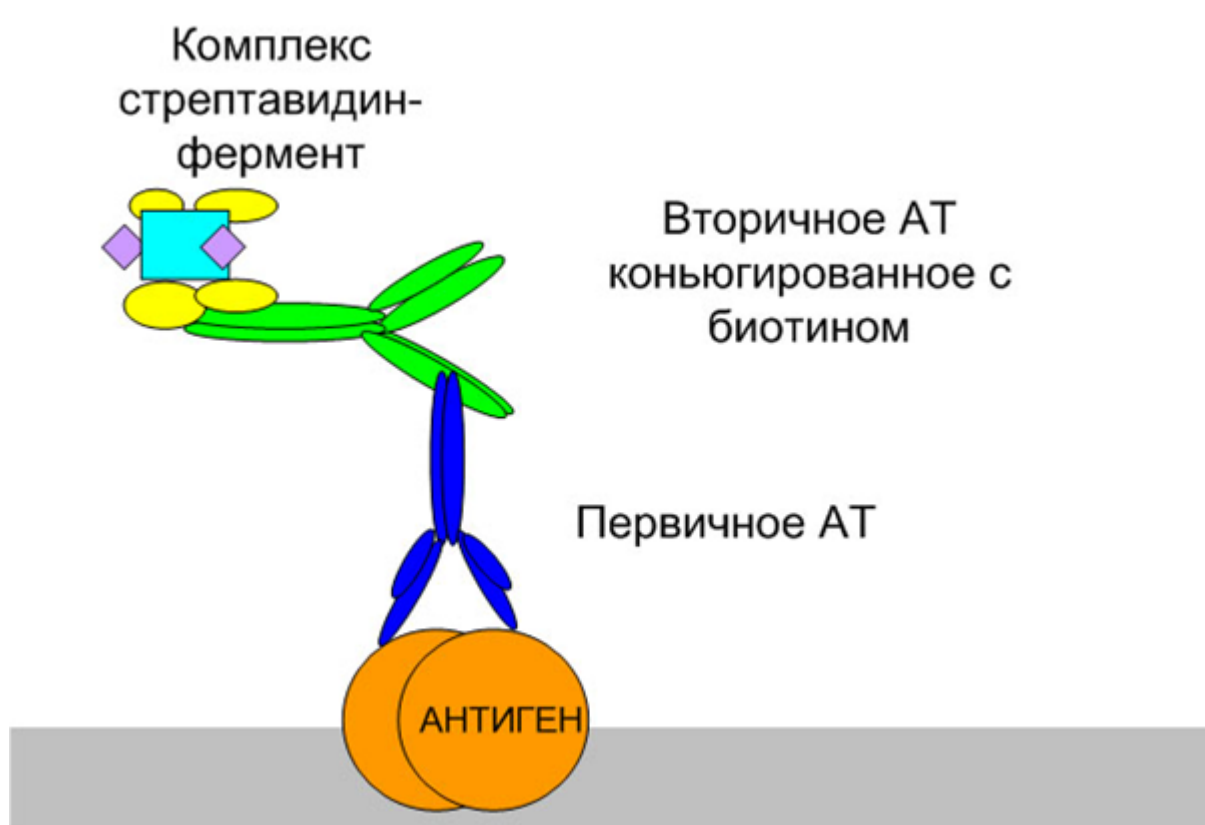
ваны на сильной аффинности авидина или стрептавидина к биотину (витамин Н).

Стрептавидин (получаемый из *Streptomyces avidinii*) и авидин (из куриного яйца) связываются с биотином четырьмя связями. Молекула биотина легко конъюгирует с антителами и ферментами. В авидин-биотиновом методе (рис.10) вторичные антитела конъюгируют с биотином и играют роль мостика между связанными с тканью первичными антителами и авидин-биотин-пероксидазным комплексом.



**Рис. 10.** Непрямая авидин-биотиновая методика (Е.В. Кайгородова, 2017)

В похожей методике LSAB, с использованием стрептавидин-биотина, также применяются биотинированные вторичные антитела, которые связывают первичные антитела с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза (рис.11).



**Рис. 11.** Методика с меченым стрептавидин-биотином (Е.В. Кайгородова, 2017)

В обоих методах одно первичное антитело последовательно (через несколько этапов) связывается с многочисленными пероксидазными молекулами, что обеспечивает увеличение чувствительности по сравнению с прямым пероксидазным методом благодаря большому сродству фермента к антителу.

Поскольку авидин представляет собой гликопротеин, и его изоэлектрическая точка находится в районе рН 10, он имеет склонность к неспецифическому связыванию с лектинами и лектиноподобными веществами, а также с отрицательно заряженными компонентами тканей при физиологических значениях рН. С другой стороны, стрептавидин имеет более нейтральную изоэлектрическую точку и небольшое количество углеводных групп. Эти различия снижают неспецифическую реакцию в ткани.

## **Полимерные системы в иммуногистохимии**

Несмотря на то, что стрептавидин-биотиновые методы все еще широко применяются в повседневной практике, они имеют определенные ограничения при определенных условиях. Присутствие эндогенного биотина в ткани может привести к появлению неспецифического окрашивания при определенных обстоятельствах. Формальная фиксация и заливка в парафин значительно сокращают количество эндогенного биотина, однако остаточная активность может наблюдаться в отдельных тканях, таких как печень или почка. Более того, с введением в практику метода температурной демаскировки антигенов, восстановление биотина стало одним из нежелательных побочных эффектов. Существуют методы частичной инактивации эндогенного биотина, однако это добавляет еще один этап в и без того сложную процедуру иммуногистохимической окраски. Эти недостатки усугубляются при использовании свежемороженых срезов, в которых уровень биотина обычно выше, чем в фиксированных.

Ввиду описанных недостатков стрептавидин-биотиновых методик, сейчас активно развиваются и завоевывают популярность иммуногистохимические методы с применением полимерных систем детекции (рис. 12). Данные методики используют уникальную технологию, в которой на полимерную основу «насаживаются» многочисленные молекулы антител и ферментов. В системе EPOS (Enhanced Polymer One Step) (Dako) с одной декстрановой основой конъюгировано примерно 70 молекул фермента и 10 первичного антитела. Это позволяет сократить всю процедуру иммуногистохимического окрашивания (от первичного антитела до фермента) до одного шага. С другой стороны, недостатком этого метода является необходимость использования только тех первичных антител, которые представляет производитель набора и невозможность использования других антител, имеющихся у пользователя. Для решения этой проблемы был разработан новый тип декстранового полимера, EnVision™ (Dako). Эта система содержит полимерную молекулу, к которой присоединены молекулы фермента, содержащего, в отличие от EPOS, первичные антитела. EnVision™ содержит вторичные антитела, специфичные к мышинным или кроличьим иммуноглобулинам. Этот универсальный реагент может быть использован для обнаружения любого первичного антитела, связанного с тканью мышинового или кроличьего происхождения. Эффективное использование данного метода дало начало новому семейству полимерных методов. Чувствительность этих ме-

тодов в сравнении с LSAB и ABC была сопоставима или даже в большинстве случаев выше. В связи с разработкой нового метода EnVision™ FLEX+, чувствительность стала еще выше, однако при высоком молекулярном весе полимерных конъюгатов в небольшом количестве случаев она ограничивается доступностью некоторых эпитопов из-за пространственных затруднений.

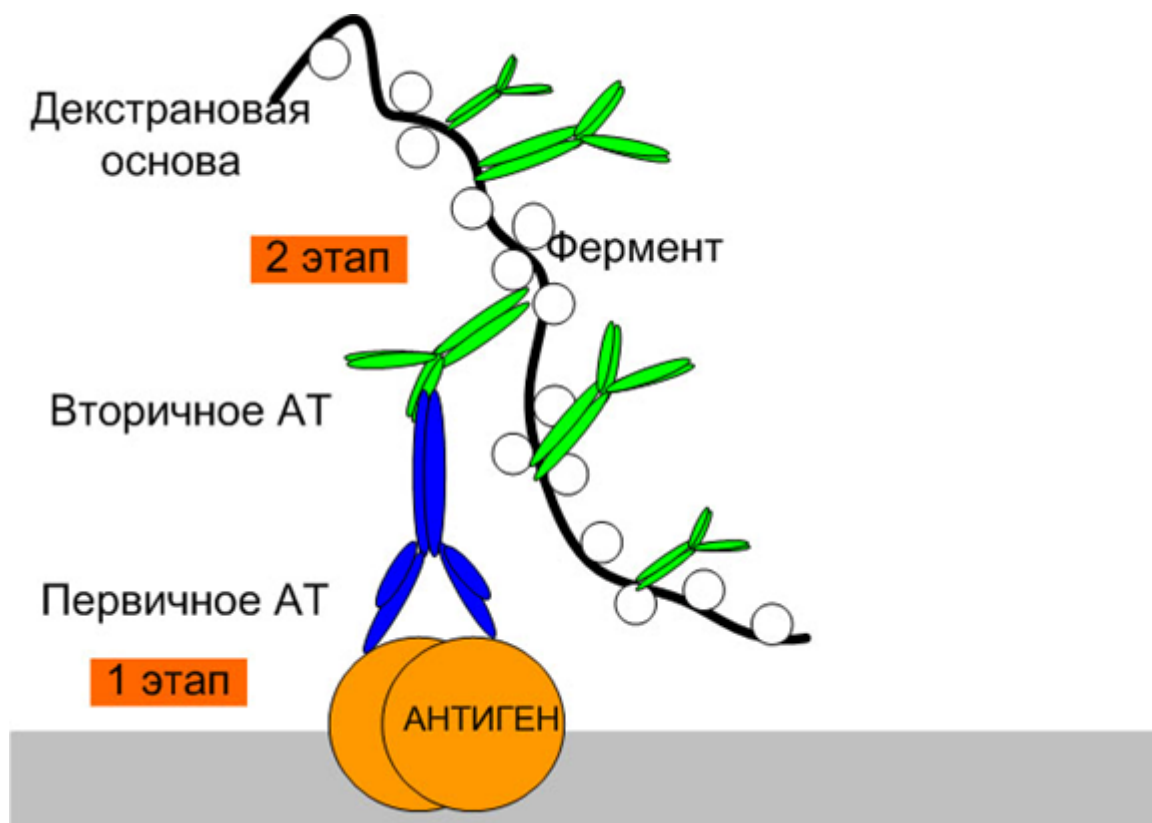


Рис. 12. Двухэтапный полимерный метод (Е.В. Кайгородова, 2017)

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Лабораторная работа № 1

#### **Определение уровня пролиферативной активности опухоли методом иммуногистохимии**

**Принцип метода:** определение уровня пролиферативной активности опухоли определяется на основе маркера пролиферации Ki-67. С помощью моноклональных антител против человеческого Ki-67 биопсийную ткань опухоли (например, рака молочной железы) окрашивают методом иммуногистохимии. После чего под световым микроскопом оценивают количество опухолевых клеток с позитивным

ядерным окрашиванием на Ki-67 и считают процент от общего числа опухолевых клеток. Расчет проводится на 1000 клеток.

### **Реагенты и оборудование:**

1. Ксилол.
2. Спирт этиловый 96 %.
3. Дистиллированная вода.
4. Реагент, блокирующий пероксидазу (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent) Фосфатный буфер, содержащий перекись водорода, 15 мМол/л азид натрия и детергент.
5. Меченый полимер (молекула декстрана, меченая пероксидазой) с козьими анти-кроличьими и анти-мышинными иммуноглобулинами в буфере, содержащем белок-стабилизатор и антимикробный агент (EnVision™ FLEX/HRP).
6. 3,3'- диаминобензидин тетрагидрохлорид, раствор (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen). Цвет реагента может варьировать от насыщенного фиолетового до бесцветного (без влияния на качество окраски при применении набора).
7. Раствор забуференного субстрата, содержащий перекись водорода и консервант (EnVision™ FLEX Substrate Buffer).
8. ТРИС/ЭДТА буфер, pH 9 x 30 мл, концентрат x50 (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)).
9. Раствор Трис-буфера, содержащий Трин 20, pH 7,6 ( $\pm 0,1$ ), концентрат x20 (EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x)).
10. Мышинные моноклональные антитела против Ki-67 человека (клон М1В-1), готовые к работе.
11. Модуль предподготовки PT Link.
12. Отрицательный контроль для соответствующих антител.
13. Водный раствор гематоксилина.
14. Лабораторная посуда и инструменты.
15. Предметные стекла.
16. Заключающая среда и покровные стекла.
17. Световой микроскоп.

### **Подготовка реагентов**

А. Раствор для демаскировки антигенов, высокий pH (50x).

*Развести необходимое количество Раствора для демаскировки 1:50, используя дистиллированную или деионизованную воду. Неиспользованный разведенный раствор может храниться при температуре 2–8 °С 1 месяц. При работе с модулем предподго-*

*товки PT Link разведение может быть осуществлено следующим образом: содержимое флакона выливается в пустую ёмкость и доливается водой до линии Fill Line. Полученный раствор может быть использован 3 раза в течение 5 дней при хранении при комнатной температуре.*

**Б. Промывающий буфер (20х).**

*Развести необходимое количество промывающего буфера 1:20, используя дистиллированную или деионизованную воду. Рекомендуется добавлять необходимое количество концентрата к воде. Осторожно перемешать. Неиспользованный разведенный раствор можно хранить при температуре 2–8 °С 1 месяц. При помутнении раствора больше его не использовать. При работе с модулем предподготовки PT Link раствор может быть использован 3 раза в течение 5 дней при хранении при комнатной температуре.*

**В. Рабочий раствор субстрата.**

*Содержащий ДАБ рабочий раствор субстрата готовится путем перемешивания 1 капли ДАБ+ хромогена и 1 мл субстратного буфера. Готовьте только необходимое количество раствора. Используйте приготовленный раствор в течение 5 дней (при хранении в темноте при 2–8 °С).*

### **Сбор и подготовка образцов**

Могут использоваться фиксированные формалином или замороженные образцы.

Образцы НЕ ДОЛЖНЫ фиксироваться в нейтральном формалине более 24 часов.

Оптимальная толщина залитых в парафин срезов – 4 мкм.

Оптимальная толщина замороженных срезов – 4–6 мкм.

Образцы на предметные стекла должны быть помещены без складок.

### **Ход работы:**

#### **А. Процедура предподготовки**

*Рекомендуется метод «три в одном» с использованием модуля предподготовки PL Link.*

Депарафинизация, регидратация и тепловая демаскировка (восстановление) антигена могут быть проведены на фиксированных

формалином, залитых в парафин образцах тканей, используя метод «три в одном»:

1. Подготовить рабочее разведение Буфера для демаскировки (разведение 1:50 в дистиллированной или деионизованной воде).
2. Заполнить емкости модуля предподготовки (1,5 л) рабочим раствором так, чтобы покрыть стекла с образцами.
3. Запустить РТ модуль, чтобы нагреть раствор до 65 °С.
4. Парафинизированные образцы тканей инкубировать 20–40 минут при температуре 97 °С.
5. Оставить образцы остывать в РТ модуле до 65 °С.
6. Держатели со стеклами переместить в емкость с разведенным промывающим раствором при комнатной температуре.
7. Оставить стекла в промывающем буфере на 1–5 минут.

### **В. Процедура окраски**

1. Обводим срезы гидрофобным карандашом и наносим реагент, блокирующий эндогенную пероксидазную активность (Peroxidase blocking reagent производитель фирма “Dako”) – 5 минут.
2. Помещаем стекла со срезами в дистиллированную воду – 1 порция 5 минут.
3. Промываем стекла со срезами в фосфатном буфере – 1 порция 5 минут.
4. Наносим первичные антитела на 30 минут при температуре 25 °С .
5. Промываем стекла со срезами в промывочном фосфатном буфере – 2 порции по 5 мин.
6. Наносим компонент системы визуализации полимер (EnVision™ FLEX/HRP) – на 30 минут при температуре 25 °С.
7. Промываем стекла со срезами в промывочном фосфатном буфере – 2 порции по 5 минут.
8. Далее, наносим раствор диаминобензидина на 5 минут (контролируем появление окраски/ход реакции под микроскопом).
9. Промываем стекла со срезами в водопроводной воде – 10 минут.
10. Докрашиваем срезы гематоксилином –10 с.
11. Помещаем стекла с окрашенными срезами в водопроводную воду на 10 минут.
12. Проводим стекла со срезами по спиртам (96°) – 3 порции по 5 минут.
13. Проводим стекла со срезами по толуолу – 3 порции по 5 минут.
14. Далее заключаем срезы в канадский бальзам.



15. Маркируем стекла согласно протоколу.

### **Контроль качества**

Каждый раз при иммуногистохимическом окрашивании следует использовать положительный контроль для определения качества работы используемых реагентов. Если на контрольном образце не выявляется окрашивание, следует признать недействительными результаты окрашивания всех остальных образцов.

Отрицательный контроль следует использовать для выявления неспецифического окрашивания.

### **Интерпретация результатов**

Окрашивание рабочим раствором диаминобензида дает коричневое окрашивание в месте соединения антигена-мишени с антителами. В случае специфического окрашивания коричневый цвет, так же как на контрольном слайде (положительный контроль), наблюдается в месте ожидаемой локализации искомого антигена. В случае неспецифического окрашивания, при котором наблюдается диффузное окрашивание в коричневый цвет по всему слайду, следует сравнить образец с отрицательным контролем. Ядра клеток должны быть окрашены в синий цвет после докраски гематоксилином.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ**

1. Основные этапы иммуногистохимического окрашивания.
2. Пероксидазно-антипероксидазный метод.
3. Авидин-биотиновая методика.
4. Методика с меченым стрептавидин-биотином.
5. Двухэтапный полимерный метод EnVision™.

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

1. СУЩЕСТВУЕТ ... ОСНОВНЫХ КЛАССОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ.

- 1) два
- 2) три
- 3) четыре
- 4) пять

2. КАЖДЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИН СОСТОИТ ИЗ

- 1) одной легкой (L) и одной тяжелой (H) цепи

- 2) из двух легких (L) и двух тяжелых (H) цепей
- 3) из одной легкой (L) и двух тяжелых (H) цепей
- 4) из двух легких (L) и четырех тяжелых (H) цепей

3. К КЛАССУ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ЧАЩЕ ВСЕГО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ИММУНОГИСТОХИМИИ, ОТНОСЯТСЯ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА

- 1) IgA
- 2) IgM
- 3) IgE
- 4) IgG
- 5) IgG и IgM

4. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА – ЭТО

- 1) гомогенная популяция иммуноглобулинов, направленных против одного эпитопа антигена
- 2) гетерогенная смесь антител, направленных против различных эпитопов одного и того же антигена
- 3) популяция иммуноглобулинов класса G, направленных против различных эпитопов
- 4) популяция иммуноглобулинов класса G, направленных против различных эпитопов одного и того же антигена

5. КРИТЕРИЯМИ ФЕРМЕНТА, НАИБОЛЕЕ ПОДХОДЯЩЕГО ДЛЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) фермент должен быть доступен в высокоочищенной форме и быть относительно недорогим
- 2) конъюгация (ковалентное связывание с антителом или авидином, например) или нековалентное связывание не должно полностью подавлять активность фермента, хотя они могут ее ослабить
- 3) связанный фермент должен быть стабилен в растворе
- 4) эндогенная активность фермента только в минимальной степени должна мешать оценке специфического окрашивания, связанного с антигеном
- 5) продукты ферментативных реакций должны легко обнаруживаться и быть стабильными

6. ДЛЯ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА (HRP) ХАРАКТЕРНЫ СЛЕДУЮЩИЕ СВОЙСТВА

- 1) молекулярная масса 100 кДа

- 2) отщепление и перенос фосфатных групп из органических эфиров путем разрушения связи  $P=O$
- 3) молекулярная масса 40 кДа
- 4) выделяется из растения *Cochlearia armoricana*
- 5) активный центр фермента представляет собой железосодержащую группу гемма (гематин)
- 6) окрашивается в растворе в коричневый цвет
- 7) активный центр фермента сначала образует комплекс  $H_2O_2$ , затем вызывает ее распад, приводя к образованию воды и атома кислорода
- 8) может быть присоединена к другим белкам посредством как ковалентной, так и нековалентной связей, также конъюгируется со стрептавидином и биотином

## ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

**1. Лабораторная работа. Трансформация бактериальных клеток с использованием хлористого кальция.**

Номер задания	Номер ответа
1	2
2	1,2,3
3	2
4	1
5	2

**2. Лабораторная работа. Выделение плазмидной ДНК.**

Номер задания	Номер ответа
1	2
2	1,3
3	1
4	2
5	1

**3. Лабораторные работы. Полимеразная цепная реакция. Электрофорез.**

Номер задания	Номер ответа
1	1
2	1,2,3
3	3
4	2
5	3
6	3
7	1,2,3,4
8	2
9	2

**4. Лабораторная работа. Методы оценки белковой экспрессии: иммуноферментный анализ, вестерн блоттинг, иммунопреципитация.**

Номер задания	Номер ответа
1	1
2	1, 2
3	1, 2, 3
4	4
5	2,4
6	1, 3, 4, 5
7	1, 3
8	2
9	2
10	1
11	2
12	1, 2, 3, 4
13	1, 2, 3, 4
14	4
15	2

**5. Лабораторная работа. Основы иммуногистохимического окрашивания.**

Номер задания	Номер ответа
1	4
2	2
3	4
4	1
5	1, 2, 3, 4, 5
6	3, 4, 5, 6, 7

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### Основная:

1. Практикум по молекулярной биологии / А.С. Коничев, И.Л. Цветков, А.П. Попов и др. – М.: Колос С, 2012 – 151 с.
2. Льюин Б. Гены. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 896 с.
3. Б. Глик, Дж. Пастернак Молекулярная биотехнология. Принципы и применение – М.: «Мир», 2002. – 589 с.
4. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: учебно-справ. пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004 – 496 с.
5. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. – М.: Наука, 2000. – 830 с.
6. Петров С.В., Райхлин Н.Г. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2012. – 623 с.
7. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed.by George L. Kumar, Lars Rudbeck.:Dako / Пер.с англ. под ред. Г.А. Франка и П.Г. Малькова. – М., 2011. – 224с.

### Дополнительная литература:

1. Pennisi A.P., Barr V., Nunez N.P. et al. Expression of insuline-like growth factor I receptors in MCF breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype // *Cancer Research*. 2002; 62: 6529–6537.
2. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots // *Expert Rev Proteomics*. 2014 Oct;11(5):549–60.
3. Предсказательное значение ряда молекулярных параметров у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы / Брагина О.Д., Слонимская Е.М., Завьялова М.В., Телегина Н.С., Перельмутер В.М., Тарабановская Н.А., Дорошенко А.В. // *Сибирский онкологический журнал*. 2014. № 3. С. 5–10.
4. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [review]. *J Cell Physiol* 2000; 182:311–22.
5. Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential // *Lancet Oncol*. 2010. Vol. 11 (2). P. 174–183.

Учебное издание

Авторы:

В.Ю. Серебров, Е.В. Кайгородова, Н.В. Юнусова, А.К. Сомов,  
А.Э. Сазонов

ПРАКТИКУМ  
ПО МЕДИЦИНСКИМ БИОТЕХНОЛОГИЯМ С ОСНОВАМИ  
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

учебное пособие  
для студентов медико-биологического факультета

Под редакцией проф. В.Ю. Сереброва

Редактор Е.В. Антошина  
Оригинал-макет И.Г. Забоенкова  
Обложка Е.В. Кайгородова

Издательство СибГМУ  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107  
тел. 8(3822) 51-41-53  
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

---

Подписано в печать 20.06.17  
Формат 60x84  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная.  
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 3,4. Авт. лист. 1,8  
Тираж 70 экз. Заказ №

---

Отпечатано в Издательстве СибГМУ  
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2  
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru