



МЕТОДИЧЕСКИЙ ПРАКТИКУМ

ПО БИОХИМИИ, МИКРОБИОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Авторы: Э. Квеситадзе

К. Муселиани

Т. Хобелия

Т. Мантидзе

Тбилиси

2024

От автора

Предложенный практикум предназначен для широкого профиля обучающихся. Программа включает в себя приобретение навыков лабораторных работ, в области биохимии, биотехнологий и других ассоциированных предметов с биохимией. В качестве тест-наборов предлагаются наборы включающие в себя курс бакалавриата и практикум для магистров выше описанных специальностей. Наборы также включают высшие классы школьного образования, также данные наборы можно использовать для обучения слушателей колледжей.

Школьная программа даёт общее впечатление о сфере деятельности в области естествознания. Не углубляясь в подробности методологических деталей школьники получают первую информацию о сфере дальнейшей деятельности. Следующим этапом познаний предлагаются наборы для бакалавриата, где студенты изучают упрощенные методы в таких областях, как энзимология, хроматография (включающая в себя гель-фильтрационную, ионообменную и тонкослойную хроматографии, электрофорез (включающий нативный электрофорез, а также электрофорез в денатурирующих условиях).

Практикум также включает в себя иммунохимические методы анализа. В рамках данной тематики студент учится проводить иммунохимические анализы применяемые на различных этапах иммунизации. Как правило, первый этап иммунизации включает в себя проверку иммунного ответа животного. Для достижения этих цели применяется метод преципитаций в агарозном геле.

Следующим этапом является метод определения титра антител. Для данного анализа применяют метод DOT.

После завершения иммунизации и определения титра антител, проводят анализы антигена, к которому были получены антитела. Метод применяющийся для этого называется ELISA.

Все вышеупомянутые методы проводятся студентом на модельных наборах. Этот практикум предназначен для того, чтобы студент получил общие представления о методах упомянутых выше. Иными словами, пройдя этот курс обучения студент еще не готов к проведению научных экспериментов. Он всего лишь имеет представление о методах.

Программа магистратуры включает в себя подготовку слушателя к экспериментам научного уровня. Примером может служить электрофорез. В программе бакалавриата ставится электрофорез в агарозном геле, что дает ему представление об электрофорезе в целом. А в программе магистратуры, студент обучается проведению электрофореза в поликарбидном геле, а также определять зигомограммную активность в геле электрофореза. Ясно, что после приобретения таких навыков, магистрант может проводить эксперименты на высоком уровне соответствующему потребности программам магистра и докторанта. Эти методы описаны в издательстве II-го уровня.

Познания в области микробиологии, развиваются от программы бакалавриата и до программ магистров, после чего слушатель может выполнять микробиологические работы любой сложности.

Практикум также включает в себя теоретические основы по всем вышеуказанным направлениям. Что касается деления программ на: курс школьный, курс бакалавриата и магистратуры, носит только рекомендательный характер. Лектор самовольно вне зависимости от нашей рекомендации, может сам составлять программу обучения выбирая наборы по своему усмотрению.

О Г Л А В Л Е Н И Е

1. Принципы и методы спектрометрии	1
1.1 СПЕКТРОМЕТРИЯ	1
1.2. Аналитические методы в спектрометрии	3
Лабораторный практикум главы 1.2	6
1.2.А Построение калибровочной кривой для определения концентрации глюкозы	6
1.2.Б Определение глюкозы	9
1.2.В Построение калибровочной кривой для определения концентрации белка	11
1.2.Г Определение концентрации белка	14
1.3. Энзимология	16
1.3.1 Определение фермент-субстратной зависимости и константы Michaelis-Menten (Km)	16
1.3.2 Определение ферментативной активности инвертазы	19
1.3.3 Обучение методом осаждения белков и высаливания	20
1.3.4. Гидролиз сахарозы	21
1.3.А Определение фермент-субстратной зависимости и константы Михаэлиса-Ментена (Km)	22
1.3.Б Определение активности фермента инвертазы	25
Изучение высаливания и осаждения Часть – I	30
1.3.В Высаливание	30
1.3.Г Осаждение	31
1.3.Д Гидролиз сахарозы	33
2. Хроматография	36
2.1 Тонкослойная хроматография	36
2.2 Гель-фильтрационная хроматография	38
2.3 Ионообменная хроматография	39
Лабораторный практикум главы 2	41
2.А Тонкослойная хроматография	41
2.Б Гель-фильтрационная хроматография	42
2.В Ионообменная хроматография	46
3. Электрофорез	51
3.1 Принцип метода электрофореза белков	53

3.2 Особенности электрофореза в полиакриламидном геле	57
3.А Электрофорез в нативных условиях	63
3.Б Электрофорез в денатурирующих условиях	67
4. Микробиология	71
4.1 Питательные среды	71
4.2 Окраска по Граму	74
4.3 Антибиотики.	77
4.А Подготовка микробиологических сред	79
4.Б Посев в стерильных условиях	81
4.В Получение колоний в чистом виде	83
4.Г Окраска по Граму	85
4.Д Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам	87
5. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИФА	90
5.1 Структура и свойства антигенов и антител	90
5.2 Структура антител	92
5.3 Ферменты как метки в иммуноанализе	97
5.4 Методы иммуноферментного анализа	97
5.5 Гетерогенные методы иммуноферментного анализа	98
5.6 Гомогенные методы иммуноферментного анализа	100
5.7 Иммуноферментный анализ или метод (ИФА)	100
5.А Метод определения антиген антителного взаимодействия преципитацией	102
5.Б Метод - DOT и установление титра	104
5.В Изучение принципов метода ELISA	108

1. Принципы и методы спектрометрии

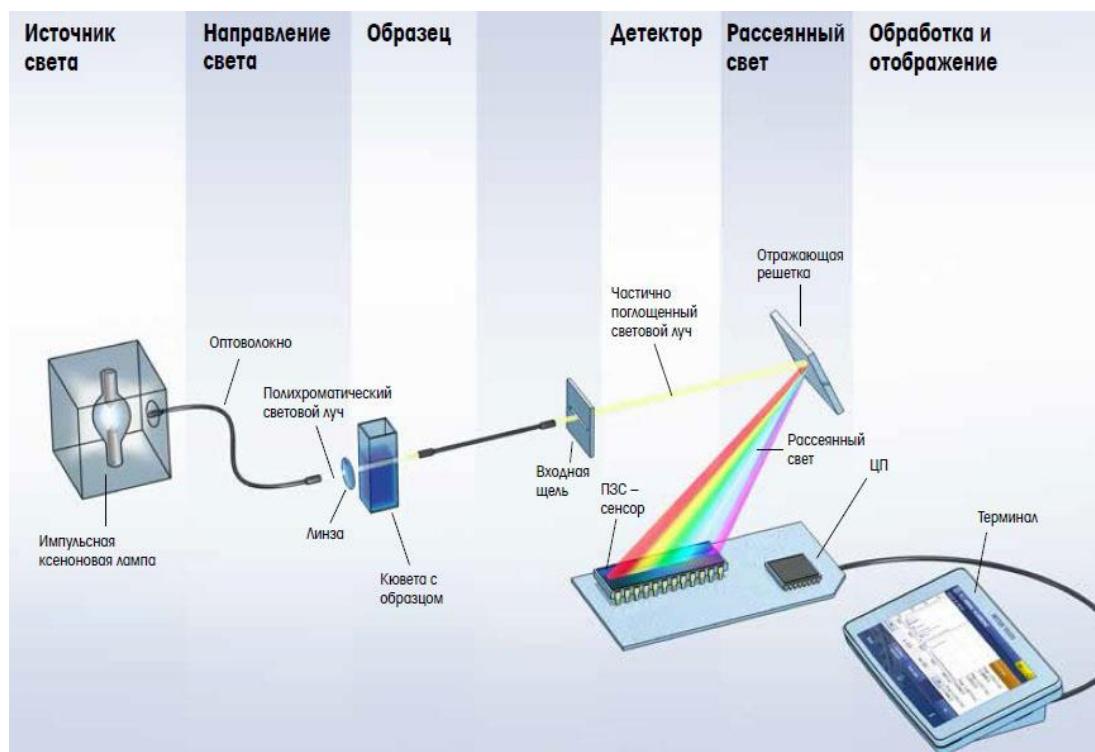
1.1 СПЕКТРОМЕТРИЯ

Спектрофотометр – это высокотехнологичный прибор, необходимый для измерения спектральной зависимости степени поглощения или пропускания, оптической плотности с целью определения концентрации различных веществ в растворах посредством электромагнитного излучения: видимого, инфракрасного, ультрафиолетового.

Принцип работы

Методы спектрометрии предполагают анализ спектрального состава разных биологических материалов с помощью отраженного или поглощенного (прошедшего через них) электромагнитного излучения в оптическом диапазоне по их способности отражать (поглощать) различные длины волн. Для этого проводится сравнение двух фотопотоков оптического излучения: падающего на образец и прошедшего или отраженного от/через образец, см. Рис. 1.1

Рис. 1.1



Эффективность данного анализа состоит в том, что все вещества по-разному поглощают свет при разной длине волны. По количеству поглощенного света можно установить концентрацию вещества, изучить состав его элементов. Анализ можно проводить в количественном и в качественном аспектах.

Устройство спектрофотометра

Спектральные анализаторы разных видов состоят из следующих основных элементов:

- источник света в виде разного вида ламп – вольфрамовых (видимый и инфракрасный спектр), дейтериевых (УФ-диапазон), комбинации галогено-дейтериевых (ультрафиолетовый и инфракрасный);
- монохроматора – призм, дифракционных решеток для выделения узких участков спектра оптического излучения;
- преломляющих, отражающих, дифракционных оптических элементов – для направления светового потока (стекла, призмы, зеркала, световоды);
- отделение или кювета для размещения исследуемого вещества, твердого или жидкого;
- фотоприемника – для фиксации уровня светового излучения, который проходит через исследуемый образец;
- усилителя сигналов – для передачи сигналов после определенного преобразования для обработки на компьютер.

Спектрофотометры имеют широкий масштаб возможностей. Они применяются для измерения концентрации веществ, их плотности, наличия различных включений, выявления примесей. Также они определяют возможности и скорость изменения показателей при модификации состава. Нередко используются для точной классификации цветов, спектрального анализа.

https://pe-lab.ru/blog/chto_takoe_spektrofotometr/

1.2. Аналитические методы в спектрометрии

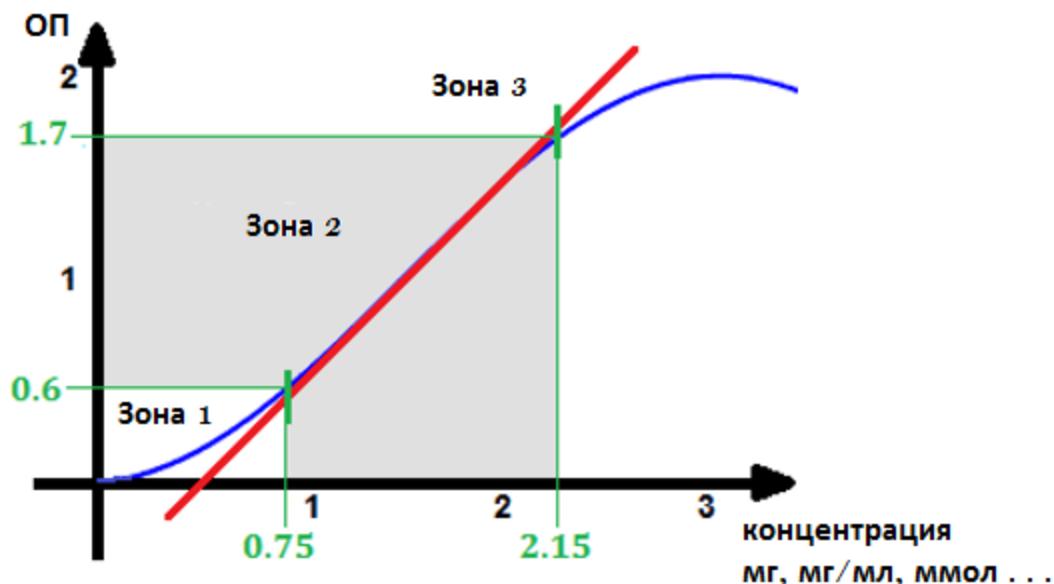
Построение калибровочных кривых

В процессе построение калибровочных кривых, студент обучается технике разбавления, измерения и построения графиков. Студент начинает понимать значение стандартных растворов и калибровочных кривых, которая классически строится как зависимость показателей колориметром оптических плотностей и концентрацией анализируемого соединения (см. рис. 1.2) имеет 3 зоны:

1. Не чувствительная зона - редко присутствует в реальных экспериментах
2. Прямо пропорциональная зона (реакция первого порядка)
3. Зона зашкала (реакция нулевого порядка)

1 зона, когда не хватает чувствительности на то или иное соединение и с повышением концентрации соединения оптическая плотность либо не увеличивается, либо увеличивается непропорционально. 2 зона, это прямо пропорциональная зависимость, математически выражается $y=ax+b$. Эта зона, так называемая рабочая зона-2 - реакция первого порядка. То есть с повышением концентрации того или иного соединения значение оптической плотности ОП увеличивается пропорционально. Студенту объясняется, что как оптические плотности, так и концентрации различных соединений не должны выходить за рамки показатели зоны-2. Из рисунка видно, что во время конкретного эксперимента значения OD могут варьировать от 0.6 до 1.7 показателя абсорбции, и от 1.1 до 2.15 концентрации или количества исследуемого соединения. Все значения получаемые выше или ниже зоны 2 неверны для расчётов. Зона 3, если показатели (анализируемого соединения) выше показателей, чем в зоне 2, значения оказываются в зоне 3. В данной зоне, как и в зоне 1 (в связи с тем, что этот участок не является прямо пропорциональной) не правильно высчитывать значения. В случае повышенных экспериментальных показателей, проба разбавляется до тех пор, пока показатели оптической плотности не окажутся в пределах зоны 2.

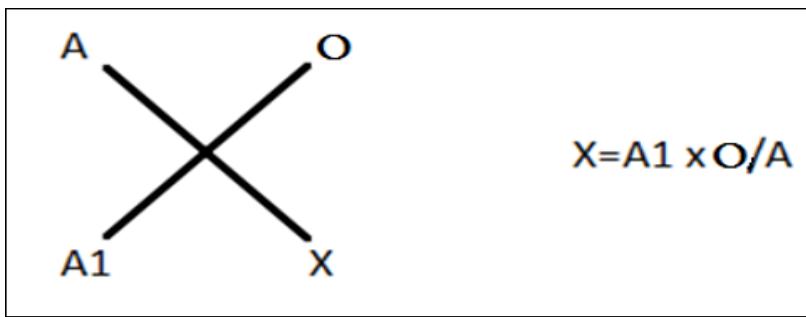
Рис. 1.2



Определение концентрации биологически активных соединений

Практикум включает методы определения концентрации белка и глюкозы в биологическом экстракте (в данном случае гидролизат молока, и гидролизат концентрата (сгущённого) молока). Значения показателей белка и глюкозы, в гидролизате молока должны оказаться во второй зоне. Учитывая, что в этой зоне зависимость прямо пропорциональная, можно проводить расчёты следующими методами: Графическое нахождение (применяется, когда калибровочная кривая стабильная и нет опасности её сдвига, также, когда экономится реагент). Измерения со стандартным раствором (применяется если есть опасность сдвига кривой или изменения угла наклона). Согласно данным стандартного раствора, если значение ОП образца или стандартного раствора находится в зоне-2, то расчет проводится химической пропорцией:

Рис. 1.3



где А - оптический показатель стандартного раствора, О - концентрация соответствующего стандарта, А₁ - оптический показатель искомого раствора, Х – искомое значение, концентрация, искомого раствора. Пример. Значение оптической плотности стандартного раствора должна соответствовать 1,7 OD (см. Рис. 1.3). Предположим, что OD - исследуемого раствора 0.6, тогда согласно пропорции, $X=0.6 \times 2.15 / 1.7$. Получаемое значение $X=0.75$ - соответствует графическому показателю. Расчёт с применением фактора F (применяется в тех случаях, когда реагент, очень стабилен). Расчет с применением фактора, является упрощенным методом расчёта, со стандартом так как конечной формулой в расчёте, со стандартом является $X=A_1 * O/A$ где О/А-параметры известного стандартного раствора, и поделив одну на другую получаем фактор -F т.е. стандартный раствор измеряется один раз на серию замеров образца. Рассчитывается фактор (F) $O/A=F$. Полученное значение образца ОП просто умножается на флакон (F). Пример см. рис. 2. Измеряется ОП стандартного раствора например 2.15 мг/мл. Значение оптической плотности стандартного раствора должна соответствовать 1.7 ОП (см. Рис.1.3). Рассчитывается фактор $F=2.15 / 1.7$, $F=1.26$. Предположим, что ОП-исследуемого раствора 0.6. Тогда согласно пропорции $X=0.6 * F$ т.е. $X=0.6 * 1.26$ т.е. $X=0.75$. Получаемое значение 0.75- соответствует графическому показателю и рассчитанному со стандартом. Все три варианта подсчета правомерны если экспериментальные данные находятся в зоне-2 см.рис.2. Показатели, концентрированной сгущенной сыворотки, окажутся в зоне 3. Поэтому данная

проба разбавляется в четыре (4) раза физиологическим раствором и измерение производится заново. В связи с тем, что проба, разбавляется в 4 раза после проведения расчётов полученное значение, умножается на число разведений т.е. 4. Расчёты можно проводить любым из вышеописанных трех методов.

Лабораторный практикум главы 1.2

1.2.А Построение калибровочной кривой для определения концентрации глюкозы

Реагенты и расходные материалы: Флакон 1-глюкоза, упаковка 2-пробирки, флакон 3-реактив для определения глюкозы, упаковка 4-пробирки, флакон 5-стоп-реактив.

Дополнительный материал, необходимый для эксперимента

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (0,1–1 мл, 2–20 мкл), наконечник для пипетки, термостат, спектрофотометр или фотометр.

Принцип (цель)

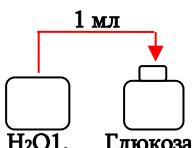
В аналитической химии калибровочная кривая – основной метод для определения концентрации вещества в неизвестном образце где, сравнивается неизвестный образец с рядом стандартных образцов известной концентрации. Калибровочная кривая – это зависимость между показателями оптической плотности прибора со значениями различных концентрации стандартных растворов. Из графической зависимости интерполяцией можно определить концентрацию того или иного вещества в анализе. Производятся серия замеров стандартных растворов согласно выбранной методике. В пределах зависимости этих измерений должен оказаться показатель анализа. Оператор, измерив неизвестное вещество, при помощи калибровочной кривой, определяет концентрацию в анализе.

Следуйте последовательности протокола, меняя наконечники пипеток после каждого шага, чтобы избежать загрязнения растворов.

Ход эксперимента

1. Приготовление стандартного раствора глюкозы:

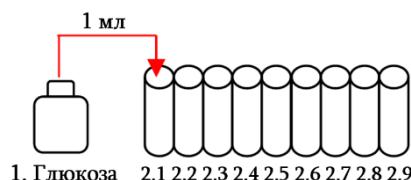
Во флакон 1 перелить 1 мл дистиллированной воды, встряхнуть. Приготовили стандартный раствор глюкозы с концентрацией 25 мг/мл (138,8 мкМ/мл).



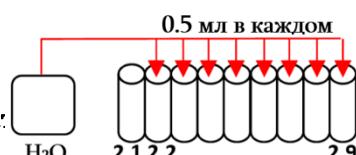
2. Разведение стандартного раствора глюкозы – I этап:

Необходимо приготовить 9 стандартных растворов глюкозы. Процесс выглядит следующим образом:

Перенесите 1 мл стандартного раствора глюкозы из флакона 1 в пробирку 2.1.



В каждую пробирку 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 перенесите по 0,5 мл дистиллированной воды.



3. Разбавление стандартных рас

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.1 в пробирку 2.2, перемешать (проба разбавляется в 2 раза).
0,5 мл раствора перенесите из пробирки 2.2 в пробирку 2.3, перемешайте (проба разбавляется в 4 раза).

0,5 мл раствора перенесите из пробирки 2.3 в пробирку 2.4, перемешайте (проба разбавляется в 8 раз).

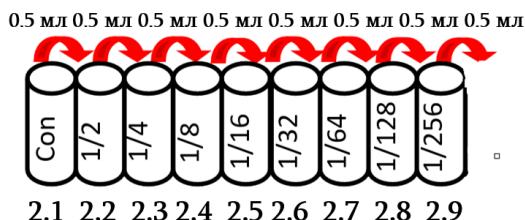
Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.4 в пробирку 2.5, перемешать (проба разбавляется в 16 раз).

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.5 в пробирку 2.6, перемешать (образец разбавляется в 32 раза).

0,5 мл раствора переносят из пробирки 2.6 в пробирку 2.7, перемешивают (образец разбавляется в 64 раза).

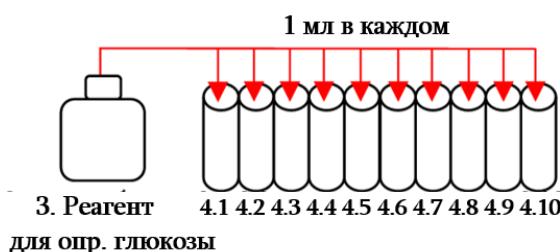
0,5 мл раствора переносят из пробирки 2.7 в пробирку 2.8, перемешивают (проба разбавлена в 128 раз).

0,5 мл раствора переносят из пробирки 2.8 в пробирку 2.9, перемешивают (проба разбавлена в 256 раз).



4. Определение глюкозы - I стадия:

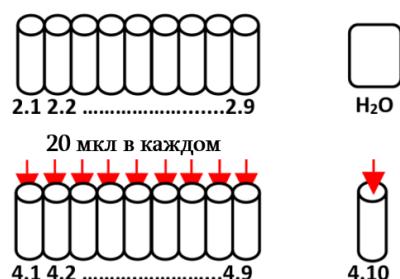
Перенесите по 1 мл реагента для определения глюкозы из флакона 3 в каждую из пробирок 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10. Перед началом реакции пробирки помещают в термостат при температуре 25°C.



5. Определение глюкозы – II этап:

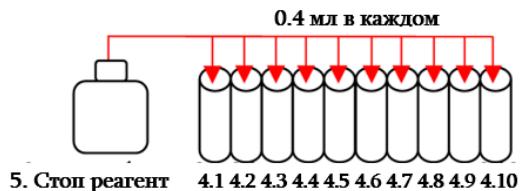
Перенесите по 20 мл раствора из каждой пробирки 2.1-2.9 в пробирку 4.1-4.9, соответственно.

В пробирку 4.10 добавляют 20 мкл дистиллированной воды. Пробирки помещают в термостатируемую качалку (или время от времени встряхивайте пробирки). Инкубируйте при 25°C в течение 10 мин.



6. Добавление стоп реагента

После инкубации в каждую пробирку 4.1-4.10 перенесите по 0,4 мл стоп-реагента.



7. Построение калибровочной кривой

При построении графика учитывайте:

На абсциссе следует наносить следующую концентрацию глюкозы: 25 мг/мл (138,8 мкм/мл); 12,5 мг/мл (69,4 мкм/мл); 6,25 мг/мл (34,7 мкм/мл); 3,12 мг/мл (17,35 мкм/мл); 1,56 мг/мл (8,67 мкм/мл); 0,78 мг/мл (4,33 мкм/мл); 0,39 мг/мл (2,16 мкм/мл); 0,19 мг/мл (1,08 мкм/мл); 0,09 мг/мл (0,54 мкм/мл).

На ординате - оптические плотности образцов 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9.

Демонстрационная калибровочная кривая



1.2.Б Определение глюкозы

Реактивы и предметы потребления:

Флакон 1 – Биологическая жидкость (лиофилизированная), флакон 2 – Концентрированная биологическая жидкость (лиофилизированная). Флакон 3-реагент для определения глюкозы, упаковка 4-пробирки, флакон 5-стоп реагент.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (2-20 мкл, 0,1-1 мл), наконечник для пипетки, термостат, фотометр или спектрофотометр.

Принцип (цель)

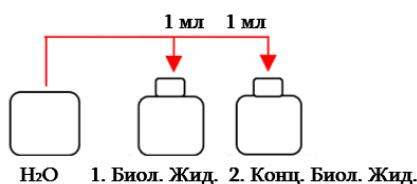
Определяем глюкозу после ферментативного окисления глюкоzoоксидазой. Колориметрический индикатор - quinoneimine, который получается при взаимодействии 4-aminoantipyrine и фенола в присутствии перекиси водорода при катализитическом воздействии пероксидазы (реакция Триндера)



Измеряется интенсивность окраски (ABS) 4-Аминоантипирином.

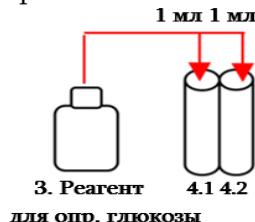
1. Приготовление лиофилизированных биологических жидкостей

Залить по 1 мл-у дистиллированной воды во флакон 1 и флакон 2, встряхнуть. Приготовлены биологические жидкости.



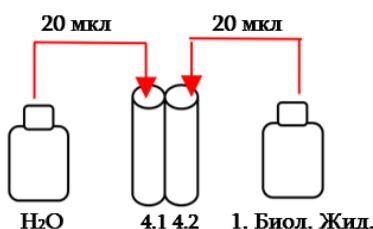
2. Определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях – I этап

Залить по 1 мл-у реагента для определения глюкозы из флакона 3 в пробирки 4.1 и 4.2. Перед началом реакции пробирки помещают при 25°C.

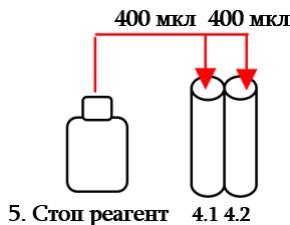


3. Определение концентрации глюкозы в биологических жидкостях II этап.

В пробирку 4.1 перенесите 20 мкл дистиллированной воды (раствор перемешайте). Перенесите 20 мкл биологически активной жидкости из флакона 1 в пробирку 4.2 (раствор перемешать). Образцы помещают на инкубацию при 25°C на 10 минут.

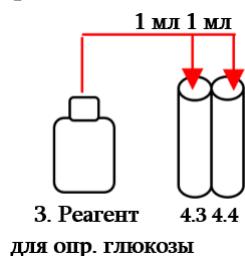


После инкубации в обе пробирки добавляют по 400 мкл стоп-реагента. В течение не более 10 мин в пробирке 4.2 измеряют оптическую плотность при длине волны 546 нм относительно пробирки 4.1.



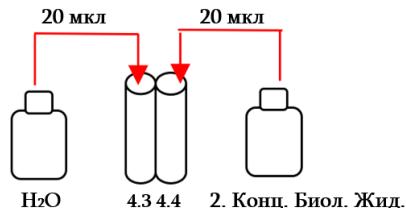
4. Определение концентрации глюкозы в концентрированной биологической жидкости - I этап:

Заливается по 1 мл-у реагента для определения глюкозы из флакона 3 в пробирки 4.3 и 4.4. Перед началом реакции пробирки помещают при 25°C.

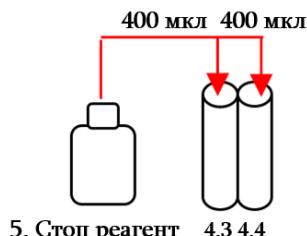


5. Определение концентрации глюкозы в концентрированной биологической жидкости - II этап:

В пробирку 4.3 перенесите 20 мкл дистиллированной воды (раствор перемешайте). Перенести 20 мкл биологической жидкости из флакона 2 в пробирку 4.4 (перемешать раствор). Образцы помещают на инкубацию при 25°C на 10 минут.



После инкубации в обе пробирки добавляют по 400 мкл стоп-реагента. В течение не более 10 мин в пробирке 4.4 измеряют оптическую плотность при длине волны 546 нм относительно пробирки 4.3.



Если оптическое значение глюкозы превышает линейную область (ОП выше 0.8), образец следует разбавить в 4 раза. (На каждый 1 объем анализируемой жидкости добавляют 3 объема воды, пробу разбавляют в 4 раза). Полученную концентрацию следует умножить на количество разбавлений (в случае четырехкратного разведения умножить на 4).

Определение концентрации глюкозы – значения ОП каждой анализируемой пробы пересчитываются на концентрацию глюкозы при помощи калибровочной кривой.

Используйте данные линейной области калибровочной кривой для определения концентрации глюкозы.

1.2.В Построение калибровочной кривой для определения концентрации белка

Реактивы и предметы потребления

Флакон 1-белок, упаковка 2-пробирки, флакон 3-биуретовый реагент, упаковка 4-пробирки.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (0,1-1 мл), головки для пипеток, спектрофотометр или фотометр.

Принцип

В аналитической химии калибровочная кривая – основной метод для определения концентрации вещества в неизвестном образце где, сравнивается неизвестный образец с рядом стандартных образцов известной концентрации. Калибровочная кривая - это зависимость между показателями оптической плотности прибора с показателями различных концентрации стандартных растворов. Из графической зависимости вышесказанного, можно определить концентрацию того или иного вещества в анализе.

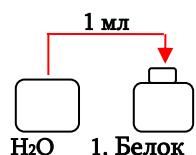
Производится серия замеров стандартных растворов согласно выбранной методике. В пределах зависимости этих измерений должен оказаться показатель аналита. Оператор, измерив неизвестное вещество, при помощи калибровочной кривой, определяет концентрацию в анализе.

Следуйте последовательности протокола, меняя наконечники пипеток после каждого шага, чтобы избежать загрязнения растворов.

Ход эксперимента

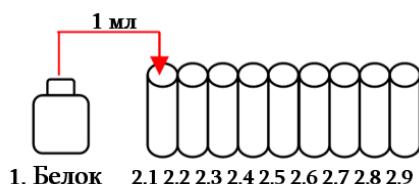
1. Приготовление стандартного раствора белка:

Во флакон 1 перелить 1 мл дистиллированной воды, встряхнуть. Приготовили стандартный раствор белка с концентрацией 25 мг/мл.

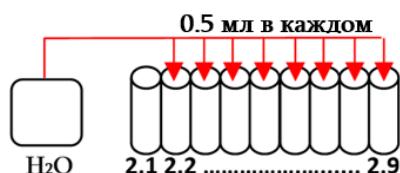


2. Разведение стандартного белкового раствора – I этап:

Необходимо приготовить 9 стандартных растворов белка. Процесс выглядит следующим образом: Перенесите 1 мл стандартного раствора белка из флакона 1 в пробирку 2.1.



В каждую пробирку 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 переносим по 0,5 мл дистиллированной воды.



3. Разведение стандартных растворов белков – II этап:

Переносим 0,5 мл раствора из пробирки 2.1 в пробирку 2.2, перемешиваем (проба разбавлялась в 2 раза).

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.2 в пробирку 2.3, перемешать (проба разбавлялась в 4 раза).

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.3 в пробирку 2.4, перемешать (проба разбавлялась в 8 раз).

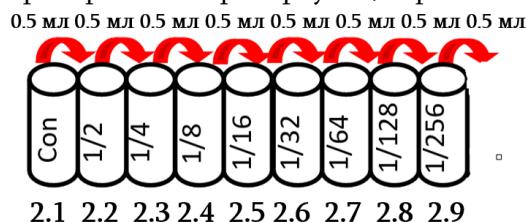
Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.4 в пробирку 2.5, перемешать (проба разбавлена в 16 раз).

Переливаем 0,5 мл раствора из пробирки 2.5 в пробирку 2.6, перемешиваем (проба разбавлена в 32 раза).

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.6 в пробирку 2.7, перемешать (проба разбавлена в 64 раза).

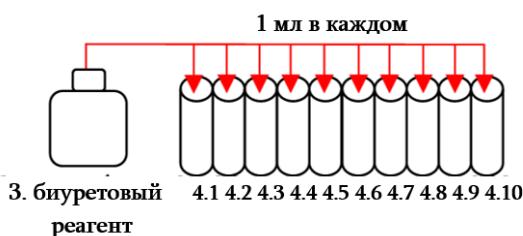
Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.7 в пробирку 2.8, перемешать (проба разбавлена в 128 раз).

Перенести 0,5 мл раствора из пробирки 2.8 в пробирку 2.9, перемешать (проба разбавлена в 256 раз).



4. Определение белка – I этап:

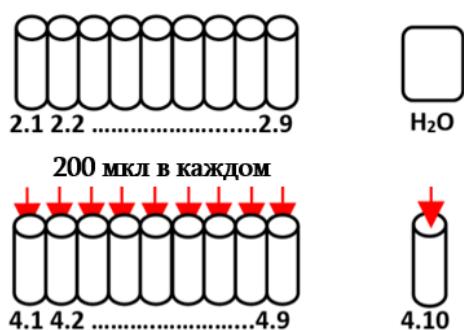
Перенесите по 1 мл реагента для определения белка из флакона 3 в каждую из пробирок 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10.



5. Определение белка – II этап:

Каждой из пробирок 2.1-2.9 перенести по 200 мкл раствора по пробиркам 4.1-4.9 (перемешать растворы), в пробирку 4.10 перенести 200 мкл дистиллированной воды (раствор перемешать).

Инкубируйте при 25 градусах Цельсия в течение 10 мин. После инкубации измеряется оптическая плотность при 546 нм измеряют против образца 4.10.



6. Построение калибровочной кривой

При построении графика учитывайте:

На абсциссе следует наносить следующие концентрации белка: 25 мг/мл; 12,5 мг/мл; 6,25 мг/мл; 3,12 мг/мл; 1,56 мг/мл; 0,78 мг/мл; 0,39 мг/мл; 0,19 мг/мл; 0,09 мг/мл. На ординате оптические плотности образцов 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9. (См. Рис. 1.4).

Рис. 1.4 Демонстрационная калибровочная кривая



1.2.Г Определение концентрации белка

Реактивы и предметы потребления:

Флакон 1 – лиофилизированная биологическая жидкость, флакон 2 – лиофилизированная концентрированная биологическая жидкость, флакон 3 - биуретовый реагент, упаковка 4 - пробирки.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (0,1–1 мл), наконечники для пипеток, спектрофотометр или фотометр.

Принцип

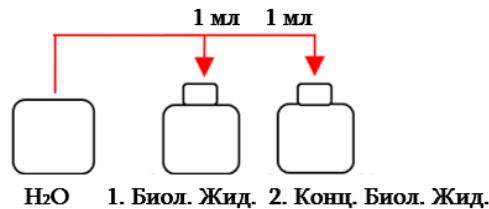
Биуретовый тест – это химический тест, используемый для обнаружения наличия пептидных связей. В присутствии пептидов ион меди(II) в щелочном растворе образует координационные комплексы фиолетового цвета.

Было разработано несколько вариантов теста, такие как тест БСА и модифицированный тест Лоури. Биуретовую реакцию можно использовать для оценки концентрации белков, поскольку пептидные связи возникают с одинаковой частотой на каждую аминокислоту в пептиде.

Интенсивность цвета и, следовательно, поглощение при 546 нм прямо пропорциональны концентрации белка в соответствии с законом Бера-Ламберта. Несмотря на название, реагент на самом деле не содержит биурета ($(H_2N-CO-)_2NH$). Тест назван так потому, что он также дает положительную реакцию на пептидоподобные связи в молекуле биурета.

1. Приготовление биологических жидкостей.

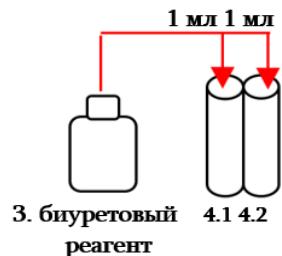
Залить по 1 мл дистиллированной воды во флакон 1 и флакон 2, встряхните. Получены биологические жидкости.



2. Определение концентрации белка в биологических жидкостях - I этап:

Переносят по 1 мл реагента для определения белка из флакона 3 в каждую пробирку 4.1 и 4.2.

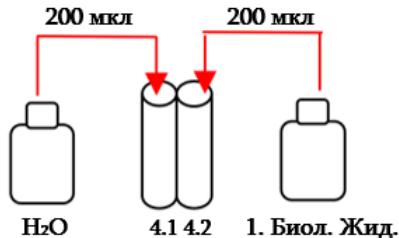
Перед началом реакции пробирки помещают при 25°C.



3. Определение концентрации белка в биологических жидкостях II этап.

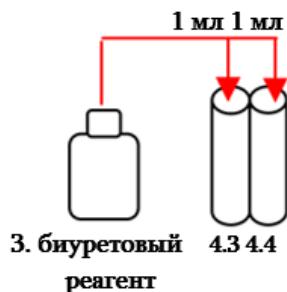
В пробирку 4.1 перенесите 200 мкл дистиллированной воды (раствор перемешайте). Перенесите 200 мкл биологически активной жидкости из флакона 1 в пробирку 4.2 (раствор перемешать). Образцы помещают на инкубацию при 25°C на 10 минут.

После инкубации в пробирке 4.2 измеряют оптическую плотность при длине волны 546 нм относительно пробирки 4.1.



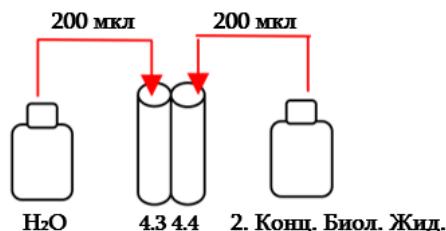
4. Определение концентрации белка в концентрированной биологической жидкости - I этап:

Залить по 1 мл-у реагента для определения белка из флакона 3 в пробирки 4.3 и 4.4. Перед началом реакции пробирки помещают при 25°C.



5. Определение концентрации белка в концентрированной биологической жидкости - II этап:

В пробирку 4.3 перенесите 200 мкл дистиллированной воды (раствор перемешайте). Перенести 200 мкл биологической жидкости из флакона 2 в пробирку 4.4 (перемешать раствор). Пробы помещают на инкубацию при комнатной температуре на 10 мин. После инкубации в пробирке 4.4 измеряют оптическую плотность при длине волны 546 нм относительно пробирки 4.3.



Если оптическое показание белка превышает линейную область(ОП выше 0.5), образец следует разбавить в 4 раза. (На каждый 1 объем анализируемой жидкости добавляют 3 объема воды, пробу разбавляют в 4 раза). Полученную концентрацию следует умножить на количество разбавлений (в случае четырехкратного разведения умножить на 4).

Определение концентрации белка – значения ОП каждой анализируемой пробы пересчитываются на концентрацию белка при помощи калибровочной кривой.

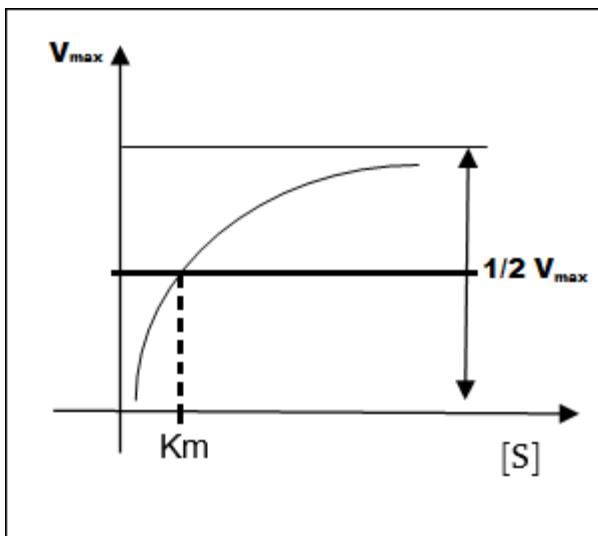
Используйте данные линейной области калибровочной кривой для определения концентрации белка.

1.3. Энзимология

1.3.1. Определение фермент-субстратной зависимости, и константы Michaelis-Menten (K_m)

Студент, на этом этапе развития, может измерить глюкозу, являющуюся продуктом гидролиза сахарозы, и белок, то есть фермент катализирующий реакцию. Соответственно вводится понятие фермента. В данном случае инвертазы, субстратом которой является сахароза. Но студент ещё не готов обсуждать активность, поскольку главная проблема взаимосвязи фермента [E] и субстрата [S] для него ещё не ясна. Основным постулатом является взаимосвязь $[S]=10K_m$. По этому прежде чем мы будем измерять активность, студент должен определить K_m , рассчитать точную концентрацию субстрата, времени, температуры, т.е. должен смоделировать метод определения активности и только потом проводится измерения называемое активностью. Берется избыточная концентрация сахарозы, добавляется фермент, и за минимальный промежуток времени (время достижения максимальной детекции продукта) измеряется глюкоза, как продукт. В последующих опытах, разбавляется сахароза (концентрация фермента, и время, не меняются) пока не начнет уменьшаться скорость реакции. Достигнув показателей уменьшения скорости реакции инвертазы за счет уменьшения концентрации субстрата, строится график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Полученная зависимость, изображает уравнение Michaelis-Menten (K_m), (См. рис. 1.5).

Рис. 1.5



Уравнение Михаэлиса-Ментен возникает из общего уравнения для ферментативной реакции : $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$, где E -фермент , S -субстрат , ES -фермент-субстратный комплекс, а P - является продуктом. Таким образом, фермент соединяется с субстратом, чтобы образовать комплекс ES , который в свою очередь превращается в продукт, сохраняя при этом фермент. K_m константа Михаэлиса - Ментена, который показывает концентрацию субстрата, когда скорость реакции равна половине максимальной скорости для реакции. Это также можно рассматривать, как меру того, насколько прочен субстратный комплекс с

заданной концентрацией фермента, иначе известный как его связывающая аффинность. Уравнение с низким значением K_m указывает на большую аффинность связывания, так как реакция подойдет к V_{max} быстрее. Уравнение с высоким K_m означает, что фермент не связывается так эффективно и V_{max} будет достигнута только тогда, когда концентрация субстрата достаточно высока, чтобы насытить фермент.

График уравнения Михаэлиса-Ментена бесконечно приближается к значению V_{max} но никогда не пересекает ее. Поэтому из зависимости V_{max} от $[S]$ определять K_m не всегда правомерно.

Принимая обратные значения с обеих сторон уравнения Михаэлиса-Ментена, получаем:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Чтобы определить значения K_m и V_{max} уравнение Михаэлиса-Ментена может быть преобразовано в уравнение Лайнуивера-Берка (Рис. 1.6).

Рис. 1.6

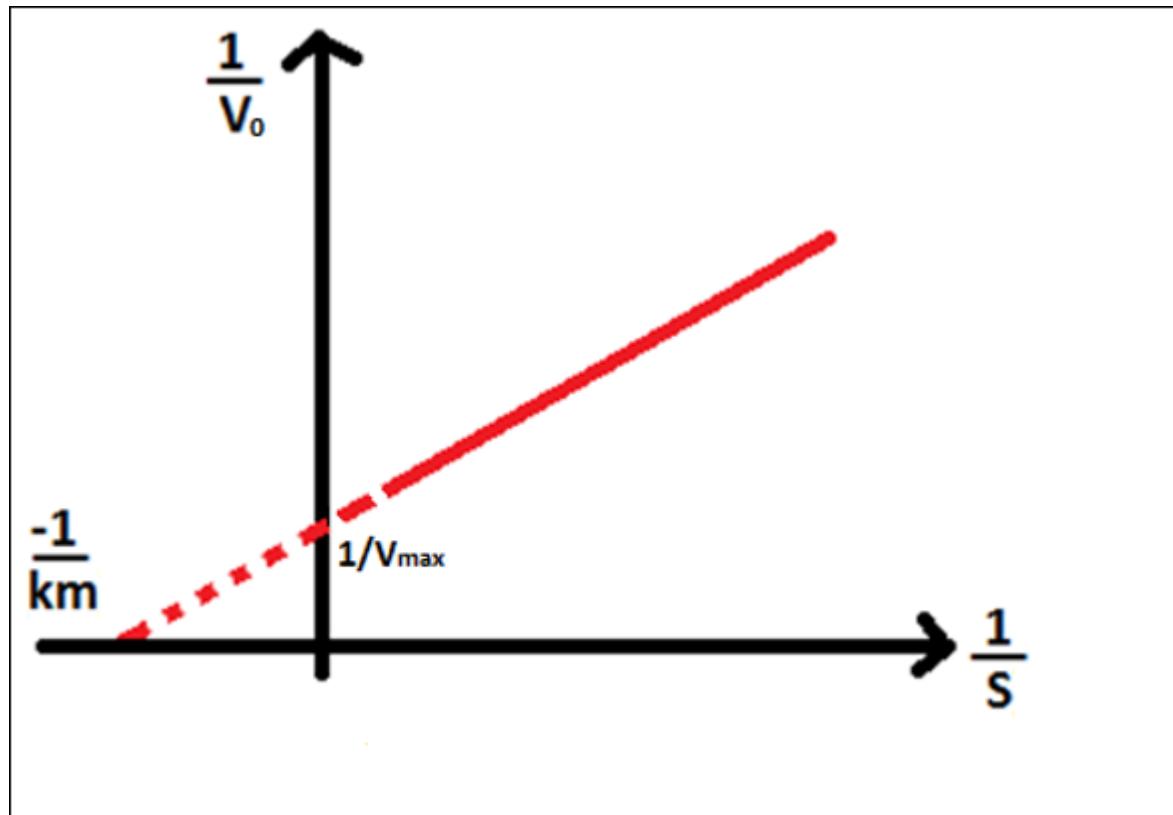
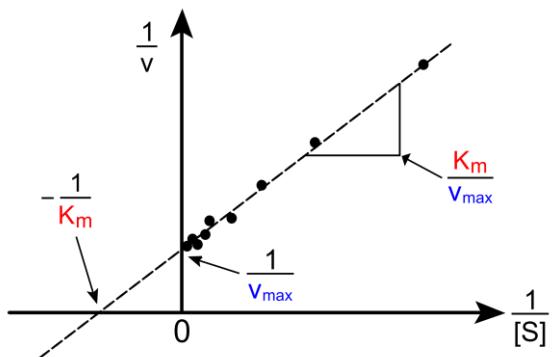


График Лайнуивера–Берка

График уравнения обратных значений на осях абсцисс и ординат, также называется уравнением Лайнуивера–Берка (Рис 1.6 и Рис 1.7): $1/V_0$ от $1/[S]$ пересечение с осью $1/V_0$ - дает значение $1/V_{max}$; а пересечение с осью X - дает значение $-1/K_m$; а наклон K_m/V_{max} . График Лайнуивера–Берка особенно полезен для анализа того, как меняется кинематика ферментов в присутствии ингибиторов, конкурентной, неконкурентной, или смесь того и другого. Из зависимости Лайнуивера–Берка графически рассчитывается значение K_m . Экстраполяция на ось $1/[S]$ в точке пересечения дает точное значение $1/K_m$. Из условия, что концентрация субстрата $[S]$ должна быть равна $10K_m$, то есть $[S]=10^*K_m$. Рассчитываем концентрацию субстрата и моделируем опыт для определения ферментативной активности инвертазы.

Для расчета K_m воспользуемся соотношением Лайнуивера–Берка (см. рис. 1.7), из которого найдем значение $1/K_m$. Затем вычисляем значение самого K_m .

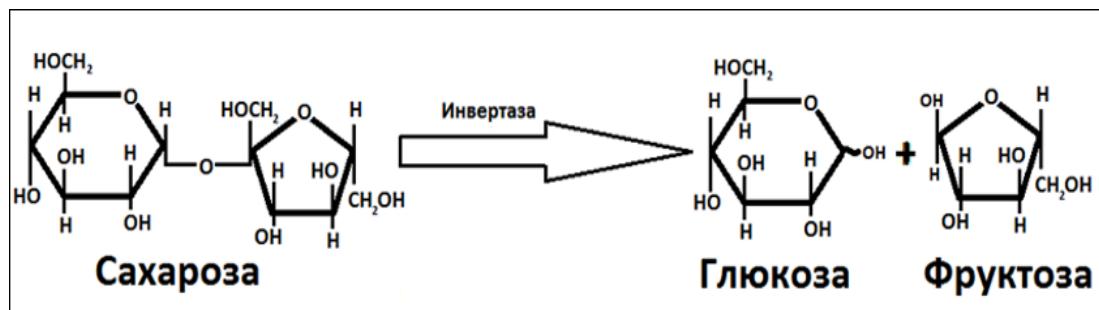
Рис 1.7 The Lineweaver-Burk Transformation



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

1.3.2. Определение ферментативной активности инвертазы

Химизм:



В предлагаемых наборах, Km полученный экспериментально, должен варьировать в пределах 15-20. Соответственно максимальная концентрация субстрата $[S]=10^*Km$, для определения активности будет 200мг/мл. Берётся подсчитанная концентрация субстрата 200 мг/мл, а время для определения активности подбирается так чтобы полученный продукт (глюкоза) оказался в зоне - 2 (в данном случае 10 мин) с максимальным показателем.

Расчёт объёмной ферментативной активности (ферментативная активность в объёмном выражении):

1.1 в случае измерения изменения показателя, характеризующего ферментативную активность,

по точечному принципу (измерение до и после некоторого временного интервала):

$$E_D/\text{мл} = (\Delta^* V^* D f^* 10000) / (t^* \dot{\varepsilon}^* l^* v)$$

$$\text{кат/мл} = (\Delta^* V^* Df^*) / (t^* \dot{\varepsilon}^* l^* v^* 1000),$$

где:

Δ – измеренное значение, характеризующее ферментативную активность (изменение

оптической плотности, интенсивности флуоресценции и т.д.)

V – объём реакционной смеси, в которой протекает ферментативная реакция, мл

D_f – Коэффициент (кратность разведения) тестируемого раствора (образца) фермента

t – Время, по прохождении которого фиксируется изменение измеряемого параметра (мин. в случае выражения активности в Ед/мл и с. в случае выражения активности в кат/мл)

ϵ – Молярный коэффициент поглощения, л²моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

l – Длина оптического пути, см

v – Объём раствора фермента, мл

ИЗМЕРЕНИЕ - ϵ – Молярного коэффициента поглощения, л²моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

Закон БИЕРА – ЛАМБЕРТА: $\epsilon=A/C \cdot I$

Где :

C – приготовленный или известный МОЛЯРНЫЙ раствор продукта или субстрата

ферментативной реакции (условно 0,01M – раствор продукта).

A – абсорбция раствора C при конкретной длине волны. (условно 0,6)

I - Длина оптического пути, см (условно 1 см.)

ϵ – Молярный коэффициент поглощения, л²моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

готовится раствор продукта ферментативной реакции определённой МОЛЯРНОСТИ (условно 0,01 M – раствор продукта) раствор C . Измеряется абсорбция (A) раствора C при определённой длине волны. Условно получаем значения - 0,6. Учитывая что длина оптического пути - условно 1.

- Удельная активность белка рассчитывается делением значения Ед/мл на мг/мл белка.

Итоговое значение после деления это Ед/мг – белка – **удельная активность**.

- Общая активность рассчитывается умножением удельной активности на объем ферментного раствора.

1.3.3. Обучение методом осаждения белков и высаливания

Сравнение общих и удельных активностей

Наиболее часто в энзимологии, на первых этапах очистки ферментов, применяют высаливание или осаждение. Чаще всего это связано с проблемами фракционирования и очистки. Целью лабораторного практикума является ознакомление с методами высаливания и осаждения.

1.3.4. Гидролиз сахарозы

Одним из часто встречающихся задач в биотехнологии, является гидролиз того или иного субстрата до конечного продукта. В данном случае вопрос может быть поставлен следующим образом: убрать сахарозу, из раствора. С точки зрения промышленной проблемы, вопрос может стоять следующим образом: получить фруктозу, глюкозу или глюкозо-фруктозный сироп (инверсионный, сахар) проблемы, встречающиеся в аналитической области - провести, количественный анализ сахарозы. Все выше перечисленные проблемы связаны с гидролизом сахарозы. Проблемой может быть ингибирование фермента, его инактивация и.т.д. Сама постановка этого вопроса, включает в себя оптимальный подбор оптимальных условий процесса гидролиза, то есть определение времени, pH и температуры гидролиза, определение концентрации фермента и субстрата и самое главное определение максимальной глубины гидролиза. То есть при каких условиях происходит максимальная трансформация сахарозы в инвертный сахар. Задача в предлагаемом практикуме поставлена следующим образом: максимально перевести сахарозу в продукты гидролиза, минимальным расходом фермента, добиться максимальной трансформации сахарозы в продукты гидролиза, а также в минимальное время добиться гидролиза сахарозы. В данном эксперименте мы априорно принимаем, что такие параметры как pH температура, концентрация фермента, и субстрата подобраны оптимально. Вариабельным параметрам, оставляем вопрос времени, т. е. за какое время подобранная концентрация фермента и субстрат при pH - 4,5, температура 55°, проведёт максимальный гидролиз сахарозы (в данном случае? часов).

1.3.А Определение фермент-субстратной зависимости и константы Михаэлиса-Ментена (Км)

Реактивы и предметы потребления

Флакон 1 – Концентрированный Ацетатный Буфер, Флакон 2 – для разбавления, фасовка 3 – пробирки, эпендорфы 4 – фермент, Флакон 5 – сахароза, фасовка 6 – пробирки, Флакон 7 – реагент для определения глюкозы, Флакон 8 – стоп реагент.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (2-20 мкл ; 0,1–1 мл), наконечники для пипеток, термостат с качалкой, спектрофотометр или фотометр.

Принцип

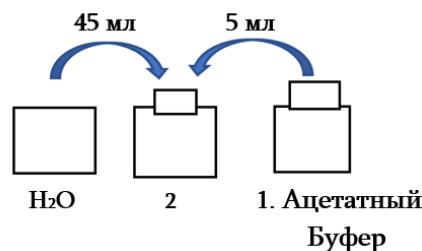
Уравнение Михаэлиса — Ментена является следствием общего уравнения для ферментативной реакции: $E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow E + P$, где E - фермент, S -субстрат, ES –фермент-субстратный комплекс и P - продукт. Таким образом фермент соединяется с субстратом, чтобы сформировать комплекс ES, который в свою очередь преобразуется в продукт, сохраняя фермент.

Км - константа Михаэлиса — Ментена, которая показывает концентрацию субстрата, когда скорость реакции равна половине максимальной скорости для реакции. Это может также считаться мерой сродства фермент-субстратного комплекса, иначе известным как аффинная связь. Уравнение с низким значением Km указывает на большое сродство, поскольку реакция приблизится к Vmax более быстро. Уравнение с высоким Km указывает, что фермент не связывает так эффективно с субстрат и Vmax будет достигнут только, если концентрация субстрата будет достаточно высока, чтобы насытить фермент.

Ход эксперимента

1. Приготовление рабочих растворов

Приготовление рабочего ацетатного буфера: Перелейте 45 мл дистиллированной воды из местного лабораторного резервуара во флакон 2. Из флакона 1 перелейте 5 мл концентрированного ацетатного буфера во флакон 2, содержащий 45 мл H₂O. Перемешайте, в результате чего получится 50 мл рабочего ацетатного буфера. M-0,03. PH 4,5

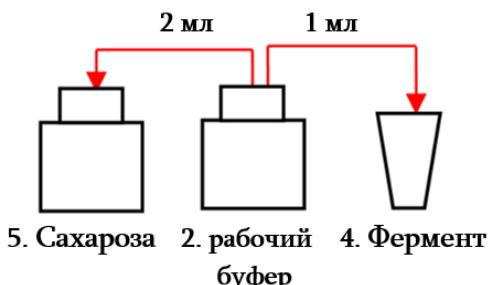


Подготовка субстрата

Готовится раствор сахарозы 50 мг/мл. Переносят 2 мл рабочего буфера из флакона 2 во флакон 5. Субстрат растворяют встряхиванием.

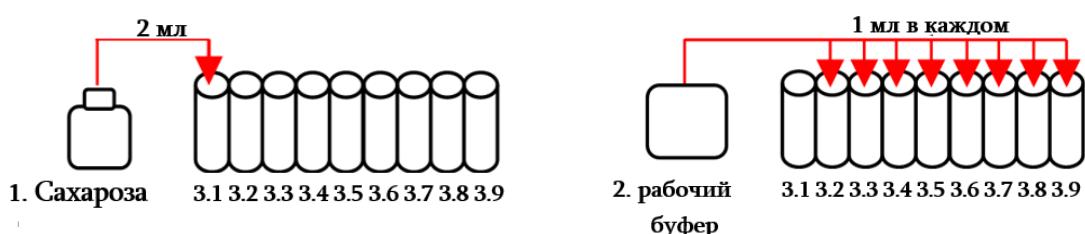
Приготовление раствора фермента

1 мл рабочего буфера переносят из флакона 2 в Эппендорф 4 (лиофилизированный фермент), фермент растворяют встряхиванием.



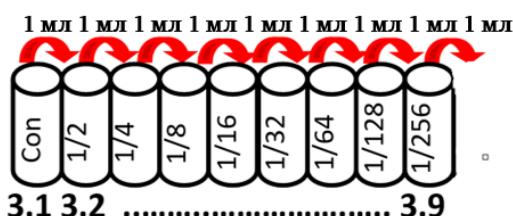
2 Разбавление субстрата – I этап:

Из флакона 5 перенесите 2 мл субстрата в пробирку 3.1, из флакона 2 перенесите 1 мл раствора в пробирки 3.2-3.9 включительно



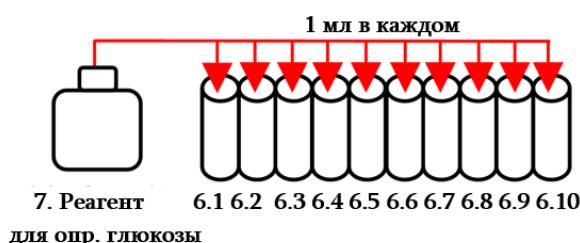
3. Разбавление субстрата – II этап:

Перенесите 1 мл субстрата из пробирки 3.1 в пробирку 3.2, перенесите 1 мл субстрата из 3.2 в 3.3 и т. д. включая пробирку 3.9. Из последней пробирки выливают 1 мл раствора. Пробирки помещают в термостат для нагрева при температуре 25°C.



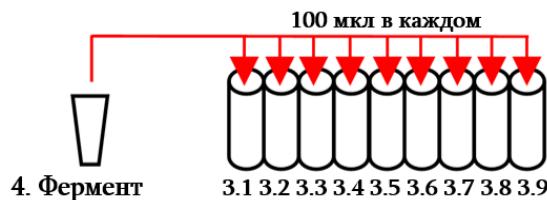
4. Внесение хромогена

Из флакона 7 переносится 1 мл Реактив для определения глюкозы в пробирки от 6.1 по 6.10 включительно. Пробирки ставятся в термостат, на подогрев до 25 ° С.

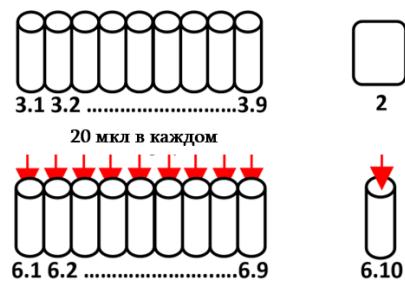


5. Определение скорости ферментативной реакции.

Перенесите 100 мкл фермента из Эплендорфа 4 в пробирки 3,1 – 3,9 включительно. Инкубацию проводят в Термостатируемой качалке при 25°C в течение 10 минут.

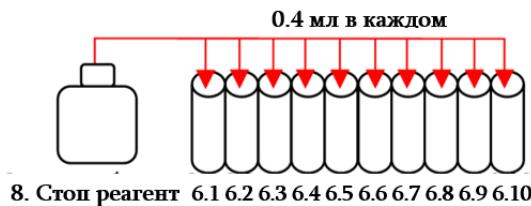


В конце инкубации перенесите 20 мкл образца из пробирок с 3,1 по 3,9 в пробирки с 6,1 по 6,9 соответственно. Перенесите 20 мкл рабочего буфера из флакона 2 в пробирки 6.10. Инкубируйте 10 минут при 25°C.



6. Внос стоп реагента.

После инкубации перенесите по 400 мкл стоп-реагента из флакона 8 в каждую пробирку 6.1-6.10. Не более чем через 10 минут после добавления стоп-реагента следует измерить оптические показатели относительно пробирки 6,10 при длине волнны 546 нм.



Нам известны значения абсциссы и концентрация субстрата. Это значения полученные после разбавления субстрата в пробирке (3,1) т. е. разбавления в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 раза, что соответствует концентрации субстрата на абсциссе это 100 мг/мл, 50 мг/мл, 25 мг/мл, 12. 5мг/мл, 6.25 мг/мл и 3.125 мг/мл, 1,56 м, 0,78 мг/мл, 0,39 мг/мл, 0,19 мг/мл.

Строим графики зависимостей скорости реакции (V -ось ординат) от концентрации субстрата ($[S]$ - ось абсцисс), где половина скорости реакции должна быть равна K_m . Более точно можно получить значение K_m из координат Лайнуивера-Берка, если взять обратные величины т.е. $1/ [V]$ и $1/[S]$, где экстраполяцией кривой до пересечения с осью абсциссы мы получим значением $(-1/ K_m)$. См. Рис 1.7.

K_m рассчитывается графически из значения абсциссы соответствующей пересечению с прямой в точке $-1/ K_m$.

1.3.Б Определение активности фермента инвертазы

Реактивы и предметы потребления

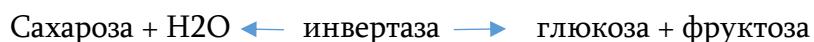
Флакон 1- Концентрированный ацетатный буфер, Флакон 2- для разбавления, Эппендорф 3 – фермент, Флакон 4 – Сахароза, Флакон 5- Реактив для определения глюкозы, Фасовка 6 – Пробирки, Флакон 7- Реактив для определения белка, Фасовка 8- пробирки, флакон 9- стоп реагент.

Необходимые материалы, не включенные

Дистиллированная вода, Штатив, пипетка (2-20 мкл, 0,1-1 мл), наконечники для пипеток, термостат с качалкой, спектрофотометр или фотоколориметр

Принципы

Сахароза может гидролизоваться в присутствии фермента, называемого инвертазой или сахаразой.



Официальное название для инвертазы - бета-фруктофуранозидаза (EC3.2.1.26), которая подразумевает, что реакция, катализируемая этим ферментом, является гидролизом не восстановливающей терминальной бета - фруктофуранозидазы востановленной до бета-фруктофуранозида. Обратите внимание на то, что **alpha-D-glucosidase**, которая отщепляет терминальную глюкозу, может также катализировать эту реакцию без присутствия инвертазы. Сахароза может гидролизоваться относительно легко в кислой среде, без фермента.

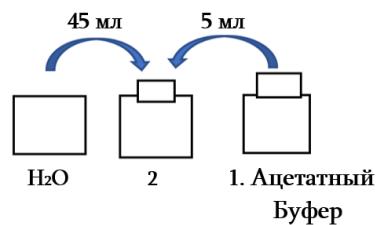
Широкий диапазон микроорганизмов может продуцировать инвертазу и может, таким образом, использовать сахарозу как питательное вещество. Коммерчески, инвертаза синтезируется дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* или *Saccharomyces carlsbergensis*. Даже в пределах той же самой культуры дрожжей, инвертаза существует больше чем в одной форме. Например, у внутриклеточной инвертазы молекулярная масса составляет 135,000 Daltons, а у внеклеточной инвертазы молекулярная масса достигает 270,000 Daltons.

Следуйте последовательности протокола, меняя наконечники пипеток после каждого шага, чтобы избежать загрязнения растворов.

Ход эксперимента

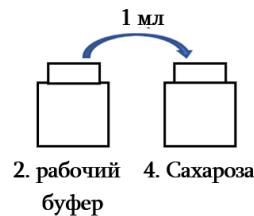
1. Приготовление рабочих растворов:

Перелейте 45 мл дистиллированной воды во флакон 2. Перенесите 5 мл жидкости из флакона 1 во флакон 2, содержащий 45 мл H₂O. Встряхните, получено 50 мл рабочего ацетатного буфера 0,03 М, РН 4,5.



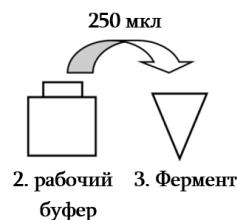
Подготовка субстрата:

Переносим 1 мл рабочего ацетатного буфера из флакона 2 во флакон 4 (сахароза) и растворяем его встряхиванием.



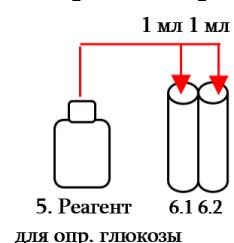
Приготовление ферментного раствора

В Эплендорф 3 (фермент) заливается 250 мкл рабочего ацетатного буфера из флакона (2), растворяется перемешиванием.

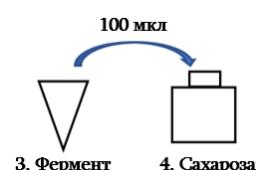


2. Определение активности фермента инвертазы – 1 этап.

Перенесите по 1 мл-у реагента глюкозы из флакона 5 в каждую из пробирок 6.1 и 6.2. Перед началом реакции поместите в термостат при температуре 25°C.

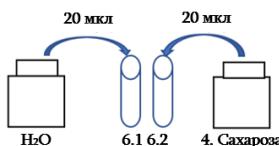


Перенесите 100 мкл раствора фермента из Эплендорфа 3 во флакон 4, флакон помещают в термостат при 25 °C на 10 минут.

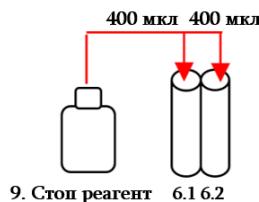


3. Определение активности фермента инвертазы – 2 этапа.

В пробирку 6.1 перенесите 20 мкл дистиллированной воды. Перенесите пробу объемом 20 мкл из флакона 4 в пробирку 6.2. Пробирки помещают в термостат при температуре 25 °С на 10 минут.



После инкубации в каждую пробирку следует добавить по 400 мкл стоп-реагента из флакона 9. Измерьте оптическую плотность пробирки 6.2 против пробирки 6.1 при длине волн 546 нм в течение не менее 10 минут



4. Расчёт объёмной ферментативной активности (ферментативная активность в объёмном выражении):

1.1 в случае измерения изменения показателя, характеризующего ферментативную активность,

по точечному принципу (измерение до и после некоторого временного интервала):

$$Е_д/мл = (\Delta^*V^*Df^*10000)/(t^*\epsilon^*l^*v)$$

$$\text{кат}/\text{мл} = (\Delta^*V^*Df^*)/(t^*\epsilon^*l^*v^*1000),$$

где:

Δ – измеренное значение, характеризующее ферментативную активность
(изменение

оптической плотности, интенсивности флуоресценции и т.д.)

V – объём реакционной смеси, в которой протекает ферментативная реакция, мл

Df – Коэффициент (кратность разведения) тестируемого раствора (образца) фермента

t – Время, по прохождении которого фиксируется изменение измеряемого параметра
(мин. в случае выражения активности в Ед/мл и с. в случае выражения активности в
кат/мл)

ε – Молярный коэффициент поглощения, л⁻¹моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

l – Длина оптического пути, см

v – Объём раствора фермента, мл

ИЗМЕРЕНИЕ - ϵ – Молярного коэффициента поглощения, л²моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

Закон БИЕРА – ЛАМБЕРТА: $\epsilon=A/C \cdot I$

Где :

C – приготовленный или известный МОЛЯРНЫЙ раствор продукта или субстрата ферментативной реакции (условно 0,01M – р-р продукта).

A – абсорбция раствора C при конкретной длине волны. (условно 0,6)

I - Длина оптического пути, см (условно 1 см.)

ϵ – Молярный коэффициент поглощения, л²моль⁻¹см⁻¹ (M⁻¹см⁻¹)

готовится раствор продукта ферментативной реакции определённой МОЛЯРНОСТИ (условно 0,01M – раствор продукта) раствор C . Измеряется абсорбция (A) раствора C при определённой длине волны. Условно получаем значения - 0,6. Учитывая что длина оптического пути - условно 1.

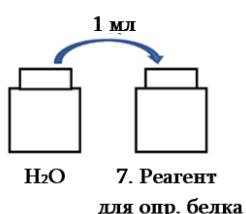
- Удельная активность белка рассчитывается делением значения $E_d/\text{мл}$ на $\text{мг}/\text{мл}$ белка.

Итоговое значение после деления это $E_d/\text{мг}$ – белка – **удельная активность**.

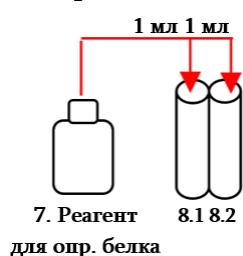
- Общая активность рассчитывается умножением удельной активности на объем ферментного раствора.

5. Определение концентрации белка – 1 этап

Разбавление реагента для определения белка. Перенесите 4 мл дистиллированной воды во флакон 7. Встряхните.



В Эплендорфе 3 определяем концентрацию белка по следующему принципу: Залить по 1 мл-у реагента для определения белка из флакона 7 в пробирки 8.1 и 8.2.

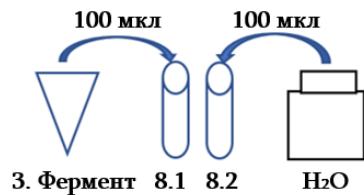


6. Определение концентрации белка – 2 этап

В пробирку (8.1) вносится (100) мкл пробы из Эплендорфа (3).

В пробирку (8.2) вносится (100) мкл H₂O.

Через (5) мин против флякона (8.2) измеряется белок при (595) нм.



Концентрация белка [X] рассчитывается по формуле:

$$0,6 * \text{О.П (пробы)} = X \frac{mg}{ml}$$

Удельная активность подсчитывается по формуле:

$$A \text{ удель} = \frac{A \frac{U}{ml}}{X \frac{mg}{ml}} = U / mg$$

где $A \frac{U}{ml}$ - значение полученное в пункте 4.

$X \frac{mg}{ml}$ - значение полученное в пункте 6

Изучение высаливания и осаждения

Часть - I

1.3.3 Высаливание

Реактивы и предметы потребления:

Флакон 1 – лиофилизированная культуральная жидкость. Упаковка 2-конусная пробирка.

Флакон 3-сульфат аммония.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (0,1–1 мл), наконечники для пипеток,

Центрифуга.

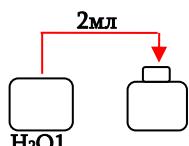
Принцип (цель)

Осаждение белков из растворов происходит, когда концентрация соли превышает критический порог, известного как осаждение, поскольку вода связывается с солью и гидратация белка становится невозможной. В основном используют сульфат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, поскольку он хорошо растворяется в воде, хотя применяют и другие нейтральные соли, например NaCl или KCl .

В связи с тем, что высаливание (осаждение) является этапом очистки белков, в том числе ферментов, характерным свойством этого процесса является уменьшение общей активности и увеличение удельной, что должно быть видно из таблицы которую заполнит обучающий.

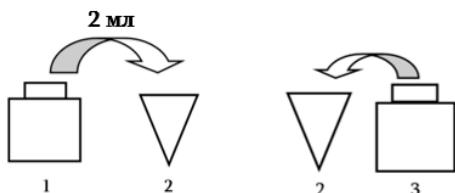
1. Приготовление культуральной жидкости:

Во флакон 1 перелить 4 мл дистиллированной воды, встряхнуть не вспенивая до полного растворения порошка. Приготовили модельный раствор культуральной жидкости. 1 мл исходного раствора откладываем для Части – II.



2. Высаливание белков из культуральной жидкости:

Раствор из флакона 1 полностью перенесите в пробирку 2. Сульфат аммония из флакона 3 полностью перенесите в пробирку 2. Встряхивайте пробирку до полного растворения сульфата. Образующаяся мутная жидкость – свидетельство высаливания белка. После высаливания жидкость центрифицируют при 4000 об/мин в течение 20 минут. Осадок растворяем в 1 мл, для Части – II.



Часть – II

В растворах исходного и перерасстворенного материала измеряем концентрацию белка и Активности. Заполняем таблицу:

	Концентрация белка (мг/мл)	Количество белка (мг)	Активность (ЕД/мл)	Уд. Активность (ЕД/мг)	Общая Активность (ЕД)
Исходный раствор					
Перерасстворенный раствор					

1.3.Г Осаждение

Реактивы и предметы потребления:

Флакон 1 – лиофилизированная культуральная жидкость. Упаковка 2-конусная пробирка.

Флакон 3-сульфат аммония.

Необходимые материалы, не включенные в набор

Дистиллированная вода, штатив, пипетка (0,1–1 мл), наконечники для пипеток, Центрифуга.

Принцип

Растворимость белка зависит от диэлектрической константы раствора, которая его окружает, поскольку она изменяет электростатические взаимодействия между заряженными группами. Поскольку при добавлении растворителей диэлектрическая проницаемость раствора уменьшается, величина электростатического взаимодействия между заряженными частицами увеличивается. Все это снижает растворимость белков в жидкости, поскольку они менее ионизированы и поэтому электростатического притяжения между ними недостаточно для предотвращения их связывания (агрегации).

Диэлектрическая проницаемость водных растворов может быть снижена, если к воде добавить органические растворители, такие как этанол или ацетон. Количество органических растворителей, необходимых для осаждения, зависит от белка, поэтому белки можно классифицировать на этом основании. Оптимальное количество органических растворителей, необходимое для осаждения белков, составляет от 5 до 60%. Фракционирование растворителем обычно проводят при температуре 0°C или ниже, чтобы избежать денатурации белка, которая может быть вызвана повышением температуры, возникающим при смешивании органических растворителей с водой.

Следуйте последовательности протокола, меняя наконечники пипеток после каждого шага, чтобы избежать загрязнения растворов.

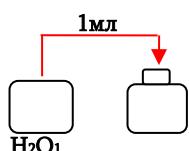
Ход эксперимента

Соблюдайте последовательность протокола.

1. Приготовление культурального раствора:

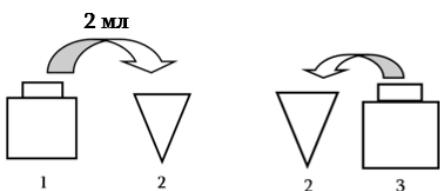
Перед началом реакции флакон 3 помещают в морозильную камеру минимум на 20-30 минут.

Во флакон 1 перелить 1 мл дистиллированной воды, встряхнуть не вспенивая до полного растворения порошка. Приготовили культуральную жидкость.



2. Осаждение белков из культуральной жидкости:

Полностью перенесите раствор из флакона 1 в пробирку 2. Перенесите 4 мл этанола из флакона 3 в пробирку 2. Встряхните пробирку и поместите образец при температуре 2–8 ° С на 20 минут. Полученная мутная жидкость является подтверждением выпадения белка в осадок. После осаждения жидкость центрифигируют при 4000 об/мин в течение 20 минут.



1.3.Д Гидролиз сахарозы

Материалы и химикаты :

Флакон 1 – Концентрированный ацетатный буфер, Флакон 2 – для разбавления, Эплендорф 3 – фермент, флакон 4- сахароза, Флакон 5- хромоген. фасовка 6 – пробирки, фасовка 7- Эплендорф и пробирки, 8- стоп реагент.

Материал не включенные в набор

Штатив , пипетки (2-20 мкл, 0,1-1 мл) , головки пипеток, пробирки, термостат, фотометр или спектрофотометр.

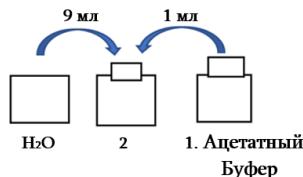
Принцип

Этот лабораторный практикум демонстрирует разложение (гидролиз) сахарозы инвертазой. Инвертаза гидролизует дисахарид сахарозу до инвертного сахара. Инверсионный сахар – это смесь глюкозы и фруктозы – они оба являются моносахаридами. Дрожжи не могут напрямую усваивать сахарозу. Для того чтобы дрожжи могли превратить сахарозу в энергетический источник, они в первую очередь должны превратить сахарозу в ферментированные моносахариды – глюкозу и фруктозу.

Сахароза не является восстанавливющим сахаром, поскольку оба моносахарида соединены друг с другом восстанавливающими группами, и из за этого у самого дисахарида нет свободной восстанавливающей группы. В нашем случае мы мерим глюкозу – это значит что после гидролиза столько же молей фруктозы находится в растворе и столько же молей сахарозы гидролизовано. Наша задача состоит в том, чтобы гидролизовать максимальное количество сахарозы.

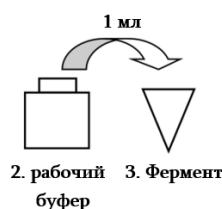
1. Подготовка рабочих растворов.

Во флакон (2) заливаем (9) мл дистиллированной воды с водяного резервуара местной лаборатории. Из флакона (1) переносим 1 мл во флакон (2) (где находится 9 мл H₂O). Получаем рабочий буфер M - 0.03 . pH 4.5



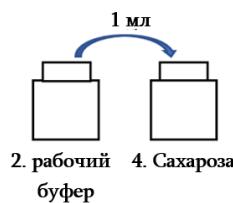
2. Приготовление ферментного раствора.

Из флакона (2) переносим 100 мкл рабочего раствора в эплендорф (3).



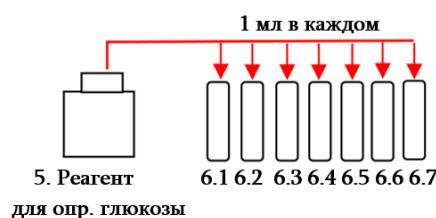
3. Подготовка субстрата.

Готовим раствор сахарозы 20 мг/мл (58,4 мкл/мл). Из флакона (2) переносим (1) мл рабочего буфера во флакон (4). Флакон помещается в термостат на качалку при температуре 25° С для нагрева.



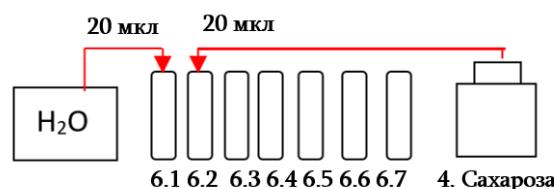
4. Заливка хромогена

Из флакона (5) переносим (1) мл раствора хромогена в пробирки (6.1 – 6.7). Пробирки помещаем в термостат при 25° С для нагрева.

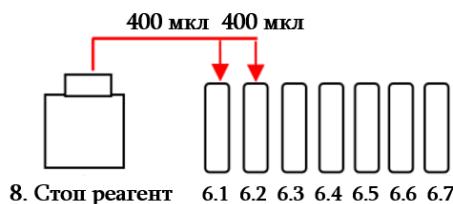


5. Определение нулевой точки.

переносим 20 мкл дистиллированной воды в пробирку (6.1), из флакона (4) переносим 20 мкл образца в пробирку (6.2), ставим в термостат на (10) мин при t 25°C.

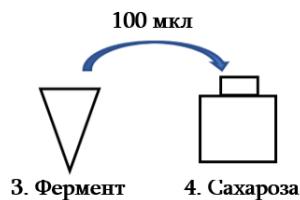


После инкубации из флакона (8) вносим 400 мкл стоп реагента в пробирки (6.1 ,6.2) и измеряем в течении (10) мин ОП (546) нм-ов против пробирок (6.1), показатель (6.2) это нулевая точка.



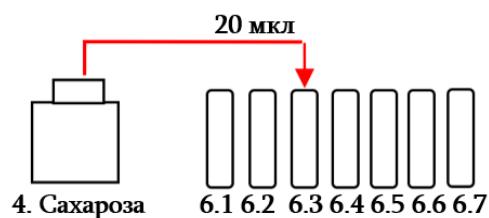
6. Определение гидролиза сахарозы – I стадия

Во флакон (4) заливаем 100 мкл фермента из эппendorфа (3). Флакон ставится в термостат на качалку при 25° С. В течении 100 мин должны измерить (5) образцов при (546) нм, они должны быть взяты каждые 5,10,20, 40, 80 мин. Если взятые пробы находятся в недостоверной зоне (оптическая плотность выше 1,5), пробы необходимо разбавить примерно в 3 раза. Результаты необходимо умножить на количество разведений).



7. Определение гидролиза сахарозы – II стадия

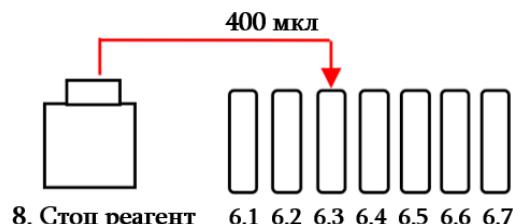
Через 5 мин от начала реакции отбирают (20 мкл образца из флакона (4) и переносят его в пробирку (6.3), инкубируют (10) мин на шейкер-термостате при 25 °C.



8. Внос стоп реагента.

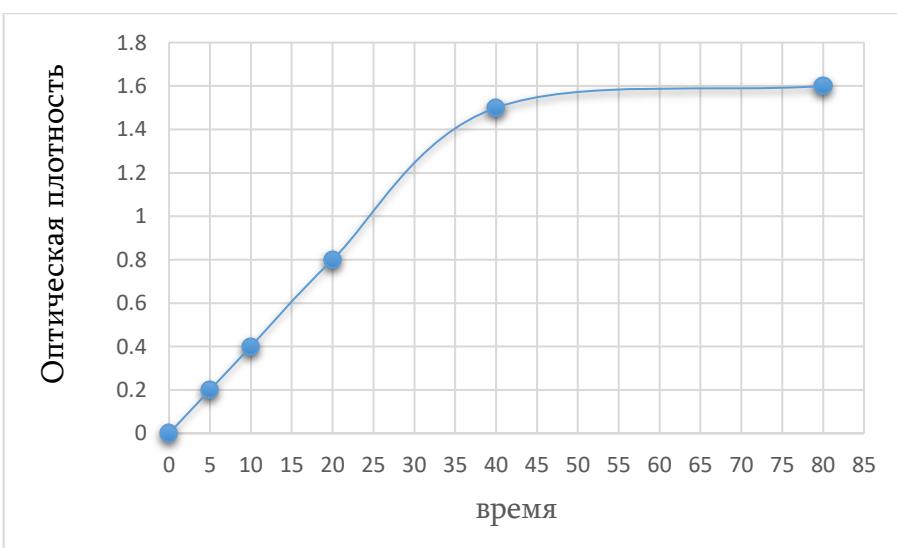
После окончания инкубации из флакона (8) вносим (400) мкл стоп реагента в пробирку (6.3), измеряем ОП (в течении 20 мин) против пробирок (6.1) при (546) нм.

Таким же образом измеряются остальные пять точек. Строим график зависимости Т (время) от ОП (пробы).



Если реакция гидролиза не закончена, то её можно закончить экстраполяцией.

Демонстрационная кривая



2. Хроматография

2.1 Тонкослойная хроматография

Тонкослойная хроматография (TCX) – простая, быстрая и недорогая процедура, позволяющая быстро получить ответ на содержание того или иного компонента в неизвестном растворе. TCX применяется также для определения идентичности соединения, в этом случае перемещение соединения от исходного положения до точки конечного перемещения выражается в сантиметрах и обозначается - Rf. Rf неизвестного вещества сравнивают с Rf известного соединения (маркера) равенство указывает на его идентичность исследуемого образца с маркером. Предпочтительно оба образца анализируют на одной пластинке TCX. Пластина для TCX может представлять собой стеклянный, металлический или пластиковый материал, покрытый тонким слоем твердого адсорбента (обычно диоксида кремния).

При тонкослойной хроматографии небольшое количество исследуемой смеси помещают на дно пластинки. Затем пластину для TCX помещают в камеру бассейна с растворителем так, чтобы в жидкость была погружена только нижняя часть пластины. Эта жидкость или элюент является **подвижной фазой** и медленно просачивается вверх по пластине TCX под действием капилляров. По мере движения растворителя для каждого компонента смеси устанавливается равновесие между молекулами этого компонента, адсорбированными на твердой поверхности, и молекулами, находящимися в растворе. Компоненты различаются растворимостью и силой адсорбции на адсорбенте. Некоторые компоненты будут перемещаться по пластине дальше, чем другие. Когда растворитель достигает верхней части пластины, пластину вынимают из камеры, сушат и окрашивают для визуализации компонентов. Если соединения окрашены, визуализация проста. Обычно соединения не окрашиваются, поэтому для визуализации пластинок используют ультрафиолетовую лампу. Часто сама пластина содержит флуоресцентный краситель, который светится везде, кроме тех мест, где на пластине находится органическое соединение.

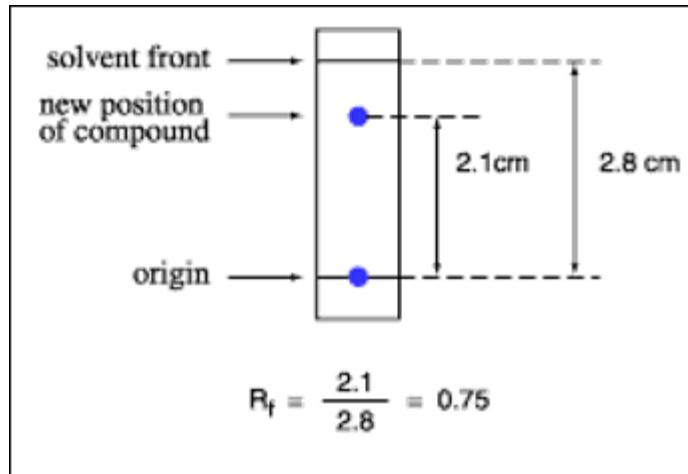
Значение Rf определяется коэффициентом удерживания, или Rf определяется как расстояние, пройденное соединением, деленное на расстояние, пройденное растворителем.

Рис. 2.1.

$$R_f = \frac{\text{distance traveled by the compound}}{\text{distance traveled by the solvent front}}$$

Например, если расстояние перемещения соединения 2,1 см, а растворителя 2,8 см, Rf будет равен 0,75: (см. рис. 2.2)

Рис. 2.2.



R_f соединения является постоянным от одного эксперимента к другому только в том случае, если следующие хроматографические условия также постоянны:

- Система растворителей
- Адсорбент
- Толщина адсорбента
- Введенное количество образца
- температура

Поскольку эти факторы трудно поддерживать от эксперимента к эксперименту, обычно предполагаются относительные значения R_f. «Относительный R_f» означает, что значения указаны относительно стандарта, или это означает, что вы одновременно сравниваете значения R_f на одной и той же пластине. Чем больше R_f соединения, тем большее расстояние проходит образец на пластинке ТСХ. При сравнении двух разных соединений, изученных в одинаковых хроматографических условиях, соединение с большим R_f является менее полярным, поскольку оно менее сильно взаимодействует с полярным адсорбентом на пластинке ТСХ. И наоборот, если вы знаете структуру соединений в смеси, вы можете предсказать, что соединение с низкой полярностью будет иметь большее значение R_f, чем полярное соединение на той же пластинке. R_f может предоставить подтверждающие доказательства относительно идентичности соединения. Образцы и стандартный образец помещают рядом на пластинке ТСХ. Если испытуемое вещество имеет то же значение R_f, что и стандарт, то, скорее всего (но не обязательно), это то же самое соединение. Если у них разные значения R_f, это определенно разные соединения. Обратите внимание, что эта проверка идентичности должна выполняться на одной пластинке, поскольку трудно точно воспроизвести все факторы, влияющие на R_f, от эксперимента к эксперименту.

Проблемы с использованием TLC и способы их решения

Примеры распространенных проблем в TLC:

- Соединение поднимается в виде полосы, а не пятна: возможно, образец был перекормлен. Это требует разбавления образца. Или узор может просто содержать множество

компонентов, создавая множество пятен, которые поднимаются вместе и выглядят как полоса. В таких случаях эксперимент может пойти не так, как ожидалось.

- Образец движется в виде мазка или верхнего полумесяца: соединения, обладающие сильными кислотными или основными группами (амины или карбоновые кислоты), иногда вызывают такие формы на пластинке ТСХ. В таких случаях к растворителю добавляют несколько капель гидроксида аммония (амины) или уксусной кислоты (карбоновые кислоты).
- Образец опускается в форме нисходящего полумесяца: Адсорбент, вероятно, разрушился в месте введения образца, что привело к образованию серповидной формы.
- Передняя часть пластинчатого диссольвера приземляется неравномерно: либо адсорбент упал по бокам пластины, либо стороны пластины касаются стенок контейнера (или бумаги, использованной для пропитки контейнера). Наклонные зоны затрудняют точное измерение значений R_f.
- На тарелке видно много случайных пятен: важно случайно не уронить на тарелку органические соединения.
- Появление синих пятен на пластинке во время теста: возможно, вместо карандаша для отметки начальной точки использовалась чернильная ручка.

2.2 Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационная хроматография — это метод разделения по молекулярной массе. Ее также называют молекулярно-ситовой или гель-проникающей хроматографией. В гель-фильтрационной хроматографии неподвижная фаза состоит из пористых шариков с четко определенным диапазоном размеров пор. Стационарная фаза гель-фильтрации имеет диапазон фракционирования, что означает, что молекулы в этом диапазоне молекулярной массы могут быть разделены. Достаточно маленькие белки могут поместиться во все поры, и в этом случае белки имеют доступ как к подвижной фазе внутри шариков, так и к подвижной фазе между шариками. Белки, которые слишком велики, чтобы поместиться в какую-либо пору, элюируются буферным раствором. Они имеют доступ только к подвижной фазе между гранулами и поэтому элюируются первыми. Белки среднего размера частично встроены в поры, то есть они могут поместиться в некоторые, но не во все поры шариков. Эти белки затем разделяются на большие («вымытые») и маленькие («полностью включенные») белки.

Рассмотрим соответствующие фракции колонки для глутаматдегидрогеназы (ММ 290 000), лактатдегидрогеназы (ММ 140 000), сывороточного альбумина (ММ 67 000), ов альбумина (ММ 43 000) и цитохрома (ММ 24 001). Био-Гель П-150 (диапазон фракций 15000 – 150000). При нанесении белковой смеси на колонку первой элюируется глутаматдегидрогеназа, поскольку она превышает верхний предел фракционирования. Поэтому он полностью вымывается изнутри пористой неподвижной фазой и следует за так называемым мертвым объемом (V₀). Цитохром с находится ниже нижнего порога фракционирования, полностью проникает в поры и в конце элюируется. Другие белки частично проникают в поры геля и

элюируются в соответствии с уменьшением молекулярной массы. Эти разделения можно описать уравнением, где V_r — объем удерживаемого белка, V_0 — объем подвижной фазы внутри колонки, между шариками неподвижной фазы (иногда называемый мертвым объемом), V_i — объем подвижной фазы внутри пористых шариков (также называемый общим объемом), а K — коэффициент распределения (определяет способность белка проникать в стационарную фазу, значения варьируются от 0 до 1). В приведенной выше смеси белков коэффициент распределения (K) для глутаматдегидрогеназы будет равен 0 (полностью непроницаем), $K = 1$ для цитохрома с (как полностью проникший), а K будет находиться в диапазоне от 0 до 1 для других белков, попадающих в диапазон фракционирования колонки.

На практике гель-фильтрацию можно использовать для разделения белков по молекулярной массе. Его также можно использовать для замены буферной системы белка.

2.3 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография — это обратимая адсорбция заряженных молекул иммобилизованными ионными группами на матрице с противоположным зарядом. Разделение может быть достигнуто путем адсорбции образцов и последующей замены их на матрице анионами или катионами.

В равновесии обменные группы связаны с противоионами. После достижения равновесия добавляется образец, молекулы которого подвергаются перезарядке, замещают противоионы обратимо, т.е. соединяются с матрицей. Несвязанная проба пройдет через колонку с «мертвым» объемом. Вещества удаляются из колонки за счет увеличения ионной силы буфера. Ионообменный материал представляет собой нерастворимую матрицу, к которой ковалентно присоединены группы с определенным зарядом. Отрицательно заряженные носители связывают положительно заряженные ионы (катионы). Когда существует второй тип ионообменного носителя, он может заменить и/или обменять отрицательный заряд. Эти смолы называются анионитами.

Анионообменные смолы заряжены положительно и связывают и/или обменивают отрицательно заряженные ионы (анионы). Некоторые группы боковых цепей аминокислотных остатков в белках являются ионизируемыми (например, лизин или глутаминовая кислота), равно как и N-концевые амино- и C-концевые карбоксильные группы, поэтому белки представляют собой заряженные молекулы. Эту функцию можно использовать для разделения различных белков с помощью ионообменной хроматографии. Для разделения белков можно использовать две ионные группы, ковалентно присоединенные к такому полимеру, как целлюлоза: карбоксиметилцеллюлоза (СМ-целлюлоза) и диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЕАЕ-целлюлоза). СМ-целлюлоза имеет карбоксиметильную функциональную группу — $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COOH}$. При нейтральном pH карбоксиметильная группа ионизируется как — $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COO}^-$, так что целлюлоза СМ имеет отрицательный заряд, поэтому она является слабым катионообменником. ДЭАЭ-целлюлоза содержит диэтиламиноэтильную группу. Он положительно заряжен при нейтральном pH, поэтому ДЭАЭ — целлюлоза является слабым анионообменником.

Разделение белков с помощью ионообменной хроматографии зависит от разницы в заряде разных белков. Заряд белка зависит от количества и типа ионизированных групп боковой цепи аминокислот. Остатки лизина при ионизации имеют положительно заряженную группу боковой цепи, тогда как остатки глутаминовой кислоты имеют отрицательно заряженную боковую цепь. У группы другая рKa; то есть pH, при котором он наполовину диссоциирует. Таким образом, общее количество зарядов конкретного белка при определенном pH будет зависеть от количества и типа ионизированных групп боковой цепи аминокислот. Поскольку по определению разные белки имеют разный аминокислотный состав, они будут иметь разные заряды при данном pH и, следовательно, могут быть разделены на основе этого принципа. Каждый белок имеет изоэлектрическую точку (pI), где при определенном pH общее количество отрицательных зарядов равно количеству положительных зарядов, и поэтому в этих условиях он не имеет заряда. pI – изоэлектрическая точка белков. Когда pH белка в буфере ниже pI, белок не связывается с ионообменной смолой. Ниже этого значения pH белок будет иметь суммарный положительный заряд и связываться с катионообменником, а выше этого значения pH он будет иметь суммарный отрицательный заряд и связываться с анионообменником. В принципе, для связывания белка используется либо катионообменник, либо анионообменник. На практике белки стабильны и функционально активны в довольно узком диапазоне pH, поэтому выбор ионообменника часто диктуется стабильностью pH желаемого белка. Для СМ-целлюлозы противоионом обычно является Na+, а для DEAE-целлюлозы противоионом обычно является Cl-.

После того как подходящая смола (гель) выбрана, ее смешивают с буфером с образованием суспензии, которой можно загрузить в подходящую хроматографическую колонку. Значение pH этого стартового буфера имеет решающее значение, поскольку оно определяет заряд высвобождаемых белков. Начальный pH буфера должен быть по крайней мере на одну единицу pH выше или ниже pI белка, который будет связываться со смолой, чтобы обеспечить адекватное связывание. Однако следует отметить, что КМ-целлюлоза и ДЭАЭ-целлюлоза являются примерами слабых ионообменников. Слабый ионообменник — это тот, который ионизируется только в ограниченном диапазоне pH. Так, ДЭАЭ-целлюлоза начинает терять заряд выше pH 9, а СМ-целлюлоза начинает терять заряд ниже pH 5. Термин «слабый» не относится ни к силе связывания ионов со смолой, ни к физической силе. Эффективный начальный диапазон pH при использовании DEAE-целлюлозы или СМ-целлюлозы составляет всего лишь pH 5–9. Помимо выбора правильного pH стартового буфера, необходимо учитывать его ионную силу. Сродство белков к ионообменным смолам снижается с увеличением ионной силы. Действительно, это свойство используется одним из методов элюирования связанных белков.

Лабораторный практикум главы 2

2.А Тонкослойная хроматография

Реагенты и расходные материалы

Упаковка 1- пластина силикагеля и капилляр, флякон 2- маркер, флякон 3- подвижная фаза.

Дополнительный материал, необходимый для теста:Химический стакан и крышка.

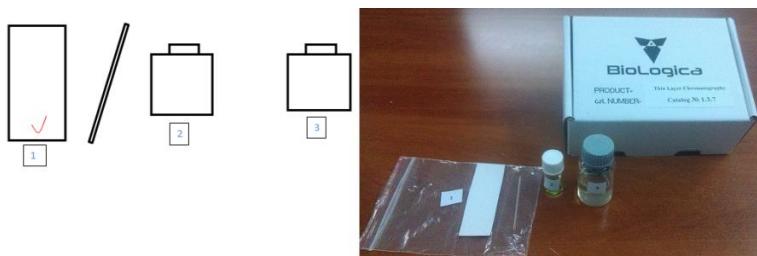
ПРИНЦИП

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ТСХ) – применяется часто и в промышленности, и в исследовательских целях. Разделение соединений происходит на силикогелевой пластине, по принципу гидрофобии или гидрофилии. Подвижной фазой служат растворители которые подбираются по принципу полярности растворителей. По окончании хроматограммы пластина подвергается специфической окраске. Учитывая тот факт что данная работа проводится предварительно окрашенными маркерами, пластина не нуждается в окраске.

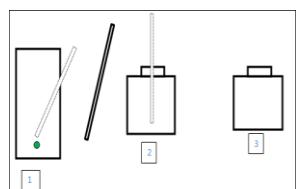
В рамках данной работы студент учится навыкам проведения ТСХ.

Ход эксперимента:

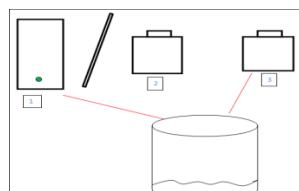
Размещаем флаконы и упаковку на столе так, как показано на схеме.



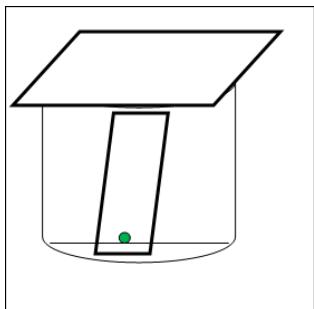
Отбираем пробу из флакона 2 с помощью капилляра и наносим на пластиинку силикагеля. Повторяем процедуру 2-3 раза. После каждого повторения процедуры образец следует высушить на пластиине.



Переливаем подвижную фазу из флакона 3 в камеру деления и помещаем вовнутрь пластиинку.

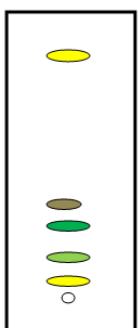


Поместив пластинку в стакан, закрываем крышку и наблюдаем за процессом.



Результат тонкослойной хроматографии:

По окончании процесса компоненты образца разделяются по принципу гидрофильности и гидрофобности. Для удобства используется предокрашение маркеры. Поэтому пластинка не требует окраски или других дополнительных процессов.



2.Б Гель-фильтрационная хроматография

Реагенты и расходные материалы

флакон 1-концентрированный фосфатный буфер (рН 6), пробирка 2-маркер, упаковка 3-гель-фильтрационная колонка, флакон 4-разделяющая гелевая суспензия, упаковка 5-фильтровальная бумага, упаковка 6-пипетка Пастера

Дополнительный материал, необходимый для теста:

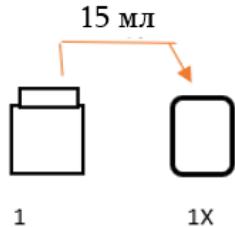
Штатив, цилиндр (1 л), пипетка (1 мл), **насадки для пипеток**, химический стакан (до 50-200 мл), емкость с 1х дистиллированной водой.

ПРИНЦИП

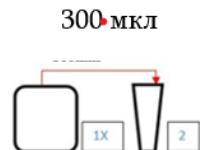
ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – это метод разделения соединений по молекулярной массе. В рамках данной работы студент обучается технике набивки колонки, приготовлению и внесению пробы, проведению процесса хроматографии и визуальной оценке деления образцов на составляющие фракции. Учитывая тот факт что данная работа проводится предварительно окрашенными маркерами, студенту предоставляется возможность визуально наблюдать за процессом деления и движения биологически активных соединений.

Ход эксперимента:

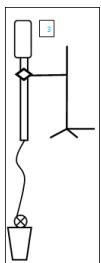
Перенесите 15 мл концентрированного фосфатного буфера (рН 6) из флакона 1 в контейнер 1X, где уже помещено 135 мл дистиллированной воды.



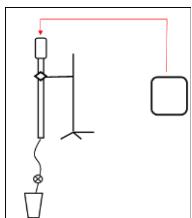
Перенесите 300 мкл фосфатного буферного раствора из пробирки 1Х в пробирку 2.



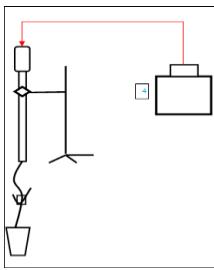
Устанавливаем колонну на штатив вертикально.



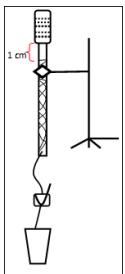
Переносим из контейнера 1Х в рабочую колонку буфера и заполняем его наполовину. Выгоняем пузырьки воздуха из колонки с помощью капилляра, контролируем чтобы буфер постоянно находился в колонке. После дегазации закрываем выпускной клапан с колонки.



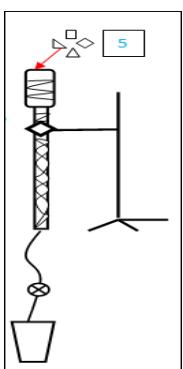
Выливаем в колонку имеющийся гель из флакона 4, открывая выпускной клапан.



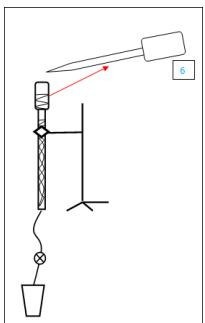
Колонку заполняем разделяющим гелем так, чтобы буфер находился над разделяющим гелем на 0,5-1 см выше.



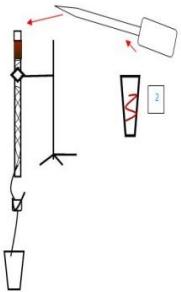
Закрываем выпускной клапан, застилаем поверхность фильтровальной бумагой (из упаковка 5).



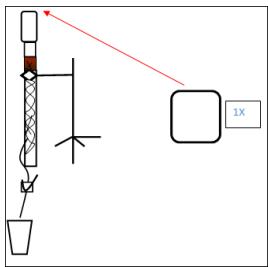
Пипеткой Пастера удаляем буфер, помещенный поверх геля.



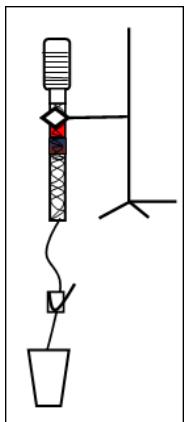
Из пробирки 2 с помощью пипетки Пастера вносим 300 мкл образца.



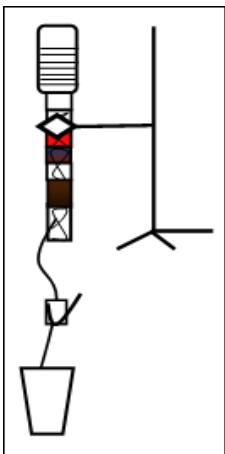
Используя пипетку Пастера, добавьте небольшое количество буфера из 1x, чтобы покрыть поверхность.



После ввода небольшого объема образца в колонку, фосфатным буфером из 1x мы заполняем резервуар колонки.



В процессе разделения мы заполняем резервуар колонки буфером и поддерживаем наличие буфера чтобы гель не пересох. После завершения процесса визуализируются три вещества с разной молекулярной массой, являются предварительно окрашенными и соответственно визуализируются три разных цвета.



2.В Ионообменная хроматография

Реагенты и расходные материалы

Флакон 1-концентрированный фосфатный буфер, пробирка 2-предокрашенные маркеры, упаковка 3-колонка, флакон 4-фиксирующий гель, упаковка 5-фильтровальная бумага, упаковка 6-пипетка Пастера, упаковка 7-пробирки, упаковка 8-посуда, флакон 9- 1 М NaCl в ацетатном буфере.

Дополнительный материал, необходимый для теста:

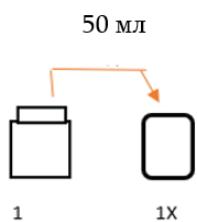
Штатив, цилиндр (1 литр), контейнер с 1х дистиллированной водой, химический стакан (200 мл), пипетка (1 мл), **головки для пипеток**.

ПРИНЦИП

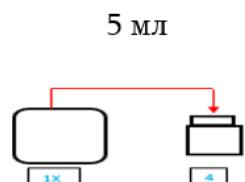
ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – применяется при делении соединений по заряду. Колонка заполненная носителем имеет заряд положительный или отрицательный, т.е. катионит или анионит. Соответственно анионит связывает отрицательную группу соединений а катионит положительную. Разные соединения с разной силой связываются с носителем и соответственно, разная ионная сила смывает их с носителя. Это свойство и заложено в основу деления ионообменной хроматографией. Проводя градиентную элюцию с колонки различные соединения смываются с неё на разных солевых концентрациях. Учитывая тот факт что данная работа проводится предварительно окрашенными маркерами можно визуально наблюдать за процессом.

1. Приготовление рабочих растворов

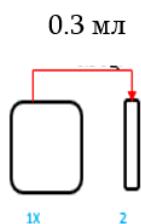
50 мл концентрированного фосфатного буфера, помещенного во флакон 1, переносим в емкость 1-X, в которую помещают 450 мл дистиллированной воды. (Контейнер и вода поставляются на месте). Получаем рабочий фосфатный буфер.



а) Переносим 5 мл рабочего фосфатного буфера из контейнера 1-X во флакон 4.

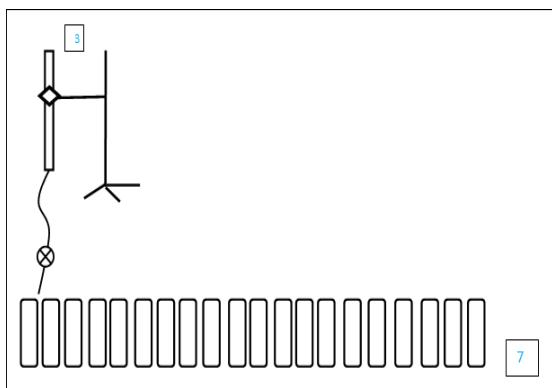


б) Переливаем 0,3 мл жидкости из емкости 1-X в пробирку 2, где находится предокрашенный маркер.



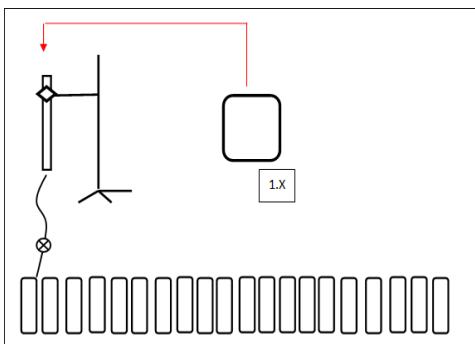
3. Процесс сборки

Устанавливается колонна к штативу вертикально.

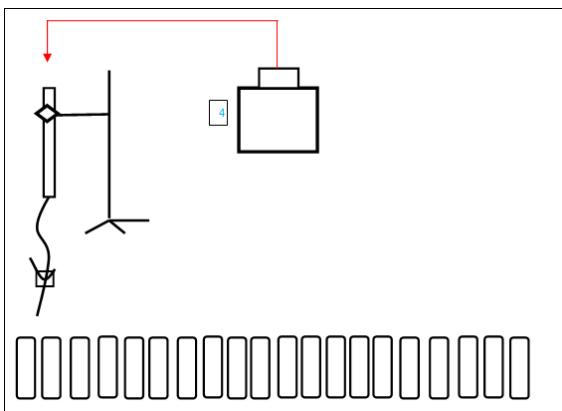


4. Заполнение колонки разделяющим гелем

Из контейнера 1-X заполняем колонку буфером и дегазируется с помощью стеклянной мешалки. Закрываем выпускной клапан.

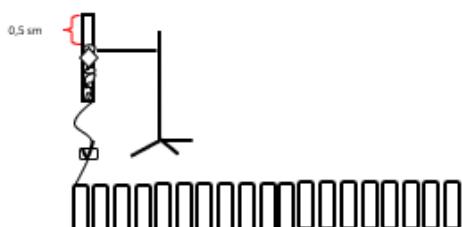


Из флакона 4 заливаем гелевую суспензию в колонку, открываем выпускной клапан.

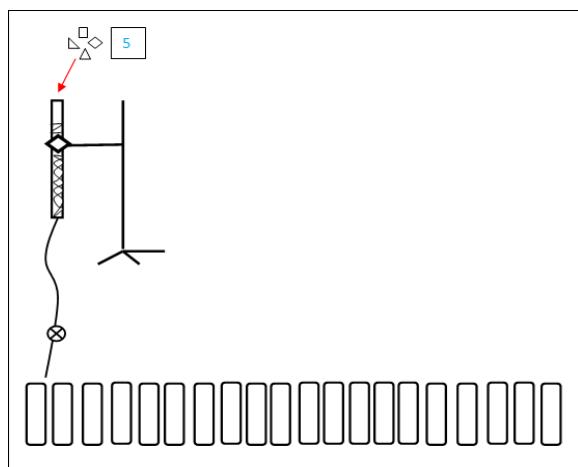


6. См. инжир. 6

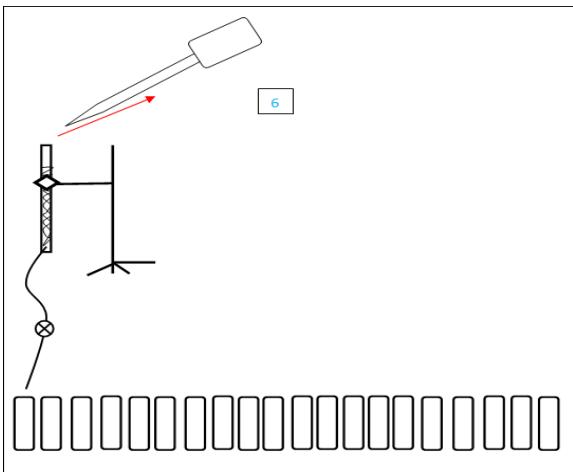
Наполняем колонку так, чтобы верхний край геля был на 0,5 см ниже буфера в резервуаре.



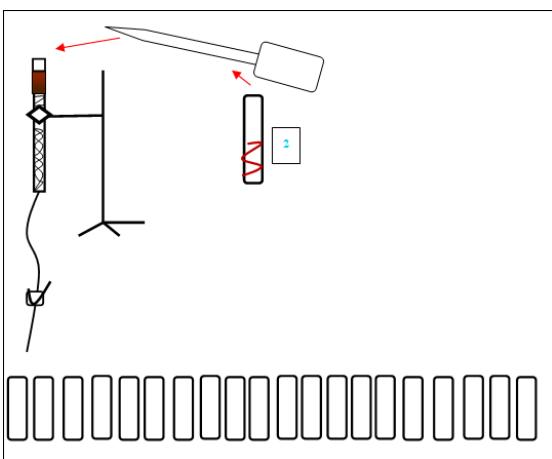
На поверхность геля кладем фильтровальную бумагу. Закрываем выпускной клапан.



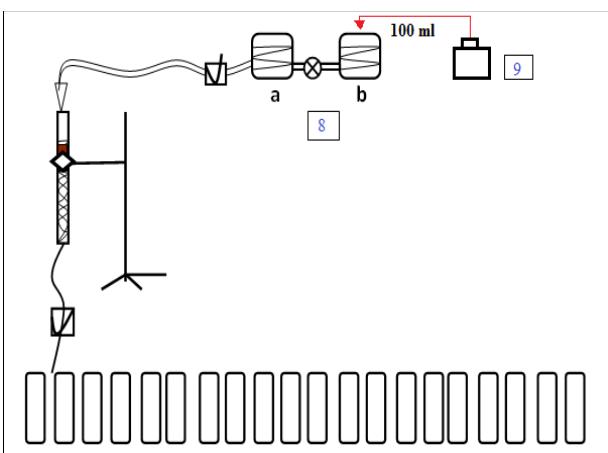
Пипеткой Пастера удаляем буфер с поверхности геля.



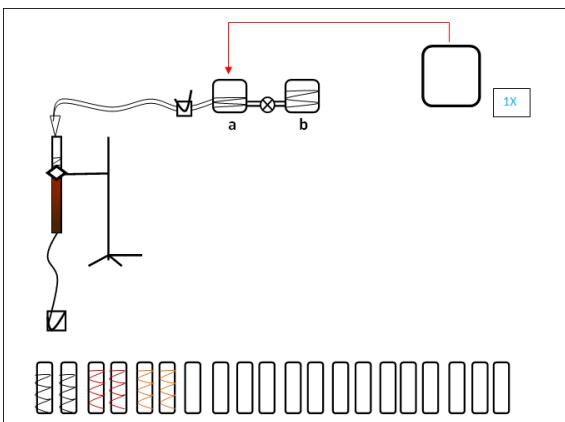
Пипеткой Пастера вносим 300 мкл образца из пробирки 2 и открываем выпускной клапан.



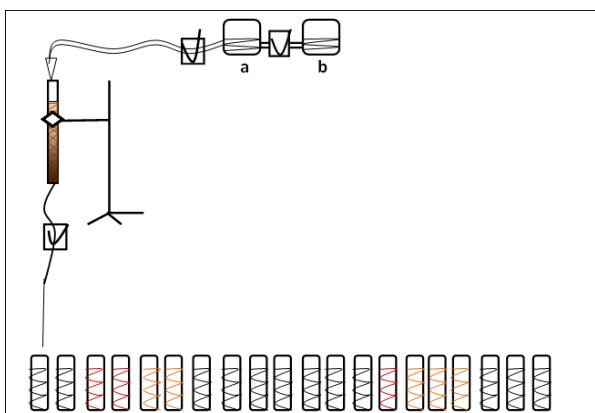
Размещаем емкость на высоте 10-20 см от колонки в резервуар (а). Наливаем фосфатный буфер в резервуар (б). Наливаем ацетатный буфер (1M NaCl). Закрываем клапан между стаканами. Выход из резервуара герметично размещается на колонке, открываем выпускной клапан.



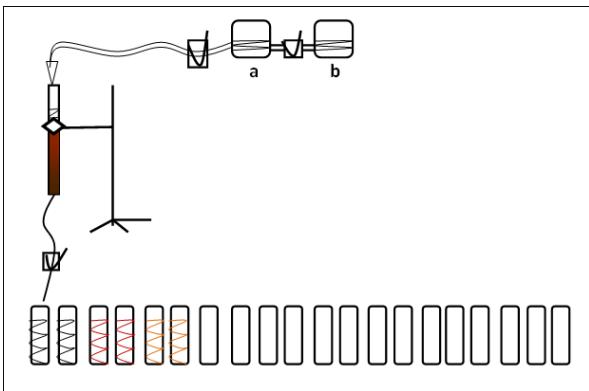
(а) В резервуар добавляем рабочий фосфатный буфер, чтобы защитить колонку от высыхания.



Открываем клапан между стаканами, в результате 1M ацетатный буфер NaCl смешивается с фосфатным буфером, проба элюируется из колонки по принципу градиента.



Процесс хроматографии контролируют по цвету жидкости, выходящей из колонки.



3. Электрофорез

Метод электрофореза, предложенный еще в начале XX века, сейчас широко используют в биологии и медицине для разделения белков в исследовательских и клинических целях. С помощью электрофореза можно разделить на отдельные компоненты белковую смесь, что позволяет установить молекулярную массу белка или его субъединиц, подтвердить чистоту выделенного белка.

Электрофорезом называют движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофоретический метод в биохимии – это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Результатом проведения электрофореза является электрофореграмма-картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления. Электрофореграмма белков биологических жидкостей человека (сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.) позволяет врачам получить значительную диагностическую информацию.

Например, у здорового человека относительное содержание белковых фракций при определении их в сыворотке крови методом электрофореза на бумаге, следующее:

Альбумины	- 55-65%,
α_1 – глобулины	- 3-6%,
α_2 – глобулины	- 7-10%,
β – глобулины	- 7-12%,
γ – глобулины	- 13-19%.

При многих заболеваниях наблюдается изменение соотношения фракций, тогда как общее количество белка обычно мало изменяется. Выявление этих изменений с помощью метода электрофореза широко используется в диагностических целях.

Электрофореграммы белков-ферментов (зимограммы) позволяют изучать изменения активности и изоферментного спектра таких белков под действием внешних и внутренних факторов как у человека, так и у других организмов. Получаемые данные используются в медицине, биотехнологии, различных отраслях сельского хозяйства и пищевой промышленности.

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Электрофорез - это движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофорограмма – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления.

Электрофоретический метод в биохимии–это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

Электрофоретическая подвижность (*u*) данной молекулы - это скорость движения заряженной молекулы (выраженной в см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1В/см.

Изоэлектрическая точка - такое значение рН среды (обозначаемое как *pI*), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю.

Зональный электрофорез - электрофорез, проводится при постоянном (не изменяющемся) значении рН буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле.

Полиакриламидный гель (ПААГ) – продукт сополимеризации акриламида (создающего линейную “основу”) и N, N' - метиленбисакриламида (служащего для поперечных “шивок” линейных цепей).

3.1 Принцип метода электрофореза белков.

Электрофоретическая подвижность

В растворе белки находятся в виде заряженных частиц. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации группировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот (карбоксильных, амино-, имидазольных и др. групп), а также при связывании ионов. Так как степень диссоциации группировок зависит от pH раствора, то величина и знак суммарного заряда белковой молекулы зависят от pH среды, а также от *ионной силы* (интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе). Для расчета ионной силы следует найти произведение концентрации каждого иона на квадрат его заряда, сложить все полученные величины и итоговую сумму разделить пополам. Если в растворе присутствуют два или более электролитов, то вычисляется общая суммарная ионная сила раствора.

Для каждого белка существует такое значение pH среды (обозначаемое как *pI-изоэлектрическая точка*), при котором положительные и отрицательные заряды ионизированных групп скомпенсированы, поэтому заряд всей белковой молекулы равен нулю. В буфере с pH, равным *pI* изучаемого белка, отсутствие заряда на белковой молекуле делает невозможным ее движение в электрическом поле. Из-за разницы в аминокислотном составе разные белки имеют разные значения *pI*.

При $\text{pH} \neq pI$ молекулы белка приобретают заряд и под действием электрического поля перемещаются к противоположно заряженному электроду – катоду (-) или аноду (+). Например, кислые белки, богатыеmonoаминодикарбоновыми аминокислотами (*асп, глу*), в слабо щелочном буфере приобретут отрицательный суммарный заряд из-за диссоциации COOH-групп до COO⁻ и H⁺ и будут двигаться к аноду. Для электрофоретического разделения оптимально такое значение pH рабочего буфера, которое обуславливает максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением pH, на 3 — 4 единицы отличающимся от среднего значения *pI* для белков данного типа. Это позволяет добиться хорошей *электрофоретической подвижности* (см. ниже) и вместе с тем – сохранить ощутимые различия молекул по заряду. Предпочтительно использовать буфер известной и постоянной ионной силы на основе однозарядных ионов. От рабочего буфера также требуется существенная емкость, так как локальная концентрация белка в образующихся при разделении смеси зонах скопления молекул может оказаться значительной. Поэтому используют буфера с концентрацией не менее 0,1—0,2M.

При проведении электрофореза электрическое поле создают с помощью **источника питания** – стабилизированного выпрямителя, способного давать регулируемое напряжение до 500 – 1000 В при силе тока в несколько десятков миллиампер (mA). Предпочтительнее использовать выпрямитель со стабилизацией по току.

Классификация электрофоретических методов

Основными типами электрофореза являются:

- *Зональный электрофорез,*
- *Изотахофорез*
- *Изоэлектрическое фокусирование*
- *Иммуноэлектрофорез*

Зональный электрофорез ведется при постоянном (не изменяющемся) значении pH буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле. Усложненным вариантом зонального электрофореза является *диск-электрофорез* (многофазный зональный электрофорез), при котором pH и другие характеристики, постоянные внутри одной “фазы”, при переходе к другой “фазе” скачкообразно изменяются. Принципы диск-электрофореза рассмотрены в разделе 1.3.

При *изоэлектрическом фокусировании* в среде для электрофореза создается плавный градиент pH. Белок останавливается в зоне, где значение pH равно его изоэлектрической точке (*pI*). Для создания градиента pH обычно используют раствор полиамино-поликарбоновых кислот, которым насыщают носитель. В отсутствии электрического поля эта смесь обычно имеет pH=6,5. При наложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент pH от 3 до 10.

В случае *изотахофореза* заряженные ионы с начала разделяются в соответствии с величинами их заряда и подвижности, а затем перемещаются в электрическом поле с одинаковыми и постоянными скоростями.

Иммуноэлектрофорез сочетает себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции “антитело – антиген”. Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

По цели различают:

- *аналитический* (для анализа состава смеси, реже – для получения малых количеств разделяемых веществ) электрофорез,
- *препаративный* (для получения препаратов – значительных количеств чистых веществ) электрофорез.

По степени денатурации разделяемых белков различают

- *нативный* электрофорез,
- *электрофорез в денатурирующих условиях*.

В отличие от нативного электрофореза, электрофорез в денатурирующих условиях предполагает применение химических реагентов, разрушающих пространственную структуру разделяемых белков.

По направлению фракционирования выделяют электрофорез, при котором белки движутся в *одном* направлении, и *двумерный* электрофорез, при котором сначала проводят разделение в одном направлении, а затем – в направлении, перпендикулярном первому. Двумерный электрофорез позволяет резко увеличить разрешающую

способность при разделении смесей, состоящих из большого количества разных белков.

В зависимости от ориентации носителя (геля, бумаги, др.) электрофорез может быть *вертикальным* или *горизонтальным*.

Классификация по типу носителя жидкой фазы представлена в таблице 1. Она также отражает развитие электрофоретических методов в историческом аспекте. Первым был разработан электрофорез без какого-либо носителя: электрическая цепь между электродами замыкалась через буферный раствор, в котором и происходило разделение белков. Позднее при электрофорезе начали применять *носители жидкой фазы* – полимеры, служащие “каркасом” для буфера. Применение носителей позволило заметно снизить конвекцию (перемешивание) и, следовательно, повысить качество разделения белков. Носитель может быть в форме порошка, пленки, геля и др. Последующие разработки были посвящены усовершенствованию свойств носителей.

Идеальный носитель должен:

- а) резко снижать конвекцию;
- б) быть простым в приготовлении;
- в) иметь высокую теплопроводность (при низкой теплопроводности трудно охладить систему);
- г) обладать низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью в отношении веществ, подвергаемых электрофорезу;
- д) не иметь заряда на поверхности частиц, чтобы не вызывать эндоэлектроосмос. Если разделяемые белки заряжены отрицательно, то при электрофорезе они должны двигаться к аноду (+), однако эндоэлектроосмос “тянет” их в другую сторону, к катоду (-), мешая электрофоретическому разделению.

Гели легко принимают разные геометрические формы, поэтому в названии электрофоретического метода с их использованием указывают, **какова конфигурация рабочего пространства**. Гель для электрофореза можно полимеризовать:

- в трубках,
- в капиллярах,
- в пластинах (“слэбах” – от англ. *slab*),

Основной недостаток электрофореза в трубках – это отсутствие теплооттока: температура в центре цилиндра геля оказывается выше, чем у его прилегающей к стеклу поверхности. Это приводит к изгибу белковых зон. На одну трубку наносится одна исследуемая проба.

Повысить теплоотток можно, применяя очень тонкие трубы – капилляры. В тонких пластинах также достигается гораздо более эффективное отведение тепла, чем в трубках. Так, при воздушном охлаждении эффективный теплоотвод возможен при силе тока 50 – 100 мА на вертикально расположенную пластину (то есть рассеиваемая в виде тепла мощность не превышает 20 Вт). Кроме того, конфигурация пластины позволяет в абсолютно идентичных условиях проводить разделение сразу нескольких (10 - 13) проб белка. Пластины легко сканировать и удобно разрезать. По сравнению с цилиндрическими гелями гелевые пластины позволяют значительно уменьшить концентрацию белка в наносимой пробе.

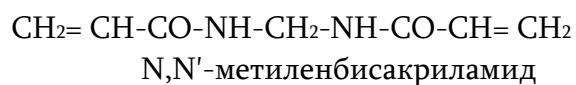
Преимущества и недостатки использования различных носителей при электрофорезе

Название метода, носитель	Преимущества метода и/или носителя	Недостатки
Электрофорез с подвижной границей (в свободном растворе). Носителя нет.	Первый электрофоретический метод, позволивший разделять белки	Сложно избежать конвекции—перемешивания разделляемых зон; для исследования нужна пробы в десятки мг белка; разрешающая способность мала (не более 8 компонентов в пробе).
На фильтровальной или хроматографической бумаге (50 е годы ХХ в.)	Сниженная конвекция, разделенные зоны можно зафиксировать и окрасить. Оборудование проще.	Непрозрачность. Загрязнения и неоднородность бумаги мешают разделению. “Хвосты” на электрофореграммах из-за высокой адсорбционной емкости. Фон окрашивается, что затрудняет распознавание белковых зон.
На пленках из ацетата целлюлозы (известен с 1957 г.)	Быстрый, требует меньшего количества пробы для анализа. Низкая адсорбционная емкость помогает избежать появления “хвостов” на электрофореграмме. После окрашивания фон остается бесцветным. Пригодны для иммуноэлектрофореза.	Непрозрачность в водных растворах (можно добиться прозрачности, погрузив в минеральное масло). Дороже, чем при использовании бумаги. Мало пригоден для препаративного электрофореза.
В крахмальном геле (предложен О.Смитисом)	Первый носитель со свойствами молекулярного сита. Активно препятствует конвекции. Повышает разрешение.	Низкая прозрачность, хрупкость, размер пор можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля трудоемко.
В агаровом и агарозном гелях	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления.	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и COOH-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда—гидростатического давления. Возможно химическое взаимодействие веществ с агаром.
В поликариламидном (ПААГ) геле (предложен Л.Оринстейном и Д.Дэвисом)	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный.	На сегодняшний день наилучший носитель, но готовится из акриламида – ядовитого вещества.

3.2 Особенности электрофореза в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качествами идеального носителя (табл.1). Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белковых смесей *не только по заряду, но и по размеру и форме частиц*. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля.

ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида (создающего линейную “основу”) и N,N'-метиленбисакриламида (служащего для поперечных “шивок” линейных цепей).



Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50% можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7,5% акриламида, равен 5 нм, а 30% акриламида - 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (M_r) разделяемых веществ и форму их молекул (см.табл.2).

Таблица 2

Выбор концентрации акриламида
При разном диапазоне молекулярных масс исследуемых белков

Размер белка, кДа	Концентрация акриламида, %
36 -205	5
24 -205	7,5
14 -205	10
14 -66	12,5
10 -45	15

В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля, строение фрагмента которой представлено на рис.1. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В тоже время ПААГ не содержит ионизированных групп.

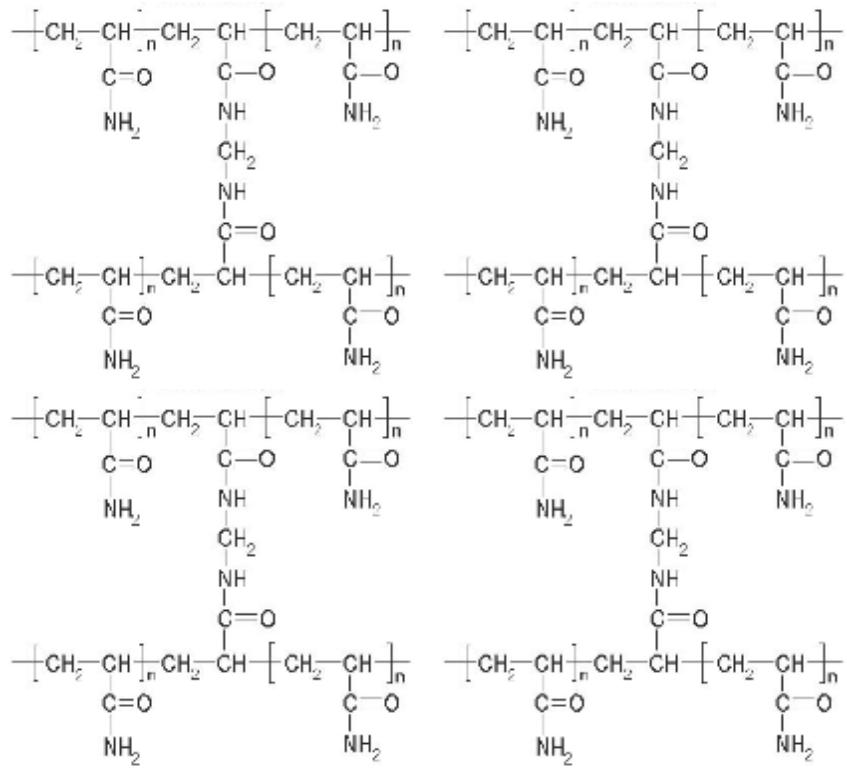
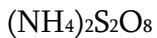
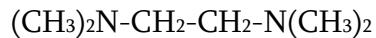


Рис.1 Структура полиакриламидного геля

Для сополимеризации нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы-источники свободных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компонентов, представленных ниже:



Персульфат аммония (ПСА). Синоним - надсернокислый аммоний. Функция: инициатор полимеризации



$\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -тетраметилэтилендиамин
(ТЕМЕД) Функция: катализатор образования ПААГ

Механизм действия персульфата иллюстрирует рис. 2: при разрыве связи $\text{O}-\text{O}$ образуются два свободных радикала, каждый из которых стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней, также образуя свободные радикалы. Каждый такой радикал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с образованием нового радикала, и т. д. Цепная реакция полимеризации идет до тех пор, пока два радикала, встретившись между собой, не образуют обычную ковалентную связь. По такому же механизму в растущую цепочку линейного полимера одной из своих концевых винильных групп может встроиться метиленбисакриламид. Если его второй конец встроится всоста вдругой линейной полимерной цепочки, то образуется «сшивка» (показана на Рис.1). Без агента, образующего поперечные сшивки, в геле образуются лишь продольно расположенные длинные тонкие волокна [1].

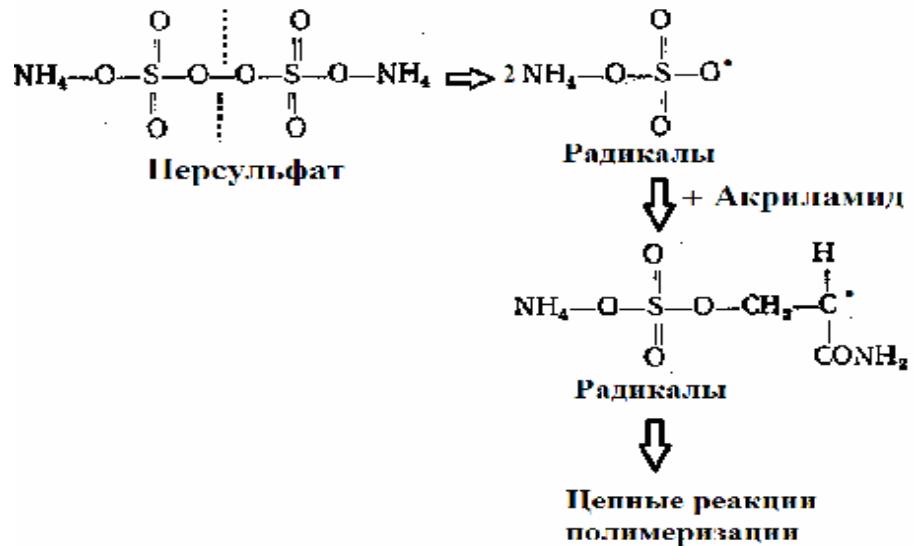


Рис. 2 Механизм действия персульфата аммония в качестве инициатора полимеризации акриламида

ВНИМАНИЕ!

- а) Персульфат аммония постепенно разлагается, в водных растворах –весьма быстро.

При растворении персульфат производит характерное пощелкивание. *Если 1%-ный раствор персульфата в воде имеет pH < 2, или при растворении не слышно щелчков, то персульфат не пригоден.*

- б) Персульфат способен окислять разделяемые вещества, что может привести к появлению дополнительных полос или инактивации ферментов. Поэтому перед опытом рекомендуется провести электрофорез без нанесения пробы с целью удаления лишнего персульфата.

Для составления геля пользуются обычно “маточными” растворами повышенной концентрации. Удобно, например, приготовить 40%-ный водный раствор смеси мономеров ($T=40$). Напомним, что T выражает процентное отношение массы обоих мономеров к конечному объему их раствора, а C – отношение массы NN' – метиленбисакриламида к сумме масс двух мономеров. Отсюда следует, что C не изменяется при разбавлении маточного раствора. Так, если предполагается иметь для рабочего геля параметры $T = 10$ и $C = 2,6$, то при составлении маточного раствора можно взять $T = 40$ и $C = 2,6$. Практически это означает, что надо отвесить $(40 \times 2,6) / 100 = 1,04$ г метиленбисакриламинечного объема 100 мл. Маточный раствор буфера может иметь двух или пятикратную концентрацию. В последнем случае полезно проверить, что pH буфера сохраняется при соответствующем разбавлении. Смесь расчетных объемов маточных растворов мономеров и буфера доводят до нужного объема водой[2].

Персульфат аммония лучше добавлять в минимальном объеме, который можно не учитывать. Для этого готовят концентрированный, обычно 10%-ный, маточный раствор персульфата, остатки которого вскоре приходится выбрасывать, так как он не хранится. Объемом вносимого в смесь ТЕМЕД также всегда можно пренебречь.

Нативный и SDS-ПААГ-электрофорез

В полиакриламидном геле можно проводить как нативный электрофорез, так и электрофорез в денатурирующих условиях.

Нативный электрофорез в ПААГ служит для разделения не подвергнутых денатурации белков (то есть белков в нативном состоянии), в том числе – в случаях, когда необходимо сохранить ферментативную или любую другую функциональную активность белков. Электрофоретическая подвижность белка в нативном состоянии зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от пространственной конфигурации полипептидной цепи. Для установления строгой количественной корреляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных.

В случае, когда требуется фракционировать белки исключительно по молекулярной массе, применяют *ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях*. Такая система была разработана У.К. Лэммли. Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси, им достигается очень четкое разделение зон, но активность ферментов полностью или в значительной мере может быть утрачена из-за их денатурации. Денатурирующие условия достигаются путем обработки пробы трехкратным избытком додецилсульфата натрия (синоним – лаурилсульфат натрия), сокращенно – ДСН (рис. 3). Чаще данное вещество обозначают SDS – от английского “*sodium dodecyl sulfate*”. Анион SDS несет отрицательный заряд.

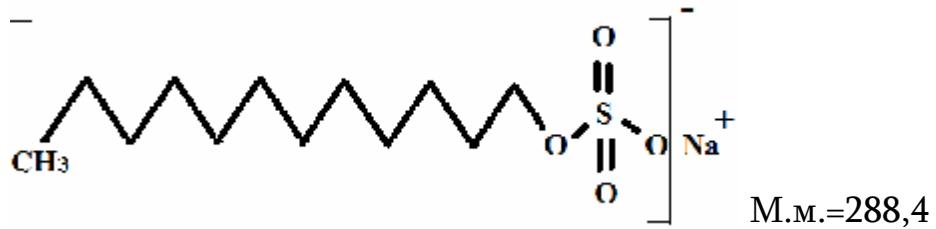


Рис. 3 Додецилсульфат натрия (ДСН, SDS)

Благодаря гидрофобным взаимодействиям анионы SDS сорбируются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным зарядом, значительно превышающим собственный заряд белковой молекулы. С большинством белков SDS связывается примерно одинаково - в соотношении 1,4 мг SDS на 1мг белка. Так как в присутствии SDS соотношение "размер/заряд" становится практически одинаковым для любого белка, деление происходит исключительно по молекулярной массе.

Отметим, что для полной денатурации белки, имеющие S-S-связи, до применения SDS обрабатывают β -меркаптоэтанолом, имеющим сильный неприятный запах, поэтому работы проводят под тягой. В качестве альтернативы β -меркаптоэтанолу используют дитиотреитол ($C_4H_{10}O_2S_2, M_r=154,25$), его требуется в 2 раза меньше, он менее летучий и не обладает столь специфическим запахом, однако, он гораздо дороже.

Диск-электрофорез

Диск-электрофорез получил свое название от двух английских слов: *discontinuity* (неоднородный, прерывистый) и *discoid* (дискообразный). Первое подчеркивает неоднородность электрофоретической среды, применяемой в этом методе. Второе описывает случайный признак – дискообразную форму зон разделенных белков в условиях, выбранных первооткрывателями метода. При диск-электрофорезе создают скачкообразные изменения концентрации (и, следовательно, пористости) геля, pH, градиента напряжения.

Вертикальный диск - электрофорез предполагает использование двух, а иногда и трех наслаждающихся друг на друга гелевых слоев:

1) Стартовый гель (sample-гель)–присутствует не всегда. Он располагается сверху, содержит пробу и краситель-“свидетель”, который будет показывать движение электрофоретического фронта. Стартовый гель предотвращает смешивание раствора пробы с электродным буфером.

2) Концентрирующий гель–крупно пористый гель. Размер его пор ограничивает диффузию, но не обеспечивает гелю свойства молекулярного сита по отношению к разделяемым белкам. Этот гель нужен для электрохимического концентрирования белков пробы, т.е. концентрирующий гель собирает смесь белков перед переходом в разделяющий гель в одну узкую полосу.

3) Разделяющий (сепарирующий, разрешающий, “running”-гель)–нижний мелкопористый гель, в котором, собственно, и происходит электрофоретическое и молекулярно-ситовое разделение компонентов пробы.

Диск-электрофорез проводится в комбинированной системе буферов – с отличающимися значениями pH и различного компонентного состава в электродных частях верхнего и нижнего геля (рис. 4).

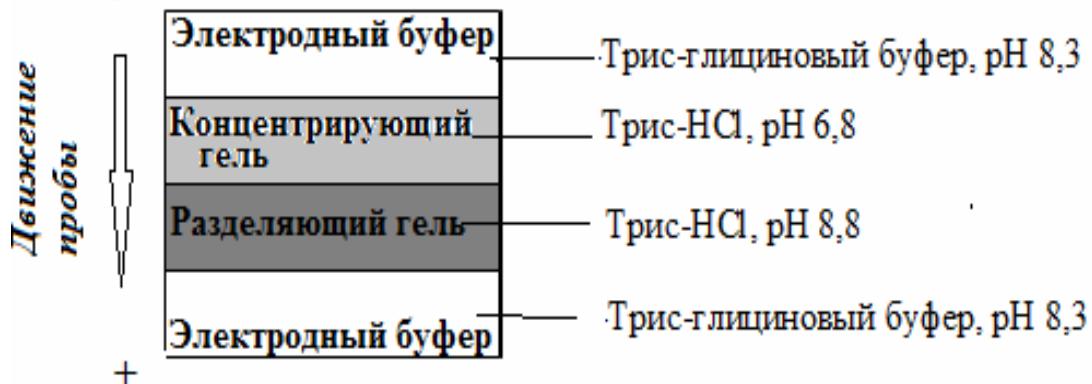


Рис.4 Прерывистая система буферов (трис-трис (гидроксиметил) аминометан, $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{-NH}_2$)

Наличие прерывистой системы буферов увеличивает разрешающую способность метода из-за возникающего электрохимического эффекта, обеспечивающего концентрирование компонентов пробы и образование тонкой стартовой зоны на границе концентрирующего и разделяющего гелей.

Буферные смеси подбирают так, чтобы электрофоретическая подвижность ионов в одной из них была выше, чем в другой. Например, в электрофоретической системе, изображённой на Рис. 4, электродный буфер с pH 8,3 обладает более медленными ионами глицината, а буфер концентрирующего геля—более быстрым и хлорид-ионами. Под действием электрического поля «быстрые» хлорид-ионы устремляются в сторону анода (+), оставляя за собой бедное и онами пространство, вследствие чего наблюдается резкое падение напряжения. В результате возникшего перепада напряжения в этом пространстве, «медленный» ион глицината начинает ускоряться, догоняет «быстрый» хлорид-ион и в дальнейшем движется с той же скоростью, что и быстрый.

Так как подвижность разделяемых компонентов исследуемой смеси в электрическом поле ниже подвижности «быстрых» ионов и выше-

«медленных» ионов, то в пространстве с резким падением напряжения они также ускоряются и на границе двух ионных фронтов концентрируются в тонкую полоску.

На границе между концентрирующим крупнопористым гелем и мелкопористым разделяющим гелем ионы затормаживаются в результате молекулярно-ситового эффекта: чем больше молекулярная масса, тем медленнее вещество проходит через небольшие поры разделяющего геля. При этом «медленный» глицинат-ион опережает ионы белкового образца, так как масса глицината относительно мала, и создает позади себя пространство с падением напряжения. «Запаздывающие» (по сравнению с глицинатом) ионы образца вынуждены продвигаться в этом образованном «медленными» ионами пространстве. Кроме того, в буфере разделяющего геля, имеющем pH 8,8, диссоциируют кислотные группировки белков и белки разного строения приобретают различный по величине отрицательный заряд, что заставляет их двигаться к аноду со скоростью, пропорциональной заряду. В итоге из-за различия разделяемых белков как по массе, так и по заряду, узкая стартовая зона разрушается, образуя в разделяющем геле зоны отдельных белков-компонентов разделяемой смеси.

3.А Электрофорез в нативных условиях

Приготовление растворов и проб

Реагенты и расходные материалы:

Флакон 1–концентрированный фосфатный буфер. (РН 8); Пробирка 2 – лиофильный маркер

Материалы, не вошедшие в набор:

Контейнер X1 – дистиллированная вода, цилиндр, стакан, пипетка, головки для пипеток.

Принцип

Электрофорез – метод разделения высокомолекулярных и среднемолекулярных веществ по массе и заряду.

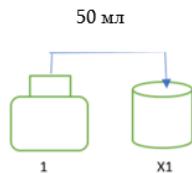
Готовится агарозный или акриламидный гель, в качестве электролита используется фосфатный буфер (РН 8). Электролит. Это раствор, обеспечивающий буферную емкость и соответствующий заряд емкости, из которой заряженные частицы поступают в гель. Заряженные вещества движутся навстречу противоположному заряду. В зависимости от пористости геля при этом движении они разделяются по заряду и массе. К электролитам относятся растворы солей, кислот и оснований, в нашем случае растворы солей фосфатного буфера.

По окончании электрофореза гель окрашивают методом диффузии и тем же методом обескрашивают. Фоновая часть геля обескрашивается полностью и в геле остаются окрашенные белки.

Методом электрофореза также определяют молекулярную массу белков. В этом случае ставится форез в денатурирующих условиях.

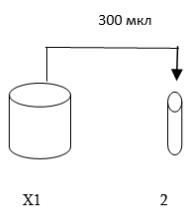
1. Приготовление рабочего раствора:

Перенесите 50 мл конц. фосфатный буфер из бутылки 1 в контейнер X1, содержащий 200 мл дистиллированной воды.



2. Подготовка проб:

Перенесите 300 мкл рабочего буфера из контейнера X1 в пробирку 2.



Формирование геля

Реагенты и расходные материалы

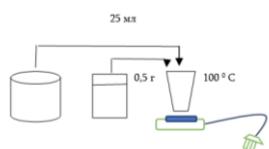
упаковка 1- агароза (для электрофореза); 2- предметные стекла; 3- Пипетка Пастера 4- Фильтровальная бумага, держатель, полоски для форм, гелевая ванна.

Материалы, не вошедшие в набор:

цилиндр, химический стакан. электрический нагреватель

1) Приготовление геля

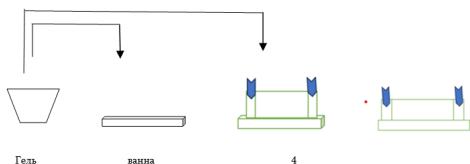
Переносим 0,5 г агарозы из пакета 1 в химический стакан, добавляем 25 мл рабочего фосфатного буфера из контейнера X1. Кипятить при 100 °C 1-2 минуты.



2) Заливка геля:

Берем предметные стекла из упаковки 2, а из упаковки 4 размещаем полоски-формы между стеклами с правой и левой стороны с помощью держателя,

Вылейте гель в ванну, подождите 5 минут для полимеризации. Наливаем гель между стеклами и снимаем полимеризацию. После полимеризации геля снимаем верхнее стекло и полоски формы. На концах прикрепляем фильтровальную бумагу из пакета 4.



1. Опускаем фильтровальную бумагу в электролиты с различными зарядами.
2. Наносим образцы на гель и по окончании фореза гель окрашиваем и обескрашиваем.

Электрофорез и окраска геля

Используемые реагенты и материалы:

бутылочка 1- краска; флакон 2-экстрагирующая жидкость; 3-фильтровальная бумага;
4-Аппарат для электрофореза.

Дополнительный материал, необходимый для теста:

регулятор напряжения; распыленный химический стакан, пинцет.

Материал из предыдущих сборников:

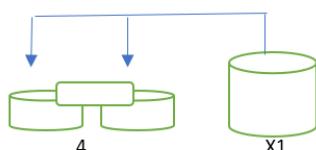
Контейнер X1-фосфатный буфер.

В пробирке двухцветный маркер.

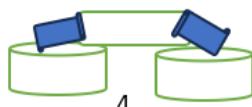
4-кейс-стекло-уже готовый гель.

Процесс анализа:

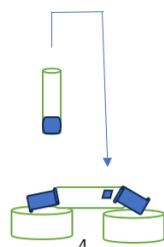
1. Налейте равное количество фосфатного буфера из контейнера X1 в контейнеры устройства.



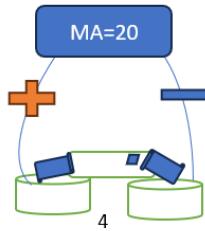
2. Стакан, на который помещен гель, закрепляем между емкостями так, чтобы прикрепленная к краям стакана фильтровальная бумага находилась в жидкости.



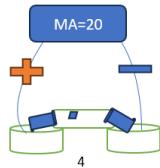
3. С помощью пинцета помещаем фильтровальную бумагу в пробу, приготовленную в предыдущей лабораторной работе, наносим фильтровальную бумагу, пропитанную пробой на гель.



4. Выставляем регулятор напряжения М МА=20.

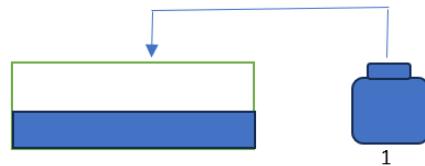


5. Наблюдаем за ходом электрофореза, как только проба пройдет через фильтровальную бумагу, выключаем регулятор напряжения от источника питания и снимаем фильтровальную бумагу. Время от времени смачиваем поверхность геля фосфатным буфером с помощью распылителя. При достижении конца фронтальной полосы, останавливаем форез.



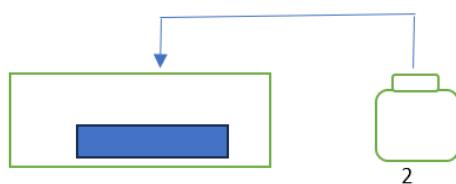
6. Окрашивание геля:

Помещаем гель в емкость, заливаем краску из флакона 1 и оставляем на 2 часа.



7. Извлечение геля:

Отделяем гель от жидкости и выливаем жидкость из флакона 2 для обескрасивания. Хорошо обескрасив гель, наблюдаем полученное изображение.



3.Б Электрофорез в денатурирующих условиях

Реагенты и расходные материалы:

1-концентрированный фосфатный буфер (рН 8); 2.1-2.2-лиофильный маркер; 3,1- буфер; 3,2-буфер для проб + меркаптоэтанол; 4-СДС; 5. Агароза: предметное стекло, фильтровальная бумага, фильтровальная бумага для образца, держатель, прокладки для формирования геля, гелевая ванна; 6-пипетка Пастера; 7-краска; 8-обескрашивающий раствор; 9-Аппарат для электрофореза.

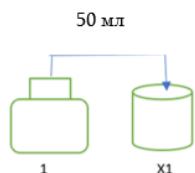
Дополнительный материал, необходимый для теста:

Регулятор напряжения, распылитель, химический стакан, дистиллированная вода, цилиндр, пипетка, головки для пипеток.

Поток процесса

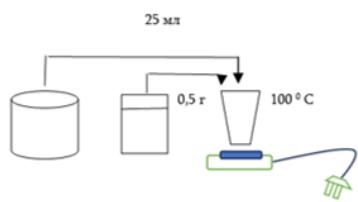
1) Приготовление рабочего раствора

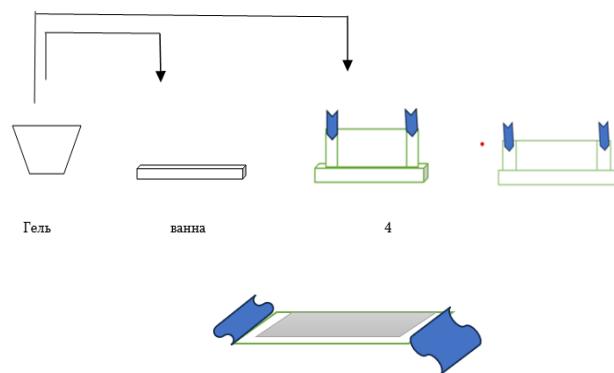
Буферные флаконы с концентрированным фосфатным буфером (рН 8) из флакона 1 переносим 50 мл в емкость X1, где находится 200 мл дистиллированной воды. Получаем рабочий фосфатный буфер.



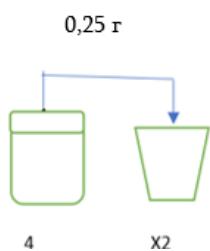
2) Приготовление геля: Переносим 0,5 г агарозы из пакета 5 в химический стакан, добавляем 25 мл рабочего фосфатного буфера из контейнера X1. Кипятить при 100°C в течение 2 минут. (рисунок 2) Берем предметное стекло из упаковки 5 и размещаем прокладки для формирования геля между стеклами с правой и левой стороны с помощью держателя из упаковки 5, заливаем гель в ванну, ждем 5 минут, чтобы он полимеризовался. Наливаем гель между стаканами и опорожняем его.

После полимеризации геля снимаем верхнее стекло и прокладки. На концах закрепляем фильтровальную бумагу из пакета 5.



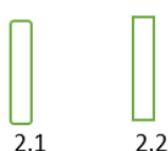
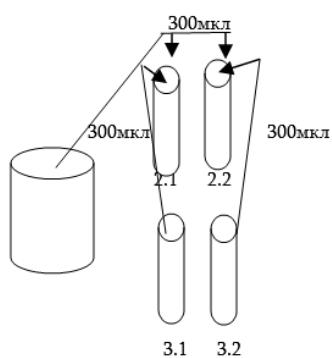


3) Берем порошок СДС (0,25 г) из упаковки 4 и открываем контейнер, нагревая его в X2.



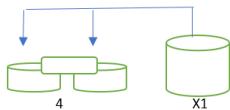
4) Подготовка проб

Перенесите 300-300 мкл рабочего буфера из контейнера X1 в пробирки 2.1 и 2.2. Берём 300 мкл жидкости из пробирки 3.1 и добавляем в пробирку 2.1. Берём 300 мкл жидкости из пробирки 3.2 и добавляем в пробирку 2.2. Поместите пробирки 2.1 и 2.2 в кипящую воду на 2 минуты.

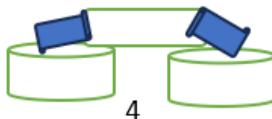


100°C

5) Налейте равное количество фосфатного буфера из контейнера X1 в контейнеры устройства.



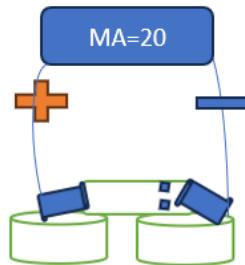
6) Прикрепляем предметное стекло (с подготовленным гелем) между емкостями так, чтобы прикрепленная к нему бумага находилась в жидкости. (Рисунок 6)



7) С помощью пинцета помещаем фильтровальную бумагу в пробирку 2.1, куда помещается образец, наносим на гель фильтровальную бумагу, пропитанную образцом.



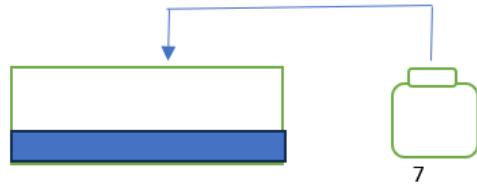
8) Регулятор напряжения устанавливаем на М MA=20.



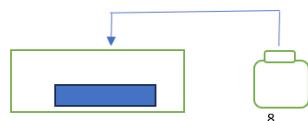
9) Наблюдаем за ходом электрофореза, как только образец пройдет через фильтровальную бумагу и войдет в гель, включаем регулятор напряжения и снимаем фильтровальную бумагу. Чтобы избежать пересыхание геля смачиваем поверхность геля фосфатным

буфером с помощью распылителя. При достижении фронтальной полосы противоположного конца геля отключаем форез.

10) Окрашивание геля: кладем гель в емкость, заливаем краситель из флакона 7 и ждем 2 часа.



11) Удаление геля: удаляем гель с краски и выливаем жидкость из флакона 8.



12) Заливаем гель обескраивающим раствором из флакона 8. Повторяем обескрашивание до тех пор, пока не проявятся белковые зоны.

4. Микробиология

4.1 Питательные среды

Разным микроорганизмам требуются разные питательные вещества. Питательные среды различаются по форме и составу в зависимости от посевного материала. Питательная среда должна содержать необходимые для всех организмов вещества в определенных пропорциях. В основном должен быть источник энергии, различных макро- и микроэлементов, витаминов и т. д. Он должен иметь соответствующий pH и быть стерильным, чтобы инокулированный организм мог образовать чистую культуру. Культура – это метод выращивания или культивирования микроорганизмов или других клеток *in vitro* в питательной среде. Питательная среда обеспечивает искусственную среду, имитирующую естественные условия, необходимые для роста.

Характеристика идеальной питательной среды:

- Быстрый рост
- Легко готовить
- Дешевый
- Простота производства

Основные требования питательной среды:

- Источник энергии
- Источник углерода
- Источник азота
- Соли
- pH
- Факторы роста

Обычные ингредиенты питательной среды:

1. Вода необходима для существования живых клеток. выступает в качестве источника водорода и кислорода.
2. Пептон – гигроскопичный порошок, получаемый из мяса, казеинового фибринса или соевой муки. Функция: источник азота, источник углерода.
3. Мясной экстракт содержит продукты распада белков, углеводы, неорганические соли, ферменты, факторы роста, богатые комплексом витаминов группы В. Функция: источник факторов роста, неорганических солей и т. д.
4. Дрожжевой экстракт содержит белки, аминокислоты, факторы роста (витамин В), углеводы и неорганические соли, такие как калий и фосфаты.

Функции: Источник факторов роста и, следовательно, превосходных стимуляторов роста. Его можно использовать для мясного экстракта.

5. Электролит – в основном используют хлорид натрия или другие электролиты. Функции: необходим для поддержания осмотического давления.
6. Агар – получен из видов *Gelidium* и других водорослей, выпускаемых в виде порошка; Содержит в основном длинноцепочечные полисахариды, белковые материалы и неорганические соли. Функции: плавится при 98°C и затвердевает при 42°C, поэтому используется в качестве отвердителя.

7. Бродячие соединения – в основном используются сахар, спирт и т. д. Функция: Выступая в качестве источника энергии, реакции ферментации помогают идентифицировать и классифицировать организмы.

8. Буферы – в качестве буферов используются карбонаты и фосфаты. Функция: поддерживать pH среды.

Типы питательные среды:

- Жидкость
- Полутвердые
- Твердый

а) **Жидкая среда или бульон** – это среда, в которую при приготовлении не добавляются затвердевающие вещества (например, агар). Наиболее часто применяемыми несинтетическими жидкими средами являются питательный бульон, раствор пептонов, молоко, кровь, сыворотка и др.

Плюсы жидкой среды:

- Для получения бактериального роста из крови или воды, когда требуется тестирование больших объемов.
- Для приготовления антигенов или вакцин.
- Используется для изучения скорости роста и скорости оседания бактериальных клеток.

Недостатки жидкой пищи:

- Трудно выделить разные типы бактерий из смешанной популяции.
- Трудно изучить характеристики колоний.

б) **Полутвердую питательную среду** готовят добавлением небольшого количества агара (0,5%) или желатина. Агар образует коллоидный раствор в горячей воде и затвердевает при охлаждении. Желатин — это экстракт животного происхождения, полученный гидролизом коллагена в кипящей воде. При растворении в воде он жидкий, при охлаждении затвердевает. Полутвердая среда может быть селективной, благоприятствует росту одного организма и замедляя распространение другого. Этот тип питательной среды можно использовать для изучения движения бактерий (полутвердая среда полезна для роста микроаэрофильных бактерий).

в) **Твердую питательную среду** готовят добавлением 2% или 1% агара; Он используется для характеристики колоний, идентификации колоний и т. д.

Способы посева

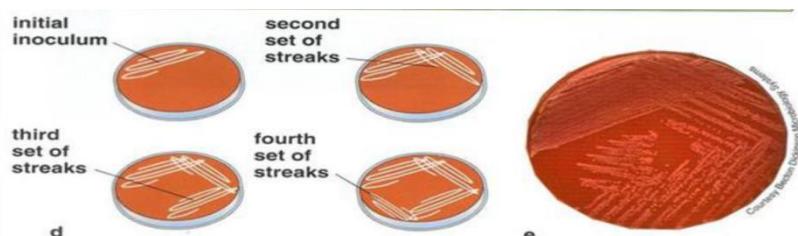
В микробиологии существуют различные инокуляционные методы получения микробных культур, главным образом метод линейной инокуляции, метод распределения по всей поверхности образца и метод отливки. Культура, содержащая только один вид микроорганизмов, называется чистой культурой. А культура, содержащая более одного микроорганизма, называется смешанной культурой. Большинство культур, встречающихся в природе, представляют собой смешанные культуры. Чистые культуры необходимы для изучения культуральных, морфологических и физиологических особенностей отдельных видов.

1) **Метод линейной инокуляции.** Этот метод был разработан двумя бактериологами, Леофлером и Гафки, в лаборатории Роберта Коха. Его обычно используют для выделения бактерий и получения чистых культур. В этом методе стерилизованную

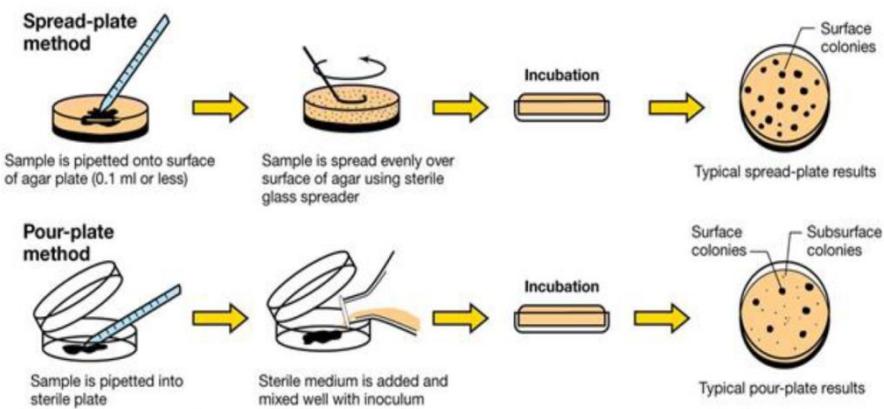
бактериологическую петлю помещают в разбавленную суспензию микроорганизмов, которую затем переносят на поверхность уже затвердевшей агаровой пластиинки для образования серии параллельных полос. Основная цель метода линейной инокуляции — получение высокодифференцированных колоний бактерий из концентрированных клеточных суспензий. Для получения линий на агаре используют стерильную бактериологическую петлю, состоящую из платиновой или никромовой проволоки. Петлю из раствора бактериальной суспензии помещают на поверхность агаровой пластиинки в стерильных условиях и перемещают петлю в виде зигзагообразной линии. Этот процесс повторяют трижды в разных участках чашки Петри, чтобы отделить бактерии друг от друга на поверхности агара. В первой полоске микроорганизмов больше, чем во второй, во второй больше, чем в третьей, и так далее. А последние полоски — это отдельные колонии микроорганизмов и так далее. Успешная изоляция зависит от пространственного разделения отдельных клеток. Чистые колонии можно получить путем переноса небольших порций каждой из хорошо изолированных колоний в отдельные питательные среды.

2) Метод распределения — это распространенный метод, используемый для выделения разбавленной смешанной популяции микроорганизмов с целью выделения отдельных колоний. В этом методе небольшой объем разведенной микробной смеси переносится в центр пластиинки с агаром и равномерно распределяется по поверхности стерильным L-образным изогнутым стеклянным шпателем при вращении чашки Петри. Чашку Петри с агаром помещают при 37°C на 24 часа в перевернутом положении. Изолированные колонии образуются из микробных клеток. Образцы, полученные этим методом, можно использовать для подсчета микробной популяции.

3) Метод разлива. Пробу выливают в стерильную чашку Петри, на которую выливают расплавленный (42°C - 45°C) агар, тщательно перемешивают и после застывания агара инкубируют. На инкубированном агаре наблюдают отдельные колонии. Этот метод используется для оценки количества жизнеспособных бактерий в суспензии.



Calculation: Number of colonies on plate \times reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
 (For example, if 32 colonies are on a plate of 1/10,000 dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000$ bacteria/ml in sample.)



4.2 Окраска по Граму

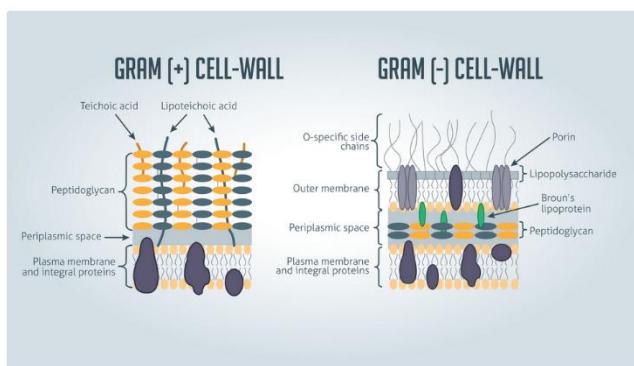
В микробиологии и бактериологии метод Грама представляет собой метод окрашивания, используемый для разделения видов бактерий на две большие группы: грамположительные бактерии и грамотрицательные бактерии. Название происходит от датского бактериолога Ганса Христиана Грамма, который разработал этот метод в 1884 году. Окрашивание по Граму позволяет различать бактерии на основе химических и физических свойств их клеточных стенок. Грамположительные клетки имеют толстый слой пептидогликана в клеточной стенке, который сохраняет основной краситель генцианвиолет. Грамотрицательные клетки имеют более тонкий слой пептидогликана, в результате чего генцианвиолет вымывается добавлением этанола. Они окрашены в розовый или красный цвет, в качестве второго красителя обычно используют сафранин или фуксин. Раствор Люголя всегда добавляют после добавления генцианвиолета для усиления связывания красителя с клеточной мембраной. Окраска по Граму почти всегда является первым шагом в предварительной идентификации бактериального организма. Хотя окрашивание по Граму является ценным диагностическим инструментом как в клинических, так и в исследовательских целях, не все бактерии можно однозначно классифицировать с помощью этого метода, что обусловлено существованием грам-переменных и грам-неопределенных групп.

Клеточная оболочка бактерий представляет собой сложную многослойную структуру, служащую для защиты их от непредсказуемой и зачастую враждебной среды. По клеточной мемbrane большинство бактерий делятся на две основные группы. Грамотрицательные бактерии окружены тонкой клеточной стенкой пептидогликана, сама клетка пептидогликана окружена внешней мембраной, содержащей липополисахарид. Грамположительные бактерии не имеют внешней мембранны, но слои пептидогликана значительно толще, чем у грамотрицательных бактерий. Внутри этих слоев пептидогликана находятся длинные анионные полимеры, называемые тейхоевыми кислотами.

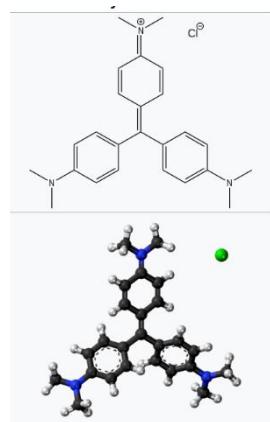
Мембрана грамотрицательной клетки имеет три основных слоя (Glauert и Thornley, 1969); внешняя мембрана (ОМ), клеточная стенка пептидогликана и цитоплазматическая или внутренняя мембрана (ИМ).

Двумя основными характеристиками, которые приводят к различным свойствам визуализации грамположительных и грамотрицательных видов, являются толщина слоя пептидогликана и наличие или отсутствие внешней липидной мембраны.

Структура пептидогликана Основная структура пептидогликана (PGN) состоит из чередующихся единиц углеводной основы N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и N-ацетилмурамовой кислоты. Пептидогликан обеспечивает прочность клеточной стенки; Клеточная стенка грамположительных бактерий может содержать до 40 слоев пептидогликана, что обеспечивает значительную механическую прочность. У грамотрицательных бактерий пептидогликан составляет около 10% сухой массы клеточной стенки; а у грамположительных бактерий толстый слой пептидогликана содержит около 20% сухой массы клеточной стенки. Хотя пептидогликан отвечает за механическую прочность и форму бактериальных клеток, он обладает достаточной пластичностью и динамическим оборотом, чтобы обеспечить рост и деление клеток.



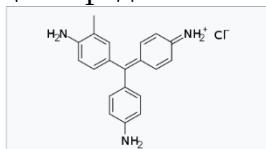
Генцианвиолет. Генцианвиолет, также известный как хлорид гексаметил паарозанилина, представляет собой триарилметановый краситель, используемый для окрашивания тканей и классификации бактерий по методу Грама. Медицинское использование красителя в значительной степени вытеснено более современными красителями, хотя он все еще внесен в список Всемирной организации здравоохранения.



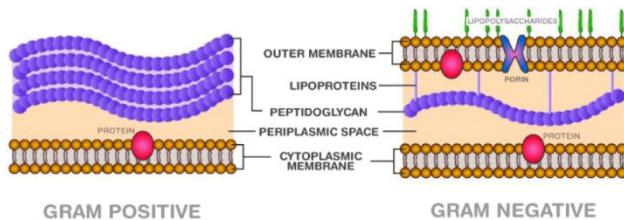
Генцианвиолет (CV) диссоциирует на ионы CV^+ и хлорид (Cl^-) в водных растворах. Эти ионы проникают через стенки как грамположительных, так и грамотрицательных клеток. Ион CV^+ взаимодействует с отрицательно заряженными компонентами бактериальных клеток и окрашивает клетки в фиолетовый цвет.[12] А йодид (I) взаимодействует с CV^+ и образует крупные комплексы генцианвиолета и йода (CV-I) во внутреннем и внешнем

слоях клетки. Йод является изолирующим агентом, который предотвращает удаление комплекса CV-I.13] Когда добавляется обесцвечивающая жидкость, такая как спирт или ацетон, она взаимодействует с липидами клеточных мембран. Грамотрицательная клетка теряет внешнюю липополисахаридную мембрану, а внутренний слой пептидогликана остается обнаженным. Комплексы CV-I вымываются из грамотрицательной клетки вместе с внешней мембраной. Напротив, грамположительные клетки обезвоживаются добавлением этанола. Большие комплексы CV-I сохраняются в грамположительной клетке из-за многослойной природы ее пептидогликана. Этап отбеливания имеет решающее значение и должен быть выполнен вовремя; Поскольку генцианвиолет можно вымыть как из грамположительных, так и из грамотрицательных клеток, если оставить отбеливатель на длительное время. После отбеливания грамположительная клетка остается фиолетовой, а грамотрицательная теряет цвет.

Фуксин или гидрохлорид розанилина представляет собой фуксиновый краситель с химической формулой C₂₀H₁₉N₃·HCl, фуксин используется для окрашивания бактерий, а иногда и в качестве дезинфицирующего средства.



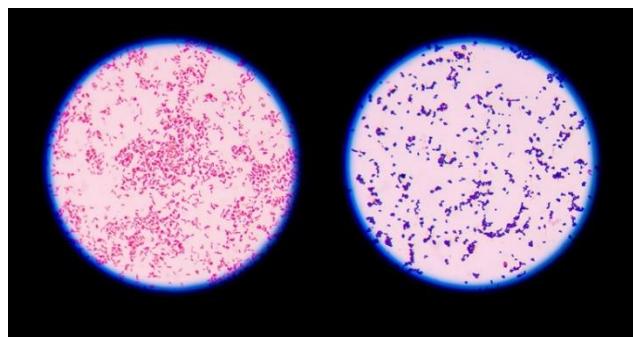
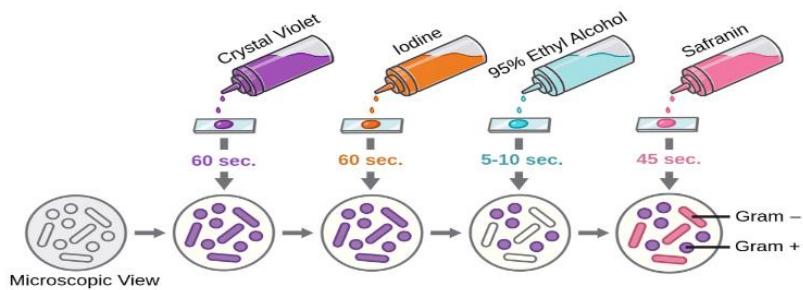
При окраске по Граму на последнем этапе используется контрастное окрашивание, обычно положительно заряженное сафранин или основной фуксин, чтобы придать неокрашенным грамотрицательным бактериям розовый или красный цвет. И грамположительные, и грамотрицательные бактерии принимают цвет второго красителя. Однако контрастное окрашивание не видно на грамположительных бактериях из-за темного фона генцианвиолета.



Грамположительная и грамотрицательная клеточная стенка

Разница между грамположительными и грамотрицательными бактериями:

- Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из толстых слоев пептидогликана.
- Клеточная стенка грамотрицательных бактерий состоит из тонких слоев пептидогликана.
- Грамположительные клетки сохраняют фиолетовый цвет при окрашивании по Граму.
- Грамотрицательные клетки не сохраняют фиолетовый цвет при окрашивании по Граму.
- Грамположительные бактерии производят экзотоксины.
- Грамотрицательные бактерии производят эндотоксины.



4.3 Антибиотики

Антибиотики широко используются для борьбы с бактериальными инфекциями, они могут либо убивать, либо подавлять рост бактерий. Ограниченнное число антибиотиков также обладают антипротозойной активностью. Антибиотики неэффективны против вирусов. Лекарства, подавляющие рост вирусов, называются противовирусными препаратами, а не антибиотиками. Лекарства, подавляющие рост грибков, называются противогрибковыми препаратами.

По источнику происхождения различают:

- Природные антибиотики – это антибиотики, вырабатываемые живыми организмами, например, пенициллин, синтезируемый плесневыми грибами;
- полусинтетические антибиотики, полученные модификацией биопрепаратов – амоксициллин, цефазолин;
- Синтетические или антибиотики полученные синтетическим путем – например, сульфаниламиды, нитрофуран.

Антибиотики обычно классифицируют по механизму действия, химической структуре или спектру действия.

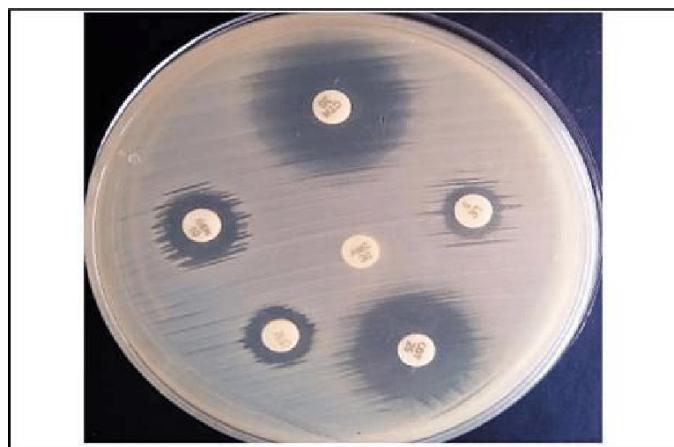
По воздействию на бактериальную клетку их делят на три группы:

- Под действием бактериостатических антибиотиков бактерии остаются живыми, но теряют способность к размножению (макролиды, тетрациклин, линкомицин, левомицетин), влияют на синтез белка. (Макролиды, линкозамиды и тетрациклины)

- Бактерии погибают под действием бактерицидных антибиотиков, но физически остаются в зоне обитания (пенициллин, цефалоспорины, аминогликозиды, рифампицин, полимиксины), в этом случае мишенью является клеточная стенка бактерий (пенициллины и цефалоспорины), клеточная мембрана (полимиксины), или подавляет функционирование бактериальных ферментов (рифамицинов), липиармицинов, хинолонов и сульфаниламидов);
- Бактериолитические антибиотики уничтожают бактерии и разрушают их клеточные мембранны.

Дальнейшая классификация основана на их целевой специфике. Антибиотики «узкого спектра действия» нацелены на определенные типы бактерий, такие как грамотрицательные или грамположительные, тогда как антибиотики широкого спектра действия воздействуют на более широкий спектр бактерий.

С 1940 г. диско-диффузионная проба для определения чувствительности микроорганизмов остается наиболее широко применяемым рутинным клиническим микробиологическим методом в лабораториях. Он используется для тестирования чувствительности наиболее распространенных и клинически важных бактерий, вызывающих заболевания человека. Метод основан на помещении различных дисков, пропитанных антибиотиками, на агар, уже инокулированный микроорганизмами. Антибиотик радиально диффундирует от поверхности в агаровый гель, создавая градиент концентрации антибиотика. После получения зон ингибирования после инкубации в течение 24 часов при температуре $35\pm1^{\circ}\text{C}$ диаметр каждой тестируемой зоны антибиотика измеряют невооруженным глазом или с помощью автоматизированной системы.



Результаты обычно описываются тремя способами:

- Чувствительный – тестируемый антибиотик остановил рост или убил бактерии или грибки, вызвавшие инфекцию. Лекарства могут быть хорошим выбором для лечения.
- Промежуточная – препарат может действовать в более высокой дозе.
- Устойчивость – препарат не останавливает рост и не убивает бактерии или грибы, вызывающие инфекцию. Неэффективен для лечения.

Устойчивость к противомикробным препаратам у бактериальных патогенов является проблемой, связанной с высокой заболеваемостью и смертностью. Множественную

лекарственную устойчивость грамположительных и грамотрицательных бактерий трудно или невозможно лечить обычными антибиотиками.

Устойчивость к противомикробным препаратам (УПП) стала серьезной угрозой общественному здравоохранению во всем мире. Точное и быстрое выявление устойчивости к противомикробным препаратам и последующее соответствующее лечение противомикробными препаратами имеют важное значение для контроля возникновения и распространения устойчивости к противомикробным препаратам.

4.А Подготовка микробиологических сред

Реагенты и расходные материалы

№	Название	Количество	Темп. хранения
1.1- 1.8	Чашки Петри	8 шт.	-
2.	Сабуро пищевая порция	13 г	-
3.	Индикаторная бумага	1шт	-

Дополнительный необходимый материал:

Автоклав или стерилизационная емкость, спирт, вата, 1х чашка для стерилизации, вода дистиллированная 200 мл.

Принцип

Для разделения, культивирования и хранения микроорганизмов используются пищевые зоны, которые содержат не только необходимые питательные вещества, но и представляют собой среду обитания микробов.

Микроорганизмам необходимы микро- и макроэлементы. Кроме того, микроорганизмам необходимы готовые органические соединения, так называемые факторы роста.

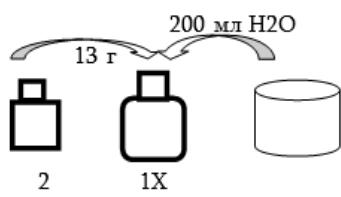
В микробиологии особое значение имеет пищевая ценность. Правильный подбор питательной среды дает возможность изолировать микроорганизмы, получать чистые культуры из среды обитания, изучать их морфологические и биохимические свойства, правильно и быстро диагностировать инфекционные заболевания. В ходе практической работы студент учится манипулировать, использовать и интерпретировать описанные выше материалы. Студент знакомится с принципами приготовления питательных сред, их стерилизацией и методам стерильной заливки стерилизованных сред.

Ход процедуры

1. Подготовка питательной среды

- а) Переносим 13 г седы Сабуро из флакона-2 в стерилизационный сосуд (1Х) и разбавляем дистиллированной водой до 200 мл. Растворяем перемешиванием
- б) Контролируем РН 6,5 с помощью индикаторной бумаги.

a)

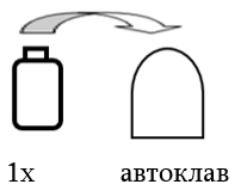


б)



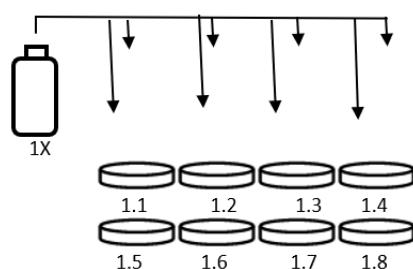
2. Стерилизация в автоклаве.

- Помещаем стерилизационный сосуд в автоклав и стерилизуем его при давлении 0,5 атм в течение 40 минут.
 - Охлаждаем до 40°C .



3. Разлив питательной среды по чашкам Петри.

В чашки Петри 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 стерильно переливаем в питательную среду супензию из стерилизационного сосуда. После застывания продукты помещают в термостат при температуре 35⁰ С для проверки на стерильность.



4.Б Посев в стерильных условиях

Реагенты и расходные материалы

№	Название	Количество	Температура хранения
1.	Песчаная среда	2.5 г	25 ⁰ C
2.	Пипетка одноразовая	1шт	25 ⁰ C
3.	Шпатель	1шт	25 ⁰ C
4.1-4.3	Пробирки	3шт	25 ⁰ C

Дополнительный необходимый материал:

Автоклав или стерилизационная емкость, спирт, спирт, штатив, 1х-чашка для стерилизации. Упаковка – чашки Петри 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 (из предыдущих лабораторных работ),

Принцип

Современная микробиологическая лаборатория отвечает всем требованиям для выращивания микроорганизмов, получения чистых культур и изучения их морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств.

Мы выделяем микроорганизмы из почвы в стерильных условиях, методом разведения. Этот метод позволяет определить общее количество микроорганизмов в 1 грамме почвы.

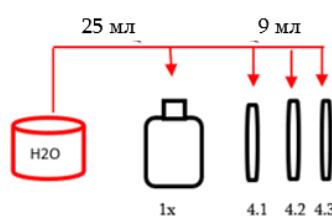
Метод разведения, который используется для получения культуры, изучается студентом по данному курсу.

Ход процедуры:

1. Стерилизация

а) Берем из набора чистые пробирки 4.1, 4.2, 4.3 и наливаем в каждую по 9 мл дистиллированной воды, закрываем пробкой.

В стерилизационную емкость (1Х) налейте 25 мл дистиллированной воды из местного резервуара, закрутите пробку.

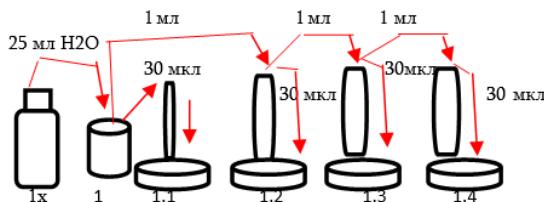


б) Поместите пробирки 4.1, 4.2, 4.3 и стерилизационный сосуд с 25 мл дистиллированной воды в автоклав. Стерилизуем при 0,5 атм 40 минут.



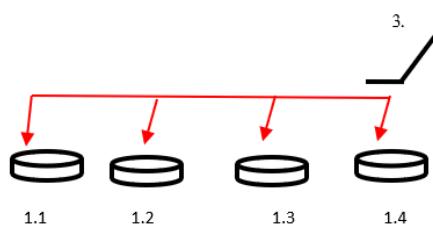
2. Посев в стерильных условиях методом разведения.

- Переливаем 25 мл дистиллированной воды из стерилизующей емкости в емкость 1, в которой создается прототип природной среды, и перемешиваем.
- После 5-минутной задержки переносим одну каплю в чашку Петри №1.1 из емкости 1 при помощи пипетки (упаковка 2).
- Перенесите 1 мл раствора из контейнера 1 в пробирку 4.1, хорошо размешав, перенесите 1 каплю образца из пробирки 4.1 в чашку Петри №1.2.
- Перенесите 1 мл из пробирки 4.1 в пробирку 4.2, после тщательного перемешивания перенесите 1 каплю образца из пробирки 4.2 в чашку Петри №1.3.
- Перенесите 1 мл из пробирки 4.2 в пробирку 4.3. Хорошо перемешав, перенесите 1 каплю (30 мкл) образца из пробирки 4.3 в чашку Петри № 1.4.



С помощью лопаточки (упаковка-3) в чашке Петри-1,4 распределяем пробу на твердой питательной среде по всей поверхности. То же действие повторяем на чашке Петри № 1.3, 1.2, 1.1.

Упаковку -1,1, 1,2, 1,3, 1,4 помещаем в термостат при температуре 35°C на 5 дней. .



4.В Получение колоний в чистом виде

Реагенты и расходные материалы

№	Название	Количество	Темп. хранения.
1	Питательная среда сабуро	6.5 г	-
2	Индикаторные бумаги	1 шт	-
3.1-3.2	Петля бактериологическая	2 шт	-
4.1-4.4	Чашки Петри	4 шт	-

Дополнительный необходимый материал:

Автоклав или емкость для стерилизации, спирт, вата, посуда для стерилизации (1x).

Необходимый материал из предыдущего набора:

Чашки Петри № 1.1, 1.2, 1.3 1.4 (из предыдущих лабораторных работ),

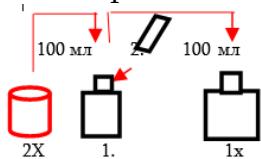
Принцип

Для идентификации различных видов микроорганизмов в почве на соответствующих питательных средах выделяют отдельные колонии и получают чистые культуры, что позволяет изучить их морфологические, культуральные, биохимические и антагонистические свойства.

Студент учится получать колонии в чистом виде в данной лабораторной работе.

Ход процесса:

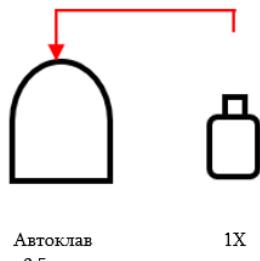
- Подготовка питательной среды к стерилизации.
 - Налейте 100 мл дистиллированной воды из 2X во флакон-1, в котором находится 6,5 г среды Сабуро. Перемешать встряхиванием.
 - С помощью индикаторной бумаги контролируем РН 6,5.
 - Раствор, помещенный во флакон-1, переносится в стерилизационный сосуд.



2. Стерилизация в автоклаве.

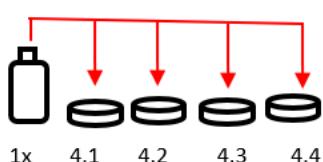
Поместите стерилизующую емкость в автоклав и стерилизуйте ее при давлении 0,5 атм в течение 40 минут.

Охлаждаем до 40⁰ С.



3. Питательную среду разливают по чашкам Петри.

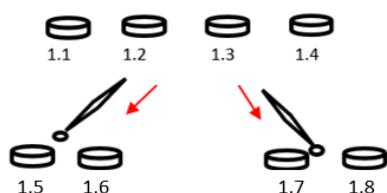
- В чашки Петри 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 стерильно переливают в среду Сабуро.



4. Получение отдельных колоний бактерий и грибов.

После застывания питательной среды в стерильных условиях, из чашек Петри № 1.1, 1.2, 1.3 1.4 (из предыдущей лабораторной работы) с помощью бактериологической петли (упаковка-3.1) переносим единичную колонию бактерий на среду Сабуро стерилизованного бульона (в чашках Петри № 1.5, 1.6)

В стерильных условиях из чашек Петри № 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 (из предыдущей лабораторной работы) посредством бактериологической петли (упаковка-3.2) переносим единичную колонию грибов в среду Сабуро (в чашках Петри № 1.7, 1.8). В чашки Петри № 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 помещаем в термостат при 35⁰ С, на 5-7 дней.



4.Г Окраска по Граму

Реагенты и расходные материалы

№	Название	Количество	Температура хранения
1.1-1.2	Стекло предметное	2 шт	
2	Генцианвиолет	1000 мкл	
3	Раствор Люголя	1000 мкл	
4	фуксина	1000 мкл	
5	пипеток Пастера	1шт	
6	иммерсионное масло	200 мкл	
7	спирт	10 мл	
8.1-8.2	Петля бактериологическая	2 шт	

Дополнительный необходимый материал:

Микроскоп, спирт, вата, химический стакан 1Х - дистиллированная вода 200 мл, химический стакан 2Х - дистиллированная вода 200 мл.

Необходимый материал из предыдущего набора:

Чашки Петри, в которой выращено чистая культура бактерий.

Чашки Петри, в которой выращено чистая культура грибов.

Принцип

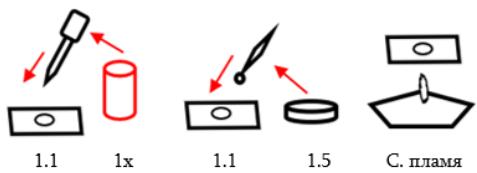
Одним из важных особенностей при идентификации микроорганизмов является окраска по Граму, которая в основном определяется химическим составом и строением клеточной стенки.

Метод Грама основан на способности некоторых бактерий вырабатывать в моче устойчивое соединение генцианвиолета и йода, которое не обесцвечивается при дальнейшей обработке спиртом. В результате бактерии сохраняют сине-фиолетовую окраску, их называют грамположительными бактериями. Бактерии, которые меняют цвет при обработке спиртом, называются грамотрицательными бактериями.

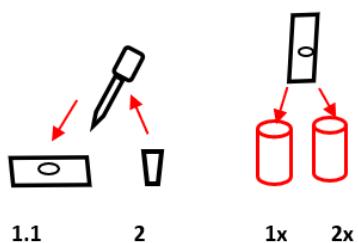
В данной лабораторной работе студент учится вышеуказанным методам окраски.

Процедура

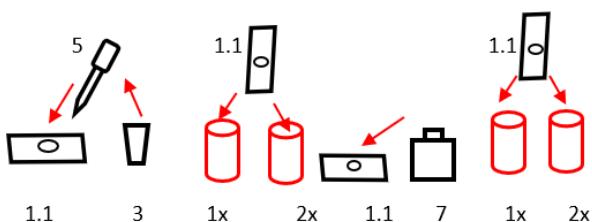
- Поместите одну каплю дистиллированной воды из 1Х на предметное стекло (упаковка 1.1) в стерильных условиях с помощью пипетки Пастера.
- Из чашки Петри (где выращивают чистую культуру бактерий) образец бактериальной культуры помещаем по капле на стекло с помощью бактериологической петли (пакет 8.1) и распределяем по поверхности.
- Фиксируем образец на спиртовом пламени.



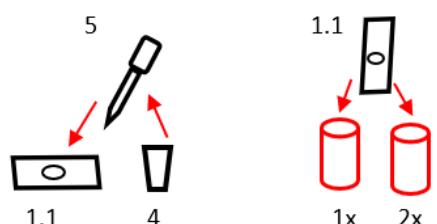
- С помощью пипетки Пастера (упаковка-5) капните 1-2 капли раствора генцианвиолета из Эплендорфа-2 на образец, зафиксированный на предметном стекле (упаковка 1.1).
- Задерживаем пробу на 1-2 минуты и промываем ее в 1Х дистиллированной водой, затем переносим в 2Х и промываем еще раз.



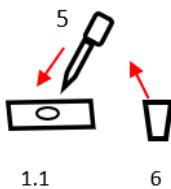
- С помощью пипетки Пастера (упаковка-5) капните 1-2 капли раствора Люголя из Эплендорфа-3 на образец, зафиксированный на предметном стекле (упаковка 1.1).
- Задерживаем пробу на 1-2 минуты и промываем ее в 1Х дистиллированной водой, затем переносим в 2Х и промываем еще раз.
- Обрабатываем препарат спиртом (флакон 7).
- Промываем в 1Х – дистиллированной водой, затем переносим в 2Х моем повторно.



- Пипеткой Пастера (упаковка-5) капаем 1-2 капли раствора фуксина из Эплендорфа-4 на образец зафиксированном на предметном стекле (упаковка 1.1).
- Задерживаем пробу на 1-2 минуты.
- Промываем 1Х дистиллированной водой, затем перенесим в 2Х раза и снова промываем.



- На препарат наносим одну каплю иммерсионного масла (Эплендорф-6). Изучаем в микроскопе, в иммерсионной системе.



- Микроорганизмы, окрашивающие сине-фиолетовый цвет, являются грамположительными, а микроорганизмы, окрашивающиеся в розовый или малиновый цвет, — грамотрицательными.
- Мы используем тот же метод при окрашивании образца грибной культуры.

4.Д Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам

Реагенты и расходные материалы

№	Название	Количество	Темп. хранения
1.1	Антибиотики для чувствительных бактерий	5 шт.	
1.2	Антибиотики против чувствительных грибов	5 шт.	
2.1- 2.2	Петля бактериологическая	2 шт	
3.1- 3.2	шпатель	2 шт	

Дополнительный материал, необходимый для теста:

Спирт, горелка спиртовая, вата, пинцеты.

Чашка Петри, в которой выращена бактериальная культура (1,5).

Чашка Петри, в которой выращена грибная культура (1,7).

Принцип

При развитии микроорганизмов в естественных условиях возникает явление, когда один вид микроорганизмов подавляет другой. Такая форма отношений называется антагонизмом. Одной из форм проявления антагонизма является образование специфического продукта обмена веществ, подавляющего или полностью предотвращающего развитие других организмов; такие вещества получили название антибиотиков.

Антибиотическое вещество, образующееся в процессе эволюции, является средством борьбы между микроорганизмами.

Активность антибиотиков имеет большое значение как в медицинской диагностике, так и во многих видах производства и научных областях.

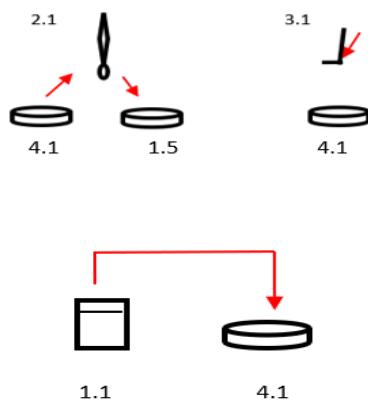
Именно эту технику студент изучает по средствам данного набора.

Ход процедуры

1. Чувствительность бактерий к антибиотикам

- Из чашки Петри (где выращена бактериальная культура) с помощью бактериальной петли (упаковка 2.1) изолируем одну колонию бактерий и переносим ее в стерильную чашку Петри.
- С помощью лопаточки (упаковка 3.1) распределяем пробу по всей поверхности питательной среды.

В стерильных условиях из упаковки 1.1, где находится диски с антибиотиками, берем каждый отдельный диск с антибиотиком и помещаем его на поверхность засеянной чашки Петри стерильным пинцетом. Помещаем его в термостат при температуре 35° С.

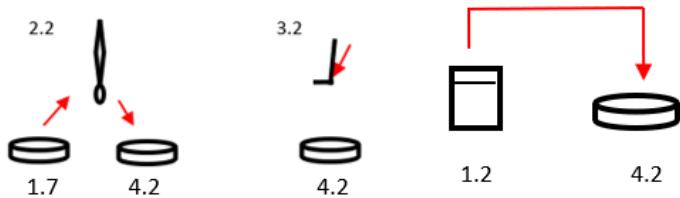


2. Чувствительность грибов к антибиотикам

- Из чашки Петри (где выращена грибная культура) с помощью бактериальной петли (упаковка 2.2) отделяем одну колонию гриба и переносим бульон на чашку Петри питательной среды.

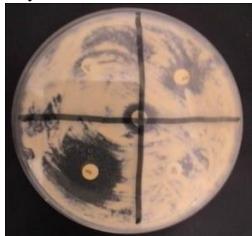
С помощью лопаточки (упаковка 3.2) образец растираем так, чтобы продукт оказался распределенным по всей поверхности.

В стерильных условиях, из упаковке 1.2, где помещены диски с антибиотиком против грибка, возьмите каждый диск с антибиотиком и распределите его по поверхности засеянной чашки Петри. Помещаем его в термостат при температуре 35⁰С на 5 дней.



- По образовавшейся вокруг диска прозрачной зоне мы судим о чувствительности бактерий и грибов к антибиотикам.

Чувствительность бактерий к антибиотикам



Как видно из снимка, антибиотик в левом нижнем углу имеет более высокую активность.

Чувствительность грибов к антибиотикам

Из данного снимка однозначно, можно сказать, что центральный диск АНТИБИОТИК.

5. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИФА

Иммунохимические методы анализа, основанные на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами, широко вошли в аналитическую практику и используются в различных областях медицины, сельского хозяйства, микробиологической и пищевой промышленности, для целей охраны окружающей среды. Индикация образующегося комплекса антиген-антитело может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая легко детектируется соответствующим высокочувствительным физико-химическим методом. Весьма удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флуоресцентные, парамагнитные и др. метки, использование которых дало возможность увеличить чувствительность классических иммунохимических методов анализа в миллионы раз, а время анализа уменьшить до нескольких минут.

Наибольшее распространение получили гетерогенные методы иммуноферментного анализа, основанные на использовании полистирольных планшетов для иммобилизации антител или антигенов, специфическом связывании определяемого вещества на стенках лунок планшета и последующем выявлении образовавшихся иммунокомплексов с помощью меченных ферментами компонентов.

5.1 Структура и свойства антигенов и антител. Генетически чужеродные вещества, попадая в организм высших животных и человека, способны вызывать в них ряд специфических процессов, направленных на их удаление из организма. Система организма, выполняющая эту функцию, называется *иммунной системой*, а сами процессы – *иммунологическими*. К важнейшим из них следует отнести образование специфических белков крови – *антител (иммуноглобулинов)*. Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, получили название *антигенов*. Способность антигенов вызывать иммунный ответ называется *иммуногенностью*, а способность образовывать комплексы с антителами – *антигенностью*. К антигенам относятся белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты как в очищенном виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (клеток, тканей, вирусов и т.д.).

На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные группы или остатки, обуславливающие *антигennую специфичность*, называемые *антигенными детерминантами* или *эпитопами*. Число эпитопов на поверхности сложной молекулы определяет валентность антигена. Понятие антигенная детерминанта включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. В молекулах белков антигенная детерминанта образуется совокупностью аминокислотных остатков (может варьировать от 5 до 20). Антигенные детерминанты белков бывают двух типов – *секвенциальные*, т.е. представляющие собой последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, и *конформационные*, образованные аминокислотными остатками из различных частей белковой глобулы. Во многих случаях единичная замена аминокислоты в структуре антигенной детерминанты или изменение конформации

белковой глобулы являются достаточными для изменений антигенной специфичности макромолекулы. Если два антигена имеют только часть одинаковых антигенных детерминант, их называют перекрестно реагирующими антигенами.

Низкомолекулярные вещества, не способные сами вызывать образование антител, но приобретающие иммуногенные свойства после конъюгирования с высокомолекулярными носителями, например, бычьим сывороточным альбумином, называются *гаптенами*. К гаптенам относится широкий круг природных соединений: пептидные и стероидные гормоны, различные лекарственные препараты, антибиотики, витамины, олигосахариды и т.д.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от проникновения чужеродных веществ путем образования прочных специфических иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма. Способность антител образовывать высокоспецифичные прочные иммунокомплексы с различными веществами и возможность получения антител в необходимых количествах являются основой иммунохимических методов анализа.

В организме антитела вырабатываются специфическими клетками крови - *B-лимфоцитами*, каждый из которых имеет на своей поверхности до 100 000 рецепторов одинаковой специфичности, способных узнавать любой чужеродный антиген. Антиген, встречаясь в кровотоке с комплементарным ему рецептором, проводит отбор (селекцию) соответствующего В-лимфоцита, который затем, трансформируясь в *плазматическую клетку* и многократно делясь, образует *клон* клеток. Каждый клон плазматических клеток секretирует гомогенные по своей структуре антитела. Однако так как антиген активирует в крови сразу большое количество типов В-лимфоцитов, которые содержат рецепторы различной степени специфичности по отношению к исходному антигену, такой иммунный ответ и антитела называются *поликлональными*. Сыворотку животного, содержащую специфические к данному антигену антитела, называют *антисывороткой*, при этом обычно указывают против какого антигена и каким животным она выработана (например, антисыворотка кролика против эритроцитов человека). Принципиально важным является то, что поликлональные антитела даже против одной-единственной антигенной детерминанты гетерогенны как по структуре активного центра, так и по физико-химическим свойствам. В том случае, если антиген поливалентный, например, белок, то в сыворотке крови образуются антитела, направленные против каждой индивидуальной антигенной детерминанты, что еще более усложняет состав антител.

В середине 70-х годов был разработан принципиально новый путь получения антител, основанный на слиянии (гибридизации) лимфоцитов иммунизированного животного с миеломными клетками с образованием новых клеток – *гибридом*. Особенностью таких клеток является их способность размножаться и продуцировать антитела в искусственных условиях вне организма. С помощью специальных методов клонирования можно выделить одну гибридную клетку, которая, размножаясь, будет секрецировать в неограниченных количествах антитела только одного вида

– моноклональные антитела, которые являются гомогенными как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам.

5.2 Структура антител. Иммуноглобулины по своей химической структуре относятся к большому классу природных соединений – гликопротеинам, т.е. белкам, содержащим в своей структуре олигосахариды. Несмотря на огромное разнообразие антител и их гетерогенность, все они обладают некоторыми общими структурными элементами, обеспечивающими выполнение их основных функций.

По своим антигенным, эффекторным свойствам и структурным особенностям иммуноглобулины подразделяются на пять основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM (Ig обозначает иммуноглобулин).

Общей структурной единицей всех иммуноглобулинов является комплекс из четырех полипептидных цепей – двух идентичных между собой легких цепей с молекулярной массой 23 кД каждая (L-цепи, от английского слова light- легкий) и тяжелых с молекулярной массой по 53000 (H-цепи, от английского heavy- тяжелый). Каждая из легких цепей прочно соединена с NH₂-концевыми участками тяжелых цепей благодаря наличию меж цепочечных дисульфидных связей и множеству слабых гидрофобных, электростатических и других межатомных взаимодействий. Аналогичные связи существуют и между свободными участками тяжелых цепей. В целом структура такого комплекса напоминает латинскую букву Y (или T) и характерна для иммуноглобулинов классов IgG, IgD, и IgE (рис.1).

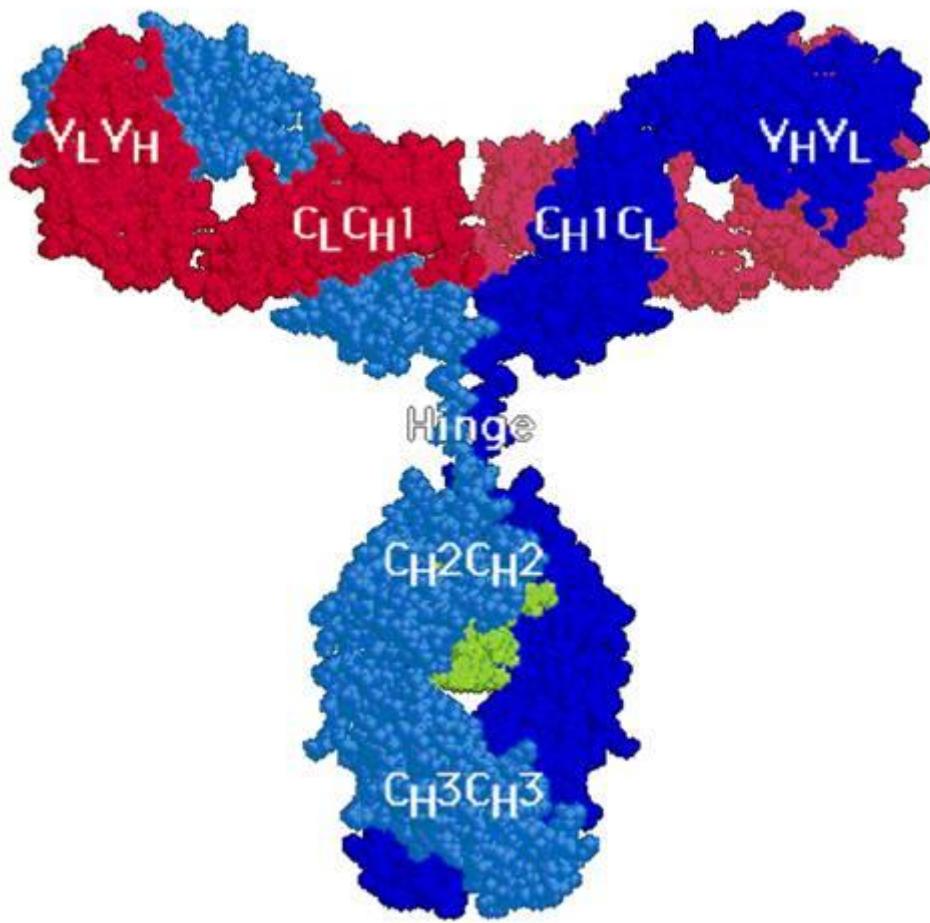


Рис. 5.1. Пространственная структура молекулы IgG

При действии протеолитического фермента папаина молекула IgG распадается на три фрагмента, два из которых идентичны и сохраняют способность связывать антигены (так называемые *Fab*-фрагменты) и третий, способный к кристаллизации (*Fc*-фрагмент), отвечающий за эффекторную функцию антител (Рис.2). Другой протеолитический фермент пепсин разрывает пептидную связь, расположенную ближе к COOH-концу цепи от S-S связи между Н-цепями в Fc-фрагменте. В результате образуются так называемый pFc'-фрагмент, представляющий остатки тяжелых цепей и соединенные дисульфидными связями два Fab-фрагмента, обозначаемые как *F(ab')*₂-фрагмент.

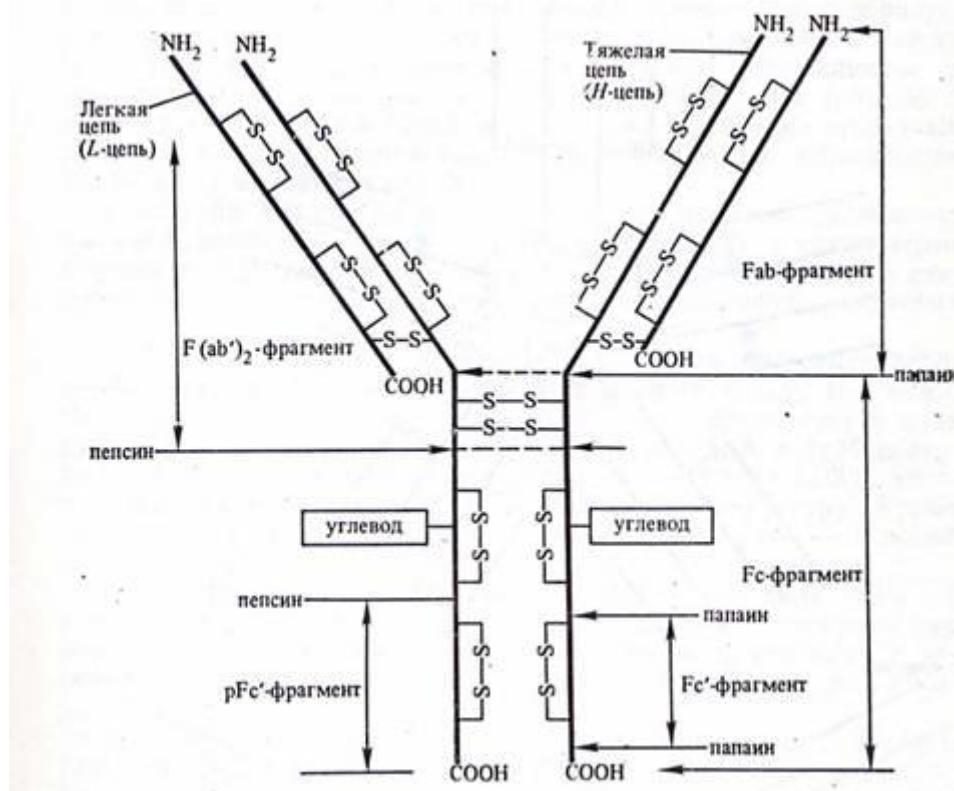


Рис. 5.2. Схематическое изображение структуры молекулы IgG.

Антигенсвязывающий центр расположен в NH₂-концевых частях Н- и L-цепей. Таким образом каждая молекула IgG, а также F(ab')₂-фрагменты содержат по два одинаковых антигенсвязывающих центра, а Fab-фрагмент – один.

Молекулы антител имеют большое число S-S –связей, которые можно разделить на 3 категории – межцепочечные, внутрицепочечные и связи между Н-цепями отдельных четырехцепочных комплексов, обусловливающих образование полимерных молекул – IgM и IgA. Структура иммуноглобулинов различных классов обусловлена числом и расположение S-S связей в молекулах, а также количеством четырехцепочных элементов. IgM присутствует в сыворотке в виде пентамиера четырехцепочных комплексов, соединенных S-S связями между Н-цепями. Некоторое количество IgA сыворотки также присутствует в виде димерной и тетрамерной формы (Рис. 3).

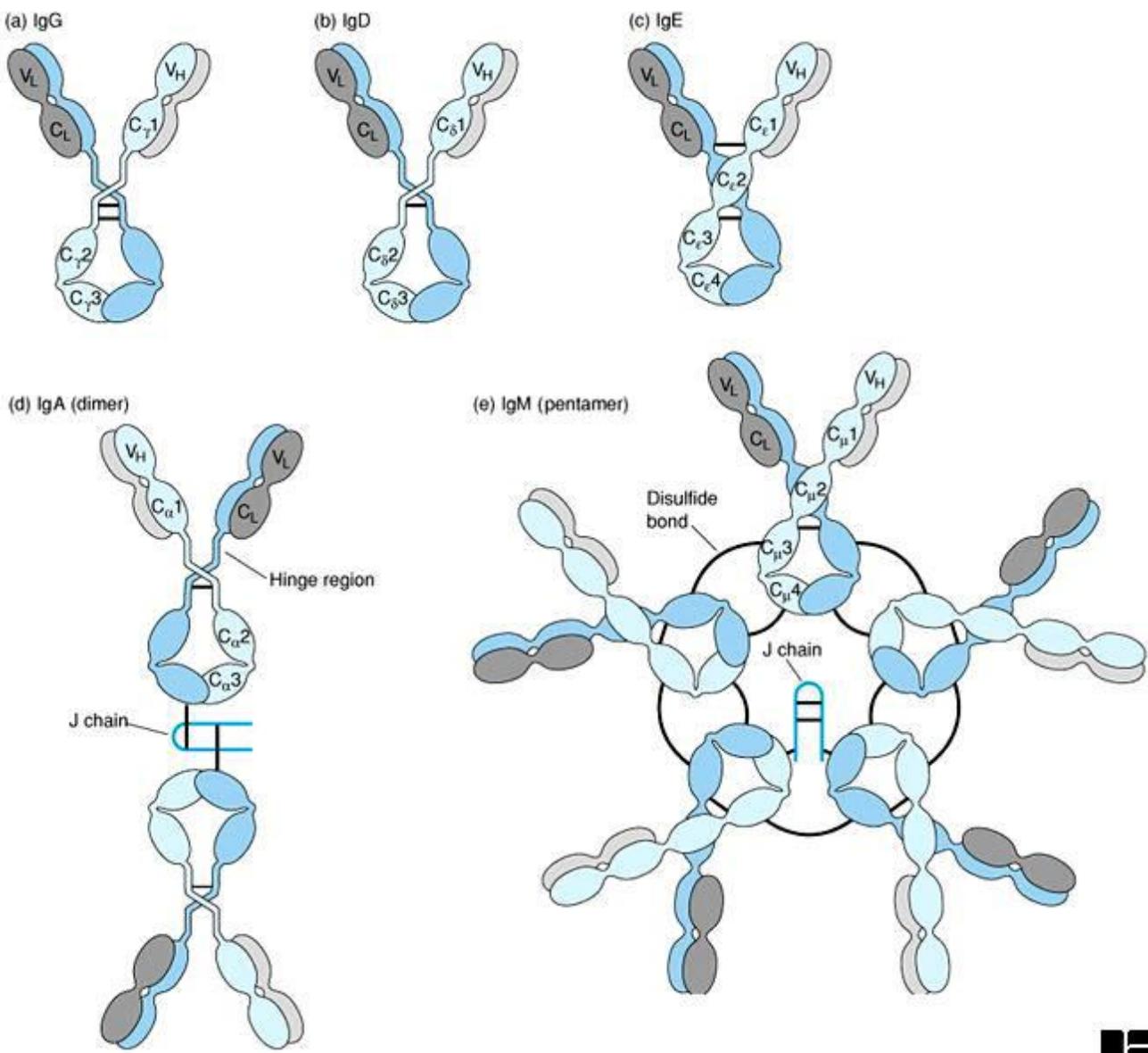


Рис. 5.3. Схематическое изображение структуры молекул иммуноглобулинов различных классов

Легкие цепи иммуноглобулинов бывают только двух типов – γ или δ , и являются общими для всех пяти классов, в то время как тяжелые цепи обладают структурными, иммунологическими и химическими особенностями, характерными для каждого класса иммуноглобулинов. При исследовании аминокислотной последовательности было обнаружено, что все легкие и тяжелые цепи имеют одну принципиальную структурную особенность: они состоят из двух частей – *вариабельной* (*V*) и *константной* (*C*) (Рис.4).

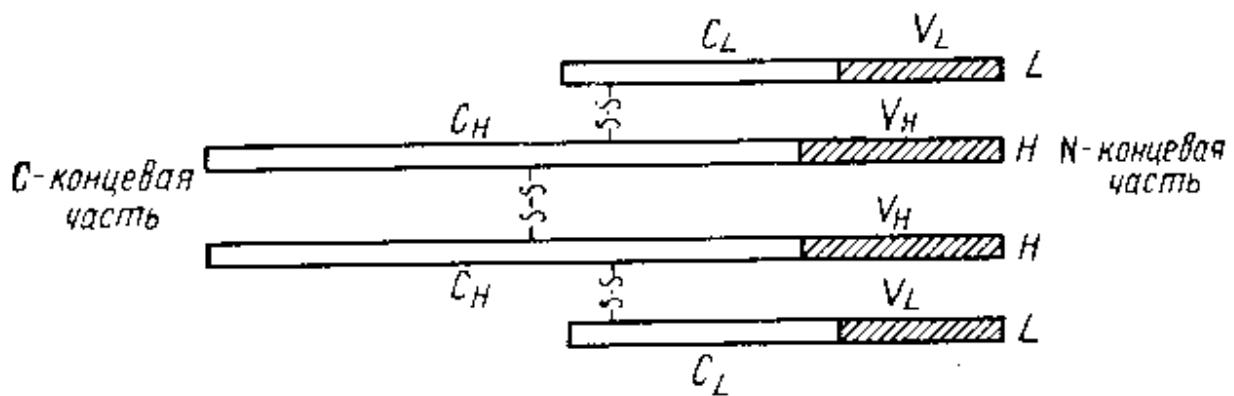


Рис. 5.4. Схематическое изображение расположения константных и вариабельных участков в молекуле IgG.

Постоянная или константная часть легких цепей (C_L) включает 107 аминокислотных остатков COOH-концевого участка, константная часть тяжелой цепи приблизительно в три раза (или в четыре в случае IgM и IgA) длиннее вариабельной.

По данным рентгеноструктурного анализа, участки пептидных цепей вблизи петли образуют глобулярную структуру, в которую включается около 110 аминокислотных остатков (Рис.5). Такие глобулы в структуре молекул антител получили название *доменов*. NH₂-концевой домен тяжелой цепи обозначают как V_H , а три последующих в константной области тяжелой цепи - как C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} (для легкой цепи, соответственно V_L и C_L).

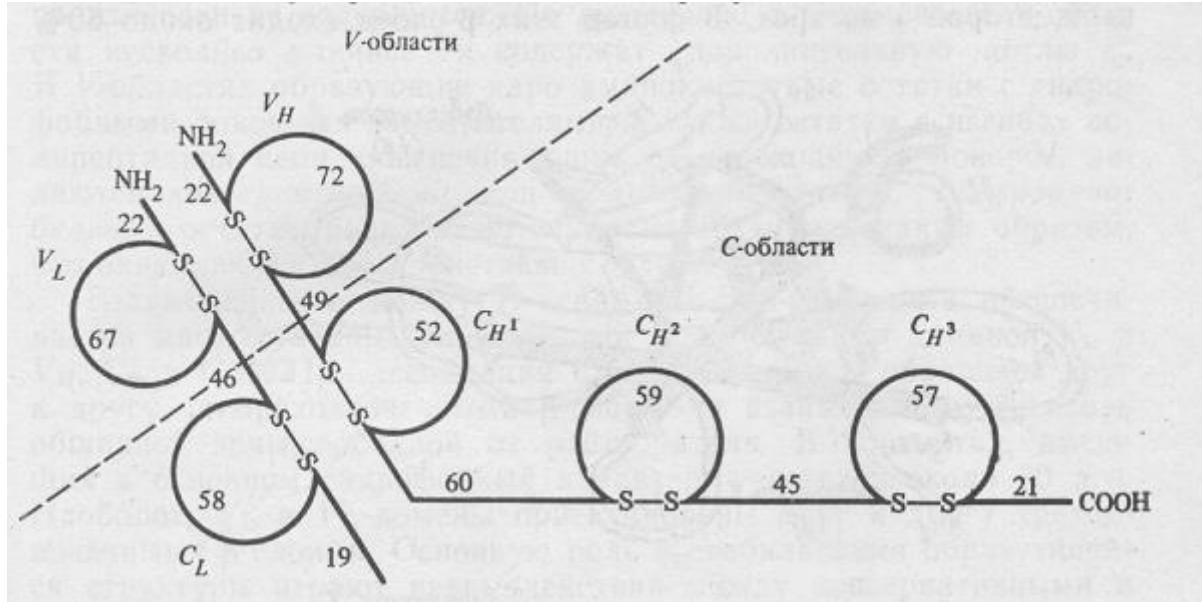


Рис. 5.5. Схематическое изображение локализации доменных участков в легкой и тяжелых цепях иммуноглобулинов.

Связывание антигена происходит в доступной растворителю щели активного центра, образованной вариабельными доменами в NH₂-концевой части легкой и тяжелой цепей. Способность связывать антигены с той же эффективностью, что и нативные молекулы антител, обладают Fab и F(ab')₂-фрагменты иммуноглобулинов. Основным принципом

организации антигенсвязывающих центров иммуноглобулинов является поликентровая структура. Малые антигенные детерминанты связываются на ограниченном участке активного центра, комплементарном данной детерминанте. Большие детерминанты могут занимать практически всю область связывания.

Антитела, образуемые в ответ на введение в организм антигенов, специфически взаимодействуют с этими антигенами. В основе первичного взаимодействия лежат общие принципы любой бимолекулярной реакции. Так как в данном случае продуктом реакции является комплекс антиген-антитело, иммунная реакция является обратимой и описывается теми же кинетическими и термодинамическими параметрами, что и любой процесс комплексообразования.

5.3 Ферменты как метки в иммуноанализе. Принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток в иммуноферментном анализе обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью регистрации ферментов в растворе. Известны усилительные системы, позволяющие регистрировать наличие всего нескольких сотен молекул ферментов в 1 мл раствора. Основными требованиями к молекулам ферментов для возможности их использования в качестве меток являются следующие: высокая удельная каталитическая активность, доступность, возможность получения фермента в высоко очищенном состоянии, сохранение каталитической активности после химической модификации при получении *конъюгатов* фермент-антитело (антigen), стабильность, простота и чувствительность метода определения концентрации (активности) фермента. Наибольшее распространение в настоящее время среди ферментов получили *пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза*. Для фотометрической регистрации активности пероксидазы предпочтительным в настоящее время является использование субстрата *тетраметилбензилина*. После остановки ферментативной реакции серной кислотой измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм.

5.4 Методы иммуноферментного анализа. Первичным процессом в иммуноферментном (или иммунохимическом) анализе является стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом. Так как процесс образования иммунохимических комплексов происходит в строго количественном соотношении, обусловленном аффинностью, концентрациями компонентов и условиями реакции, то достаточным для определения исходной концентрации анализируемого соединения является количественная оценка образовавшихся иммунных комплексов. Для такой оценки возможно либо прямое определение концентрации образующихся иммунокомплексов (*тип 1*), либо количественная оценка оставшихся свободными мест специфического связывания (*тип 2*). Второй общей стадией любого метода иммуноферментного анализа является формирование связи меченого ферментом соединения со специфическим комплексом или свободными центрами связывания. И наконец, заключительным обязательным процессом в иммуноферментном анализе является трансформация ферментной метки в соответствующий сигнал, измеряемый каким-либо физико-химическим методом (спектрофотометрическим,

флуориметрическим, люминесцентным и т.д.), что достигается путем измерения скорости превращения субстрата или количества продукта, образующегося за фиксированный промежуток времени.

Принимая во внимание вышеописанные подходы для определения специфических комплексов, дальнейшую классификацию методов иммуноферментного анализа, можно осуществить по типу реагентов, используемых на первой стадии анализа. Если на первой стадии в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антigen и специфические антитела), то метод является *неконкурентным*. Для неконкурентного анализа типа 1 оптимальным является соотношение компонентов, при котором концентрация центров связывания значительно превышает концентрацию определяемого соединения. Необходимым условием для неконкурентного анализа типа 2 является соблюдение соотношения избытка или сравнимой концентрации определяемого соединения (антгена) и мест специфического связывания, так как в этом случае определяется разность общего числа мест связывания и числа образовавшихся иммунных комплексов. Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания, то метод является *конкурентным*. Необходимым условием конкурентного метода является недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога.

Следующим принципом классификации методов иммуноферментного анализа является их разделение по типу проводимых на каждой из иммунохимических стадий реакций. В соответствии с этим все методы можно разделить на две группы – *гомогенные и гетерогенные*.

5.5 Гетерогенные методы иммуноферментного анализа. Гетерогенный иммуноферментный анализ объединяет методы, в которых анализ проводится в двухфазной системе, при этом разделение на фазы может происходить на любой стадии определения. В целях удобства классификации целесообразно проводить разделение гетерогенных методов по характеру проведения первой стадии «узнавания», которая является определяющей для всего анализа. Если на первой стадии антиген или антитело используют в иммобилизованном состоянии и формирование специфического иммунокомплекса проходит на твердой фазе, то метод относится к *твердофазным* (англ. solid phase assay). Если же на первой стадии анализа образование специфических иммунных комплексов происходит в растворе, а лишь затем для целей разделения используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом, то такие методы целесообразно классифицировать как *гомогенно-гетерогенные*.

Многообразие методов гетерогенного иммуноферментного анализа, относящихся к типам 1 и 2, обусловлено возможностью введения ферментной метки как в молекулу

антигена, так и молекулу антитела. Кроме того, для конкретной схемы анализа определяющим является, какой из реагентов – антитело или антиген, использован в иммобилизованном виде для разделения иммунохимических комплексов от несвязавшихся компонентов.

В качестве примера гетерогенного неконкурентного метода проведения иммуноферментного анализа приведем одну из самых распространенных схем иммуноферментного анализа белков (поливалентных антигенов), основанную на использовании пары антител различной антигенной специфичности, одно из которых иммобилизовано на поверхности твердого носителя, а второе конъюгировано с ферментной меткой (например, пероксидазой хрена). Анализ проводят следующим образом. В лунки полистирольного планшета с сорбированными антителами вносят анализируемый образец, инкубируют в течение 1 часа, при этом анализируемый антиген образует вступает в реакцию с антителами и образует иммунокомплекс на поверхности лунок. Планшет отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом антитела. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченых антител, что послужило поводом для широкого распространения в литературе названия «сэндвич»-метод (англ. sandwich). Часто в литературе встречается и другое название *двухцентровой метод* (англ. two-site assay). Схема может быть использована для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере две расположенные далеко друг от друга антигенные детерминанты, а для определения большого числа моновалентных антигенов (например, низкомолекулярные гормоны, лекарственные соединения, пестициды) метод неприемлем.

Конкурентный твердофазный анализ низкомолекулярных антигенов может быть реализован по следующей схеме. К иммобилизованным на носителе антителам добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген и фиксированную концентрацию конъюгата антигена с ферментом. После проведения инкубации носитель отмывают от несвязавшихся свободного и меченого антигена и регистрируют ферментативную активность на носителе, которая обратно пропорциональна концентрации определяемого антигена.

Конкурентные твердофазные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными. Предел обнаружения различных соединений для них ограничен как чувствительностью регистрации ферментной метки, так и аффинностью антител, в то время, как для неконкурентных методов, при отсутствии неспецифических взаимодействий, – только чувствительностью определения фермента. Поэтому для достижения высокой чувствительности анализа конкурентным методом необходимо использовать высокоаффинные антитела.

5.6 Гомогенные методы иммуноферментного анализа. К гомогенным относятся методы, осуществляемые в однофазной системе, и не требующие стадии механического разделения образовавшихся комплексов. Во всех схемах проведения гомогенного иммуноферментного анализа регистрируется концентрация не образующегося специфического комплекса антитело-антigen, а оставшихся свободными центров специфического связывания. Однако, в противоположность гетерогенным схемам, наблюдаемая ферментативная активность, соответствующая концентрации незанятых мест специфического связывания, может как уменьшаться, так и увеличиваться, что обусловлено различной природой воздействия связывания лигандов на ферментативную активность. Введение метки в молекулу антигена является одним из наиболее распространенных подходов в гомогенных методах иммуноферментного анализа. Все гомогенные методы относятся к конкурентным и основаны на одновременном взаимодействии с антителами анализируемого и меченого антигенов. После образования в растворе соответствующего иммунохимического комплекса проводят измерение ферментативной активности, которая пропорциональна концентрации свободного или связанного меченого лиганда.

Одним из распространенных методов является *EMIT-анализ* (enzyme multiplied immunoassay technique), основанный на изменении активности ферментной метки в коньюгате фермент-антиген при образовании комплекса с антителами, происходящем в результате конформационных перестроек в молекуле фермента или стерическом исключении доступности молекулы субстрата к активному центру фермента при комплексообразовании коньюгата с антителами. Достоинствами гомогенных методов является значительное сокращение времени проведения анализа (несколько минут), недостатками – меньшая чувствительность и возможность влияния состава анализируемого образца на результаты анализа.

Перспективными направлениями дальнейшего развития иммуноферментного анализа является создание экспресс-методов, основанных на использованием мембранных и иммунохроматографических систем, проточно-инжекционных методов, кинетического анализа, иммунобиосенсорных устройств, позволяющих проводить экспресс-анализ, в том числе одновременное определение нескольких антигенов в одном образце, в реальном времени.

5.7 Иммуноферментный анализ, или метод (ИФА) – выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, коньюгированных с ферментом-меткой (пероксидазой хрена, бета-галактозидазной и или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченою ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом и изменяется цвет продукта реакции – интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики сальмонеллеза, микоплазмозов и др., а также

определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях - 10^{10} - 10^{12} г/л (См. Рис. 5.6).

Рис. 5.6

<p>Твердофазный ИФА - вариант теста, когда один из компонентов иммунной -реакции (антиген Ag или антитело Ab) сорбирован на твердом носителе, напр., в лунках планшеток из полистирола. Компоненты выявляют добавлением меченых антител или антигенов. При положительном результате изменяется цвет хромогена. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют не связавшиеся реагенты путем промывания.</p> <p>I. При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую сыворотку, меченую ферментом Φ и субстрат/хромоген для фермента.</p> <p>II. При определении антигена в лунки с сорбированными антителами вносят антиген (напр., сыворотку крови с искомым антигеном), добавляют диагностическую сыворотку против него и вторичные антитела (против диагностической сыворотки), меченные ферментом, а затем субстрат/хромоген для фермента.</p>	<p>I. Определение антител в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированным антигеном Ag)</p> <p>II. Определение антигена в сыворотке больного (в лунках планшеток с сорбированными диагностическими антителами)</p>
<p>Конкурентный ИФА для определения антигенов: искомый антиген(1) и меченый ферментом антиген(2) конкурируют друг с другом за антитела (3), сорбированные на твердой фазе.</p>	

Конкурентный ИФА для определения антител: искомые антитела и меченые ферментом антитела конкурируют друг с другом за антигены, сорбированные на твердой фазе

5.А Метод определения антиген антителенного взаимодействия преципитацией

Реактивы и предметы потребления

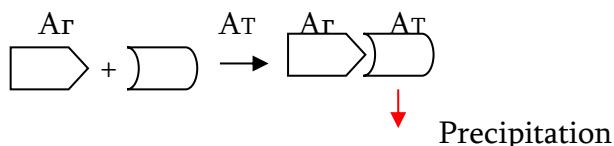
Флакон 1- солевой комплект для буфера, эплендорф 2 -лиофилизированные АТ (антитела), эплендорф 3 -лиофилизированный АГ (антиген), фасовка 4 - агароза, фасовка 5 -резак для кружков, насадка шприца для изъятия вырезанных кружков агарозы, чашка Петри для заливки агарозы.

Необходимый материал, которого нет в комплекте.

Пипетка 20-200 мкл, 100-1000 мкл, головки пипеток, огнеупорная посуда для агарозы (2-25 мл), холодильник, дистиллированная вода.

Принцип

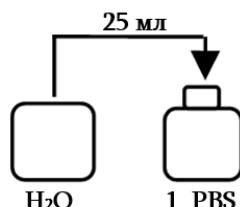
Этот метод используется на первом этапе проверки иммунной сыворотки. После иммунизации отбирается кровь у животных и методом преципитации в Агарозном геле, проверяется наличие Антител АТ в крови иммунизированного животного. В случае положительного ответа сыворотка подвергается дальнейшей обработке.



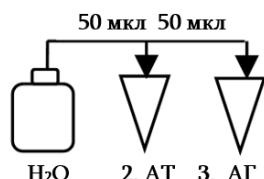
1. Приготовление рабочих растворов

В флакон 1 переносим 25 мл дистиллированной воды из лабораторного резервуара.

Получаем рабочий PBS (Phosphate-buffered saline- фосфатный буфер с NaCl).



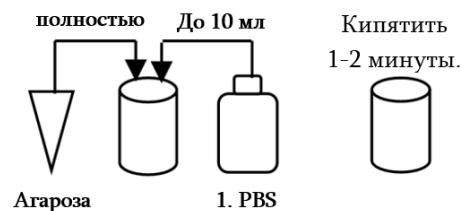
Из флакона 1 переносим 50 мкл PBS в эплендорф 2. Перемешиванием растворяем АТ. Из флакона 1 переносим 50 мкл PBS в эплендорф 3. Перемешиванием растворяем АГ.



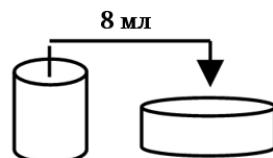
2. Приготовление геля и разлив

Из фасовки 4 (агарозу) переносим в местную посуду. Заливаем PBS из флакона 1.

Объем доводим до 10 мл (получаем 1 % агарозу). Агарозу расплавляем при 100° С 1-2 мин (пока раствор агарозы не станет прозрачным).



Полученную агарозу охлаждаем до 30-40°. Затем переносим агарозу с помощью пипетки около 8 мл на стеклянную подложку, агарозу остужаем около 10-15 мин.



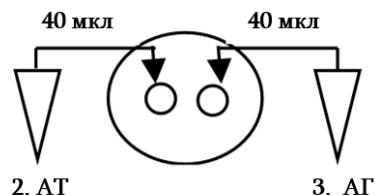
3. Формирование агарозы

Вертикально расположенный резак для кружков кладём на охлаждённую агарозу. На агарозе вырезаем 2 кружка, расстояние между кружками не должно быть более 4-8 мм. Если с резаком не вынимается кружок геля, тогда используем кончик иглы.



4. Внесение пробы

Из эплендорфа 2 переносим АТ (35-40 мкл антитела) в первый кружок, так чтобы кружок заполнился. Из эплендорфа 3 переносим Аг (35-40 мкл антигена) во второй кружок, так чтобы кружок заполнился. Чашку Петри помещаем в холодильник 2-8°C, или при 37°C. В течении 24-72 часов наблюдаем за появлением полукруга т.е. зон преципитации. Зоны лучше просматриваются на чёрном фоне с задним освещением.



5.Б Метод – DOT и установление титра

Флакон 1 – солевой состав для буфера, флакон 2- блокирующий агент, эплендорф 3 - лиофилизированные АГ, эплендорф 4 – лиофилизированный конъюгат, фасовка 5 – мембрана и стеклянная подложка, фасовка 6 – контейнер для промывки мембранны, эплендорф 7 – хромоген (пользуйтесь осторожно), эплендорф 8 – подкисленная H₂O, эплендорф 9 – перекись водорода. Фасовка 10-Капилляр.

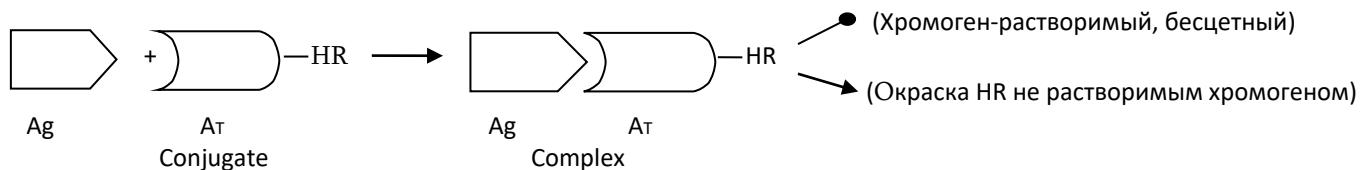
Необходимые материалы не поставляемые с наборами

Пипетка 2-20 мкл, 100-1000 мкл, головки пипеток, качалка, эплендорфы, пробирка (местная) 11 (5-10 мл), дистиллированная вода, холодильник.

Принцип

DOT с английского означает «точка», соответственно метод DOT- это метод точечного нанесения образца на нитроцеллюлозную мембрану и его специфическая окраска, где в качестве субстрата используются диаминобензидин DAB либо 4-хлор-1-нафтоль. Эти хромогены окисляясь образуют нерастворимый комплекс и оседают на месте окисления, т. е. где присутствует оксидаза, соответственно окрашивая нанесенное на нитроцеллюлозную мембрану антиген или антитело. (См.схему)

HR-пероксидаза



Хромоген из растворимого соединения, после окисления HR-пероксидазой переходит в нерастворимый комплекс сорбирующийся на пероксидазе. Соответственно указывая наличие АГ.

Метод DOT широко применяется в иммунохимии и в медицинской диагностике, особенно широко его применяют как качественный анализ для определения типов различных вирусов. Последнее время методом титрации DOT-ом часто ставят количественный анализ. Преимущество метода DOT это простота выполнения и высокая специфичность.

В процессе выполнения метода DOT студент осваивает методы высокой специфичности и чувствительности, приобретая навыки специалиста высокого уровня.

1. Приготовление рабочих растворов

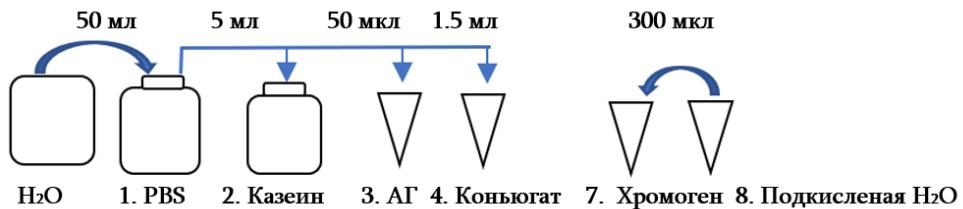
Во флакон 1 переносим 50 мл H₂O из лабораторного резервуара. Получаем PBS (Phosphate-buffered saline pH7.4 - фосфатный буфер с NaCl).

Из флакона 1 переносим 5 мл PBS во флакон 2. Получаем блокирующее жидкость перемешиванием.

Из флакона 1 переносим 50 мкл PBS в эплендорф 3. Растворяем АГ перемешиванием.

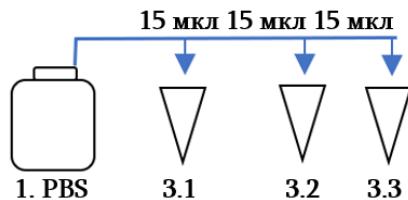
Из флакона 1 переносим 1,5 мл PBS в эплендорф 4. растворяем конъюгат перемешиванием.

Из эплендорфа 8 переносим 300 мкл раствора в эплендорф 7. растворяем перемешиванием. Перед окраской для улучшения визуализации рекомендовано заморозить и разморозить реактив до употребления. См. схему



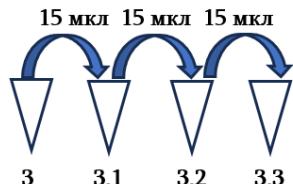
2. Разбавление пробы I этап

Из флакона 1 переливаем 15мкл раствора в эплендорфы 3.1, 3.2 и 3.3- в каждую.



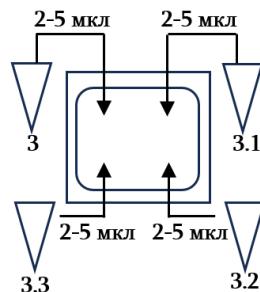
3. Разбавление пробы II этап

Из эплендорфа 3 переливаем 5 мкл раствора в эплендорф 3.1. Из эплендорфа 3.1 переносим 5 мкл в эплендорф 3.2, а из эплендорфа 3.2 переносим 5 мкл в эплендорф 3.3. Находящуюся мембрану в фасовке 5 кладём на стеклянную подложку (находящийся в той же фасовке).



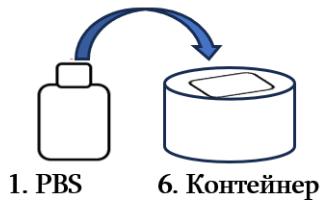
4. Внесение пробы

На мембрану наносим примерно 2-5 мкл пробы из эплендорфа 4, 4.1, 4.2 и 4.3 (Вы можете использовать капиллярную трубку или пипетку). Мембрану помещаем в течение 15 мин при комнатной температуре под лампой накаливания для тепловой денатурации.



После инкубации мембрану переносим без подложки в контейнер 6 и промываем 3 раза PBS-ом (3-4 мл каждый раз) из флакона 1.

Промыть 3 раза (3-4 мл каждый раз)



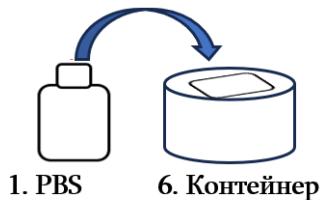
5. Забивка блокирующим агентом

Промытую мембрану заливаем примерно 5 мл раствора блокирующего агента (так чтобы мембрана покрылась) из флакона 2. Пробу ставим для инкубации в холодильник на 30 мин и 30 мин на качалке (при медленном вращении).



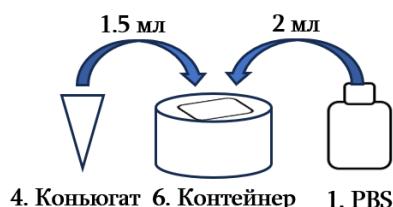
После инкубации мембрану промываем 3 раза раствором PBS (3-4 мл каждый раз) из флакона 1.

Промыть 3 раза (3-4 мл каждый раз)



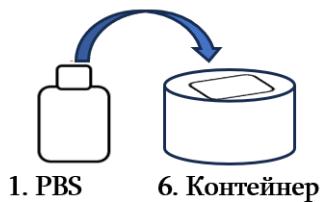
6. Посадка конъюгата

Промытую мембрану заливаем раствором конъюгата из эпендорфа 4. (В случае если мембрана не покрывается раствором, из флакона 1 добавляем PBS не более 2 мл). Пробу ставим для инкубации в холодильник на 30 мин и 30 мин на качалке (при медленном вращении).



После инкубации мембрану промываем 3 раза раствором PBS из флакона 1.(3-4 мл каждый раз)

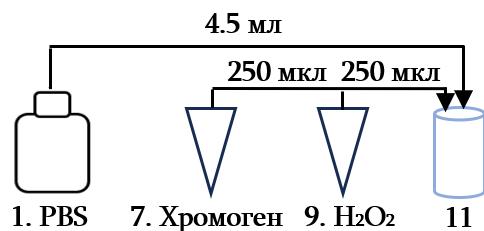
Промыть 3 раза (3-4 мл каждый раз)



1. PBS 6. Контейнер

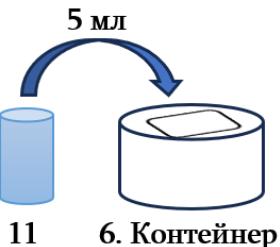
7. Приготовление хромогена

Из флакона 1 в пробирку 11 переливаем 4.5 мл PBS. С эпендорфа 7 переливаем 250 мкл в пробирку 11. С эпендорфа 9 переливаем раствор (250 мкл) в пробирку 11. Перемешиваем получаем хромоген.



8. Окраска пробы

Заливаем промытую мембрану полученным хромогеном. Инкубация 30 мин. при комнатной температуре в темноте.



5.В Изучение принципов метода ELISA

Информация для заказа: Каталог 2.3.3

Флакон 1 солевой комплекс для буфера, флакон 2 – Блокирующий агент, эплендорф 3 – лиофилизированные антиген (АГ), фасовка 4 - лунки № 4.0, 4.1, эплендорф 5 - Twin 20, эплендорф 6-лиофилизированный конъюгат, эплендорф 7-субстрат А, субстрат Б, эплендорф 8 - стоп-реагент.

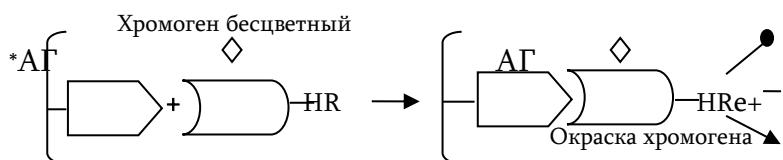
Необходимые материалы не поставляемые с наборами

Пипетка 2-20 мкл, 100-1000 мкл, головки пипеток, дистиллированная вода, пробирка- №9 (10 мл).

Принцип

Этим набором, студент обучается принципам построения метода ELISA. Студент учится методам последовательности для забивки свободных участков, во избежание ложноположительных ответов, а также студент проводит раститровку АГ, что даёт ему возможность понять принципы количественного анализа методом ELISA.

Схема



Подложка Лунки
(твёрдая фаза)

*В данном случае Ag-ом является кроличье антитело (АТ).

◊ Коньюгат служит козлиное Антитело (полученное к кроличьим антителам), меченое пероксидазой.

Количественный метод анализа ELISA широко используется в медицинской диагностике для анализа гормонов, онкомаркеров инфекции и т.д. Метод также применяется в фармакологии, животноводстве, с/х и в лабораториях пищевой промышленности.

1. Приготовление рабочих растворов

Во флакон 1 переносим 50 мл дистиллированной воды (из лабораторного резервуара). Получаем рабочий PBS (Phosphate-buffered saline pH7.4 -фосфатный буфер с NaCl).

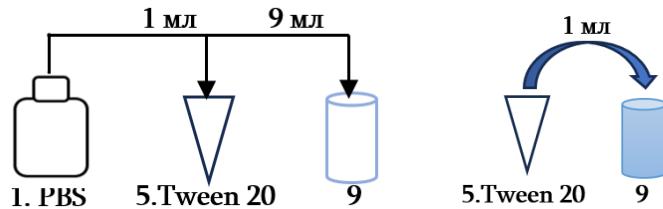
Из флакона 1 переносим 5 мл PBS во флакон 2. Перемешиванием растворяем BSA.

Из флакона 1 -переносим 250 мкл PBS в эплендорфе 3. Перемешиванием растворяем АГ.

Из флакона 1 переносим 300 мкл PBS в эплендорф 6.Перемешиванием растворяем конъюгат.

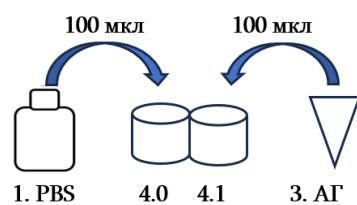


Из флакона 1 переносим 1 мл PBS в эплендорф 5. Из флакона 1 переносим 9 мл PBS в пробирку 9. Из эплендорфа 5 переносим всю жидкость в пробирку 9, Перемешиваем, получаем рабочий PBST.



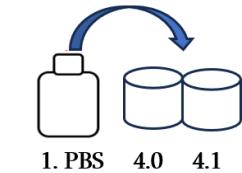
2. Внесение пробы

Из флакона 1 переносим 100 мкл PBS в лунку № 4.0. Из эплендорфа 3 переносим 100 мкл пробы в лунку № 4.1.



После инкубации лунку промываем 3 раза PBS-ом из флакона 1.

Промыть 3 раза (Заполните)



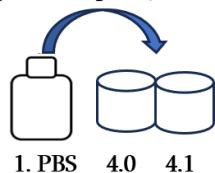
3. Блокировка

300 мкл раствора блокирующее жидкость вносится из флакона 2 в лунки № 4.0 - № 4.1. Инкубация 30 мин при 37°C.



После инкубации лунки промываются 3 раза PBS-ом из флакона 1.

Промыть 3 раза (Заполните)

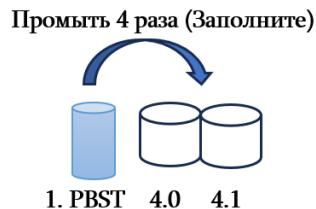


4. Внесение конъюгата

100 мкл конъюгат переносим из эплендорфа 6 в лунки №4.0 , №4.1. Инкубация 30 мин при 37°C.



После инкубации лунки промываем 4 раза с помощью PBST, из пробирки 9.



5. Внесение субстрата

(Приготовление субстрата: добавьте 450 мкл раствора субстрата А из эплендорф 7 в раствор субстрата Б (эплендорф 7) и встряхните, используйте немедленно. Добавьте по 100 мкл раствора субстрата из эплендорфа 7 в каждую лунку от № 4.0 до № 4.1. Инкубируйте 2–5 мин в темноте.



6. Внесение стоп реагента

После инкубации добавьте в каждую лунку по 100 мкл **стоп-раствора** из эплендорфа 8.

