

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

**Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии**

Методические материалы по дисциплине:

Методы исследования биологических макромолекул

основная профессиональная образовательная программа высшего
профессионального образования - программа специалитета

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Биологические макромолекулы

Выделение из источников

БММ и их источники

Биологические макромолекулы (БММ)

- Базовый критерий макромолекул – молекулярная масса выше 1000 Да
- Биологические макромолекулы:
 - Олиго- и полисахариды
 - Полимеры аминокислот: олиго-, полипептиды и белки
 - Полимеры нуклеотидов: олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты

Выделение БММ из источников

Параметры, влияющие на протокол выделения

- Свойства источника
 - биологические (необходимость соблюдения мер предосторожности при работе с биологически опасными источниками)
 - физические, химические и физико-химические (необходимость и методы измельчения и гомогенизации)
- Количество и доступность источника
- Свойства целевого продукта (основа протокола очистки)
- Возможные исследовательские задачи (необходимая степень очистки, допустимые и недопустимые примеси)
 - Установление первичной структуры БММ
 - Изучение ковалентных химических модификаций
 - Установление пространственной структуры (структурная биология)
 - Изучение параметров взаимодействия с другими молекулами (специфичность, скорость, изменение структуры при взаимодействии)
 - Изучение биологических функций

Источники БММ

Возможные варианты классификаций

- **Естественные**

 - микроорганизмы

 - ткани и клетки макроорганизмов

 - внеклеточные среды

 - экзосомы

- **Системы экспрессии целевых БММ**

 - (продукты генной инженерии)

- **Синтетические аналоги БММ**

 - (продукты химического синтеза)

Источники БММ

Возможные варианты классификаций

- **Клеточные**

- прокариотические
- эукариотические

- **Внеклеточные**

- секреторные
- экзосомальные (везикулярные)
- продукты бесклеточных (cell-free) систем экспрессии

- **Вирусы**

Источники БММ. Естественные источники

Преимущества и недостатки

Преимущество

- естественная **структура** (пространственная форма и химические модификации) и **свойства**
- **протокол** выделения и/или очистки **может лишить этого преимущества!**

Вероятные недостатки

- этические ограничения
- малые количества самого источника
- низкое содержание исследуемых молекул в источнике
- трудности при выделении (например, для очень плотных тканей)

Возможно культивирование клеток и тканей, позволяющее повысить количество целевых молекул

- проще для микроорганизмов
- достаточно легко для клеток крови, кроветворных клеток, фибробластов, МСК, опухолевых клеток
- наиболее сложно (иногда невозможно) для высокодифференцированных клеток
- **возможно влияние** условий культивирования **на структуру** и/или **биологические свойства** исследуемых молекул

Источники БММ

Генно-инженерные продукты. Системы экспрессии

- **Прокариотические**
- **Эукариотические**
 - Дрожжи
 - Растения и каллусные культуры
 - Культуры клеток насекомых
 - Культуры клеток млекопитающих
- **Бесклеточные (cell-free)**

Генно-инженерные продукты

Преимущества и возможные недостатки

Преимущества

- Снятие этических ограничений
- Увеличение количества целевых молекул
- Возможность введения меток, необходимых для анализа (изотопы)
- Возможность введения модификации, облегчающих очистку
 - необходимо убедиться в отсутствии влияния на свойства молекулы
 - предусмотреть варианты удаления модификации после выделения и очистки

Ограничения

- Необходимо убедиться в структурном и/или биологическом соответствии получаемых молекул естественным

Генно-инженерные продукты

Бактериальные системы экспрессии

Преимущества

- Высокая скорость продукции целевых БММ
- Технологическое удобство
- Наименьшая стоимость

Недостатки

- Вероятность конформационных изменений
- Вероятность отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования)
- Вероятность загрязнения бактериальным аналогом и другими бактериальными компонентами

Генно-инженерные продукты

Эукариотические системы экспрессии

- **Дрожжи**
- **Клетки насекомых**
- **Клетки млекопитающих**
- **Клетки человека**

- **Преимущества**
 - возрастающее сходство посттрансляционных модификаций с человеческими в ряду дрожжи > насекомые > млекопитающие
- **Недостатки**
 - Возрастающие сложности и стоимость культивирования в ряду дрожжи > насекомые > млекопитающие

Генно-инженерные продукты

Бесклеточные (cell-free) системы экспрессии

Наиболее часто используемые лизаты клеток

- *E.Coli*
- ретикулоциты кролика
- СНО
- HeLa

Преимущества

- синтез токсичных белков
- возможность введения неестественных компонентов
- существуют решения для получения мембранных и гликозилированных белков
- скорость

Этапы выделения БММ

Этапы выделения БММ

- Дезинтеграция тканей
- Разрушение клеток
- Фракционирование клеточных компартментов
- Выделение смеси БММ
- Грубая очистка целевых БММ
- Тонкая очистка целевых БММ
- Качественный и количественный анализ
(желательно проводить на каждом этапе после выделения смеси БММ)

Этапы выделения БММ

Дезинтеграция тканей и разрушение клеток

Физические методы

- Замораживание/оттаивание – очень небольшие образцы клеточных суспензий
- Осмотический шок – очень небольшие образцы клеточных суспензий; метод очистки от примеси эритроцитов
- Ультразвук – суспензии клеток небольшого объема (0,2 – 50 мл); при большой мощности прибора – до нескольких литров
- Механические – клеточные осадки, ткани (в том числе жесткие), объем зависит от типа оборудования
 - Блендерного типа – предварительное разрушение крупных образцов
 - Мельничного типа
 - роторные, ножевые, режущие, дисковые, шаровые
 - подходят для жестких тканей
 - существуют варианты оборудования для одновременного измельчения большого количества образцов
 - объемы и производительность варьируются в широком диапазоне
 - Приборы криогенного измельчения
 - Пестиковые гомогенизаторы (ручные и полуавтоматические)
 - ручные – очень небольшие объемы мягких образцов
 - полуавтоматические подходят для гомогенизации жестких образцов небольшого объема

Химические методы

- детергенты – разрушают фосфолипидный бислой; используются для лизиса мембран клеток и децеллюляризации внеклеточных матриксов
- хаотропные агенты – денатурируют белки

Ферментативные методы

- в ряде случаев позволяют относительно селективно выделить из тканей определенный тип клеток (эпителиоциты)
- используются в качестве предварительной обработки при дезинтеграции особо устойчивых тканей
- удаление белков при выделении НК

Этапы выделения БММ

Фракционирование клеточных компартментов

При необходимости выделения БММ из конкретной части клетки, после стадии разрушения клеточных мембран, проводят центрифугирование

- Компоненты клеточных мембран
- Компоненты органелл и вакуолей
- Цитоплазматические компоненты

Далее при необходимости проводят лизис выделенных структур химическими и ферментативными методами

Этапы выделения БММ из их смеси

Грубая очистка

- Осаждение отдельных компонентов смеси
 - высаливание (ионная сила раствора)
 - осаждение белков сульфатом аммония
 - по изоэлектрической точке (pH)
 - осаждение белков трихлоруксусной кислотой
 - осаждение НК стрептомицином
- Жидко-жидкостная экстракция (различия в растворимости)
 - фенол-хлороформная экстракция нуклеиновых кислот
- Центрифугирование и ультрацентрифугирование
 - отделение осажденных компонентов
 - разделение по молекулярной массе
- Ультрафильтрация
- Диализ
- Колоночная хроматография

Этапы выделения БММ из смеси

Тонкая очистка

- Колоночная хроматография – комбинация разных методов
- Препаративный электрофорез
- Диализ

Анализ качества выделения белков

Качественный и количественный анализ белков

- Колориметрические методы – цветные реакции и взаимодействие с красителями
 - На основе взаимодействия с ионами меди
 - биуретовая реакция
 - метод Лоури
 - реакция с бицинхониновой кислотой
 - Метод Брэдфорд – связывание белковых молекул с красителем
- Спектрофотометрический метод (абсорбционная спектрофотометрия)
- Флуориметрические методы
- Методы определения активности ферментов
- Электрофоретические методы
- Хроматографические методы
- Иммунологические методы: ИФА, вестерн-блотт

Количественный анализ белков

Поглощение ультрафиолета при 280 нм

- Закон Бугера-Ламберта-Бера

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} c l$$

- Характеристический максимум поглощения белков – **280 нм**
- Хромофоры – ароматические радикалы аминокислотных остатков (Три, Тир, Фен) и Цис
- Коэффициент молярной экстинкции белка $\varepsilon_{280} = 5500 \cdot (n\text{Trp}) + 1490 \cdot (n\text{Tyr}) + 125 \cdot (nCys)$
- Мешают анализу
 - агрегация белка и взвеси (мутный раствор) – необходимо вычислять вклад светорассеяния
 - Тритон X-100
 - нуклеиновые кислоты (!) – необходимо сравнивать с поглощением при 260 нм
- Определение концентрации
 - По калибровочной кривой
 - Метод Варбурга и Кристиана – по таблице или номограмме на основании данных A_{280} и A_{260}
- **ПЛЮСЫ:**
 - сохранность белка
 - скорость анализа

Количественный анализ белков

Биуретовая реакция

- В щелочной среде **ионы меди** образуют с **белками** (пептидные связи) комплексы фиолетового цвета
- Инкубация – 30 минут при комнатной температуре
- Определяют светопоглощение
 - при длине волны 540-580 нм (**546 нм**)
 - альтернативный вариант – **310 нм** (повышение чувствительности)
- Реакцию дают пептиды из 3 и более аминокислот
- **МИНУС:**
 - низкая чувствительность
- **ПЛЮСЫ:**
 - НЕ мешают анализу: ароматические аминокислоты, фенолы, мочевая кислота
 - Метод считается наиболее точным и специфичным
 - Удобен для определения концентрации белка в грубом экстракте

Количественный анализ белков

Метод Лоури

- Одновременное протекание биуретовой реакции и восстановления фосфорномолибденово-вольфрамового реактива (реактив Фолина)
- Реактив Фолина взаимодействует с радикалами ароматических аминокислот (Тир), Цис
- В течение 20-30 минут при комнатной температуре образуются окрашенные продукты, в дальнейшем происходит снижение ее интенсивности
- Интенсивность окраски определяют по поглощению при **750 нм**, на основании калибровочной кривой определяют концентрацию
- В качестве стандарта необходимо использовать сходный белок и растворитель
- Мешают анализу
 - комплексообразователи (ЭДТА)
 - восстановители (углеводы, тиоловые соединения)
 - липиды
 - неионные детергенты
 - органические растворители
 - мочева кислота, гуанин, ксантин, Гли, Цис, Тир, Гис, фенолы, сульфат аммония, глицерин, Трис
- **ПЛЮСЫ:** чувствительнее биуретовой реакции и спектрофотометрического метода
- **МИНУСЫ:** низкая специфичность

Количественный анализ белков

Реакция с бицинхониновой кислотой

- Происходит восстановление ионов Cu^{2+} до Cu^{1+} за счет наличия пептидных связей, а также Цис, Три, Тир
- Cu^{1+} образует окрашенный комплекс с бицинхониновой кислотой (2,2'-бихинолин-4,4'-дикарбоновая кислота)
- Инкубацию проводят в течение 30 мин при 37°C
- Определяют оптическую плотность при **562** нм
- Стандартный образец и буфер должны быть сходны с анализируемым
- **Мешают анализу**
 - восстановители: углеводы, аскорбиновая кислота
 - комплексообразователи: ЭДТА
 - Трис, сульфат аммония
- **ПЛЮСЫ:**
 - Чувствительность
 - НЕ мешают анализу детергенты

Количественный анализ белков

Метод Брэдфорд

- Связывание красителя Кумасси бриллиантовый синий R-250 с белками и пептидами (не менее 15 аминокислот!)
- Наиболее активно связывают Арг и Лиз – необходим сходный стандарт (отклонения до 50%)
- Смещение максимума поглощения красителя Кумасси бриллиантовый синий R-250 от 465 до 595 нм
- Инкубацию белка с реактивом проводят в течение 10 минут
- Мешают анализу (относительно слабо)
 - детергенты (Тритон-X100, SDS)
 - амфолиты
- Не используют кварцевые кюветы (связывают краситель)

Количественный анализ белков

Флуорометрические методы (дериватизация аминов)

С *o*-фталальдегидом

- *o*-фталальдегид взаимодействует с первичными аминогруппами белка (на N-концах и остатков Лиз)
- определяют интенсивность флуоресценции
 - длина волны возбуждения 340 нм
 - длина волны испускания между 440 и 455 нм

С флуоресцамином

- длина волны возбуждения 390 нм, испускания – 475 нм
- **ПЛЮСЫ:** высокая чувствительность!
- **Мешают** анализу: первичные амины

Количественный анализ белков

Выбор метода

- При отсутствии возможности использовать подходящий стандарт следует избегать метода Брэдфорд и флуорометрических методов
- При анализе гликозилированных белков следует избегать методов Брэдфорд и Лоури
- Спектрофотометрический метод не подходит для белков с низким содержанием ароматических аминокислот (особенно Три)
- Присутствие ЭДТА в растворе – не подходят метод Лоури и бицинхониновая кислота
- Присутствие первичных аминов и ионов аммония – не следует использовать метод Лоури, ВСА, и дериватизации аминов
- Для количественного определения белка в сложных смесях рекомендуется использование биуретовой реакции
- Следует учитывать возможные влияния детергентов

Выделение нуклеиновых кислот

Выделение нуклеиновых кислот

Возможные целевые продукты

- ДНК
 - геномная ДНК
 - митохондриальная ДНК
 - плазмидная ДНК
 - вирусная ДНК
 - экзосомальная ДНК
 - внеклеточная ДНК
- РНК
 - тотальная РНК
 - рРНК
 - мРНК
 - тРНК
 - микроРНК
 - вирусная РНК
 - экзосомальная РНК
 - внеклеточная РНК

Выделение нуклеиновых кислот из смеси БММ

Два основных подхода – жидко-жидкостная и твердофазная экстракция

- **Жидко-жидкостная экстракция**

осадительный подход – основан на **разной растворимости** компонентов смеси – белков, липидов и нуклеиновых кислот

- Фенол-хлороформная экстракция

- **Твердофазная экстракция**

сорбционный подход – основан на специфической **сорбции** целевого продукта и последующем **снятии с сорбента**

- Спин-колонки
- Сорбция на микрочастицах

Выделение нуклеиновых кислот

Фенол-хлороформная экстракция

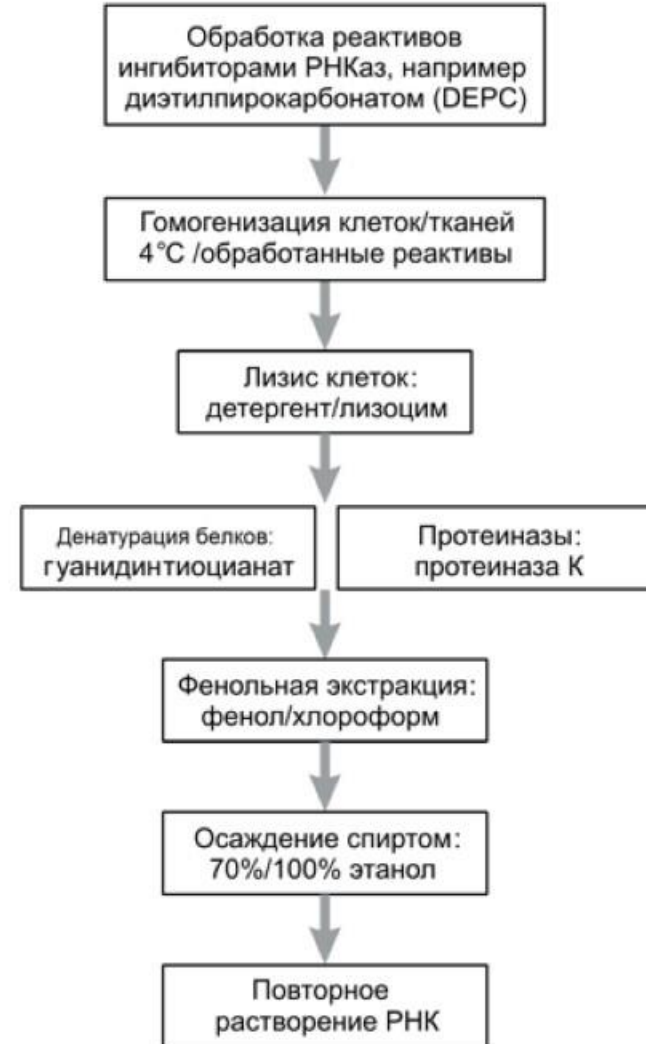
- к раствору, содержащему смесь БММ, **добавляют смесь фенола и хлороформа**, интенсивно **перемешивают и центрифугируют**
 - модификация – добавление гуанидина изотиоцианата или хлорида (хаотропный агент, денатурирующий белки, в том числе нуклеазы)
 - при необходимости **выделить РНК** водный раствор подкисляют – ДНК переходит в органическую фазу
- липиды растворяются в хлороформе, белки денатурируют и оказываются на границе раздела фаз, **смесь НК остается в водном растворе** (верхняя фракция), которую отбирают для дальнейшего использования
- НК из водной фазы при необходимости (концентрирование, дополнительная очистка) **осаждают спиртами** (этанол, изопропанол)
 - при низком содержании НК используют соосадители, например, гликоген (влияет на результаты ПЦР и секвенирования – необходима корректировка параметров)
- дальнейшая очистка (при необходимости) может включать сорбционные методы, в том числе хроматографические, а также электрофоретическое разделение

ПРЕИМУЩЕСТВА: возможность подбирать параметры; хороший выход при ограниченном количестве источника; низкая стоимость

НЕДОСТАТКИ: менее стандартизованная процедура по сравнению с готовыми системами – влияние на результаты от серии к серии; работа с токсичными реагентами

Выделение нуклеиновых кислот

Основные этапы



Выделение нуклеиновых кислот

Твердофазная экстракция

- **Спин-колонки**
- **Сорбция на частицах**
 - **осаждение** частиц центрифугированием
 - **магнитная сепарация** частиц

ПРЕИМУЩЕСТВА:

- скорость очистки
- относительно стандартизованные условия выделения при использовании готовых наборов (варьируется в зависимости от системы)

НЕДОСТАТКИ:

- выход может быть относительно низким (варьируется в зависимости от системы)
- стоимость

Выделение нуклеиновых кислот

Общие моменты

- жидко-жидкостные и твердофазные **методы могут дополнять друг друга**
- дополнительную очистку от белков можно осуществить их расщеплением протеиназой K
- **нуклеазы** также расщепляются протеиназой K, денатурируют в присутствии солей гуанидина
- **ДНКазы** ингибируются ЭДТА
- **концентрирование НК** можно провести после осаждения их спиртами (этанол, изопропанол)
- высокая степень очистки НК достигается при **ультрацентрифугировании в градиенте плотности хлорида цезия**
- **разделение нуклеиновых кислот**
 - для очистки ДНК от РНК используют РНКазы
 - выделение мРНК основано на наличии полиА-последовательности (сорбционная очистка)
 - тонкая очистка – электрофорез
- **выделение РНК** требует специально подготовленных реагентов и лабораторного пластика, не содержащих РНКаз
- **примеси** могут влиять на результаты дальнейших исследований
 - полисахариды влияют на ПЦР и секвенирование

Выделение нуклеиновых кислот

Оценка качества и количественное определение

- **спектрофотометрический метод (УФ-спектроскопия)**
 - оценка качества извлечения и очистки
 - образец может быть использован после измерения
 - примеси мешают точному определению концентрации
 - для исключения влияния примесей необходимо снимать спектр
- **флуоресцентный метод**
 - по включению флуоресцентных красителей
 - дцДНК – Hoechst 33258, бромистый этидий
 - позволяет определять количество НК в сложных смесях
- **количественная ПЦР**
 - определение количества специфических последовательностей в образце
 - необходима стандартизация протоколов выделения и очистки

Выделение нуклеиновых кислот

Оценка качества и количественное определение

Спектрофотометрический метод

- измеряют поглощение при длине волны **260 нм**
- **коэффициенты пересчета** на единицу поглощения
 - дцДНК 50 мкг/мл
 - оцДНК 33 мкг/мл
 - оцРНК 40 мкг/мл
- для **олигонуклеотидов** необходим расчет коэффициента экстинкции по составу
- **примесь белка** оценивают по отношению поглощения при 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280})
 - образец ДНК считается чистым от примеси белка при значении A_{260}/A_{280} больше 1,8
 - образец РНК считается чистым от примеси белка при значении A_{260}/A_{280} около 2,0
- **другие примеси** оценивают по отношению A_{260}/A_{230} (для чистого образца более 2,0)
 - остаточный гуанидин, фенол, гликоген и другие примеси повышают поглощение при длине волны 230 нм

ПРИМЕЧАНИЕ: для выявления примесей следует снимать спектр поглощения в диапазоне 220-320нм, а не поглощение при отдельных значениях длин волн

Основные реагенты и растворы,
применяемые при выделении
БММ

Защита продукта

- **Консерванты**

- азид натрия

- **Ингибиторы протеаз**

- сериновых – PMSF
- цистеиновых и сериновых – лейпептин
- металлопротеиназ – комплексообразователи – ЭДТА, ЭГТА
- неспецифические – хаотропные агенты (соли гуанидина)

- **Ингибиторы нуклеаз**

- неспецифические – хаотропные агенты (соли гуанидина)
- специфические

Другие часто используемые реактивы

- **Комплексообразователи**

- ЭДТА, ЭГТА

- **Восстановители**

- меркаптоэтанол, DTT, тимеросал

- **Детергенты**

- неионогенные – Tween-20, Triton X-100
- цвиттерионные – желчные кислоты, CHAPS
- анионные – SDS

- **Хаотропные** (денатурирующие) агенты

- гуанидина хлорид, гуанидина изотиоцианат, мочеви́на, тиомочеви́на, SDS

- **Глицерол** – стабилизатор

- **ДМСО** – растворитель, криопротектор

Присутствие этих веществ и их примесей **необходимо учитывать** как **при очистке**, так и при дальнейшем **использовании и исследовании БММ**

Спасибо за внимание!

Центрифугирование в очистке и анализе БММ

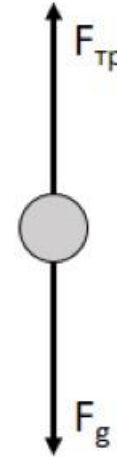
Физические основы

Физические основы Закон Стокса

- сферическая частица в гравитационном поле
- сила гравитации vs сила лобового сопротивления
- параметры, влияющие на скорость осаждения:
 - плотность частицы
 - плотность среды
 - вязкость среды
 - размер – диаметр частицы
 - гравитационное поле

$$\bullet V = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2(\rho_{\text{частицы}} - \rho_{\text{среды}})}{\mu} \cdot g$$

$$\bullet V = \frac{d^2(\rho_{\text{частицы}} - \rho_{\text{среды}})}{18\mu} \cdot g$$



Физические основы

Относительное центробежное ускорение

- revolutions per minute – RPM – число оборотов в минуту
- угловая скорость – ω
- $\omega = 2\pi \text{ RPM}/60$
- центробежное ускорение – $G = \omega^2 r$
- $G = \frac{4\pi^2 \text{RPM}^2 r}{3600}$
- relative centrifugal field – RCF – ОЦУ – относительное центробежное ускорение
- $\text{ОЦУ} = G/g = G/980 = \frac{4\pi^2 \text{RPM}^2 r}{3600 \cdot 980} = 1,12 \cdot 10^{-5} \cdot \text{RPM}^2 r$ (радиус указан в сантиметрах)
- если радиус дан в миллиметрах, то $\text{RCF} = 1,12 r \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$

Методы

Классификация

- по задаче
 - препаративное – выделение материала для дальнейших исследований
 - аналитическое – изучение свойств центрифугируемых частиц
- по ОЦУ
 - низкоскоростное
 - высокоскоростное
 - ультрацентрифугирование
- по методике
 - дифференциальное
 - зональное
 - изопикническое
 - градиентное

Дифференциальное центрифугирование (фракционирование)

- раздельное (поочередное) осаждение частиц (фракционирование)
- разделение на фракции путем серии циклов центрифугирования с увеличивающимся ОЦУ
- $$V = \frac{d^2(\rho_{\text{частицы}} - \rho_{\text{среды}})}{18\mu} \cdot g$$
- обычно плотность разделяемых частиц значительно превосходит плотность среды ($\rho_{\text{частиц}} \gg \rho_{\text{среды}}$) и не является ключевым параметром
- основным параметром является размер частиц – **d**
- более крупные частицы – в осадке, более мелкие – в надосадочной жидкости (супернатанте)
- целевая фракция может находиться как в осадке, так и в супернатанте

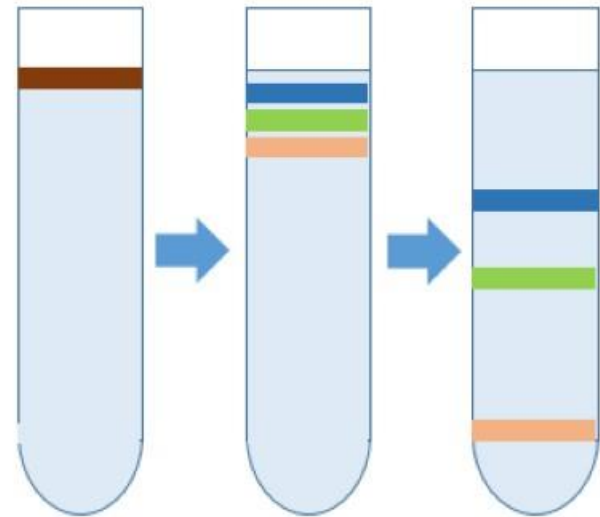
Дифференциальное центрифугирование

Характерные параметры

- ядра и клеточный дебрис — 10 мин при 1000 g
- осаждение сократительного аппарата — 10 мин при 10 000 g
- выделение обогащенной митохондриями фракции — 20 мин при 20 000 g
- разделение микросомальной и цитозольной фракций — 1 ч при 100 000 g

Зональное (зонально-скоростное)

- частицы в растворе и/или суспензии наслаиваются на поверхность среды с большей плотностью, чем у раствора
- частицы одного размера формируют отдельную относительно компактную зону (слой), перемещающуюся под действием центробежной силы
- частицы большего размера перемещаются быстрее, меньшего – медленнее
- частицы разных размеров формируют разные зоны (слои), движущиеся с разной скоростью и разделяющиеся по мере центрифугирования
- осадок не формируется



Изопикническое центрифугирование

Плавучая плотность

- $$V = \frac{d^2(\rho_{\text{частицы}} - \rho_{\text{среды}})}{18\mu} \cdot g$$

- плавучая плотность:

$$\rho_{\text{частицы}} = \rho_{\text{среды}}$$

$$\Delta\rho = 0 \rightarrow V = 0$$

- зависит от взаимодействия частицы с молекулами среды (воды):
- плавучая плотность ДНК
 - в воде 1,1 г/см³
 - в CsCl 1,7 г/см³
 - собственная 2 г/см³

Градиентное центрифугирование

- плотность среды повышается в направлении дна пробирки (центробежной силы)
- за счет повышения концентрации растворенных в среде вспомогательных веществ
- градиент
 - ступенчатый – возможно приготовление вручную путем наслаивания
 - непрерывный
 - самоустанавливающийся
 - требуется автоматическое оборудование
- разделение частиц происходит по плотности
 - по изопикнической точке
 - скоростное

Градиентное Вещества для создания градиента

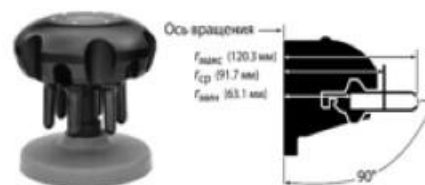
- неорганические соли элементов с большим атомным весом
 - хлорид цезия
 - бромид и иодид натрия
- органические соединения, содержащие элементы с большим атомным весом
- органические соединения с относительно большой молекулярной массой (сахароза)
- полимеры (декстран, фикоилл, перколл)
- критерии выбора:
 - диапазон плотности
 - вязкость
 - осмотическая активность

Роторы

Типы роторов

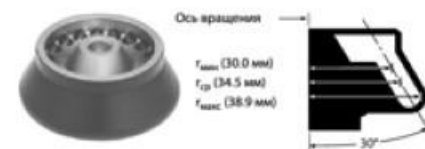
- **горизонтальные (бакетные)**

- центрифужные пробирки помещаются в бакеты (стаканы)
- верхняя часть бакета имеет паз для установки на ротор
- крепление для бакета выполнено по принципу качель
- установленный на ротор бакет свободно качается на креплении
- при центрифугировании под действием центробежной силы бакеты и находящиеся в них пробирки переходят в горизонтальное положение
- при остановке ротора стаканы с пробирками возвращаются в вертикальное положение
- наиболее длинный седиментационный путь (при прочих равных условиях)
- в коническом дне пробирки формируется плотный осадок



- **угловые**

- имеют расположенные под углом пазы для пробирок
- коническое дно центрифужной пробирки при таком угле наклона формирует относительно вертикальную стенку, на которой скапливается осадок
- угол наклона пробирок в процессе центрифугирования не меняется
- седиментационный путь короче, чем в бакетных роторах
- частицы осаждаются по стенке с формированием менее плотного осадка



- **с практически вертикальным расположением пробирок**

- меньший седиментационный путь
- меньшее время центрифугирования
- неразделяющиеся частицы оседают на дно или всплывают



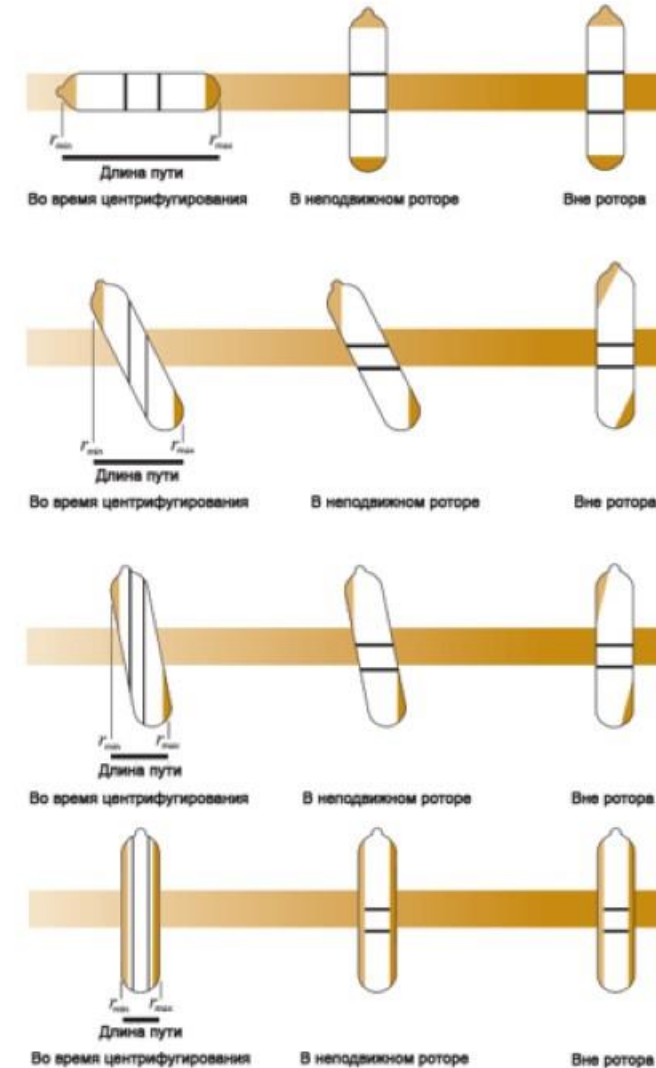
- **с вертикальным расположением пробирок**

- наименьший седиментационный путь
- наименьшее время центрифугирования



Типы роторов

- **горизонтальные (бакетные)**
 - центрифужные пробирки помещаются в бакеты (стаканы)
 - верхняя часть бакета имеет паз для установки на ротор
 - крепление для бакета выполнено по принципу качель
 - установленный на ротор бакет свободно качается на креплении
 - при центрифугировании под действием центробежной силы бакеты и находящиеся в них пробирки переходят в горизонтальное положение
 - при остановке ротора стаканы с пробирками возвращаются в вертикальное положение
 - наиболее длинный седиментационный путь (при прочих равных условиях)
 - в коническом дне пробирки формируется плотный осадок
- **угловые**
 - имеют расположенные под углом пазы для пробирок
 - коническое дно центрифужной пробирки при таком угле наклона формирует относительно вертикальную стенку, на которой скапливается осадок
 - угол наклона пробирок в процессе центрифугирования не меняется
 - седиментационный путь короче, чем в бакетных роторах
 - частицы осаждаются по стенке с формированием менее плотного осадка
- **с практически вертикальным расположением пробирок**
 - меньший седиментационный путь
 - меньшее время центрифугирования
 - неразделяющиеся частицы оседают на дно или всплывают
- **с вертикальным расположением пробирок**
 - наименьший седиментационный путь
 - наименьшее время центрифугирования



Воспроизведение параметров на разных роторах

- ОЦУ (RCF) = $1,12 \cdot 10^{-5} \cdot \text{RPM}^2 r$

- r_{\max} – расстояние от оси вращения до дна пробирки в сантиметрах

- расчет числа оборотов (RPM) по ОЦУ (RCF): $\text{RPM} = \sqrt{\frac{\text{RCF}}{1,12 \cdot 10^{-5} \cdot r}} = \sqrt{\frac{\text{RCF} \cdot 10^5}{1,12r}}$

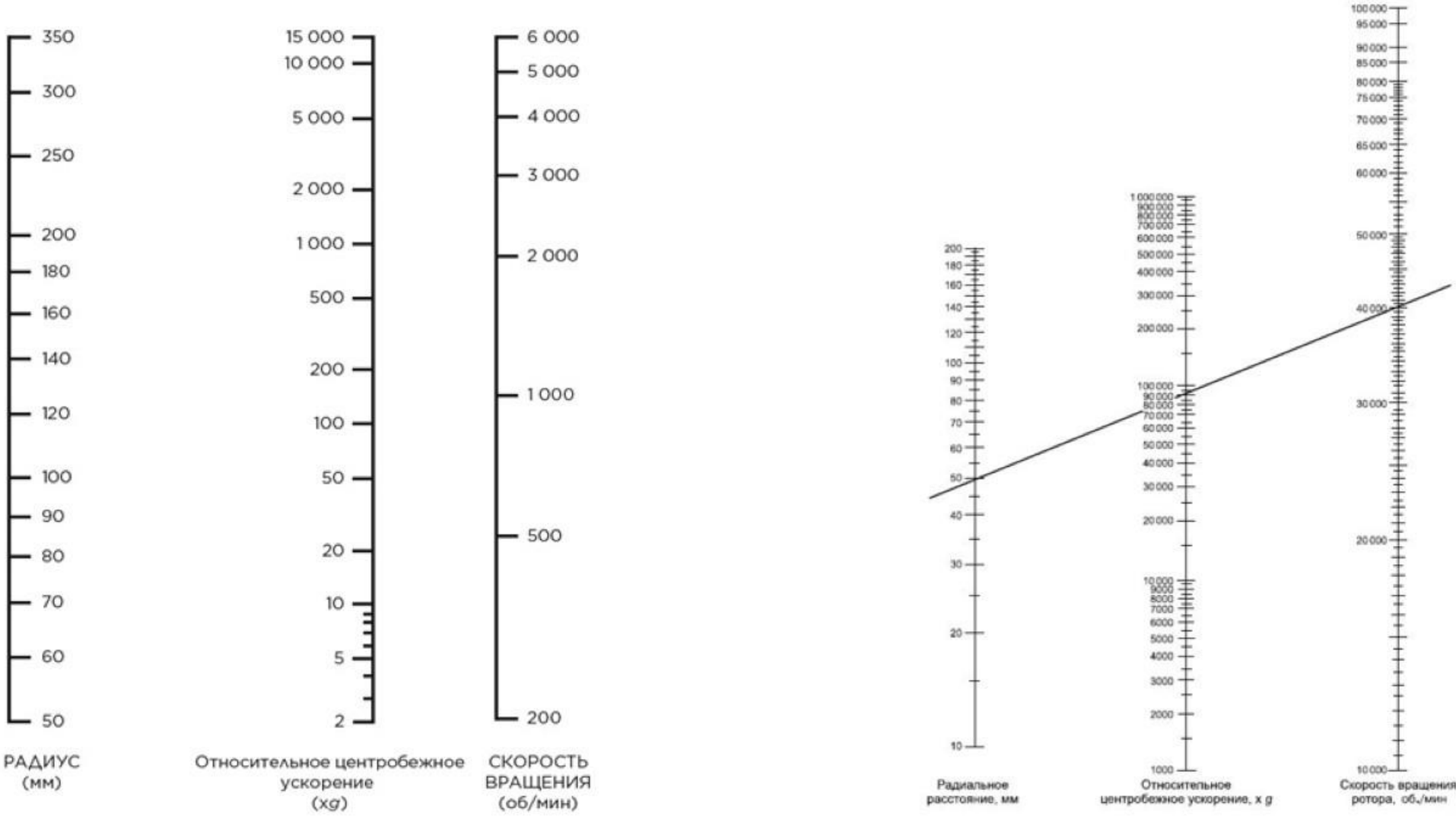
- если радиус дан в миллиметрах, то $\text{RCF} = 1,12r \left(\frac{\text{RPM}}{1000} \right)^2$

- $\text{RPM} = 1000 \sqrt{\frac{\text{RCF}}{1,12r}}$

- корректировка по времени при разном значении RCF: $t_2 = \frac{t_1 \cdot \text{RCF}_1}{\text{RCF}_2}$

Воспроизведение параметров на разных роторах

Номограмма



Параметры роторов

K-фактор

- максимальная скорость вращения
- радиус
- k -фактор (clearing factor)

- учитывает
 - максимальное центробежное ускорение
 - длину пути осаждения

$$k = \frac{\ln(r_{\max}/r_{\min})}{\omega^2} \times \frac{10^{-13}}{3600} = \frac{2,53 \cdot 10^5 \ln(r_{\max}/r_{\min})}{(\text{rpm}/1000)^2}$$

- константа для ротора, позволяющая сравнивать разные типы и виды
- пропорционален времени (в часах), необходимому для осаждения частицы с определенным S

- расчет времени: $t = \frac{k}{S}$

- $S = 10^{-13}$ сек

- k -фактор при скорости меньше максимальной: $k_2 = k \left(\frac{\text{номинальная максимальная скорость ротора}}{\text{реальная скорость ротора}} \right)^2$

Аналитическое ультрацентрифугирование

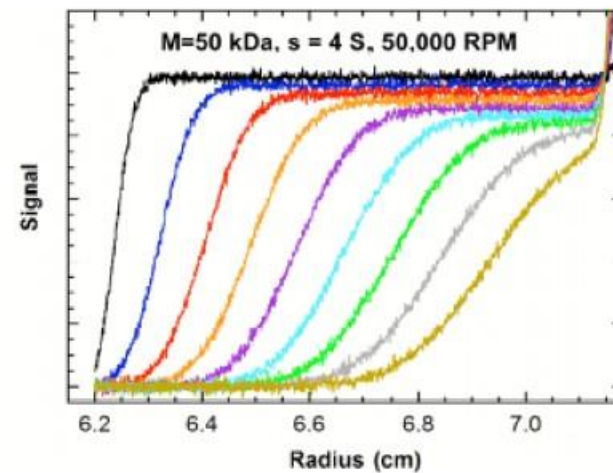
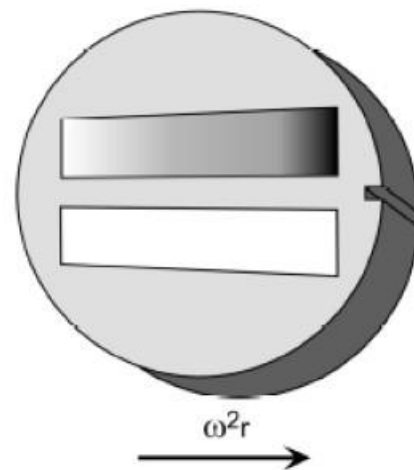
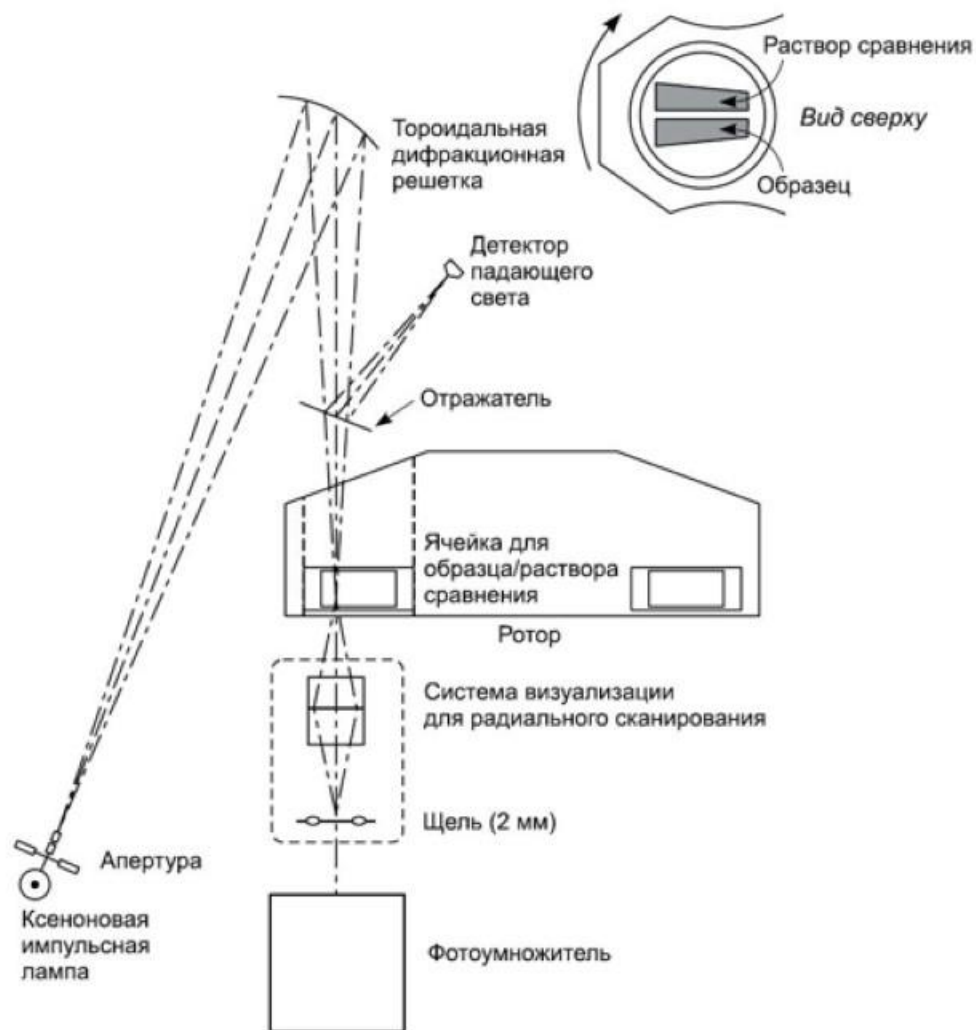
Классификация

- по ОЦУ
 - низкоскоростное – до 10 000g
 - высокоскоростное – до 100 000g
 - ультрацентрифугирование – от 100 000g
 - препаративное
 - аналитическое
- по методике
 - дифференциальное
 - зональное
 - изопикническое
 - градиентное

Аналитическое ультрацентрифугирование

- определение молекулярной массы макромолекул и их комплексов в нативном состоянии
- частицы равномерно распределены в среде
 - в процессе центрифугирования появляется четкая граница среды без макромолекул
 - граница движется в направлении центробежной силы
 - перемещение границы детектируется по оптической плотности
 - скорость движения границы – анализируемый параметр
- раствор частиц наслаивается на более плотную среду

Аналитическая ультрацентрифуга



Аналитическое ультрацентрифугирование

Скорость и коэффициент седиментации

- скорость седиментации: $v = \frac{d^2(\rho_{\text{частицы}} - \rho_{\text{среды}})}{18\mu} \cdot g = \frac{dr}{dt}$ (см/сек)
- коэффициент седиментации $S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{1}{\omega^2 r} \times \frac{dr}{dt}$
- $S = 10^{-13}$ сек
- уравнение Сведберга $M = RTs/(D(1 - \nu\rho))$
- $M = (2RT \ln(c_2/c_1))/(\omega^2(1 - \nu\rho)(r_2^2 - r_1^2))$

Спасибо за внимание!

Хроматографические методы очистки и анализа БММ

Колоночная хроматография

Колоночная хроматография

Основные принципы и термины

- неподвижная (стационарная) фаза
 - твердый носитель, гель, жидкость, сорбированная на твердом носителе (матрице), жидкость
- носитель (матрица) – твердое инертное вещество, на которое нанесена стационарная фаза
 - в виде гранул
 - нанесенное на стенки колонки – характерно для микроколонок
- подвижная фаза
 - жидкость – жидкостная хроматография (ЖХ/LC)
 - газ – газовая хроматография (ГХ)
- элюция, элюирование (лат. eluo – вымывать)
 - процесс смывания (снятия) молекул, ранее сорбированных на неподвижной фазе
- элюент – подвижная фаза, обеспечивающая десорбцию (смывание, снятие) с неподвижной фазы сорбированных ранее молекул
- элюат – выходящий с колонки раствор веществ, снимаемых элюентом с неподвижной фазы

Колоночная хроматография

Основные принципы и термины. Режимы

- проявительная (элюентная) хроматография
 - образец наносят в небольшом объеме
 - подается подвижная фаза
 - молекулы с разными свойствами проходят по колонке с разной скоростью и разделяются
- изократическое элюирование
 - состав подвижной фазы не меняется на протяжении всего процесса хроматографического разделения
- градиентное элюирование
 - в процессе разделения меняется состав элюента (полярность, pH, концентрация электролитов)
 - плавно или ступенчато
- вытеснительная хроматография
 - молекулы сорбируются на стационарной фазе
 - связывание разных молекул характеризуется константой равновесия (мера сродства)
 - молекулы поочередно смывают с элюентом, содержащим вещество с большим сродством к стационарной фазе
 - первыми выходят молекулы с низким сродством, затем с более высоким
- фронтальная
 - образец непрерывно наносится на колонку

Колоночная хроматография

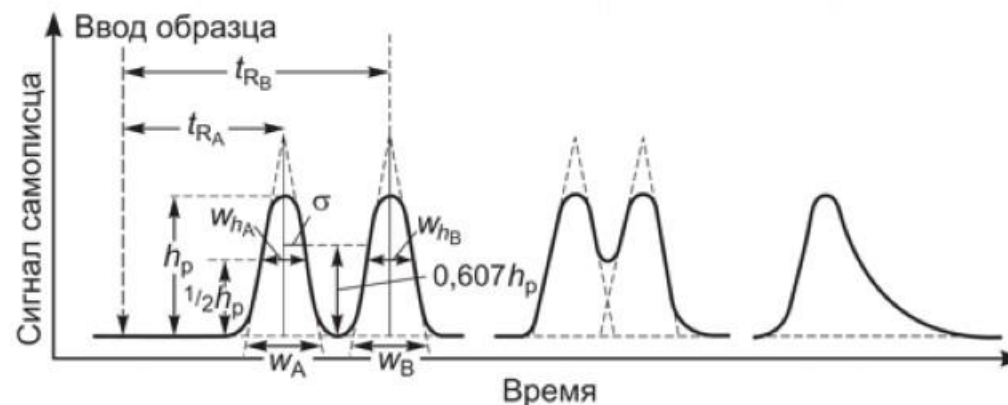
Основные принципы и термины

- коэффициент распределения: $K_d = \frac{C_{\text{в фазе А}}}{C_{\text{в фазе В}}}$
 - распределение вещества между двумя несмешивающимися фазами – основа хроматографии
- эффективный коэффициент распределения
 - отношение количеств (не концентраций) вещества в двух фазах
 - пересчет на объемы двух фаз
 - $K_d \cdot (V_A/V_B)$

Колоночная хроматография

Основные принципы и термины

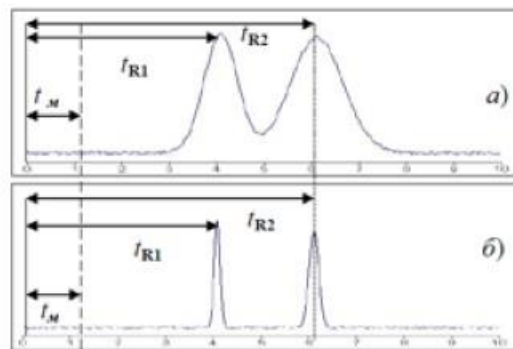
- хроматограмма – зависимость интенсивности сигнала от
 - времени удерживания или объема элюирования
- время удерживания, t_R – время от начала нанесения образца до начала выхода
- мертвое время, t_M (t_0) – время заполнения пространства между частицами матрицы (объема пустот)
- приведенное время удерживания $t_R' = t_R - t_M$
- относительное время удерживания – относительно к внутреннему или внешнему стандарту
- коэффициент ёмкости (удерживания) – $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$
 - во сколько раз больше времени необходимо для элюирования анализируемого вещества по сравнению со временем элюирования не удерживаемого на колонке вещества ($t_R = t_M$)
 - позволяет сравнивать разные хроматографические системы
- ёмкость – какое количество вещества можно разделить без смыкания пиков
- фактор селективности $\alpha = \frac{t_R'A}{t_R'B} = \frac{k'A}{k'B}$
- разрешение, R_s – способность отделить один компонент от другого
 - $R_s = \frac{\Delta t_R}{\omega_{cp}}$
 - $R_s = 1$ – разделение двух пиков на 97,7%
 - $R_s = 1,5$ – разделение на 99,8%



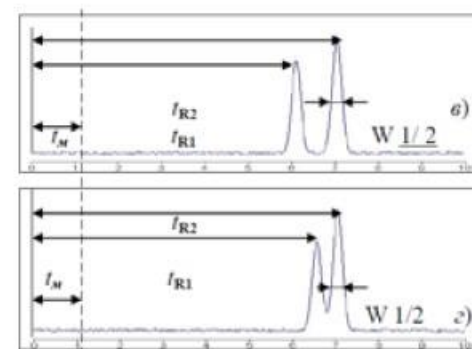
Колоночная хроматография

Основные принципы и термины

- хроматограмма – зависимость интенсивности сигнала от
 - времени удерживания или объема элюирования
- время удерживания, t_R – время от начала нанесения образца до начала выхода
- мертвое время, t_M (t_0) – время заполнения пространства между частицами матрицы (объема пустот)
- приведенное время удерживания $t_R' = t_R - t_M$
- относительное время удерживания – относительно к внутреннему или внешнему стандарту
- коэффициент ёмкости (удерживания) – $k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$
 - во сколько раз больше времени необходимо для элюирования анализируемого вещества по сравнению со временем элюирования не удерживаемого на колонке вещества ($t_R = t_M$)
 - позволяет сравнивать разные хроматографические системы
- ёмкость – какое количество вещества можно разделить без смыкания пиков
- фактор селективности $\alpha = \frac{t_{R'A}}{t_{R'B}} = \frac{k'A}{k'B}$
- разрешение, R_s – способность отделить один компонент от другого
 - $R_s = \frac{\Delta t_R}{\omega_{cp}}$
 - $R_s = 1$ – разделение двух пиков на 97,7%
 - $R_s = 1,5$ – разделение на 99,8%



Одинаковая селективность, разная эффективность



Одинаковая эффективность, разная селективность

Колоночная хроматография

Основные принципы и термины. Теоретические тарелки

- хроматографическая колонка – последовательность зон (теоретических тарелок), в каждой из которых может быть установлено равновесное распределение анализируемого вещества между двумя фазами

- высота теоретической тарелки (H) – длина колонки, соответствующая одной теоретической тарелке

- высота тарелки связана с шириной пика вещества: $H = \frac{\sigma^2}{x}$

- σ – стандартное отклонение
- x – длина пути, пройденного веществом

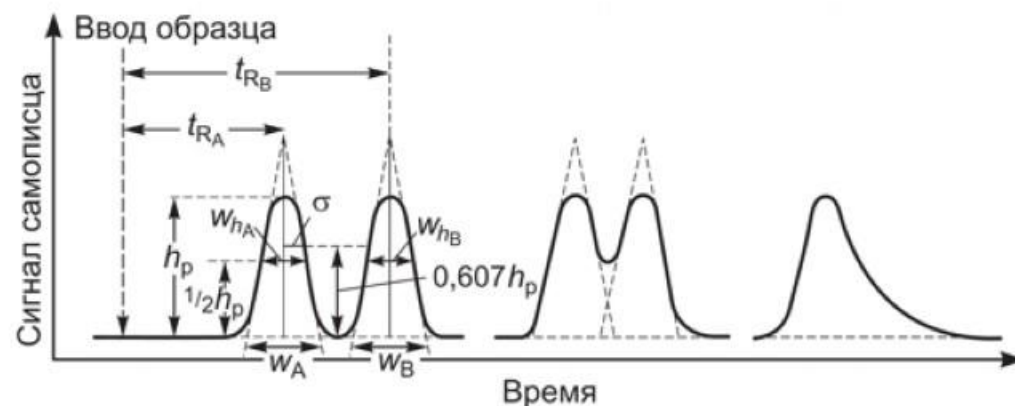
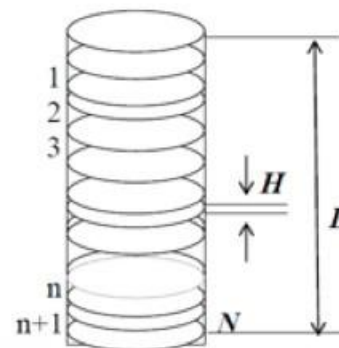
- для симметричных пиков общее число теоретических тарелок в колонке: $N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{16L^2}{\omega^2}$

- L – длина колонки
- ω – ширина основания пика

- при выражении через время удерживания $N = \frac{16t_R^2}{\omega^2} = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$

- ширину пика удобнее измерить на половине высоты – $\omega_{1/2}$

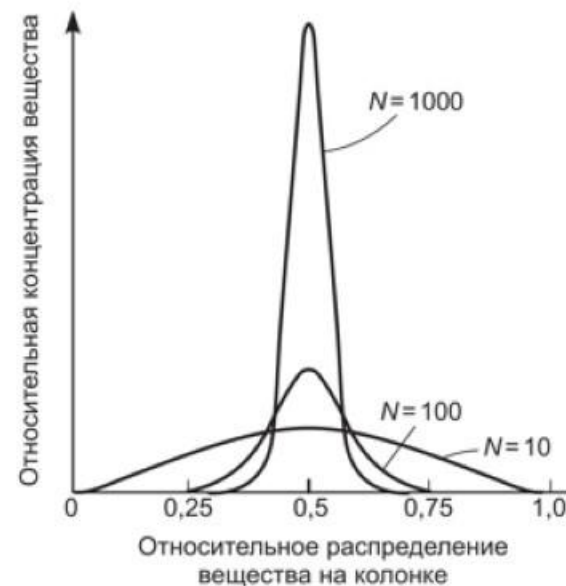
- $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2$



Колоночная хроматография

Основные принципы и термины. Теоретические тарелки

- хроматографическая колонка – последовательность зон (теоретических тарелок), в каждой из которых может быть установлено равновесное распределение анализируемого вещества между двумя фазами
- высота теоретической тарелки (H) – длина колонки, соответствующая одной теоретической тарелке
- высота тарелки связана с шириной пика вещества: $H = \frac{\sigma^2}{x}$
 - σ – стандартное отклонение
 - x – длина пути, пройденного веществом
- для симметричных пиков общее число теоретических тарелок в колонке: $N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} = \frac{L^2}{\omega^2} = \frac{16L^2}{\omega^2}$
 - L – длина колонки
 - ω – ширина основания пика
- при выражении через время удерживания $N = \frac{16t_R^2}{\omega^2} = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$
- ширину пика удобнее измерить на половине высоты – $\omega_{1/2}$
- $N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\omega_{1/2}} \right)^2$
- мера эффективности колонки – чем меньше H и больше N, тем уже пик



Колоночная хроматография

Уширение пика

- нанесение образца (время и объем)
- продольная диффузия – зависит от скорости потока
- неравномерность набивки и неоднородность потока подвижной фазы
 - отсутствует в капиллярных колонках
- кинетика массообмена – зависит от размера частиц НФ

- уравнение Ван Деемтера: $H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x$
 - A – неоднородность потока
 - B – продольная диффузия
 - C – кинетика массообмена
 - u_x – скорость потока элюента



Колоночная хроматография

Типы равновесий

Физико-химические свойства БММ как основа хроматографии

Типы равновесия

- равновесная адсорбция – адсорбционная, гидрофобная хроматография
 - стационарная фаза – твердая
 - подвижная фаза – жидкая
- равновесное распределение – распределительная хроматография
 - стационарная фаза – жидкая
 - подвижная фаза – жидкая или газообразная
- ионообменное равновесие – ионообменная хроматография, хроматофокусирование
 - стационарная фаза – твердая (ионообменные смолы)
 - подвижная фаза – жидкая
- эксклюзионное равновесие – эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация)
 - неподвижная твердая пористая матрица
 - подвижная фаза – жидкая
- равновесное связывание – аффинная хроматография
 - иммобилизованный на твердой матрице лиганд
 - подвижная фаза – жидкая

Колоночная хроматография. Типы равновесия

Адсорбционное

- неподвижная фаза – твердый адсорбент
 - гидроксипатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
 - применение
 - отделение оцДНК от дцДНК: оцДНК смывается первой при повышении концентрации фосфата в элюирующем буфере
 - очистка дцДНК (высокое сродство) от РНК и белков
 - особенности
 - варианты для LPLC и HPLC
 - матрица с привитыми гидрофобными группами
 - гидрофобные группы (алкильные $\text{C}_2\text{-C}_8$ и фенильные) связаны с матрицей
 - элюенты – растворы электролитов (сульфат аммония) с различным рН

Колоночная хроматография. Типы равновесия

Распределительное

- обе фазы – НФ и ПФ – жидкие, но разные по полярности
- одна полярная, вторая неполярная – два варианта проведения
 - нормально-фазовая жидкостная хроматография
 - стационарная фаза – полярная
 - подвижная – относительно неполярная
 - обращенно-фазовая жидкостная хроматография
 - стационарная фаза – неполярная
 - подвижная – относительно полярная
 - ион-парная обращенно-фазовая хроматография – подавление заряда с помощью рН или противоиона
- элюотропный ряд – расположение растворителей по полярности
 - н-гексан < циклогексан < трихлорметан < дихлорметан < тетрагидрофуран < ацетонитрил < этанол < метанол < уксусная кислота < вода
- по механизму удержания стационарной фазы на матрице
 - жидко-жидкостная – жидкая НФ удерживается на матрице-сорбенте за счет физических взаимодействий
 - целлюлоза, крахмал и силикагель при содержании воды до 50% сохраняют сыпучесть
 - преимущества
 - низкая стоимость
 - высокая емкость
 - недостатки
 - постепенное вымывание
 - изменение параметров хроматографии
 - привитая стационарная фаза – ковалентная связь с матрицей-сорбентом
 - характерно для обращенно-фазовой хроматографии
 - алкилсилановые группы (C4-C18), связанные на оксиде кремния
 - часто применяется в анализе белков в FPLC

Колоночная хроматография. Типы равновесия

Ионообменное

- связывание молекул с противоположным зарядом
- катионообменники содержат отрицательно заряженные группы и связывают катионы
- анионообменники содержат положительно заряженные группы и связывают анионы
- выбор зависит от устойчивости целевых молекул при разных значениях pH
- полная обменная емкость
 - число миллиэквивалентов обмениваемых ионов на грамм сухого ионообменника либо на единицу объема водной смолы
 - количество перекрестных сшивок влияет на емкость ионообменника
 - выбор конкретного ионообменника определяется относительными молекулярными массами (и размерами) компонентов образца
- прочность связывания определяется количеством заряженных групп
- селективная десорбция (элюция) – за счет изменения pH и/или концентрации противоиона
 - градиентное элюирование – непрерывный и ступенчатый градиенты
 - анионообменники
 - катионные буферы – Tris, пиридиновый, алкиламиноновый буфер
 - понижающийся градиент pH
 - повышающийся градиент ионной силы
 - катионообменники
 - анионные буферы – ацетатный, барбитуратный или фосфатный
 - повышающиеся градиенты pH и ионной силы

Колоночная хроматография. Типы равновесия

Ионообменное. Хроматофокусирование

- в колонке создают линейный градиент рН
 - анионообменник уравнивают при определенном значении рН
 - наносят полибуфер
 - равная буферная емкость во всем рабочем диапазоне рН
 - начальное значение рН ниже того, при котором уравнивали колонку
 - устанавливается градиент рН – значение рН в верхней части на 3–4 единицы ниже, чем в нижней части
- белок наносят в буфере с рН равным значению в верхней части колонки
- белок мигрирует до зоны с рН равным его изоэлектрической точке
- приобретает отрицательный заряд и связывается анионообменником
- подача исходного буфера приводит к сдвигу вдоль колонки градиента рН
- белок приобретает положительный заряд и начинает мигрировать
- при переходе через зону изоэлектрической точки снова сорбируется
- процесс повторяется несколько раз, пока белок не сойдет с колонки

Колоночная хроматография. Типы равновесия

Эксклюзионное

- эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация, метод молекулярных сит)
- колонка заполнена пористыми частицами
- более мелкие молекулы проникают через поры внутрь частиц и двигаются медленнее
- более крупные молекулы и комплексы быстро проходят между частицами геля
- смена подвижной фазы не требуется – изократическое элюирование
- применение
 - очистка и разделение
 - обессоливание и очистка от низкомолекулярных компонентов (в т.ч. детергентов) – быстрее и эффективнее диализа
 - концентрирование
 - определение молекулярной массы

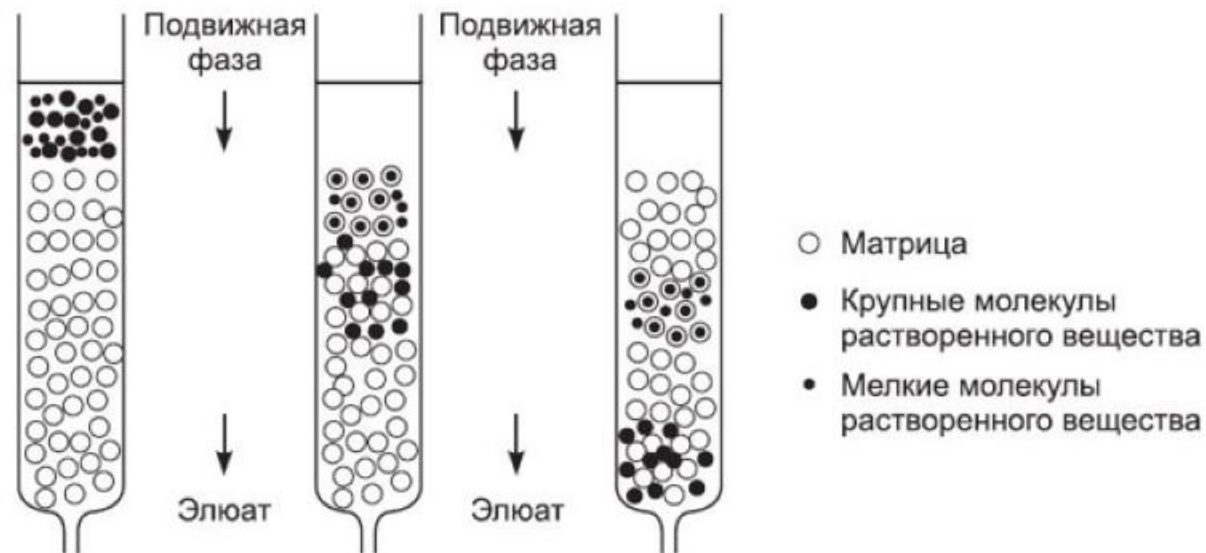
Колоночная хроматография. Типы равновесия

Эксклюзионное

Полимер	Фирменное название	Диапазон фракционирования ^a , $M_r \cdot 10^{-3}$
Жидкостная хроматография низкого давления		
Декстран	Сефадекс	
	G-10	< 0,7
	G-25	1-5
	G-50	1,5-30
	G-100	4-150
G-200	5-600	
Перекрестно-сшитый декстран	Сефакрил	
	S-100	1-100
	S-200	5-250
	S-300	10-1500
S-400	20-8000	
Агароза	Сефароза	
	6B	10-4000
	4B	60-20 000
2B	70-40 000	
Полиакриламид	Биогель	
	P-2	0,1-1,8
	P-6	1-6
	P-30	2,5-40
	P-100	5-100
P-300	60-400	

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ и FPLC)

Поливинилхлорид	Фрактогель	
	TSK HW-40	0,1-10
	TSK HW-55	1-700
	TSK HW-65	50-5000
TSK HW-75	500-50 000	
Декстран, связанный с перекрестно-сшитой агарозой	Супердекс	
	75	3-70
200	10-600	



Колоночная хроматография. Типы равновесия

Аффинное

- специфичное взаимодействие молекул
- на матрице иммобилизован лиганд
- элюция
 - неспецифическая (изменение pH и/или ионной силы)
 - специфическая (аффинная) – другой лиганд, обладающий большим сродством
- примеры
 - иммуноаффинная
 - металл-хелатная
 - иммобилизованные ионы металлов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Mn^{2+}
 - селективно связывают: имидазольная группа гистидина, тиогруппа цистеина, индольная группа триптофана
 - элюция: ЭДТА, pH, имидазол
 - мРНК – селективная гибридизация на поли(U)-Sepharose 4B

Спасибо за внимание!

Электрофорез

Основы метода

Основы метода

- заряженные частицы перемещаются под действием электрического поля
- подвижность частицы зависит от ее размера, формы и заряда (при прочих равных условиях)
- белки – радикалы катионогенных и анионогенных аминокислот
 - соотношение аминокислот
 - pH
- нуклеиновые кислоты – отрицательный заряд за счет фосфатных групп

Физико-химические принципы

Принцип метода

- разность потенциалов (напряжение) в вольтах – V (voltage)
- расстояние между электродами в сантиметрах – d (distance)
- заряд молекулы в кулонах (Кл) – q
- градиент потенциала (В/см) – $E = V/d$
- формируется сила, направляющая заряженную молекулу к электроду: Eq (Н)
- препятствует сила трения – f
 - размер и форма частиц
 - свойства среды, в которой происходит разделение (вязкость, размер пор геля)
- скорость движения $V = Eq/f$
- электрофоретическая подвижность иона $\mu = V/E$
- ток в растворе – в основном за счет ионов буфера + ионы образца

Принцип метода

- закон Ома
 - сопротивление $R = V/I$
 - сила тока $I = V/R$
 - напряжение $V = R \cdot I$
- мощность $W = V \cdot I = I^2 \cdot R = V^2/R$
- напряженность электрического поля E (В/см) = V/d
 - ограничено нагреванием
 - конвекция
 - диффузия

Принцип метода

Факторы, препятствующие разделению

- конвекция
- диффузия
- электроэндоосмос
 - направление заряженных частиц противоположное электрофоретическому (к катоду)
 - отрицательно заряженные группы носителя или поверхности сосуда
 - силанольные группы стекла, сульфатные группы агарозы
 - положительно заряженные ионы перемещаются по ним к катоду
 - среда и молекулы образца увлекаются за ними

Носители

В растворе (без носителя) – граничный

- Арне Тизелиус 1930
- U-образная трубка
- детектируется перемещение границы белка по оптической плотности
- низкая эффективность
 - электроосмотический перенос вдоль стенок трубки – необходимость большого диаметра
 - конвекция
 - диффузия
- большое количество образца – десятки и сотни миллиграмм

На носителях – зональный/зонный электрофорез

Требования к носителям

- резкое снижение конвекции
- высокая теплопроводность
- низкая адсорбция
- химическая инертность
- отсутствие заряда

На носителях – зональный/зонный электрофорез

Носители

- на фильтровальной бумаге
 - снижение конвекции и диффузии
 - высокая адсорбция
 - сложность детекции – окрашивание фона
- ацетат целлюлозы
 - относительно низкая адсорбция
 - пригоден для иммуноэлектрофореза
- в гелях
 - крахмальный
 - первый из использованных гелей с эффектом молекулярных сит
 - активно препятствует конвекции
 - хрупкий
 - сложно готовить
 - ограничения по размеру пор
 - низкая прозрачность
 - агарозный
 - полиакриламидный (ПААГ)

Агарозный

Особенности

- агароза – линейный полисахарид, компонент агара (1-3%)
- $M \sim 12000$
- раствор получают нагреванием сухой агарозы в буфере
- гель легко плавится – возможность выделения очищенных макромолекул
- размер пор геля зависит от исходной концентрации раствора агарозы
- выше концентрация – меньше поры
- мономер – агаробиоза (галактоза и 3,6-ангидрогалактоза)
- гидроксильные группы сахаров могут замещаться на
 - сульфатные – показатель чистоты (чем ниже содержание, тем выше чистота – ниже электроэндоосмос)
 - карбоксильные
 - метоксильные
 - пируватные

Агарозный

Особенности

- простота приготовления
- удовлетворительная прозрачность
- относительно высокая пластичность
- химическая инертность зависит от наличия замещенных групп
- активный электроэндоосмос при низкой чистоте агарозы
- подходит для разделения макромолекул с высокой молекулярной массой (НК)
- электрофорез в агарозе обычно проводят в горизонтальном исполнении

- КОМПОНЕНТЫ
 - акриламид – обеспечивает удлинение
 - N,N'-метиленабисакриламид (бисакриламид) – обеспечивает удлинение и ветвление
- полимеризация
 - свободно-радикальный катализ
 - тетраметиленабис(2-аминоэтанол) (ТМЕА) катализирует разложение иона персульфата с образованием свободного радикала
 - катализаторы добавляют непосредственно перед заливкой геля
 - фотополимеризация
 - рибофлавин под действием света разлагается с образованием свободных радикалов

ПААГ

Особенности

- термостабилен
- прочен
- прозрачен
- химически инертен
- неионогенен (низкая активность электроэндоосмоса)
- широкий диапазон размера пор

ПААГ

Особенности

- основная характеристика – % содержание акриламида – определяет размер пор
- от 3% до 30%
- выше содержание акриламида – меньше поры
- гель выбирают в зависимости от размера разделяемых молекул
- белковый форе́з проводят в ПААГ
- электрофорез в ПААГ обычно проводят в вертикальном исполнении

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

Техники

Изотахорез

- основа – три типа электролита с общим противоионом
- в электрическом поле выстраиваются в соответствии с электрофоретической подвижностью
 - ведущий (в области анода)
 - анализируемые
 - замыкающий
- все ионы двигаются в одном направлении
- формируют зоны
 - находятся в равновесном состоянии
 - перемещаются с одинаковыми скоростями
 - ширина соответствует количеству аниона
- внесение дополнительного иона с промежуточной подвижностью раздвигает зоны исследуемых ионов
- может применяться как самостоятельный метод
 - плохое разрешение

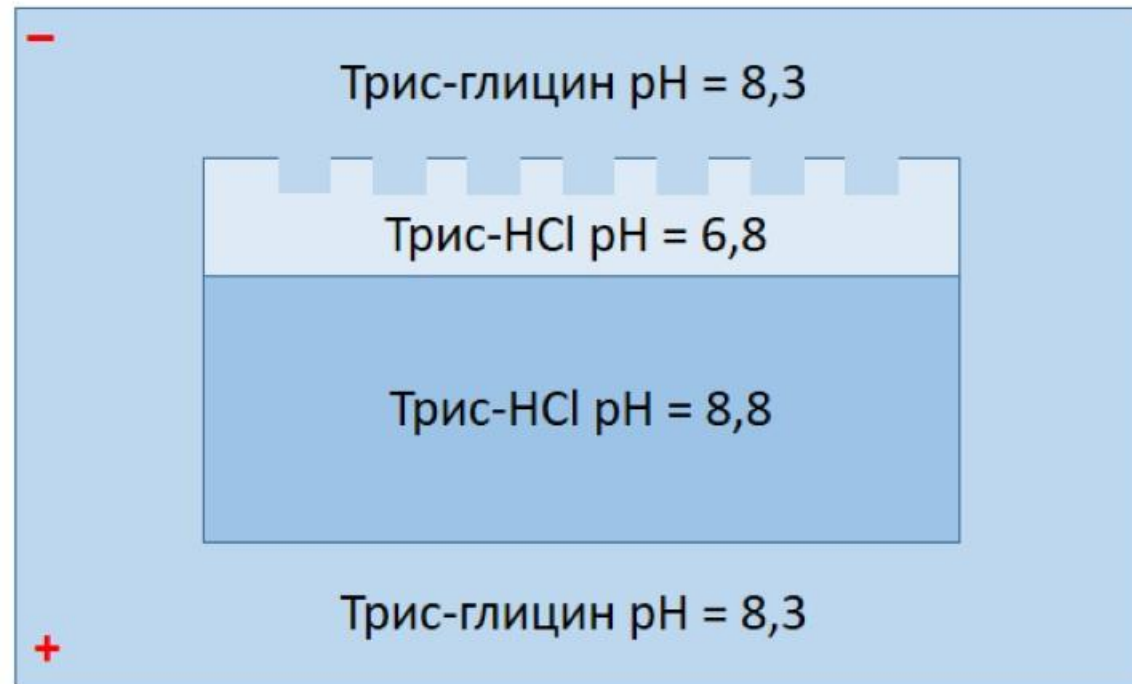
Ступенчатый электрофорез

- по Орнштейну и Дэвису
- discontinuous (disc-электрофорез)/ступенчатый
- два геля с разной концентрацией мономеров и pH буферных систем
 - концентрирующий – верхний
 - 4% акриламид
 - pH = 6,8
 - белки проходят свободно, без разделения
 - за счет явления изотахофореза формируется узкая белковая полоса (фронт) – белок концентрируется
 - разделяющий – нижний
 - в среднем от 12% до 15% (зависит от молекулярной массы целевых молекул)
 - pH = 8,8
 - формирование зон белков с одинаковой молекулярной массой

Ступенчатый электрофорез

Роль буферов

- формируется контур $[Cl^-] > [белок] > [глицин]$
- изотахофорез способствует концентрированию и препятствует разделению белков
- переход в щелочной буфер резко повышает подвижность глицина и он обгоняет белки

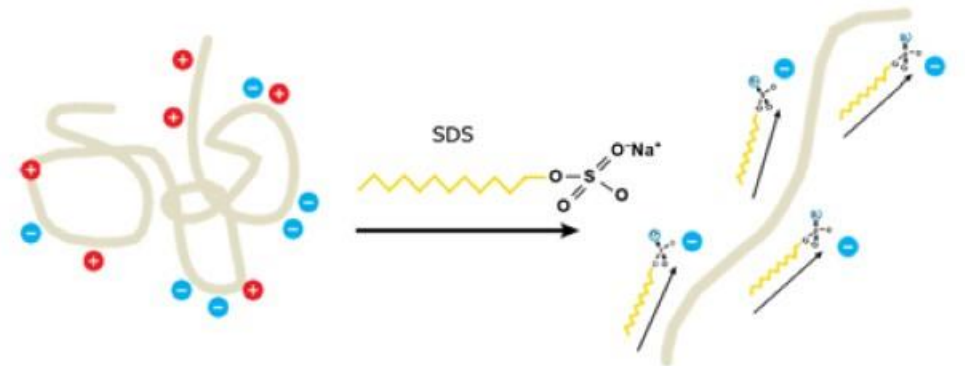


Градиентный

- в качестве разделяющего используется гель с градиентом концентраций акриламида
- концентрация возрастает сверху вниз непрерывно (обычно от 5 до 25%)
- градиент создается специальным смесителем
- заливка начинается с самой высокой концентрации со снижением по мере заполнения
- по мере продвижения по гелю белки достигают области с предельным для них размером пор
- достигается высокое разрешение белков с близкими молекулярными массами

Электрофорез по Лэммли

- белковый ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях (SDS-PAGE)
- особенности
 - додецилсульфат/лаурилсульфат натрия (SDS, SLS)
 - денатурирует и расправляет полипептидную цепь, взаимодействуя гидрофобной частью
 - предотвращает ренатурацию
 - придает отрицательный заряд всем белкам
 - уравнивает соотношения молекулярных масс и зарядов полипептидов
 - β -меркаптоэтанол восстанавливает (разрывает) дисульфидные связи
 - прогревание ускоряет денатурацию
 - разделение исключительно по молекулярной массе



Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)

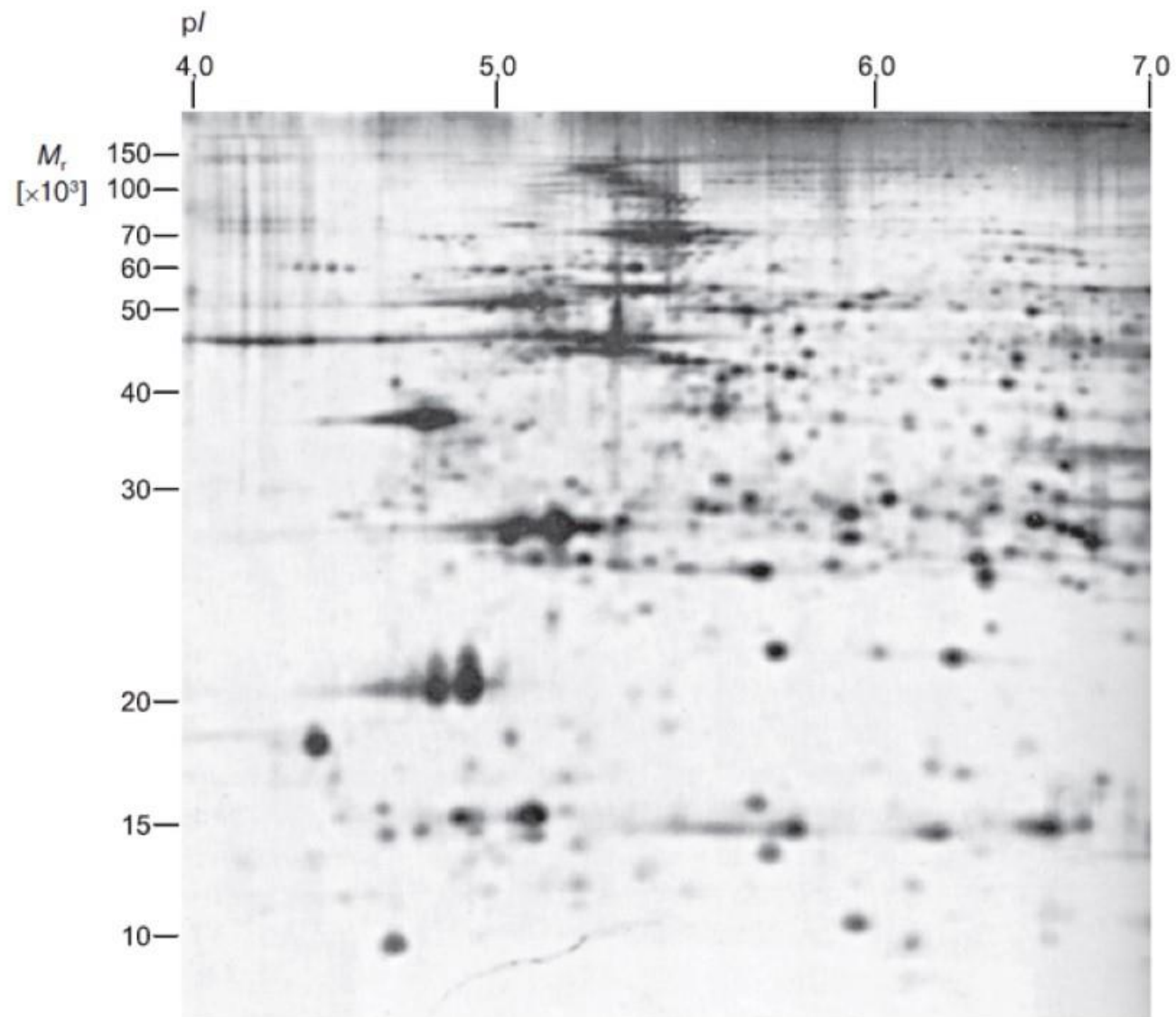
- амфолиты формируют в геле градиент рН
- разделяемые в процессе электрофореза белки достигают изоэлектрической точки и останавливаются

Двумерный электрофорез белков

- проводится в два этапа
 - изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) с разделением белков по заряду (ИЭТ)
 - электрофорез в денатурирующих условиях (по массе)
- на этапе ИЭФ получают полосу с белками разделенными по ИЭТ
- полученную полосу помещают горизонтально на обычный ПААГ
- проводят электрофорез
- каждой области белков с определенной ИЭТ соответствует своя дорожка
- результат – гель с пятнами, соответствующими белкам с определенной молекулярной массой и ИЭТ

Двумерный электрофорез белков

Результат



Детекция результатов

Детекция белков

Основные методы

- **кумасси бриллиантовый синий R-250**

- 0,1 % раствор в системе метанол-вода-ледяная уксусная кислота (45:45:10)
- метанол и уксусная кислота осаждают и фиксируют белок в геле, что предотвращает его вымывание
- краситель окрашивает весь гель, но с белком связывается прочно
- после окрашивания следует стадия отмывки в той же смеси метанол-вода-уксусная кислота, но без красителя (отмывка требует несколько смен растворителя)
- чувствительность: выявляет белок в количестве 0,1мкг (100нг)

- **серебро**

- восстановление Ag^+ до металлического серебра
- полосы коричневого или черного цвета
- чувствительность: позволяет выявлять белок в количестве менее 1 нг
- возможно использование после окрашивания кумасси для выявления минорных фракций

Детекция белков

Флуоресцентные методы

- Sypro оранжевый и Sypro красный
 - чувствительность – около 10 нг
- требуется УФ-трансиллюминатор

Детекция белков

Выявление гликопротеинов

- система иодной кислоты (PAS – periodic acid-Schiff)
 - низкая чувствительность
- окрашивание лектинами после переноса на мембрану (блоттинг)
 - лектины специфичны к различным типам углеводов
 - дает информацию о типе гликозилирования

Спасибо за внимание!

Полимеразная цепная реакция

Исследование с помощью ПЦР

Основные этапы

- **пробоподготовка**
 - выделение целевой НК
 - удаление примесей, мешающих проведению ПЦР
- **смешивание компонентов ПЦР**
- **полимеразная цепная реакция**
- **детекция результатов ПЦР**
 - по конечной точке (электрофорез)
 - ПЦР в реальном времени
- **анализ результатов**

ПЦР

Цикл и стадии цикла

Метод многократного увеличения количества (амплификации) копий последовательности ДНК

Результат ПЦР – множество копий (**ампликонов**) целевой последовательности ДНК

- **цикл ПЦР – три стадии**

- **денатурация (плавление)** – разрыв водородных связей между комплементарными цепями ДНК
- **отжиг** – присоединение праймеров к комплементарному участку матрицы
- **элонгация** – синтез цепи ДНК, комплементарной матрице

- **смена этапов** происходит путем **изменения температуры**

- малые объемы реакционной смеси
- тонкостенные пробирки
- точная, быстрая и равномерная работа нагревательных элементов

- **параметры этапов (длительность и температура)**

- **зависят от** свойств и количества используемых **компонентов** (матрицы, праймеров, полимераз, дНТФ, присутствия ингибиторов и др)
- **влиять на чувствительность и специфичность** метода

- **количество циклов**

- зависит от **количества матрицы** в исходном образце (обратная зависимость)
- в большинстве случаев в пределах **20-40** циклов
 - **большее** количество может потребоваться **при низкой эффективности** ПЦР
 - в других случаях **увеличение** количества циклов **нецелесообразно** вследствие **выхода** кинетики реакции **на плато**
- $N_n = N_0 E^n$, где
 - N_0 – количество целевых молекул в исходном образце
 - n – порядковый номер цикла
 - N_n – количество ампликонов на цикле n
 - E – эффективность (от 0 до 2)

Параметры цикла ПЦР

- **денатурация** (плавление/melting) – разрыв водородных связей между цепями ДНК
 - температура (T_m) – 90-98°C
 - длительность
 - в первом цикле совмещают с прогревом смеси в течение 1-3 минут
 - для последующих циклов 5-60 секунд
- **отжиг** (annealing) – присоединение праймеров к комплементарному участку матрицы
 - температура (T_a) – 40-75°C
 - в среднем на 3-5°C ниже **T_m праймеров**
 - при появлении неспецифических ампликонов можно повысить на 2-3°C
 - длительность 5-60 секунд
- **элонгация** – синтез цепи ДНК, комплементарной матрице
 - температура – 60-75°C
 - длительность зависит от длины фрагмента, скорости полимеразы, состава реакционной смеси (~1 мин/1 т.п.о)

Примечания:

- **параметры зависят от свойств и количества** используемых компонентов
- **изменение параметров** этапов позволяет **изменять специфичность и чувствительность** метода
- близость температурных режимов этапов **отжига и элонгации** позволяет в ряде случаев **объединить их**

Компоненты ПЦР

- матрица
- субстраты и источники энергии
- полимеразы
- Mg^{2+}
- буфер и дополнительные компоненты

Компоненты ПЦР

Матрица

- наиболее часто встречающиеся **виды**
 - геномная (большое количество ДНК не означает высокого содержания целевого фрагмента)
 - плазмидная (обычно требуется гораздо меньшее количество по сравнению с геномной)
 - кДНК (количество и качество зависит от стадии ОТ)
- **количество** матрицы **влияет на число циклов** ПЦР, необходимое для накопления достаточного количества ампликонов (обратная зависимость)
- **теоретически одной копии** целевого фрагмента **достаточно** для успешной амплификации, но
 - проблема неспецифичной амплификации
 - ингибиторы ПЦР
- **примеси** – возможная причина **снижения эффективности** ПЦР
 - компоненты клеток и тканей образца (полисахариды, **гепарин** и др)
 - реагенты, используемые при выделении и очистке НК (**ЭДТА, ионные детергенты, фенол** и др)
 - нуклеазы (особенно **РНказы** – для ОТ-ПЦР, **ДНКазы** при амплификации длинных фрагментов)
 - для многих простых приложений степень чистоты не существенна
 - критичны для амплификации длинных фрагментов (более 3 т.п.о.) и специфических приложений

Компоненты ПЦР

Праймеры

Задают **границы** амплифицируемого участка с **двух сторон** (два типа праймеров)

Важнейший компонент, влияющий на **специфичность** и **чувствительность** ПЦР

- **требования к праймерам**
 - длина – **15–30 нуклеотидов** (в некоторых случаях может быть как меньше, так и больше)
 - $T_m = 55–70^\circ\text{C}$ (см. ниже)
 - T_m для **обоих праймеров** должна быть **одинаковой** или максимально близкой (**в пределах 5°C**)
 - содержание **G и C – 40–60%** с равномерным распределением
 - на 3'-конце должно быть **от 1 до 3 G/C**
 - отсутствие – слабое связывание
 - более 3 – неспецифичное связывание
 - **отсутствие повторов**
 - **не** должны образовывать вторичные структуры, гомодимеры и олигомеры
 - **не** должны взаимодействовать друг с другом
- **допустимо:** на 5'-конце может находиться не комплементарная матрице последовательность
- T_m **праймеров** – температура, при которой 50% праймеров образуют комплекс с комплементарной последовательностью
- **расчетное значение $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$**
 - формула применима, если длина праймеров составляет 18-22 нуклеотидов
 - позволяет сравнить два праймера
- на **реальную T_m** праймеров также **влияют**
 - **другие компоненты** реакционной смеси (ионы Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , примеси и др)
 - **специальные добавки**, используемые для ее модификации (DMSO)
- температура стадии отжига при ПЦР на $3–5^\circ\text{C}$ ниже T_m праймеров
- **концентрация** в большинстве случаев 0,1-0,5 мкМ

Компоненты ПЦР

Полимеразы. Характеристики

- все ДНК-полимеразы присоединяют новый нуклеотид к 3'-концу синтезируемой цепи ДНК, обеспечивая ее рост в направлении 5'→3'
- основные характеристики
 - термостабильность
 - точность
 - процессивность
- часто используют смесь полимераз, сочетая их свойства

Компоненты ПЦР

Полимеразы. Характеристики. Термостабильность

- ситуации, требующие высокой термостабильности полимеразы
 - амплификация протяженных последовательностей (ПЦР длинных фрагментов)
 - амплификация GC-богатых регионов
- полимеразы архей обычно гораздо более термостабильны по сравнению с бактериальными

Компоненты ПЦР

Полимеразы. Характеристики. Точность

- во многом зависит от $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазной активности полимеразы
- при присоединении некомплементарного нуклеотида полимеразы способна удалить его
- показатель точности – величина, обратная частоте ошибок
- частота ошибок – отношение присоединенных некомплементарных нуклеотидов к общему количеству присоединенных нуклеотидов
- точность полимераз может быть выражена по отношению к точности Taq-полимеразой
- существуют полимеразы в 300 раз более точные по сравнению с Taq-полимеразой
- сравнение точности полимераз необходимо проводить на матричной последовательности одинаковой протяженности и при одинаковом количестве циклов

Компоненты ПЦР

Полимеразы. Характеристики. Процессивность

- присоединившаяся к матрице полимеразы способна синтезировать ограниченный по длине фрагмент
- длина синтезированного фрагмента (в нуклеотидах) при однократном присоединении молекулы полимеразы – **процессивность**
- ситуации, требующие высокой процессивности
 - ПЦР длинных фрагментов
 - амплификация GC-богатых регионов

Компоненты ПЦР

Полимеразы. Источники и представители

- бактериальные
 - Таq-полимераза (*Thermus aquaticus*)
 - наиболее известная и часто используемая
 - хорошо подходит для рутинных протоколов (выявление последовательности в образце)
 - время полужизни резко сокращается при повышении температуры с 92 до 95°C и выше
 - отсутствует 3'-5'-экзонуклеазная активность, что отрицательно сказывается на точности
 - ампликоны содержат дополнительные нуклеотиды на 3'-конце (обычно А)
 - *Tth* (*Thermus thermophilus*)
 - обладает ревертазной активностью в присутствии Mn^{2+}
- археи
 - обычно гораздо более термостабильны по сравнению с бактериальными
 - не способны использовать в качестве матрицы урацил-содержащую ДНК
 - скорость и процессивность обычно ниже по сравнению с бактериальными
 - *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*)
 - примерно в 20 раз стабильнее *Taq* при 95°C
 - обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью
 - точность примерно в 7 раз выше по отношению к *Taq*
 - процессивность ниже по сравнению с *Taq*
 - *Pwo* (*Pyrococcus woesei*)

Компоненты ПЦР

Ионы Mg^{2+}

- **$MgCl_2$**
- концентрацию необходимо **корректировать** в зависимости от
 - концентрации дНТФ
 - присутствия комплексонов (ЭДТА, ЭГТА)
 - используемых солей
 - при использовании KCl обычно можно снизить концентрацию ионов Mg^{2+}
 - при использовании $(NH_4)_2SO_4$ концентрацию ионов Mg^{2+} повышают (противоположное влияние на отжиг)
- **оптимальная** концентрация – в пределах **1-5 мМ**
- **повышение** концентрации **повышает температуру плавления** (T_m) ДНК и праймеров
- **избыток снижает специфичность** отжига праймеров

Компоненты ПЦР

Буфер и дополнительные компоненты реакционной смеси

- **буфер** предотвращает снижение pH, обусловленное высвобождающимся пирофосфатом (часто – разные модификации Tris)
- **KCl** (ионы K^+), реже $(NH_4)_2SO_4$
 - при использовании KCl обычно можно снизить концентрацию ионов Mg^{2+}
 - при использовании $(NH_4)_2SO_4$ концентрацию ионов Mg^{2+} повышают (противоположное влияние на отжиг)
- **пирофосфатаза** предотвращает ингибирование реакции накапливающимся пирофосфатом
- **стабилизаторы** – предотвращают денатурацию полимераз и сорбцию компонентов на стенках пробирок
 - бетаин
 - глицерин
 - бычий сывороточный альбумин (БСА)
 - неионные детергенты (Tween-20)
- **диметилсульфоксид** (ДМСО/DMSO)
 - облегчает расхождение цепей ДНК, в том числе при амплификации GC-богатых регионов,
 - понижает температуру отжига праймеров

Этапы исследования с помощью ПЦР

Детекция результатов

- **по конечной точке** – с помощью **электрофореза** ампликонов
 - ампликоны имеют относительно низкую молекулярную массу – электрофорез в ПААГ
 - визуализация
 - флуоресцентные красители (бромистый этидий)
 - зонды
 - метод позволяет определять чистоту ампликонов, выявить неспецифичные продукты ПЦР
 - из геля можно выделить чистый продукт
- **в реальном времени**
 - в каждом цикле встраиваются в новые ампликоны флуоресцентные метки
 - прибор считывает интенсивность флуоресценции на каждом цикле и строит график накопления сигнала
 - метод позволяет проводить количественный анализ по кинетике накопления сигнала

Варианты протоколов ПЦР

Варианты протоколов ПЦР

Горячий старт

- метод **повышения специфичности** ПЦР
- при комнатной температуре
 - присутствуют расплетенные (денатурированные) участки ДНК
 - возможно их неспецифическое взаимодействие с праймерами
 - сохраняется активность ДНК-полимераз
 - в результате образуются неспецифические продукты
- метод горячего старта подразумевает **взаимодействие полимеразы с другими компонентами** только **после прогрева** при температуре близкой к температуре стадии денатурации (возможно совмещение)
- **реализация**
 - добавление одного из компонентов при высокой температуре реакционной смеси
 - механический барьер (парафин)
 - модификация полимеразы (антитела, аптамеры, химические модификации)

Варианты протоколов ПЦР

Ступенчатая (Touchdown) ПЦР

- метод **повышения специфичности** ПЦР
- в первых циклах устанавливают **температуру отжига выше T_m** праймеров
- таким образом **снижается вероятность неспецифического взаимодействия** праймеров с матрицей и друг с другом
- при таком подходе **может снижаться эффективность** накопления и специфичных ампликонов
- для решения этой проблемы часто используют понижение температуры отжига на 1°C с каждым последующим циклом (**ступенчато**) вплоть до достижения оптимальных значений (на $3-5^\circ\text{C}$ ниже T_m праймеров) – touchdown

Варианты протоколов ПЦР

Вложенная («гнездовая») ПЦР

- метод **повышения специфичности и эффективности** накопления целевых ампликонов
- ПЦР проводится в **два раунда**
- **в каждом раунде** используется **своя пара праймеров**
- **в первом раунде** праймеры ограничивают **относительно длинный участок**
- накопленные в первом раунде **ампликоны** используются **в качестве матрицы во втором раунде**
- **вторая пара праймеров** при этом ограничивает **фрагмент внутри ампликонов**
- таким образом снижается вероятность неспецифического взаимодействия с матрицей второй пары праймеров
- в то же время достигается высокий выход целевых ампликонов даже при ограниченном количестве исходной матрицы

Варианты протоколов ПЦР

Инвертированная ПЦР

- метод **амплификации** участка с **неизвестной последовательностью** (при наличии другой известной последовательности)
- праймеры подобраны таким образом, что **амплификация** идет **не навстречу** от одного к другому, **а расходится** в разные стороны (**инвертирована**)
- у линейных геномные ДНК **формируют липкие концы** путем обработки рестриктазами
- **липкие концы лигируют**, что приводит к **формированию кольцевой ДНК**
- проводят инвертированную **ПЦР**
- в результате образуются **линейные ампликоны** с **известными последовательностями на концах**

Контроль качества

Контаминация

этапы исследования методом ПЦР

- пробоподготовка
- смешивание компонентов ПЦР
- полимеразная цепная реакция
- детекция результатов ПЦР
- анализ результатов

исследование необходимо проводить в условиях, исключающих:

- перекрестную контаминацию
- контаминацию ампликонами

основные приемы для снижения риска контаминации:

- зонирование этапов (отдельные помещения для выделения, смешивания и детекции)
- наконечники для пипеток с аэрозольными фильтрами
- использование контролей (ВКО, отрицательный контроль)

Контроли в ПЦР

- **внутренний** контрольный образец (ВКО)
 - определение **ложноотрицательных** результатов
 - ошибка при добавлении компонентов
 - ингибирование амплификации примесями
 - деградация полимераз и/или праймеров
 - **эндогенный** – изначально присутствует в экспериментальном образце (гены домашнего хозяйства, актин, тубулин)
 - **экзогенный** – добавляют вместе с другими компонентами
- **отрицательный** контрольный образец
 - определение **ложноположительных** результатов
 - перекрестная контаминация
 - контаминация ампликонами

Спасибо за внимание!

Масс-спектрометрия биологических макромолекул

Молекулярная масса и масс-спектр

Масс-спектр

Масс-спектр — **график**, отражающий **относительное количество** ионов при каждом значении **m/z**

Анализируют **именно отношение** массы к заряду иона, **а не просто массу** иона

Ионы образуются в результате разных методов обработки анализируемого вещества



Для **калибровки** приборов используют стандартные вещества с точно известными значениями M_r

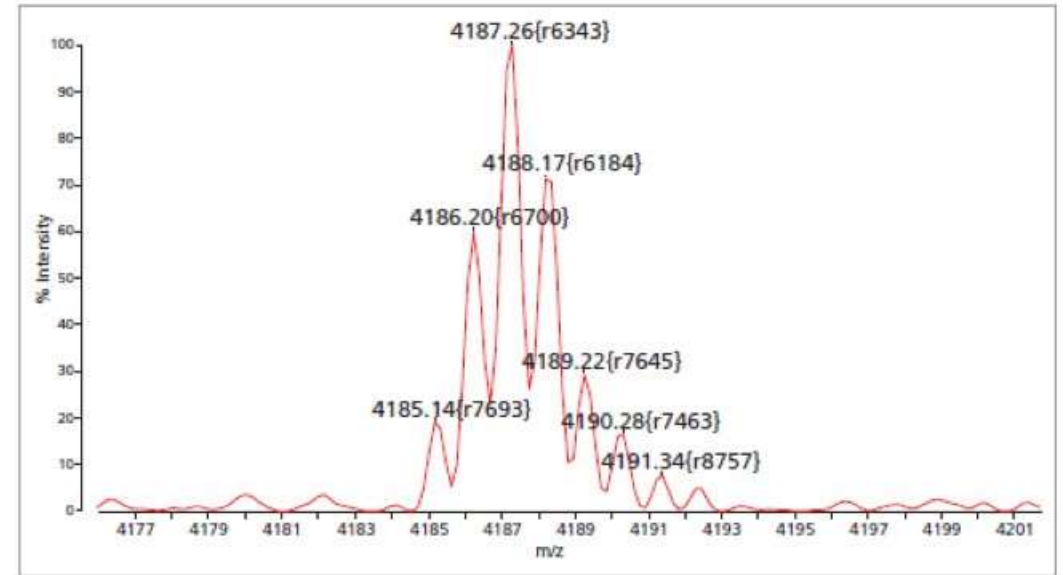
Измерения проводятся по углеродной шкале, причем **масса углерода ^{12}C принимается равной 12,000000**

Масс-спектр

Масс-спектр демонстрирует в виде пиков m/z разной интенсивности **состав ионов**, на которые **фрагментируется** соединение при **данном** методе **ионизации** и **сортировки** ионов

Изотопы и массы вещества

- Содержание ^{13}C – около 1%
- ^2H , ^{15}N , ^{17}O , ^{33}S также вносят вклад
- Более широкие пики
- Менее интенсивные пики



В пептидах, содержащих больше 100 углеродных атомов (более 1500 Да), более интенсивные пики в спектре будут соответствовать молекулам, содержащим тяжелые изотопы

Усредненные массы элементов

C – 12.011

H – 1.00794

N – 14.00674

O – 15.994

S – 32.066

Изотопы и массы вещества

- **номинальная** – молекулярная масса, рассчитанная **суммированием целочисленных** атомных масс **наиболее распространенных (легких) изотопов** элементов
- **моноизотопная** – молекулярная масса, рассчитанная **суммированием точных** атомных (с учетом дефекта массы) **наиболее распространенных (легких) изотопов** элементов
- **средняя** – молекулярная масса, рассчитанная **суммированием усредненных** атомных масс элементов (с учетом распространенности)
- **наиболее распространенная** – масса с **наиболее интенсивным пиком в кластере молекулярного иона**

Основные возможности масс-спектрометрии

- определение молекулярной массы с высокой точностью
- установление структуры соединений
 - секвенирование пептидов и белков, олигонуклеотидов, углеводов
 - определение посттрансляционных модификаций белков
- количественный анализ
- визуализация

Основные этапы масс-спектрометрии

Основные этапы масс-спектрометрии

- введение пробы
- ионизация
- сортировка ионов
- детекция m/z
- обработка данных



Основные этапы масс-спектрометрии. Ионизация

- **заряд** частицы позволяет управлять ее **движением**
- основные процессы
 - потеря и присоединение протонов и электронов
 - перегруппировка заряженных частиц между ионами, молекулами образца и растворителя (матрицы)
- регистрируется m/z – **степень ионизации** (а значит, и метод) **влияет на масс-спектр**
- ионизация может приводить к **фрагментации** молекул
- **методы различаются по жесткости** в отношении целостности молекул
- **цели** определяют **выбор** между **сохранностью** и **фрагментацией**
 - анализ смеси, определение массы – мягкая ионизация
 - установление структуры – фрагментация

Основные этапы масс-спектрометрии. Ионизация

Методы ионизации

- электронный удар (электронная ионизация - EI)
- химическая ионизация
 - в газовой фазе (CI)
 - в жидкой фазе при атмосферном давлении (APCI)
- *бомбардировка быстрыми атомами (ББА, FAB)*
- **электроспрей** (ESI, APESI)
- **MALDI** (матрица-активированная лазерная десорбция/ионизация)

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация. Бомбардировка быстрыми атомами - ББА (FAB). Механизм

- раствор анализируемого вещества в матрице на металлической подложке
- атомы инертных газов (наиболее эффективен ксенон) энергией 7-9 кэВ
- в результате интенсивного разогрева поверхностный слой переходит в состояние плотного газа
- происходит образование родительских ионов, которые далее фрагментируются
- образуются разнозаряженные ионы и нейтральные частицы (не детектируются)

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация. Бомбардировка быстрыми атомами - ББА (FAB). Характеристики

- фрагментированные ионы
- четноэлектронные ионы – протонирование или депротонирование
- ограничен примерно 2000 Да
- количество - не менее 100 пикомолей чистого образца

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. MALDI. Механизм

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

- **раствор** анализируемого **вещества в матрице** на подложке
- **импульсы лазера** определенной длины волны (УФ или ИК)
- **из матрицы выбиваются молекулы** в виде высокотемпературного суперплотного газа, переходящего в состояние плазмы (зону шлейфа)
- в плазме протекают процессы вторичной ионизации (разнозаряженные ионы)

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. MALDI. Характеристики

- мягкий метод ионизации – **молекулярные (полноразмерные)** ионы
- преимущественно (пики выше) **однозарядные** ионы (протонирование, Na⁺, K⁺) **[M+H]⁺**
- размер молекул до миллионов дальтон
- высочайшая чувствительность – уровень зептомолей (10⁻²¹)
- рекорд 800 йоктамолей – 480 молекул

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. MALDI. Варьируемые параметры

- природа матрицы
- соотношение матрица/анализируемое соединение
- длина волны лазера
- мощность излучения
- диаметр луча лазера
- длительность импульса

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. MALDI. Примеры матриц

Смесь 2,5-дигидроксибензойной и 5-метоксисалициловой кислот	 <chem>O=C(O)c1cc(O)ccc1O</chem>	Белки
α -циано-4-гидроксикоричная кислота	 <chem>O=C(O)C(C#N)Cc1ccc(O)cc1</chem>	Пептиды <10 кДа
3,5-диметокси-4-гидроксикоричная кислота	 <chem>O=C(O)CCc1cc(OC)c(O)c(OC)c1</chem>	Пептиды >10 кДа
3-гидроксипиколиновая кислота	 <chem>O=C(O)c1cc(O)ncn1</chem>	Олигонуклеотиды
2-(4-гидроксифенилазо)-бензойная кислота	 <chem>O=C(O)c1ccccc1N=Nc2ccc(O)cc2</chem>	Олигосахариды, белки

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. MALDI. Введение образцов

Подготовка образцов



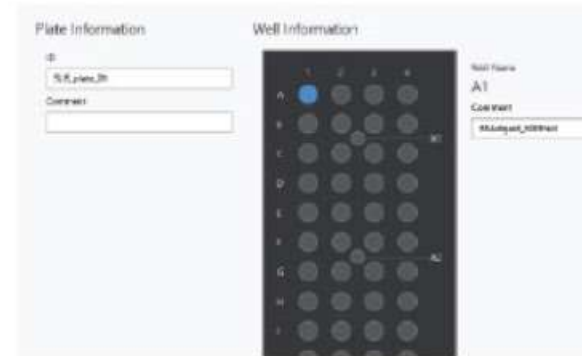
Нанесение образцов на мишень
(Используются мишени FlexNass-SR или FlexMass-DS)

Вакуумирование



Установка мишени в прибор
и откачка вакуума

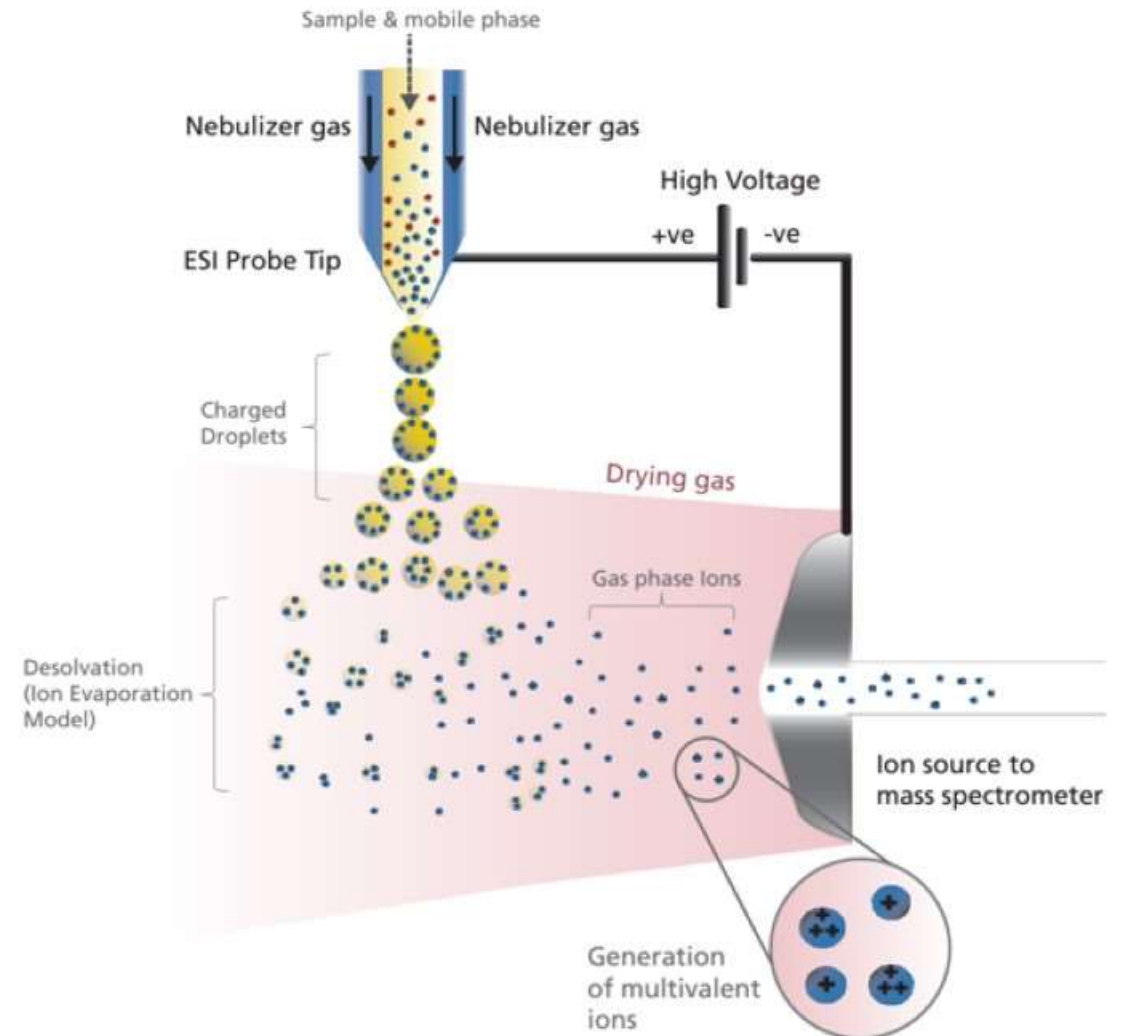
Получение результатов



Запуск измерения

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС. Метод электроспрея (ESI). Механизм

- ввод пробы в жидком виде
 - возможен непосредственно из хроматографа
- на иглу диаметром 0,1 мм подается напряжение 3-7 кВ
 - капли с высоким поверхностным зарядом двигаются к противоэлектроду
- давление постепенно снижается (в пределах атмосферного)
 - капли, теряя растворитель, уменьшаются в размере
- достигается предел Релея
 - силы кулоновского отталкивания превышают поверхностное натяжение
 - капли распадаются на более мелкие
 - процесс повторяется



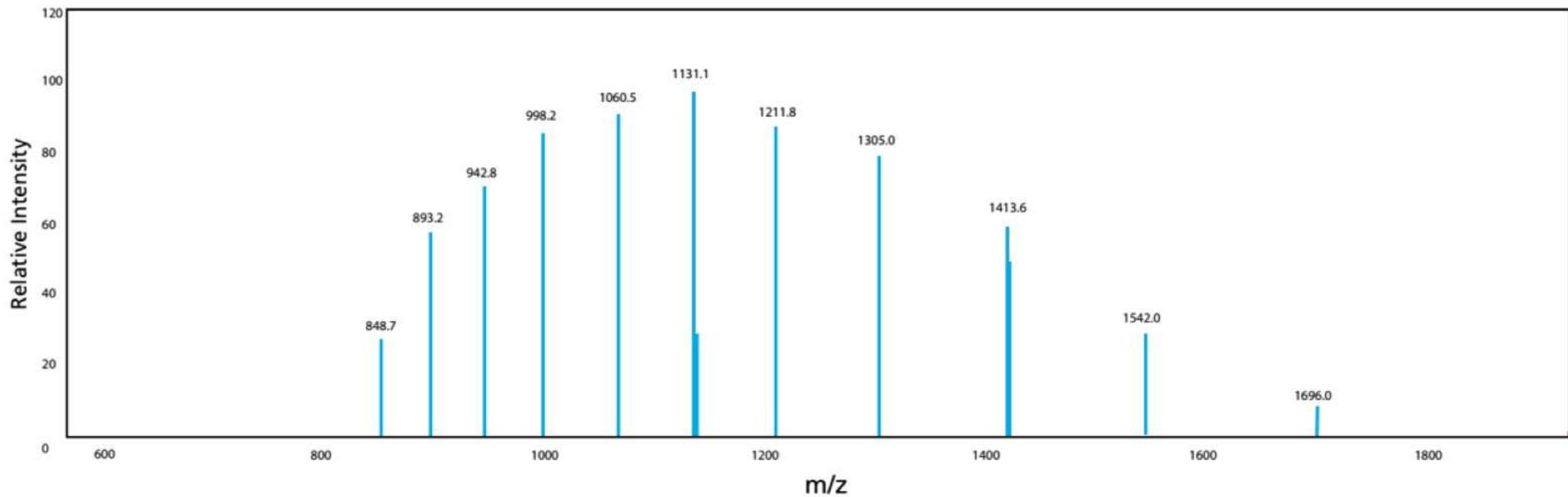
Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС

Метод электроспрея (ESI). Характеристики

- ввод пробы в жидком виде
 - возможен непосредственно из хроматографа (ЖХ-МС)
- ионы с разным количеством зарядов
 - одно- и монозарядные
 - $[M+nH]^{n+}$
- наиболее активно протонируются основные радикалы
- фрагментация практически не реализуется
 - при необходимости – тандемная МС
- чувствительность – зептомоли
- диапазон масс зависит от метода детекции
- многозарядные ионы усложняют спектр, но позволяют детектировать крупные белки в области относительно низких отношений m/z (рабочий диапазон зависит от прибора)

Этапы масс-спектрометрии. Ионизация ВМС

Метод электроспрея (ESI). Многозарядные ионы



Основные этапы масс-спектрометрии

Сортировка ионов

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- введение пробы
- ионизация
- сортировка ионов
- детекция m/z
- обработка данных



Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

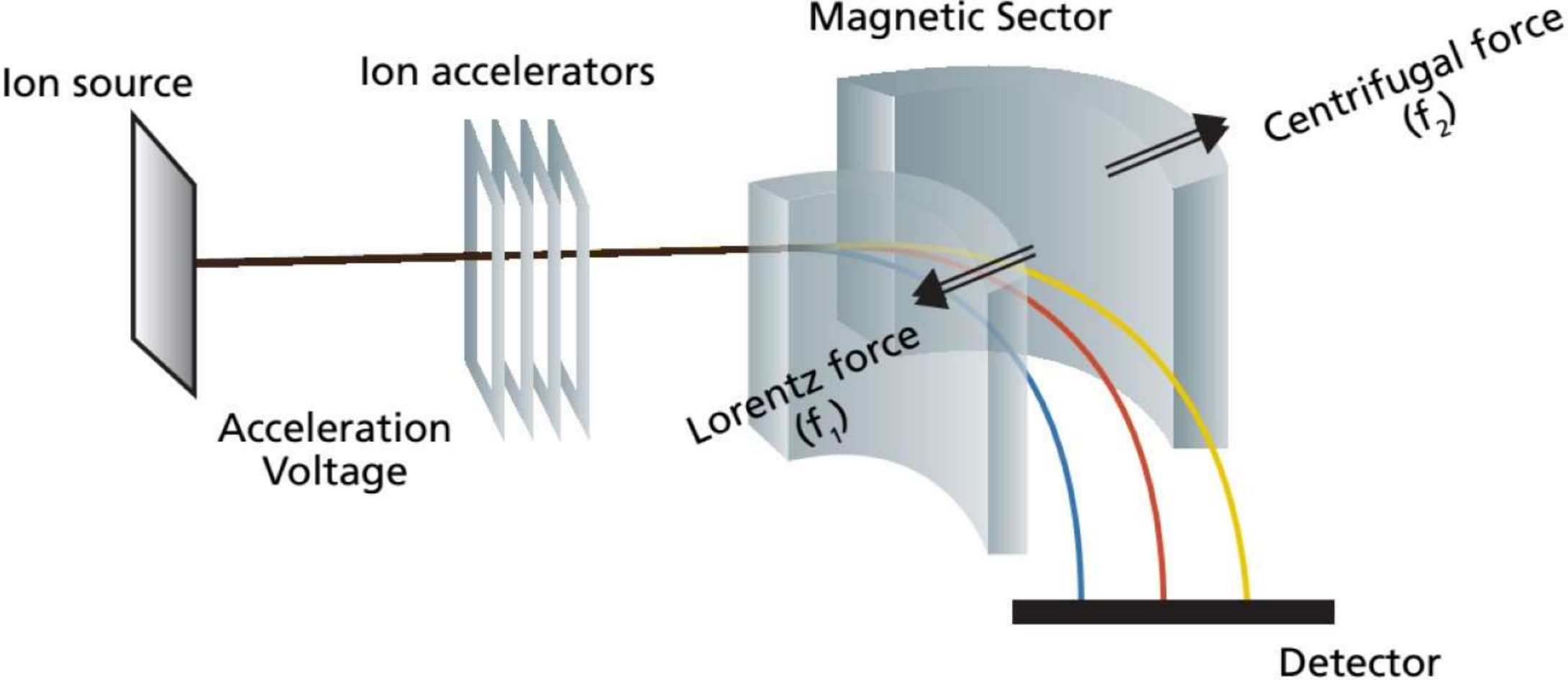
- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

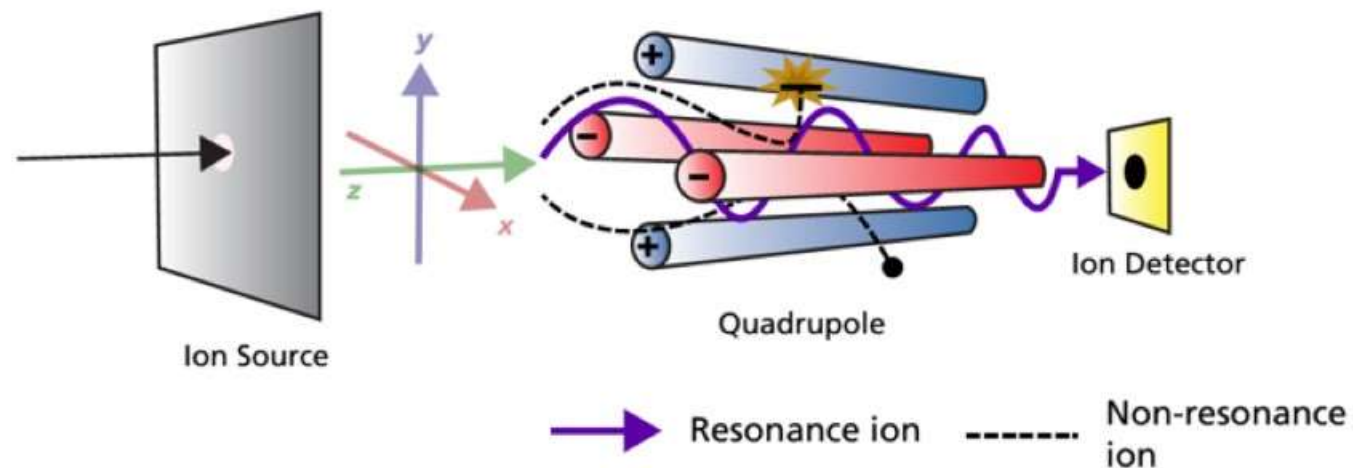
Магнитный сектор



Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z . Квадрупольный анализатор. Механизм



- **четыре** параллельно расположенных цилиндрических стержня (**электрода**)
- на каждый стержень подается **постоянное напряжение (ПН)** и **переменное радиочастотное напряжение (РН)** – создается **переменное электрическое поле**
- путем **изменения напряжения** электрического поля (**сканирования**) на детектор последовательно подаются ионы с **разными m/z**
- ионы с **другим отношением m/z** сталкиваются со стержнями и не детектируются

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z . Квадрупольный анализатор. Характеристики

- анализ ионов с m/z вплоть до 2000
- удаление ионов при столкновении со стержнями снижает чувствительность метода
- возможны два режима работы:
 - сканирование
 - **selected ion monitoring (SIM)** – режим фильтра
 - только ионы с определенным m/z проходят через квадруполь – количественный анализ
- относительно невысокий вакуум ($10^{-2} - 10^{-3}$ Па)
- компакты
- квадруполь можно устанавливать последовательно (QQQ) – тандемная МС
- используются в гибридных системах

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

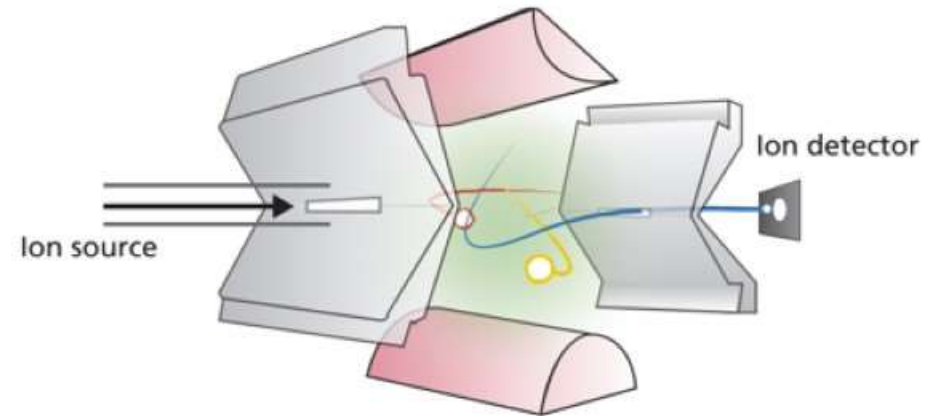
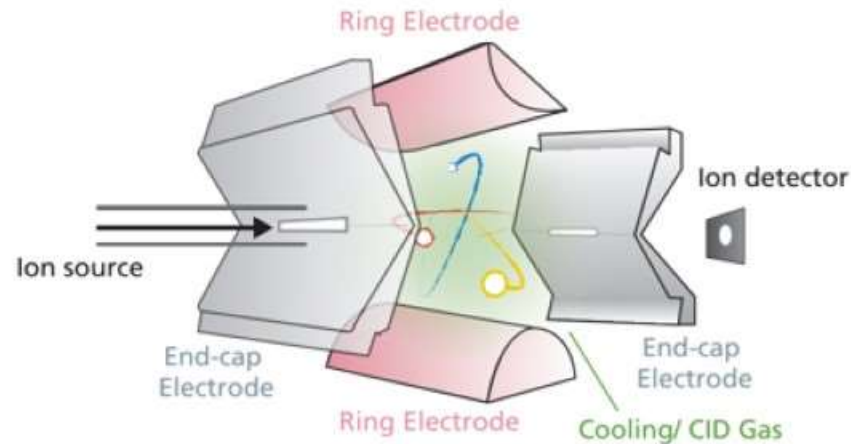
Ионная ловушка. Механизм

- электроды формируют камеру – ионную ловушку
- время цикла – время, необходимое для заполнения ловушки и анализа
- в ловушке низкое давление He, замедляющего ионы
- потенциал выталкивает из ловушки ионы с определенным m/z
- меняя потенциал, регулируют отношение m/z ионов, выходящих из ловушки в сторону детектора
- в ионной ловушке можно реализовать фрагментацию за счет соударений с He

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

Ионная ловушка. Характеристики

- ионы не удаляются (как в квадрупольном анализаторе) – чувствительность выше
- в ионной ловушке можно реализовать фрагментацию за счет соударений с He
 - позволяет выполнять структурный анализ



Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z . Ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FT-ICR)

- вариант ионной ловушки в статическом и равномерном магнитном поле
 - заставляет ионы двигаться по круговой орбите
 - частота такого вращения зависит от массы, заряда и скорости иона
- ионы на орбитах в пространстве между электродами детектора не дают измеряемого сигнала
- радиочастотный сигнал длительностью несколько миллисекунд
 - увеличивает радиус вращения ионов с одним определенным значением m/z , соответствующим частоте сигнала
 - такие ионы дают детектируемый образ тока
- образ тока подвергается преобразованию Фурье
 - угловая частота вращения дает значения m/z

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z . Ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FT-ICR)

- детекция частот, а не частиц
 - частоты определяются с высокой точностью
 - **высокое разрешение**
 - после возбуждения ионы возвращаются на исходные орбиты
 - позволяет повторять анализ многократно
 - **высокая чувствительность**

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

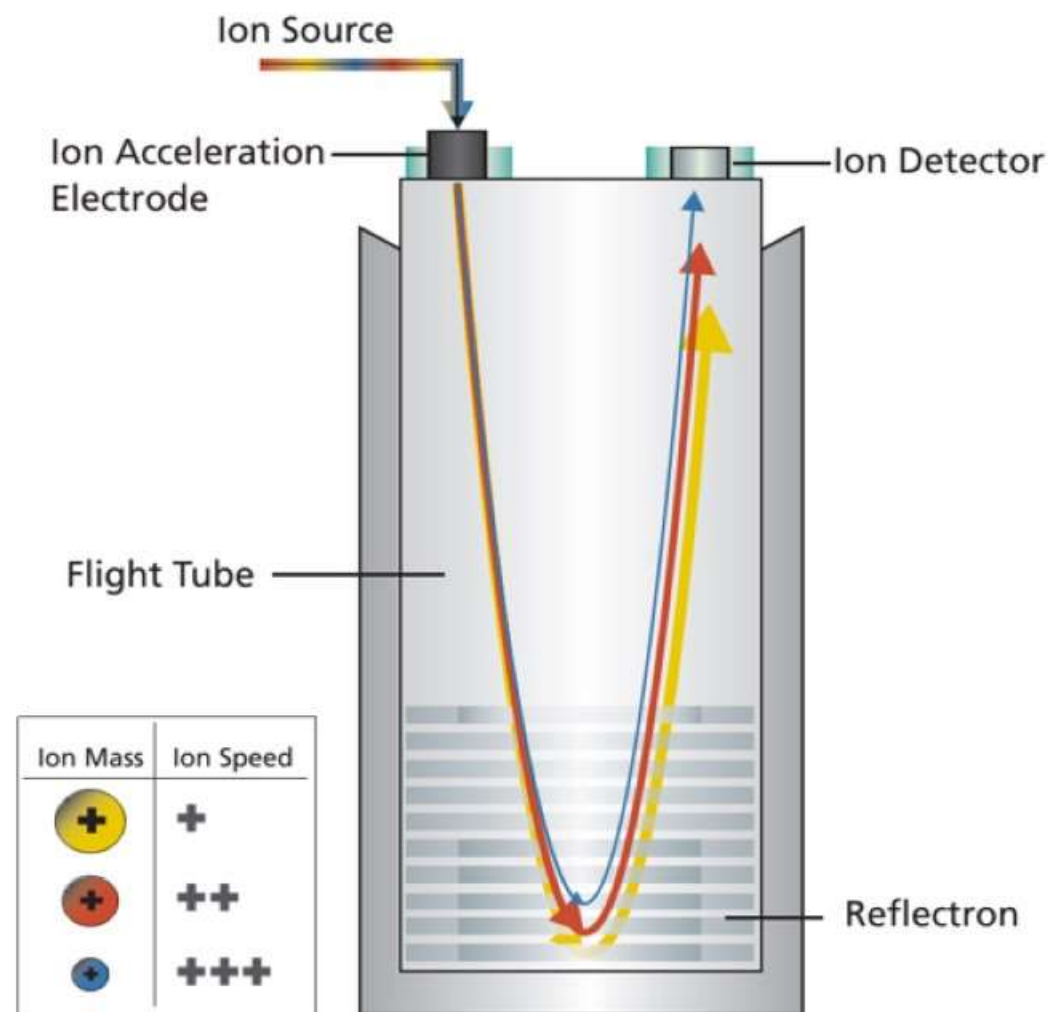
Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z .

Времяпролетный детектор (TOF)

- ионы пролетают дистанцию от источника до детектора
- время пролета при прочих равных условиях пропорционально $\sqrt{m/z}$
 - $T = \frac{\text{distance}}{\text{velocity}} = \sqrt{\frac{m}{z}} \times \frac{L}{\sqrt{2eV}}$
- измерение времени пролета требует точной точки отсчета
 - сочетается с импульсными методами ионизации (MALDI)
- все частицы достигают детектора
 - **высокая чувствительность**
 - нет возможности сканирующего режима

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z . Времяпролетный детектор (TOF). Рефлектрон

- рефлектрон (отражатель)
 - градиентное электрическое поле
 - ионы с разной энергией описывают дуги, разные по кривизне
 - выравнивает ионы с одинаковой массой, но разной энергией
 - перенаправляет (отражает) ионы
 - увеличивает дистанцию
 - повышает разрешение



Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

- магнитный сектор
- квадрупольный (Q)
- ионная ловушка
- ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье
- Orbitrap
- времяпролетный (TOF)
- гибридные

Этапы масс-спектрометрии. Методы сортировки частиц по m/z

Связь методов ионизации и детекции

- времяпролетный детектор
 - практически не имеет ограничений по максимальной молекулярной массе анализируемых ВМС
 - хорошо сочетается с MALDI, дающим однозарядные ионы с m/z равным молекулярной массе белка
- квадрупольный анализатор
 - ограничен m/z 2000
 - снижает его применение в сочетании с MALDI
 - хорошо сочетается с ESI, генерирующим многозарядные ионы
- при необходимости фрагментации – тандемная МС

Основные этапы масс-спектрометрии

Обработка данных

Этапы масс-спектрометрии. Обработка данных

- введение пробы
- ионизация
- сортировка ионов
- детекция m/z
- обработка данных



Основные возможности масс-спектрометрии

- определение молекулярной массы с высокой точностью
- установление структуры соединений
 - секвенирование пептидов и белков
 - определение посттрансляционных модификаций белков
- количественный анализ
- визуализация

Основные возможности масс-спектрометрии

Установление структуры

- определение молекулярной массы с высокой точностью
- **установление структуры соединений**
 - секвенирование пептидов и белков
 - определение посттрансляционных модификаций белков
- количественный анализ
- визуализация

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

- полипептиды ионизируют в мягких условиях (MALDI, ESI)
- результат – молекулярные (полноразмерные) ионы
- большинство методов сортировки ионов также не влияет на целостность молекул
- легко определять молекулярную массу, масс-спектр целых пептидов (молекулярный спектр)
- нет информации о структуре

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

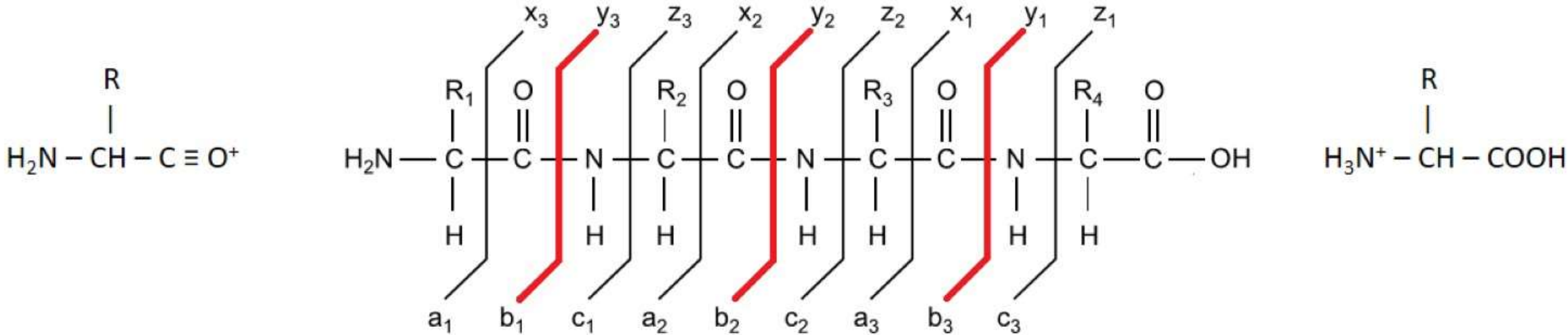
Тандемная и гибридная масс-спектрометрия (MS/MS), MSⁿ

- информация о структуре может быть получена в результате фрагментации
- после масс-анализатора, определяющего массу и сортирующего ионы, вводят стадию фрагментации (камера соударений)
- полученные фрагменты анализируются во втором масс-анализаторе
- тандемная масс-спектрометрия – одинаковые анализаторы (тройной квадруполь – QQQ)
- гибридная масс-спектрометрия – анализаторы разных принципов (Q-TOF)



Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

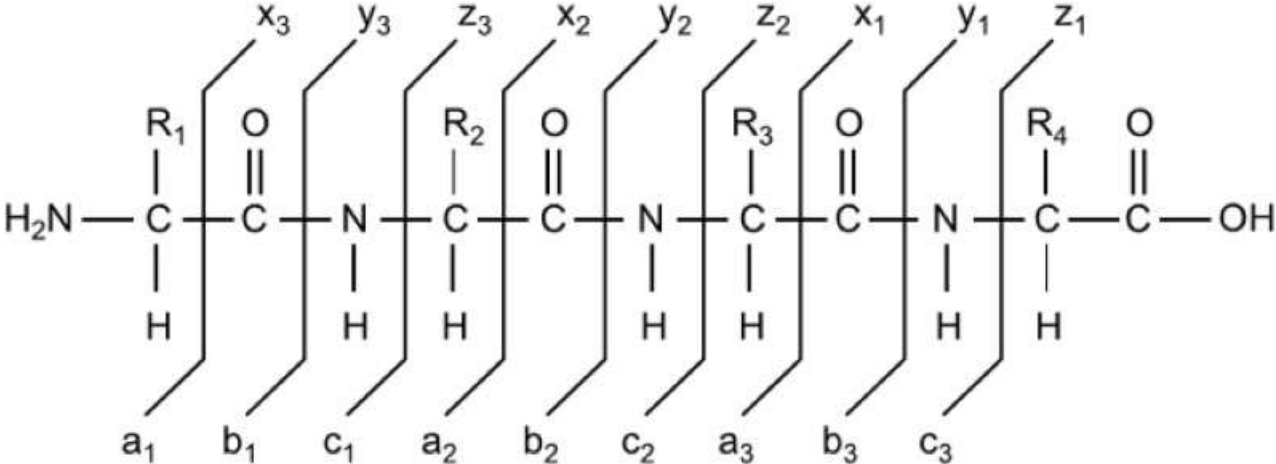
Фрагментация пептида



Разрыв пептидных связей приводит к образованию различных пар b- и y-фрагментов

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

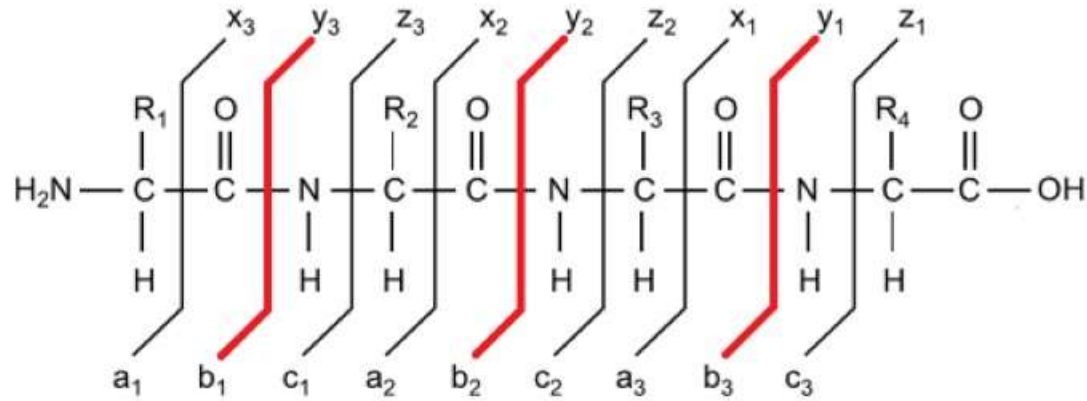
Фрагментация пептида



		+		
		┌───────────┐		
b ₁	130,05	E FTPPGQAAYQK	y ₁₁	1207,61
b ₂	277,12	EF TPPGQAAYQK	y ₁₀	1060,54
b ₃	378,17	EFT PPGQAAYQK	y ₉	959,50
b ₄	475,22	EFTP PGQAAYQK	y ₈	862,44
b ₅	572,27	EFTPP GQAAYQK	y ₇	765,39
b ₆	629,29	EFTPPG QAAYQK	y ₆	708,37
b ₇	757,35	EFTPPGQ AAYQK	y ₅	580,31
b ₈	828,39	EFTPPGQA AYQK	y ₄	509,27
b ₉	899,43	EFTPPGQAA YQK	y ₃	438,24
b ₁₀	1062,49	EFTPPGQAAY QK	y ₂	275,17
b ₁₁	1190,55	EFTPPGQAAYQ K	y ₁	147,11
		└───────────┘		
		+		

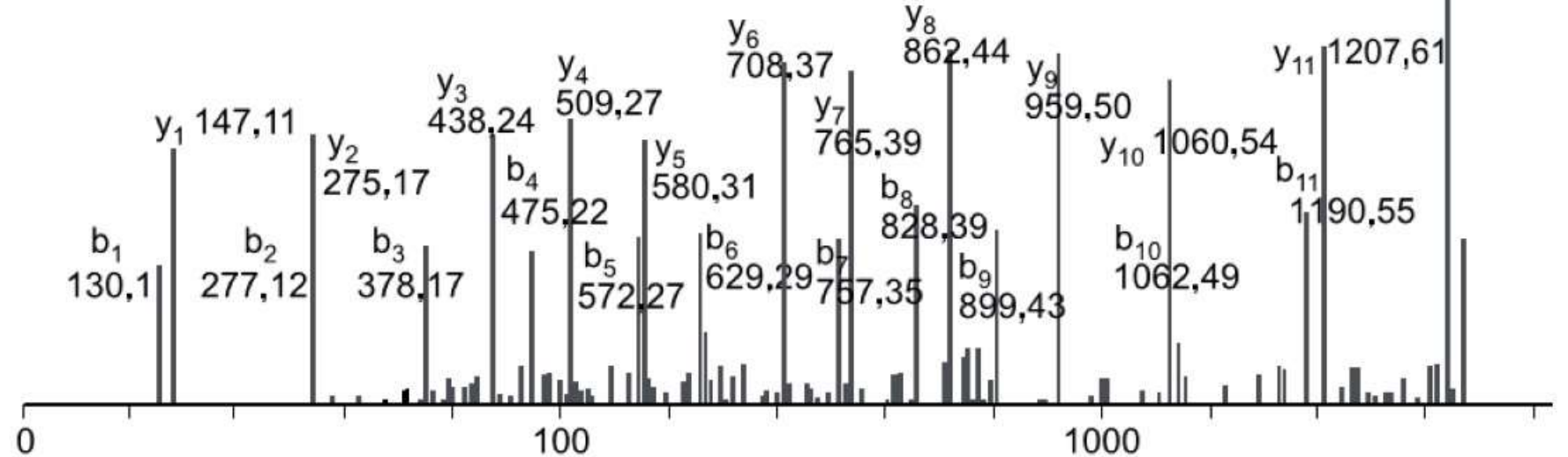
Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Фрагментация и масс-спектр пептида



b ion	m/z	Sequence	y ion	m/z
b_1	130,05	E FTTPGQAAYQK	y_{11}	1207,61
b_2	277,12	EF TPPGQAAYQK	y_{10}	1060,54
b_3	378,17	EFT PPGQAAYQK	y_9	959,50
b_4	475,22	EFTP PGQAAYQK	y_8	862,44
b_5	572,27	EFTPP GQAAYQK	y_7	765,39
b_6	629,29	EFTPPG QAAYQK	y_6	708,37
b_7	757,35	EFTPPGQ AAYQK	y_5	580,31
b_8	828,39	EFTPPGQA AYQK	y_4	509,27
b_9	899,43	EFTPPGQAA YQK	y_3	438,24
b_{10}	1062,49	EFTPPGQAAY QK	y_2	275,17
b_{11}	1190,55	EFTPPGQAAYQ K	y_1	147,11

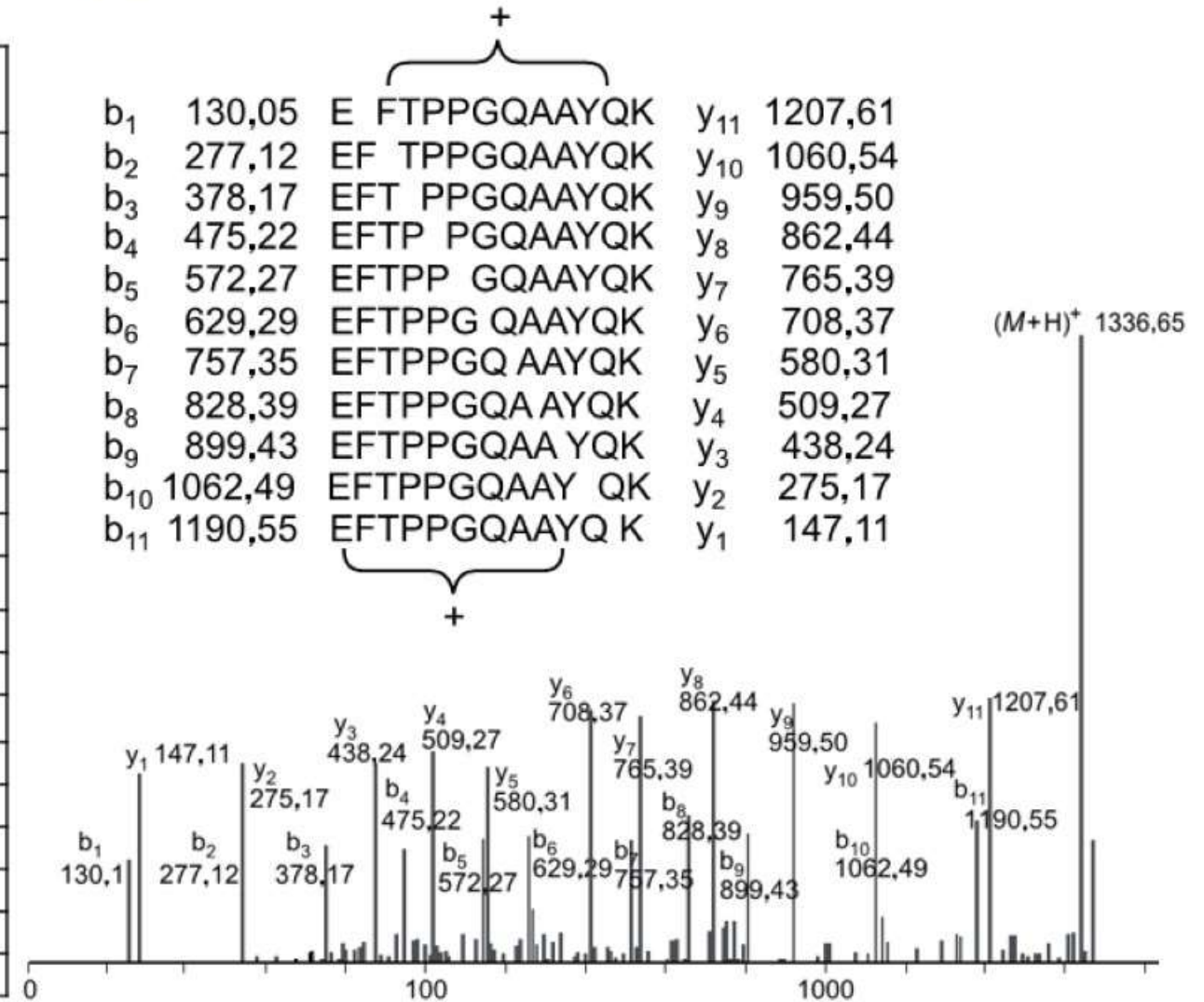
$(M+H)^+$ 1336,65



Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Фрагментация и масс-спектр пептида

Аминокислота	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Масса остатка, Да
Глицин	G	Gly	57
Аланин	A	Ala	71
Серин	S	Ser	87
Пролин	P	Pro	97
Валин	V	Val	99
Треонин	T	Thr	101
Цистеин	C	Cys	103
Лейцин	L	Leu	113
Изолейцин	I	Ile	113
Аспарагин	N	Asn	114
Аспарагиновая кислота	D	Asp	115
Глутамин	Q	Gln	128
Лизин	K	Lys	128
Глутаминовая кислота	E	Glu	129
Метионин	M	Met	131
Гистидин	H	His	137
Фенилаланин	F	Phe	147
Аргинин	R	Arg	156
Тирозин	Y	Tyr	163
Триптофан	W	Trp	186



Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков

- снизу-вверх (bottom-up)
 - пептидное картирование
 - ЖХ-МС/МС
- сверху-вниз(top-down)

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков «снизу-вверх». Пептидное картирование

- ферментативное расщепление белка
 - образуются короткие пептиды (6-15 аминокислотных остатков)
 - количество и состав фрагментов зависит от фермента
- очистка от низкомолекулярных примесей
- масс-спектрометрия
- обработка данных (Mascot)
- сравнение спектров с библиотекой (теоретический протеолиз) – «отпечатки пальцев»
- результат – в виде вероятностей (индекс достоверности)

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков «снизу-вверх». Пептидное картирование

- в ряде случаев можно анализировать простые смеси белков
- выявление мутаций (по изменению масс пептидов)
- для эффективного расщепления необходима стадия денатурации и разрушения дисульфидных мостиков
- неэффективный протеолиз – нереализованные разрывы – изменение спектра
- модифицированные аминокислоты – усложнение анализа
- программы имеют ограничение по максимальному одновременному количеству модификаций

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков «снизу-вверх». ЖХ-МС/МС

- снизу-вверх (bottom-up)
 - пептидное картирование
 - ЖХ-МС/МС
- сверху-вниз(top-down)

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков «снизу-вверх». ЖХ-МС/МС

- процесс схож с пептидным картированием
- пептиды, очищенные методом ЖХ, секвенируются МСⁿ
- часто достаточно последовательности одного из пептидов

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков «снизу-вверх». Сложности и недостатки

- изоформы
- посттрансляционные модификации
- мутации
- чаще говорит о групповой принадлежности, а не о конкретном белке

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков. Сверху-вниз (top-down)

- МСⁿ с анализом разных серий характеристических ионов
- идентификация известных белков
- секвенирование *de novo* (до 669 000 Да)
- middle-down, протеомный анализ в расширенном диапазоне (ERPA) – анализ длинных продуктов неполного протеолиза

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Идентификация белков. Сверху-вниз (top-down). Сложности

- изобарные пары
 - Leu/Ile, Hyp
 - Phe/Met_{ox}
 - Gln/Lys
- не все пептидные связи рвутся – нет полной серии характеристических ионов
- циклизация коротких пептидов

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Молекулярные массы аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однбуквенный код	Масса остатка, Да
Глицин	Gly	G	57
Аланин	Ala	A	71
Серин	Ser	S	87
Пролин	Pro	P	97
Валин	Val	V	99
Треонин	Thr	T	101
Цистеин	Cys	C	103
Лейцин	Leu	L	113
Изолейцин	Ile	I	113
Аспарагин	Asn	N	114
Аспарагиновая кислота	Asp	D	115
Глутамин	Gln	Q	128,05858
Лизин	Lys	K	128,09497
Глутаминовая кислота	Glu	E	129
Метионин	Met	M	131
Гистидин	His	H	137
Фенилаланин	Phe	F	147
Аргинин	Arg	R	156
Тирозин	Tyr	Y	163
Триптофан	Trp	W	186

Применение масс-спектрометрии. Установление структуры ВМС

Посттрансляционные модификации. Дисульфидные связи

- ферментативно (например, трипсином) расщепляют два варианта белка
 - нативный белок с интактными дисульфидными связями
 - белок, предварительно обработанный дитиотрейтолом, разрушающим дисульфидные связи
- спектры MALDI позволяют идентифицировать пептиды, связанные S-S мостиком
 - в масс-спектре фрагментов нативного белка будет присутствовать сигнал большого пептида
 - в масс-спектре фрагментов обработанного белка вместо большого пептида появляются два новых сигнала с меньшей молекулярной массой
 - $A+B = M+2$ (восстановление двух атомов серы – 2 протона)

Основные возможности масс-спектрометрии

Количественный анализ

- определение молекулярной массы с высокой точностью
- установление структуры соединений
 - секвенирование пептидов и белков
 - определение посттрансляционных модификаций белков
- **количественный анализ**
- визуализация

Основные возможности масс-спектрометрии

Количественный анализ

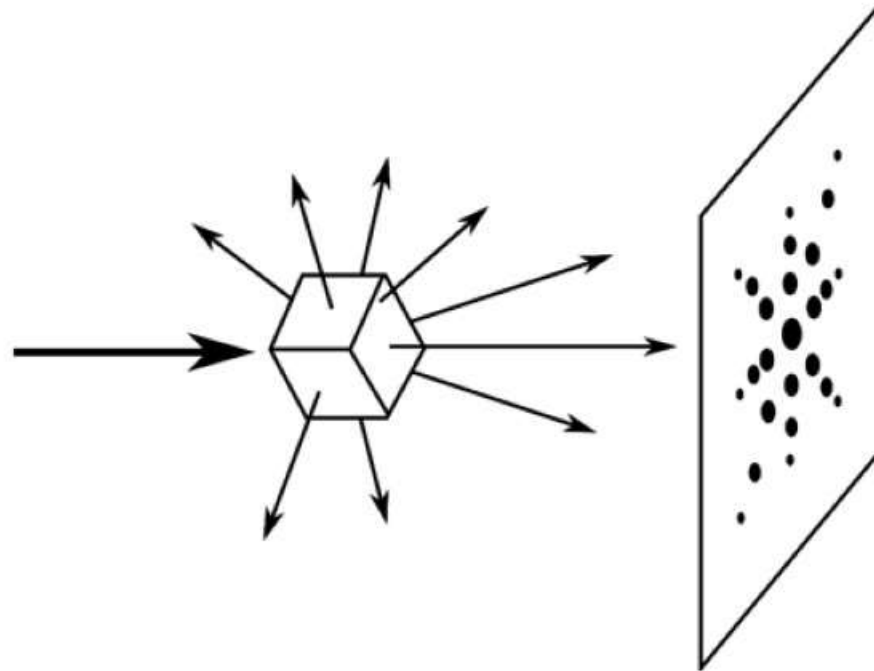
- **сравнительная протеомика** – относительные изменения количеств белка(ов)
 - безизотопные методы – сравнение интенсивностей в двух отдельно снятых спектрах
 - изотопные методы – введение изотопной метки в одну из проб – снятие одного спектра
 - in vivo
 - $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$
 - SILAC
 - in vitro
 - на цистеин-ICAT
 - на N-конец
 - на C-конец
- **точное количественное определение** – по контролю с изотопами
 - AQUA – синтетический характеристический пептид с тяжелыми изотопами
 - SISCAPA – аналогично, но с предварительной аффинной хроматографией
 - QconCAT – искусственный белок, содержащий характеристические пептиды нескольких белков
 - PSAQ – целевой рекомбинантный белок с тяжелыми изотопами

Спасибо за внимание!

Рентгеноструктурный анализ

Опыт Лауэ

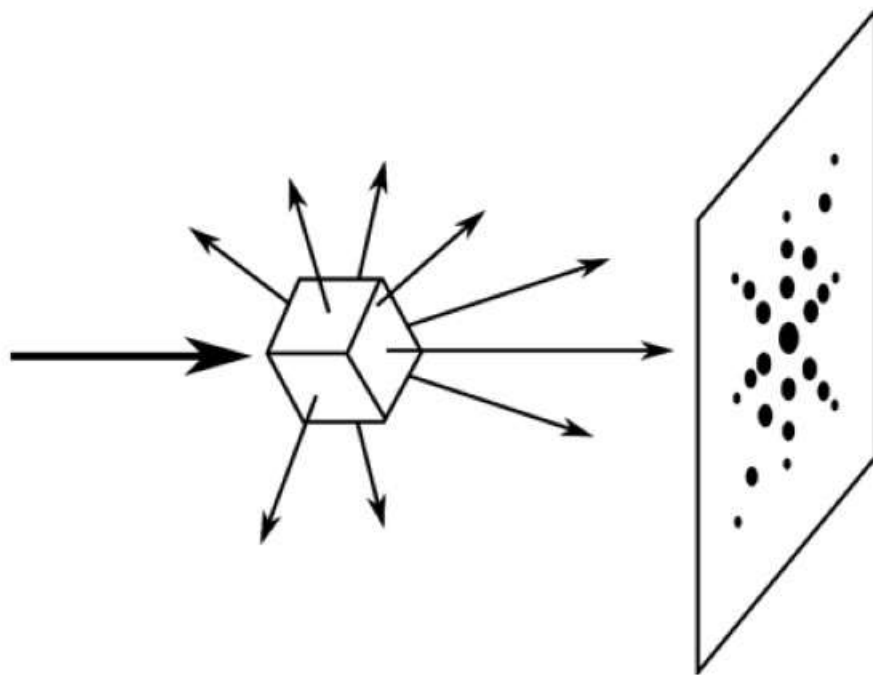
- изучал рентгеновское излучение
- доказательство волновой природы рентгеновского излучения
- кристалл в качестве дифракционной решетки



Рентгеновское излучение

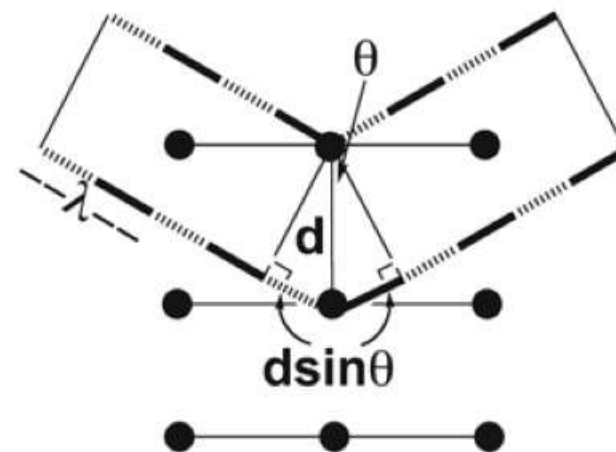
Анализ взаимодействия

- нет собирающих линз
- результат – дифракционная картина – набор пятен (рефлексов)
- перевод дифракционной картины в картину электронной плотности –
– математический аппарат (обратное преобразование Фурье)



Условие и уравнение Вульфа-Брэггов

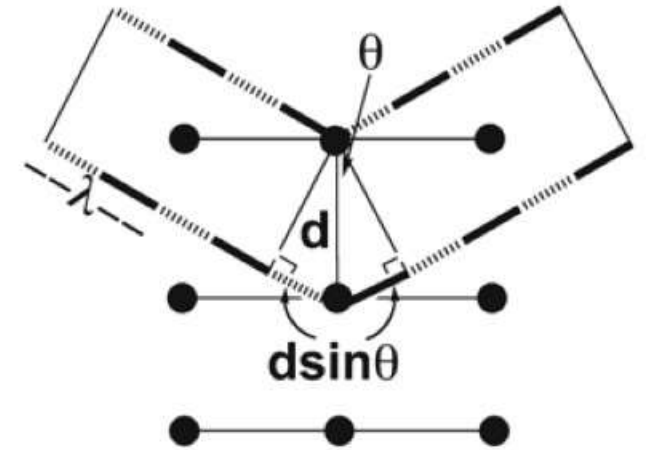
- взаимодействие рентгеновского излучения с атомами
 - упругое рассеяние
 - неупругое рассеяние
- кристалл – система параллельных атомных плоскостей
 - зависит от поворота кристалла по отношению к источнику (угла падения рентгеновских лучей)
 - характеризуется расстоянием между плоскостями (d)
- излучение от разных плоскостей имеет разность хода
 - если разность хода равна целому числу волн, то амплитуда увеличивается, максимумы интенсивности детектируются
 - интерференция – дифракционная картина
- уравнение Вульфа-Брэггов **$n\lambda = 2d \sin\theta$**



Условие и уравнение Вульфа-Брэггов

- $n\lambda = 2d \sin\theta$
- длина волны (λ)
- угол падения рентгеновских лучей/поворот кристалла (θ)
- расстояние между плоскостями (d)

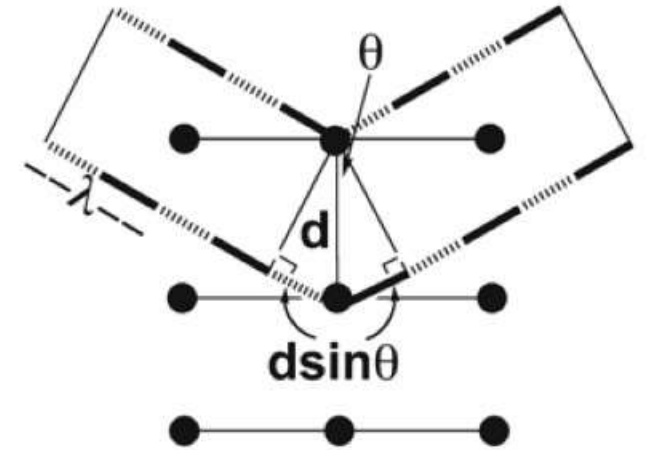
- условие не выполняется – возникает расхождение фаз
- для каждого луча в системе найдется луч в противофазе
- происходит взаимное гашение



Условие и уравнение Вульфа-Брэггов

Способы выполнения условия

- метод Лауэ – полихроматическое излучение
- метод Брэггов – вращающегося монокристалла
- метод порошка



Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- получение карт электронной плотности (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Рентгеноструктурный анализ белков

Особенности

- Брэгги – работа с простыми кристаллами неорганических солей
 - легко кристаллизуются
 - высокоупорядоченные структуры
- проблемы и особенности при работе с белками
 - получение кристаллов
 - обработка данных
 - огромное количество атомов с разной локализацией
 - десятки тысяч рефлексов
 - элементарная ячейка больших размеров
 - фазовая проблема

Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- получение карт электронной плотности (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Получение кристаллов белка

Получение кристаллов белка

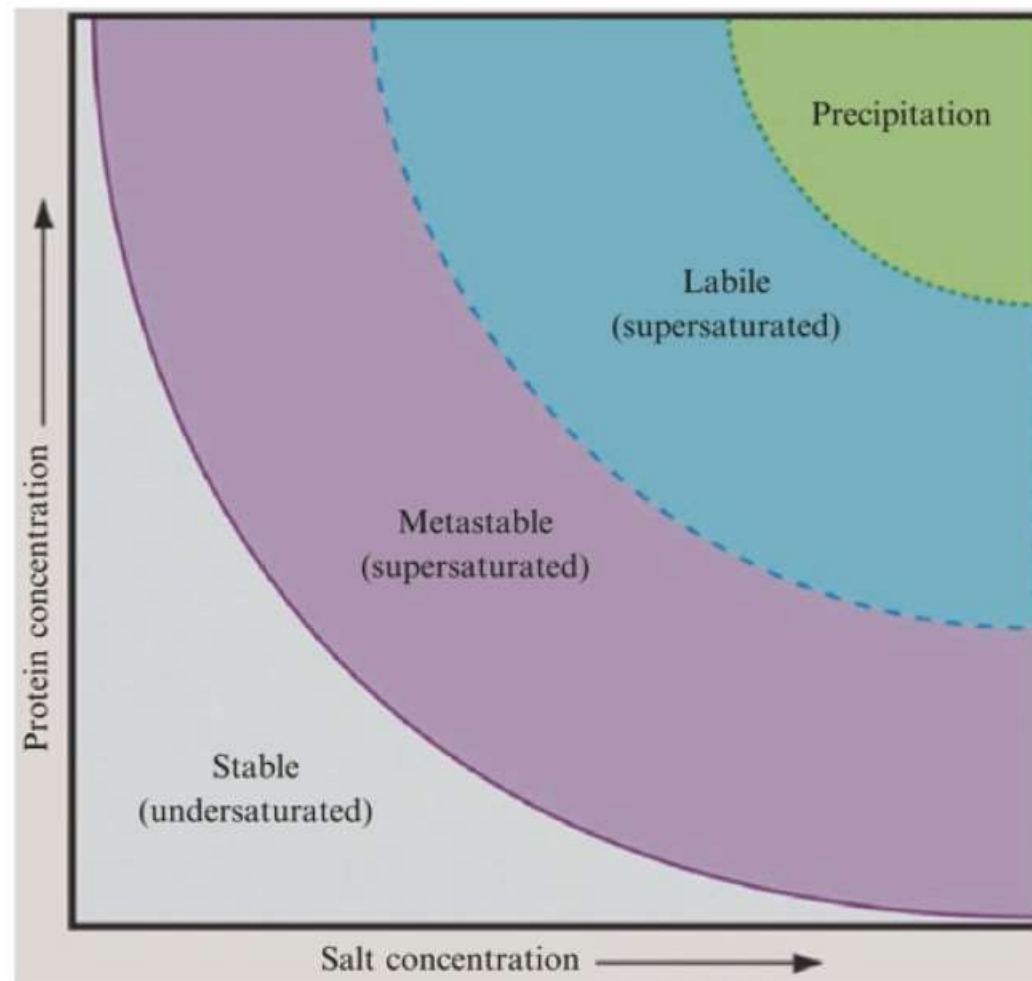
Требования к белку

- до 1990х требовался кристалл размером 0,25–1,0 мм
- современные технологии – 20-50 мкм
- концентрация раствора
 - от 2 мг/мл для крупные комплексов и вирусов
 - до более 100 мг/мл для некоторых хорошо растворимых белков
- высокоочищенный белок
- большое количество белка – для подбора условий

Получение кристаллов белка

Параметры. Фазовая диаграмма

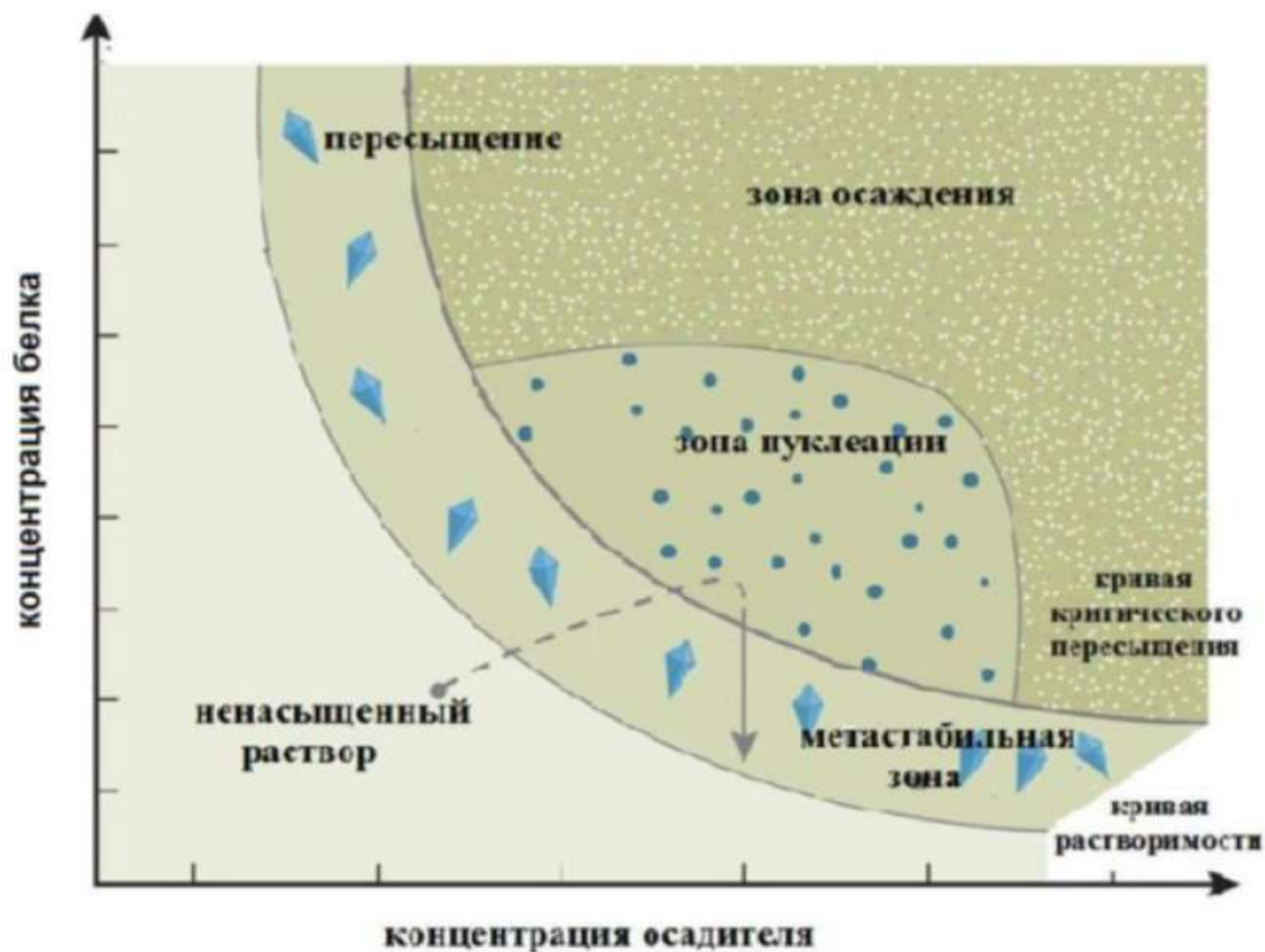
- концентрация белка (пересыщенный раствор)
- концентрация осадителя
 - неорганические (сульфат аммония)
 - органические (этанол)
 - полимеры (ПЭГ)
- pH
- температура (обычно 4 или 18°C)
- **Но! Не существует полноценной всеобъемлющей теории получения кристаллов!**



Получение кристаллов белка

Параметры. Фазовая диаграмма

- концентрация белка (пересыщенный раствор)
- концентрация осадителя
 - неорганические (сульфат аммония)
 - органические (этанол)
 - полимеры (ПЭГ)
- pH
- температура (обычно 4 или 18°C)
- **Но!** Не существует полноценной всеобъемлющей теории получения кристаллов!



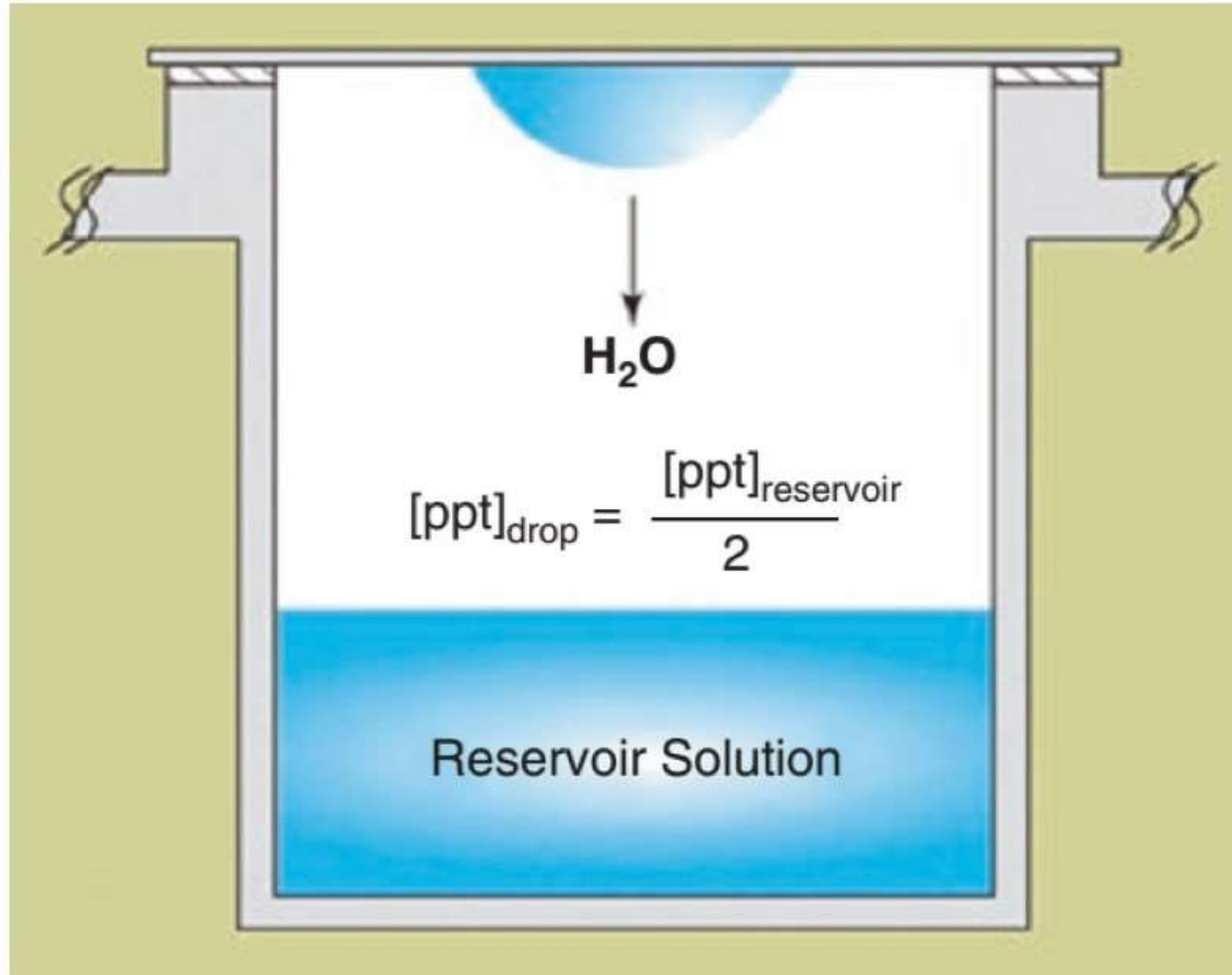
Получение кристаллов белка

Основные методы

- кристаллизация в объеме
- диффузия в парах
 - метод висячей капли
 - метод сидячей капли
- встречная диффузия
- диализ

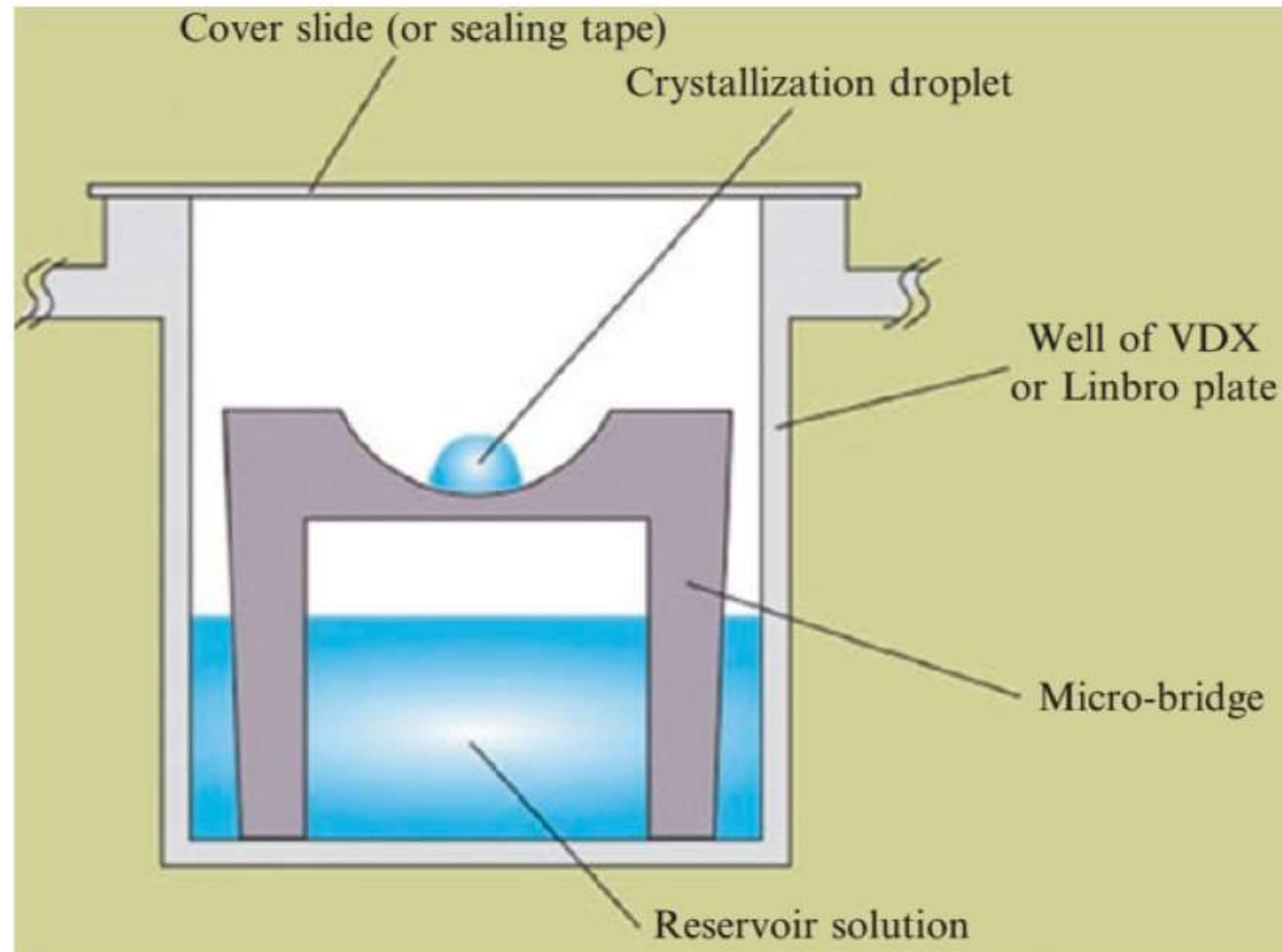
Получение кристаллов белка

Метод висячей капли



Получение кристаллов белка

Метод сидячей капли



Получение кристаллов белка

Автоматизация

- роботизированные станции
- множество лунок планшетов с разным содержанием компонентов
- объем капель – несколько нанолитров
- подбор оптимальных условий
- масштабирование для получения достаточно крупных кристаллов

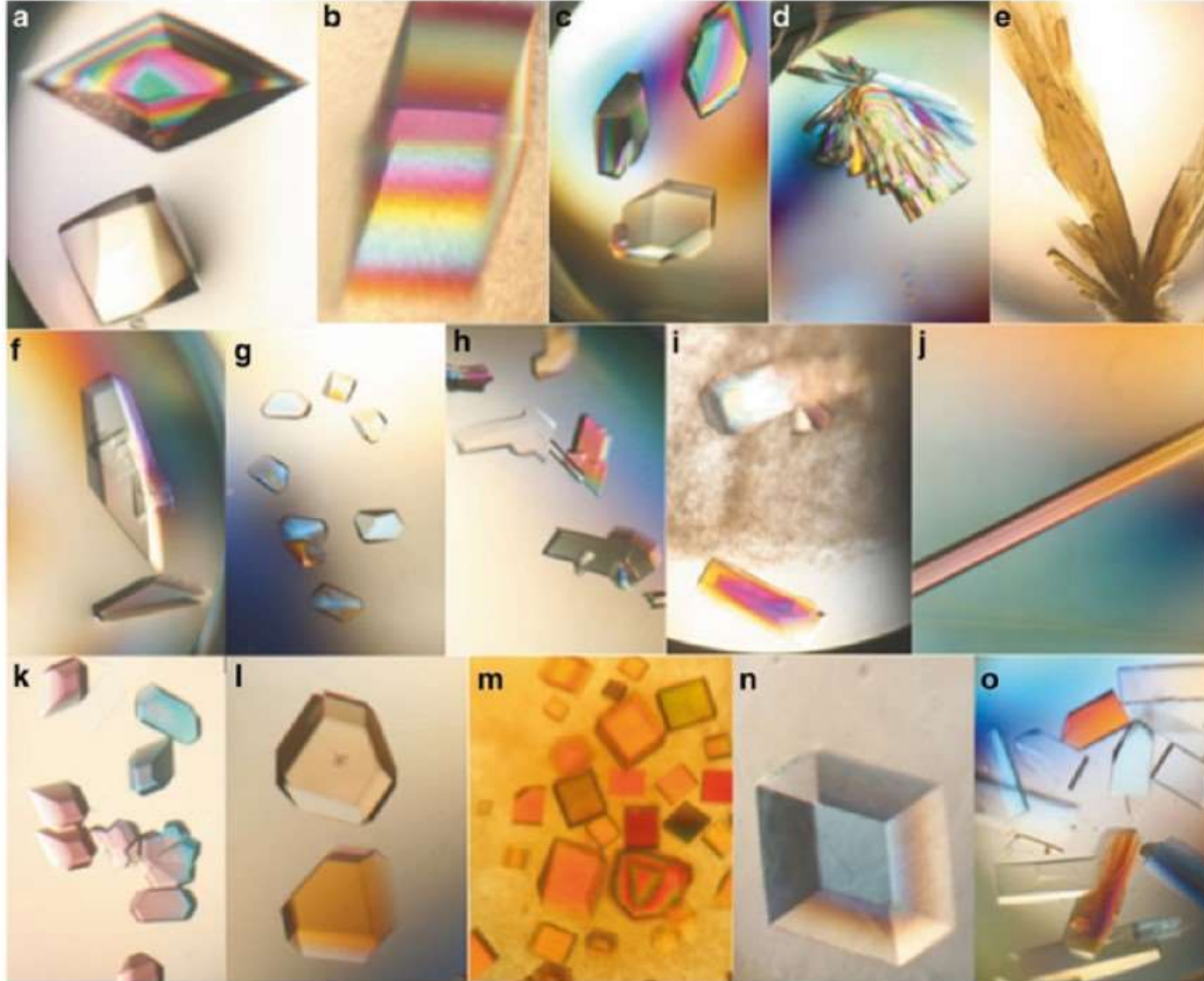
Получение кристаллов белка

Свойства белковых кристаллов

- около 50% – растворитель
 - инсулин – 25%
 - тропомиозин – 90%
- уменьшение объема элементарной ячейки с одновременным уменьшением количества включенного растворителя – повышение дифракционного разрешения
- легко разрушаются (в т.ч. при обезвоживании)
- мягкие
- диффузия в кристалле – включение малых молекул в структуру
- обычно – простая морфология
- отсутствие энантиомеров
- 65 пространственных групп (а не 250 для смесей энантиомеров)

Получение кристаллов белка

Свойства белковых кристаллов



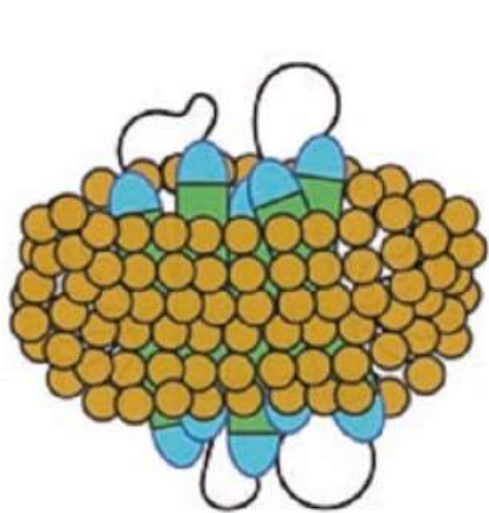
- (a) thaumatin
- (b) bovine trypsin
- (c) tetragonal lysozyme
- (d) monoclinic lysozyme
- (e) beef liver catalase
- (f–h) three different crystal forms of bovine RNase S
- (i) beta-lactoglobulin
- (j) concanavalin B
- (k) satellite tobacco mosaic virus
- (l) glucose isomerase
- (m) concanavalin A
- (n) rhombohedral canavalin
- (o) orthorhombic canavalin

Получение кристаллов белка

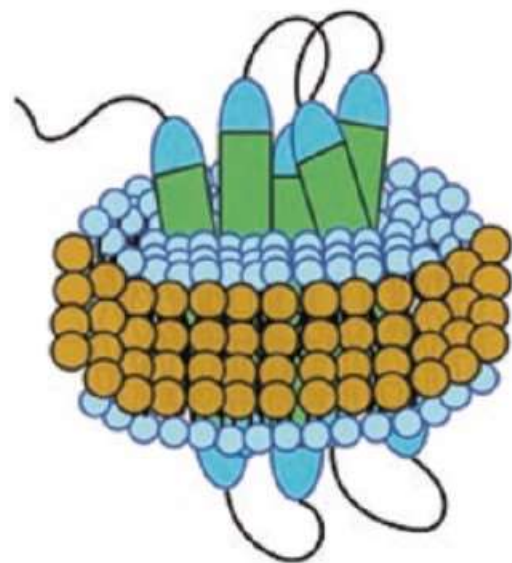
Проблема мембранных белков

- составляют около 30% человеческого протеома
- в настоящий момент являются мишенями большинства ЛП
- сложности получения в большом количестве в нативной конформации
 - выбор системы экспрессии
 - создание конструкции
- плохо растворимы – использование детергентов
- могут утрачивать нативную конформацию под действием детергентов
- добавление детергентов – многократное увеличение подбираемых условий
 - разные детергенты
 - разные концентрации

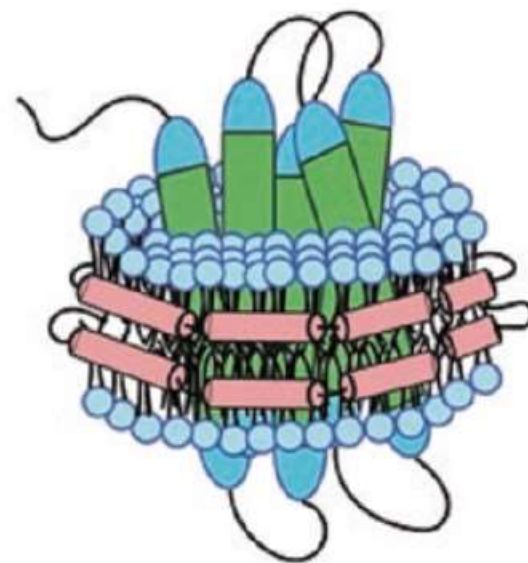
Получение кристаллов белка. Мембранные белки



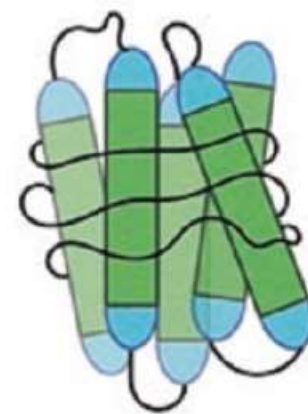
Micelle



Bicelle



Nanodisc



Amphipol

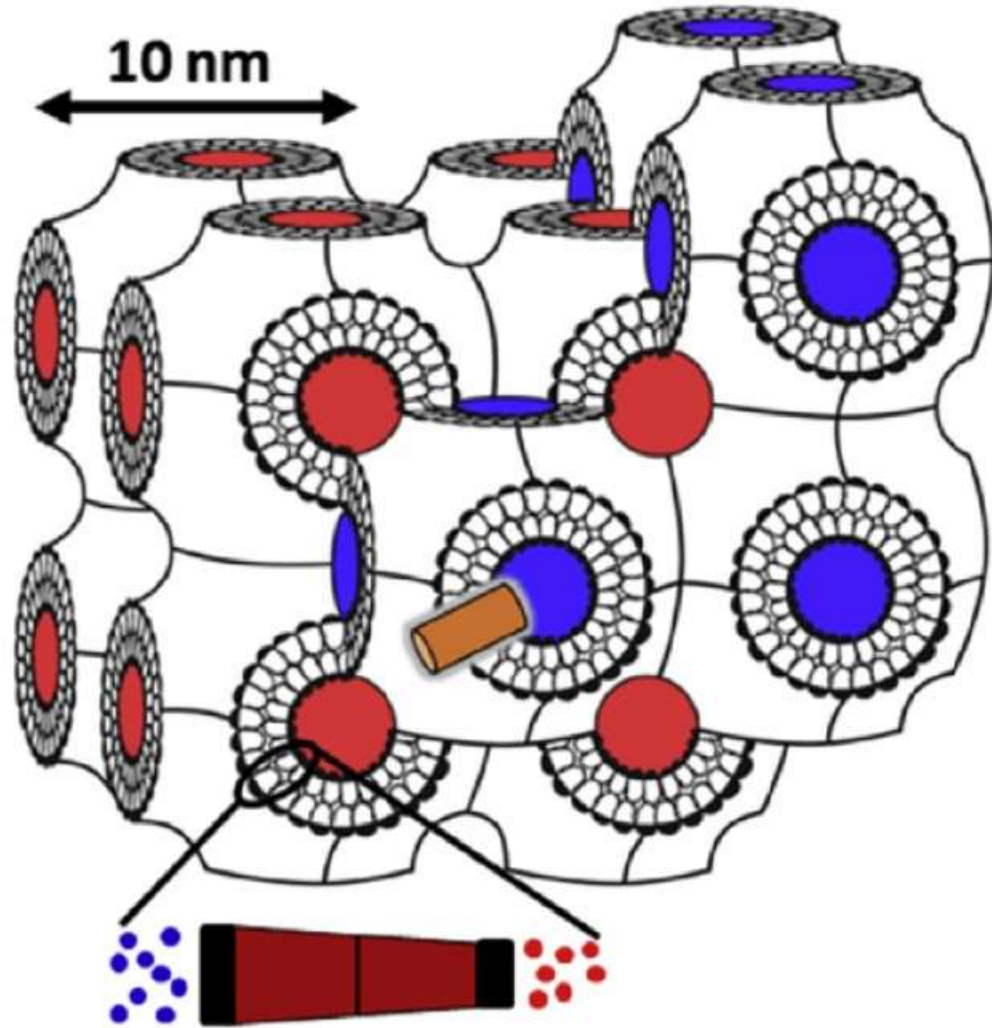
Получение кристаллов белка. Мембранные белки

Кубическая липидная фаза

- E.M. Landau, J.P. Rosenbusch. [Lipidic cubic phases](#): a novel concept for the crystallization of membrane proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(25):14532-5. doi: 10.1073/pnas.93.25.14532
- «Quasisolid lipidic cubic phases»
- «мембранная система, состоящая из липидов, воды и белков в соответствующих пропорциях, образует структурированный, прозрачный и сложный [трехмерный липидный массив](#), пронизанный системой сообщающихся водных [каналов](#)»
- кристаллизация в липидной мезофазе ([in meso](#))

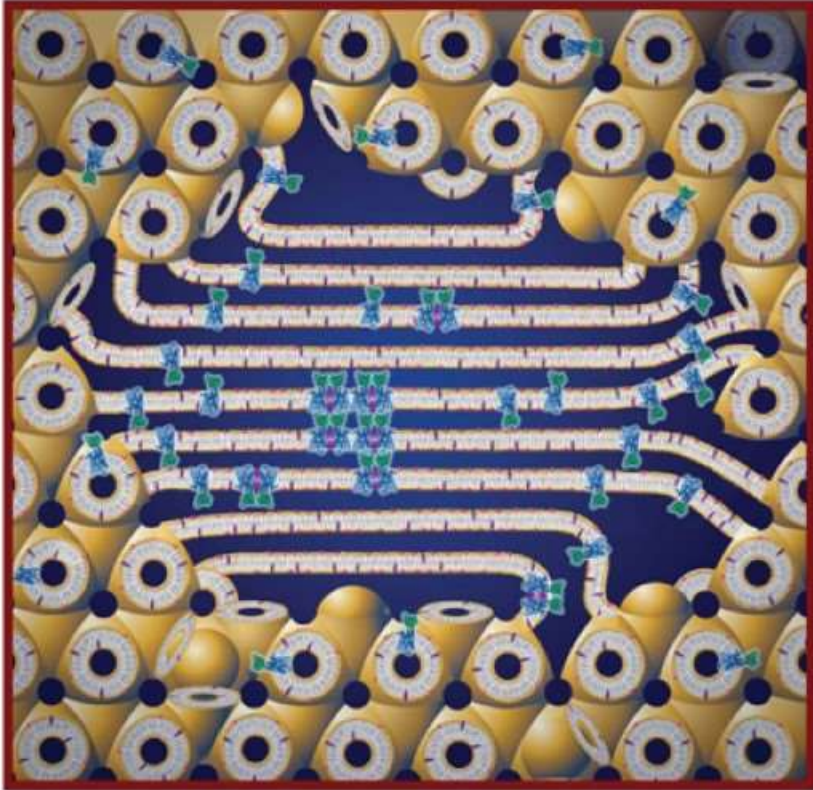
Получение кристаллов белка. Мембранные белки

Кубическая липидная фаза



Получение кристаллов белка. Мембранные белки

Кубическая липидная фаза



Обработка данных

Рентгеноструктурный анализ белков

Особенности

- Брэгги – работа с простыми кристаллами неорганических солей
 - легко кристаллизуются
 - высокоупорядоченные структуры
- проблемы и особенности при работе с белками
 - получение кристаллов
 - обработка данных
 - огромное количество атомов с разной локализацией
 - десятки тысяч рефлексов
 - элементарная ячейка больших размеров
 - фазовая проблема

Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- получение карт электронной плотности (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- **получение карт электронной плотности** (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Свойства белковых кристаллов

Элементарная ячейка

- кристалл состоит из **повторяющихся единиц**
- **минимальная по размерам** повторяющаяся единица кристалла, сохраняющая **все его свойства**, называется **элементарной ячейкой**
- правильный кристалл
 - элементарные ячейки **абсолютно идентичны**
 - расположены в пространстве **строго регулярно**
- в белковых кристаллах элементарная ячейка может состоять из одной, двух или нескольких белковых молекул, расположенных определенным образом
- простейшая элементарная ячейка – параллелепипед
- характеристики – длина граней (десятки ангстрем) и углы между ними
 - ортогональные (углы 90°)
 - неортогональные
- закон рациональных индексов: плоские грани кристалла всегда параллельны плоскостям решетки

Дифракционная картина

Анализ

- количество рефлексов – десятки тысяч
- прямая задача – по структуре дать соответствующую дифракционную картину
- анализ дифракционной картины – обратная задача
- обратное преобразование Фурье
- интенсивность – квадрат амплитуды
- интенсивность зависит от размера атома
- информация о фазах не детектируется – **фазовая проблема**

Дифракционная картина. Фазовая проблема

Способы решения

- прямые методы – математические
 - карты Паттерсона
- метод множественных изоморфных замещений
- метод аномальной дисперсии
- метод молекулярного замещения

Дифракционная картина. Фазовая проблема

Изоморфное замещение

- Макс Перуц – структура гемоглобина
- ввел в структуру ртуть
- тяжелые атомы – большое количество электронов – выше интенсивность
- метод множественных изоморфных замещений
- подразумевает отсутствие влияния введенных атомов на структуру белка

Дифракционная картина. Фазовая проблема

Способы решения

- прямые методы – математические
 - карты Паттерсона
- метод множественных изоморфных замещений
- метод аномальной дисперсии
- метод молекулярного замещения

Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- получение карт электронной плотности (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Рентгеноструктурный анализ белков

Этапы. Получение карт электронной плотности

- получение большого количества высокоочищенного белка
- получение монокристаллов белка
- получение дифракционной картины
- получение карт электронной плотности (анализ дифракционной картины)
 - определение пространственной группы
 - определение примерного положения нескольких атомов
 - определение фазы
 - появление информации о положении других атомов
 - уточнение фаз и фурье-уточнение
 - уточнение карт электронной плотности
- вписывание в карту электронной плотности молекул аминокислот

Рентгеноструктурный анализ белков

Источники излучения

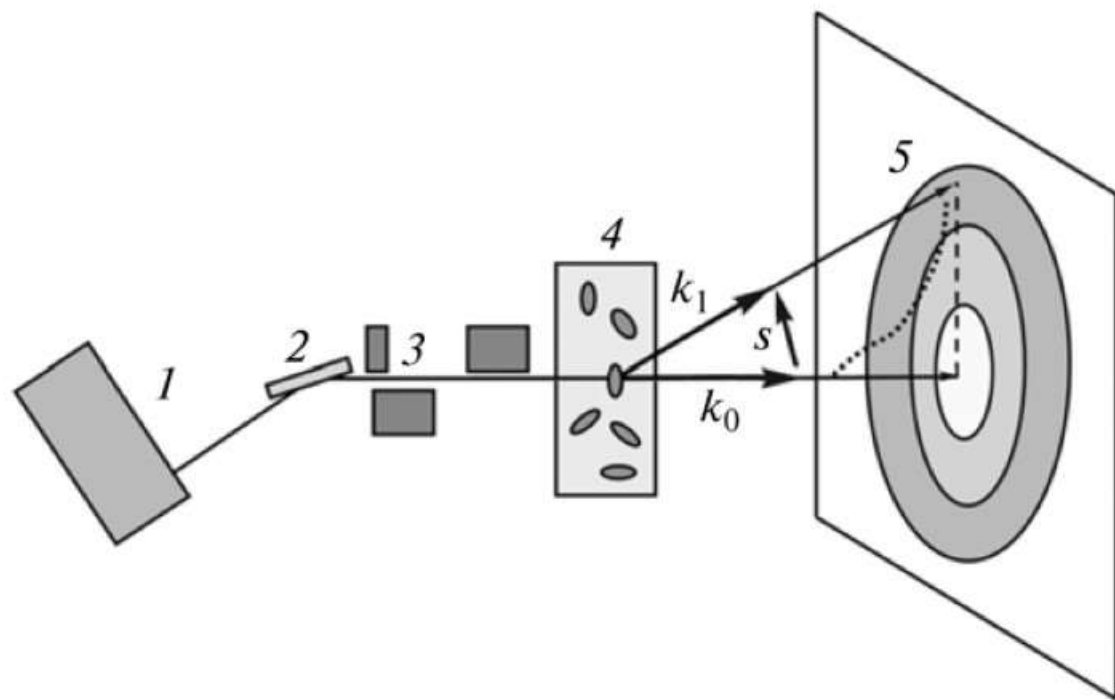
- рентгеновская трубка
 - фиксированная длина волны (характеристическая)
- синхротрон
 - широкий спектр монохромных излучений
 - высокая яркость
 - высокое разрешение
- рентгеновские лазеры на свободных электронах

Спасибо за внимание!

Рентгеновское малоугловое
рассеяние (МУР)
Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

Малоугловое рассеяние (МУР)

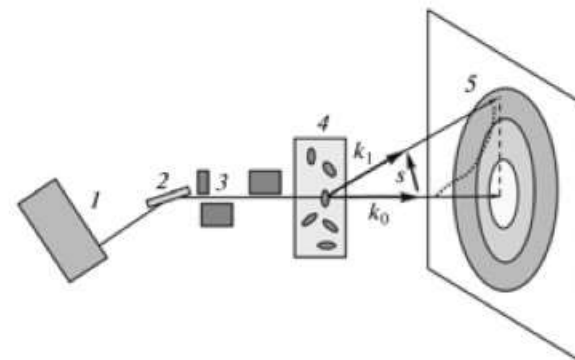
Схема получения картины рассеяния



- 1 – источник излучения
- 2 – монохроматор
- 3 – коллиматор
- 4 – образец
- 5 – детектор
- S – вектор рассеяния
- k_0 – волновой вектор первичного пучка ($2\pi/\lambda$)
- k_1 – волновой вектор рассеянного излучения
- точечная линия – профиль интенсивности МУР

История и особенности метода

- 1938 г. – А. Гинье (Guinier A.// Ann. Phys. 1939 V. 12. P. 161)
 - центральная часть дифракционной картины содержит довольно сильное рассеяние
 - при наличии в веществе **высокодисперсных** зерен с **размерами в десятки нанометров** (наночастиц)
- **важнейшая особенность** МУР – возможность анализа внутреннего строения **разупорядоченных систем**
- **больше размер** рассеивающего объекта – в **меньшем угловом интервале** сосредоточено **рассеянное излучение** (номинальное **разрешение d** , отвечающее переносу момента s , $d = 2\pi/s$)
- рассеяние на малые углы (**меньше нескольких градусов**) несет информацию о “крупномасштабных” (по отношению к длине волны излучения λ) рассеивающих объектах
- **исследование** веществ самой разнообразной структуры, содержащих **неоднородности** размерами в диапазоне **1–10³ нм**
- структурная информация с **разрешением до 1-2 нм**
- часто – **единственный способ** получения **прямой структурной информации** о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности
- получение данных о структуре БММ в растворе – условия, близкие к естественным
- **неоднородные системы**
 - **монодисперсные** (раствор одного белка)
 - **полидисперсные** (смесь БММ)



История и особенности метода

- **техническая сложность:** регистрация достаточно **слабого рассеяния** вблизи **мощного первичного пучка** излучения
- А. Гинье сконструировал специальную камеру с низким собственным уровнем фона
- 1950–60е – исследование БММ методом рентгеновского МУР в растворе
 - альтернатива белковой кристаллографии в отсутствие кристаллов
 - данные МУР позволяют **напрямую** определять параметры частиц
 - средний размер
 - массу
 - анизометрию
- 1970–80е
 - появление и развитие синхротронов – решение проблемы слабого рассеяния
 - при определенных ограничениях удается создавать трехмерные модели
 - в случае БММ – не способны эффективно конкурировать с альтернативными методами структурной биологии
- конец 1990х
 - доступность источников СИ
 - новые подходы к интерпретации данных
 - компьютерные программы открытого доступа
 - анализ моно- и полидисперсных систем

История и особенности метода Синхротроны в исследованиях МУР

- все важнейшие синхротроны в мире имеют одну или несколько станций
 - целиком выделенных для МУР
 - совместно с кристаллографией или дифракцией на волокнах
- **огромная яркость** пучка – радиационное **повреждение** образца
 - РСА – охлаждение кристалла
 - исследования МУР растворов – выше точки замерзания воды
 - в раствор добавляют **поглотители свободных радикалов**
 - и/или выполняют измерения в ячейках, где **образец протекает через пучок** (несколько увеличивает необходимое количество материала)
- **размер пучка** на современных синхротронных станциях
 - **десятки микрометров**
 - субмикронные размеры – на специализированных установках
- **объем** образца – **10-50 μl**
- **длительность** МУР-эксперимента зависит от поколения станции СИ
 - порядка **минуты** (для станций на поворотных магнитах)
 - доли **секунды** (для ондуляторных установок)
- рентгеновские камеры – минуты и даже часы (на установках с точечной геометрией пучка)

История и особенности метода РСА и МУР

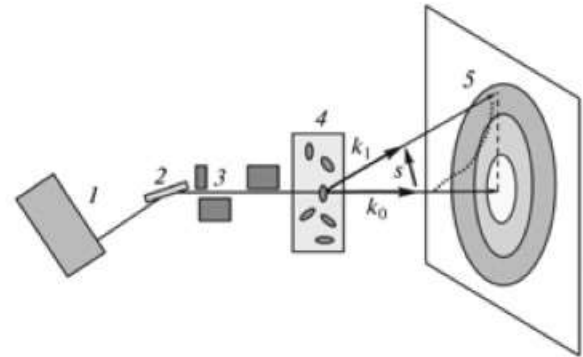
- **дифракция на кристаллах** (система упорядоченных молекул)
 - трехмерная картина рентгеновской интенсивности $I(\mathbf{s})$
 - набор рефлексов вдоль определенных направлений вектора рассеяния \mathbf{s}
 - рефлексы можно измерять до высокого разрешения
 - восстановление трехмерной структуры при атомном разрешении (после решения фазовой проблемы)
- **разупорядоченные системы**
 - не дают рефлексов (как правило)
 - измеряемая картина рассеяния
 - достаточно гладкая, часто изотропная функция $I(\mathbf{s})$
 - $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ – модуль вектора рассеяния или перенос момента
 - 2θ – угол рассеяния
 - усредненная по ориентациям – для монодисперсных систем
 - усредненная по ориентациям и по размерам – для полидисперсных систем
 - решение обратной задачи рассеяния – **однозначное** восстановление **трехмерной структуры** объекта
– в **общем случае** просто **невозможно**
 - создание трехмерной модели требует дополнительной информации и подходов

Основы анализа

Традиционные методы в анализе данных МУР

Основы анализа традиционными методами

- анализ рассеяния разупорядоченными системами – **концепция “матрица–частица”**
 - **рассеивающий объект** можно представить как **совокупность частиц**, внедренных в **матрицу**
 - рассеивающая способность частиц отличается от матрицы (**контрастны** по отношению к матрице)
- **рассеивающая способность** частиц для рентгеновских лучей **описывается распределением электронной плотности $\rho(r)$**
- матрица имеет постоянную электронную плотность ρ_s
- эффективная рассеивающая способность частицы представляется разницей $\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_s$
- амплитуда упругого рассеяния от одной частицы в матрице определяется преобразованием Фурье
- $A(s) = \mathfrak{F}[\rho(r)] = \int_V \Delta\rho(r)\exp(isr)dr$
- где вектор рассеяния s – разность между волновыми векторами рассеянной k_1 и падающей k_0 волн
- измеряется не амплитуда, а **интенсивность рассеяния $I(s) = A(s)A^*(s)$** ,
 - пропорциональная числу фотонов, рассеянных в направлении s



Инварианты и моделирование монодисперсных систем

- при исследовании **разбавленных растворов** эффектами **межчастичной интерференции** можно **пренебречь**
- **кривая рентгеновского МУР** после вычета рассеяния матрицей (растворителем) отвечает **рассеянию одной частицей**, усредненному по всем ориентациям
- $I(s) = \langle I(s) \rangle_{\Omega}$, где Ω – телесный угол в обратном пространстве
- кривая изотропного рассеяния позволяет без привлечения априорной информации определять некоторые интегральные характеристики исследуемых частиц (**инварианты**)

Инварианты и моделирование монодисперсных систем

- **инварианты** – структурные характеристики систем, которые могут быть в явном виде выражены через интенсивность МУР
- вычисление **не требует никакой априорной информации** о частицах в системе (при **правильно проведенном** эксперименте)
- классический параметр (определен А. Гинье) – радиус инерции частицы R_g – характеризует ее **средний размер**
 - может быть найден по начальному участку кривой рассеяния (для малых значений s) с помощью **формулы Гинье**
 - $I(s) = I(0)\exp(-s^2R_g^2/3)$
 - по наклону прямолинейного участка зависимости $\ln I(s)$ от s^2 (**графика Гинье**)
- интенсивность рассеяния в нулевой угол $I(0)$
 - находится путем линейной аппроксимации
 - пропорциональна квадрату **молекулярной массы**
- геометрические характеристики частиц – из кривой рассеяния в **относительных** единицах
- расчет масс требует **абсолютных** значений

Инварианты и моделирование монодисперсных систем

- объем V и площадь поверхности S вычисляются с использованием нормированного инварианта Порода

- $Q_0 = \int_0^{\infty} i(s)s^2 ds$

- $i(s) = I(s)/I(0)$

- $V = \frac{2\pi^2}{Q_0}$

- $\frac{S}{V} = \frac{\pi}{Q_0} \lim_{s \rightarrow \infty} [s^4 i(s)]$

- $s \rightarrow \infty$

- Фурье-преобразование интенсивности рассеяния позволяет определить функцию распределения по расстояниям

- $p(r) = \frac{r^2}{\pi r^2} \int_0^{\infty} s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} dr$

- позволяет оценивать

- анизометрию частицы
- максимальный размер D_{\max} (из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\max}$)

Полидисперсные системы и смеси

- полидисперсные – системы неидентичных частиц
- два наиболее важных случая
 - **несколько** различных типов **невзаимодействующих** частиц с произвольной структурой
 - частицы **схожей формы** и **различные по размерами**
- интенсивность рассеяния от смеси **первого типа** может быть записана в виде линейной комбинации:
 - $I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s)$
 - $v_k > 0$ и $I_k(s)$ – объемная доля и интенсивность рассеяния от k-го типа частиц (компонент) соответственно, а K – число компонентов
 - на основе только МУР смеси, нельзя реконструировать структуры отдельных компонентов
 - количество информации, которая может быть извлечена, зависит от дополнительной информации
 - если известны число компонентов и их кривые рассеяния – можно определить объем фракций v_k методом неотрицательных линейных наименьших квадратов
 - примеры систем:
 - растворы олигомерных белков, процессы сборки самоорганизующихся объектов, фазовые переходы в микроэмульсиях

Полидисперсные системы и смеси

- полидисперсные – системы неидентичных частиц
- два наиболее важных случая
 - **несколько** различных типов **невзаимодействующих частиц** с произвольной структурой
 - частицы **схожей формы** и **различные по размерами**
- системы **второго типа** описывают объемной функцией распределения
 - $D(R) = N(R)V(R)$
 - где $N(R)$ – число частиц с характерным размером R в системе, а $V(R)$ – объем одной частицы данного размера
 - интенсивность рассеяния определяется интегралом
 - $I(s) = (\Delta\rho)^2 \int_{R_{min}}^{R_{max}} D(R)V(R)i_0(sR)dR,$
 - где $i_0(sR)$ – “форм-фактор” – нормированная интенсивность рассеяния частицей ($i_0(0) = 1$), R_{min} и R_{max} – минимальный и максимальный размер частиц соответственно
 - **БММ редко дают такой тип полидисперсности**
 - часто применяется к мицеллам, микроэмульсиям, блоксополимерам, металлическим наночастицам и др.
 - в большинстве практических случаев предполагается, что форм-фактор частицы известен (в частности, для изотропной системы частицы обычно можно считать сферическими)
 - объемную функцию распределения функций $D(R)$ можно определить с помощью косвенного преобразования

Традиционные методы анализа

- **сферическое усреднение** кривой интенсивности рассеяния – **значительная потеря информации**, содержащейся в дифракционных данных
- крайне высокая трудоемкость интерпретации одномерных данных рассеяния с использованием трехмерных моделей
- возможности традиционных методов для монодисперсных систем
 - расчет **инвариантов**
 - **простое моделирование** путем аппроксимирования формы частицы трехпараметрическими геометрическими телами
- для построения более **сложных моделей** применяли **метод проб и ошибок**
 - использование **априорной информации** о строении частиц, полученной другими методами (электронная микроскопия, различные физико-химические измерения)
 - строился **ряд предполагаемых моделей** исследуемых частиц
 - проводилось сравнение рассеяния на них с экспериментальной кривой
 - подбор модели, наилучшим образом отвечающую как данным рассеяния, так и априорной информации
 - **нет единственного решения**

Современные методы

Современные методы структурной интерпретации данных малоуглового рассеяния

- основные современные методы
 - метод сферических гармоник – решение обратной задачи рассеяния
 - прямое восстановление формы
 - метод молекулярной тектоники
- возможности
 - определение 3D-структур частиц в монодисперсных (и умеренно полидисперсных) системах с разрешением до 1 нм
 - анализ полидисперсных смесей – возможность количественного описания сложных объектов и процессов

Современные методы Сферические гармоники

- 1970е – Х. Штурман
- использование **мультипольного разложения** для **сферического усреднения** дифракционной картины
 - процесс упрощается
- эффективны для параметризации структуры частицы в прямом пространстве
- можно параметризовать
 - распределение электронной плотности внутри частицы
 - и ее форму
 - предполагается, что частица однородна
 - каждому угловому направлению ставится в соответствие расстояние от центра до границы частицы
- на основе математического аппарата сферических гармоник созданы
 - ряд высокоэффективных алгоритмов
 - программы моделирования формы и строения низкого разрешения наночастиц в монодисперсных системах

Современные методы Сферические гармоники

- рассеяние отдельно взятой частицей, состоящей из N атомов
 - атомные координаты $r_k = (r_k, \omega_k) = (r_k, \theta_k, \varphi_k)$, $k = 1, 2, \dots, N$
 - соответствующие атомные форм-факторы $f_k(s)$
 - трехмерная амплитуда рассеяния: $A(s) = \sum_{k=1}^N f_k(s) \exp(isr_k)$
- функцию $\exp(isr)$ можно представить в виде: $A(s) = 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l j_l(sr) Y_{lm}^*(\omega) Y_{lm}(\Omega)$
 - $j_l(sr)$ – сферические функции Бесселя
 - $Y_{lm}(\Omega)$ – сферические гармоники
- амплитуда рассеяния записывается в виде $A(s) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{lm}(s) Y_{lm}(\Omega)$,
- функции $A_{lm}(s)$ называют парциальными амплитудами:
- $A(s) = 4\pi i^l \sum_{k=1}^N f_k(s) j_l(sr_k) Y_{lm}^*(\omega_k)$
- возведение в квадрат и сферическое усреднение по Ω – все перекрестные члены исчезают (благодаря ортогональным свойствам сферических гармоник)
- результат – простое выражению для интенсивности МУР
- $I(s) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l |A_{lm}(s)|^2$
- L – величина обрыва ряда, определяет разрешение представления структуры частицы

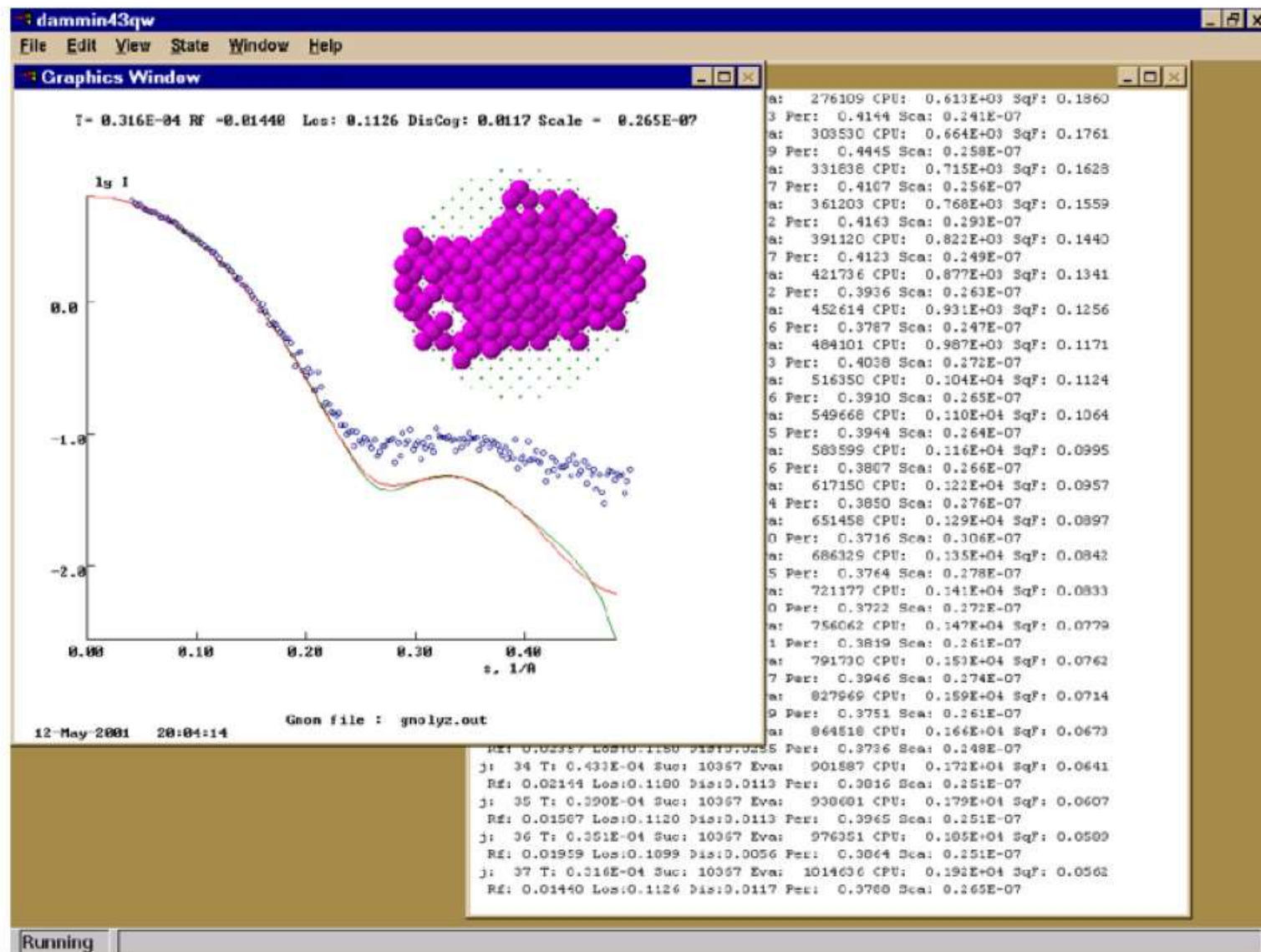
Современные методы структурной интерпретации данных малоуглового рассеяния

- основные современные методы
 - метод сферических гармоник – решение обратной задачи рассеяния
 - прямое восстановление формы
 - метод молекулярной тектоники
- возможности
 - определение 3D-структур частиц в монодисперсных (и умеренно полидисперсных) системах с разрешением до 1 нм
 - анализ полидисперсных смесей – возможность количественного описания сложных объектов и процессов

Современные методы Прямое восстановления формы

- конец 1990х – модель конечных объемных элементов
- поиск трехмерной формы с использованием эвристических методик глобальной минимизации
 - моделирование отжига
 - генетический алгоритм
- область поиска – например, сфера с диаметром, равным максимальному размеру частицы
- заполняется N плотноупакованными шариками
- каждый шарик индексируется X_j
 - $X_j = 0$ – растворитель
 - $X_j = 1$ – частица
- строится модель, удовлетворяющая данным МУР
- программы (свободный доступ)
 - DALAI_GA
 - DAMMIN
 - DAMMIF
 - GASBOR

Современные методы Прямое восстановления формы



Современные методы структурной интерпретации данных малоуглового рассеяния

- основные современные методы
 - метод сферических гармоник – решение обратной задачи рассеяния
 - прямое восстановление формы
 - метод молекулярной тектоники
- возможности
 - определение 3D-структур частиц в монодисперсных (и умеренно полидисперсных) системах с разрешением до 1 нм
 - анализ полидисперсных смесей – возможность количественного описания сложных объектов и процессов

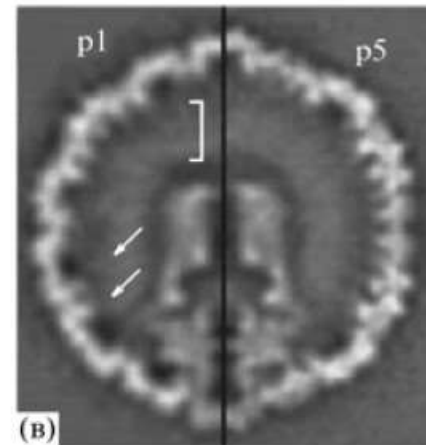
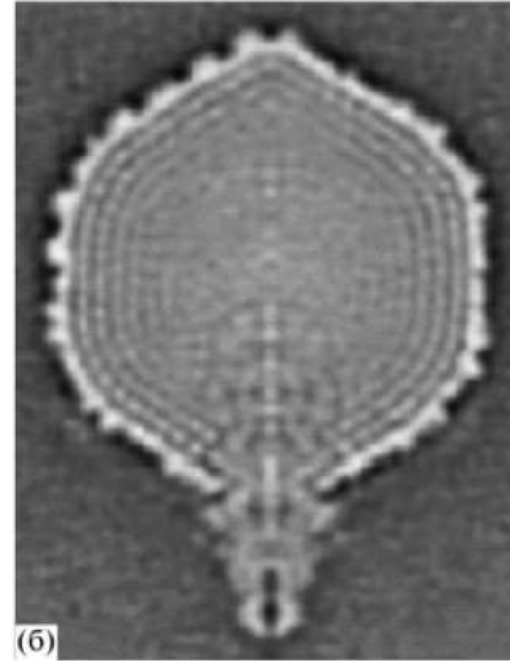
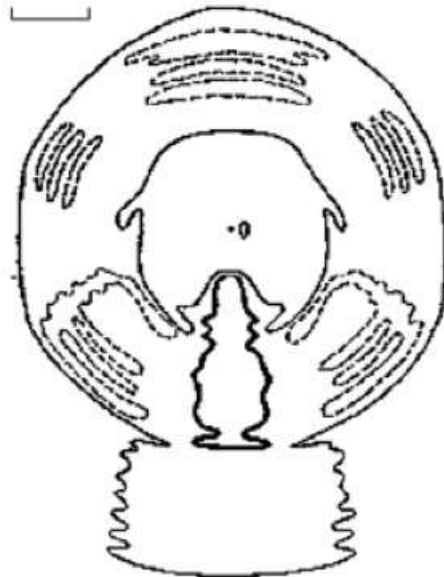
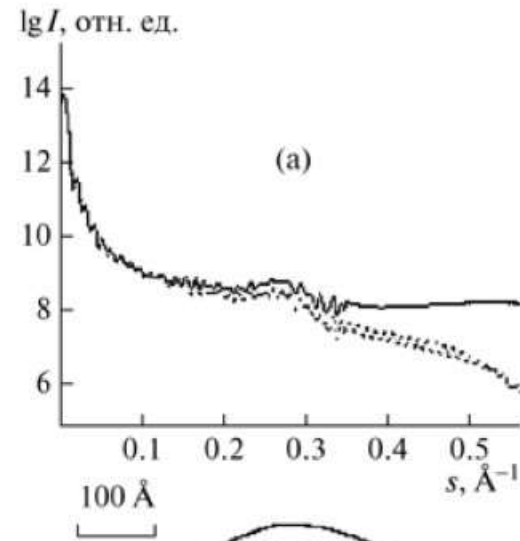
Современные методы

Метод молекулярной тектоники

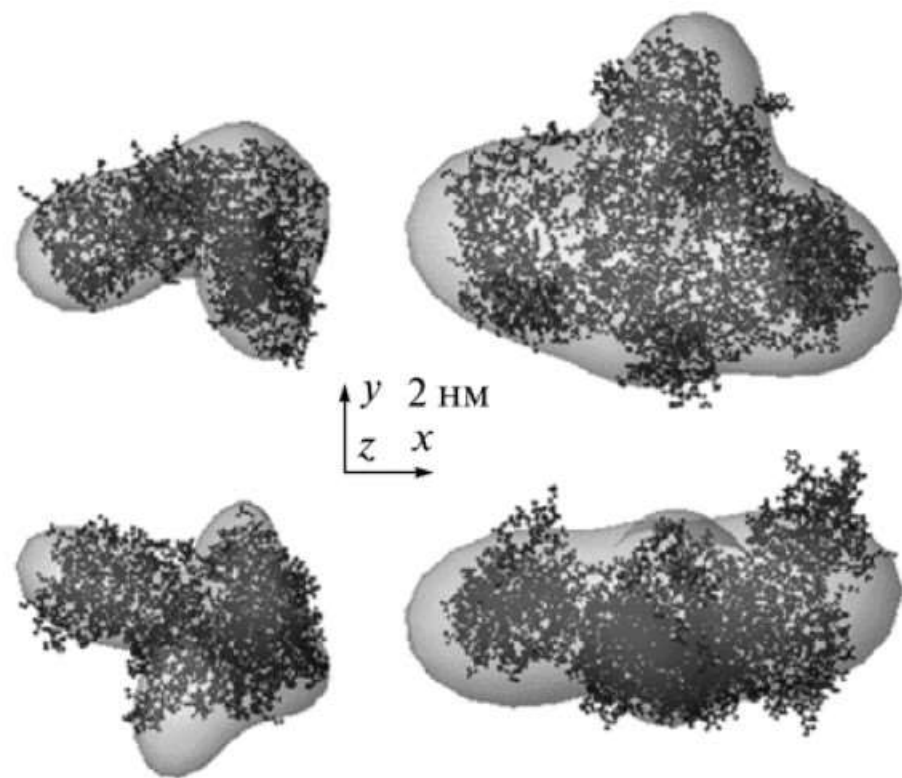
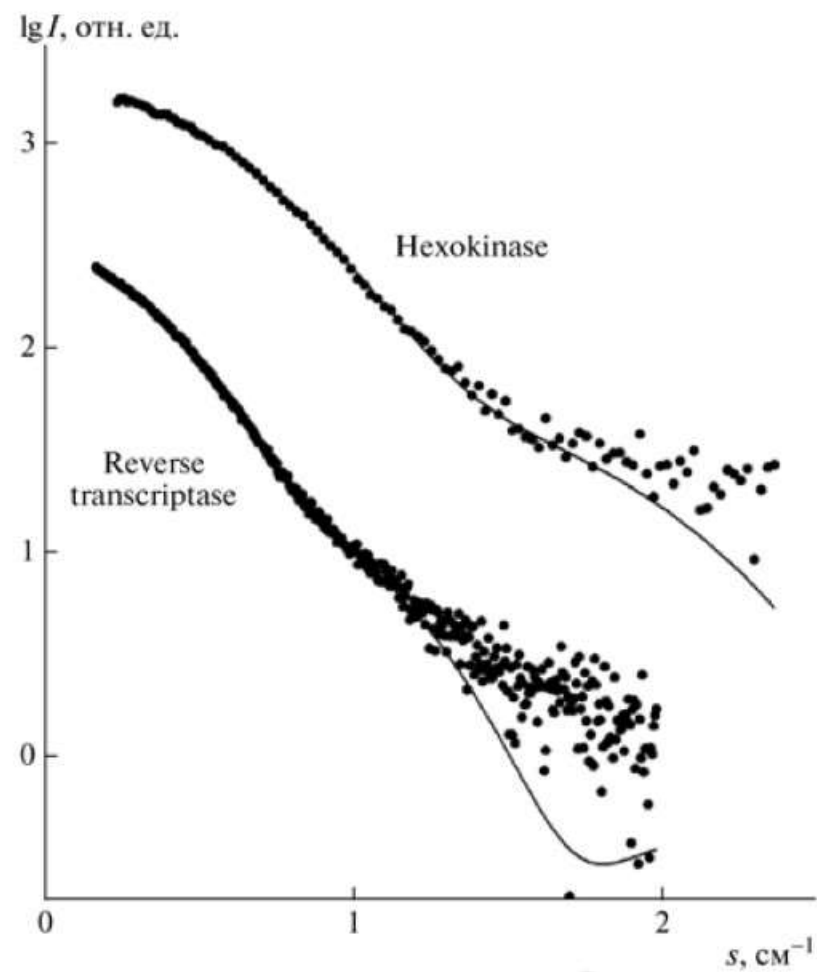
- моделирование жесткими (твердыми) телами
- для макромолекулярных комплексов (олигомерные белки)
- условие – известны структуры (с высоким разрешением) отдельных компонентов (субъединиц)
- модель комплекса строится путем перемещения и/или вращения одной из субъединиц
- структуру модели определяют
 - Эйлеравы углы вращения
 - три координаты

ПРИМЕРЫ

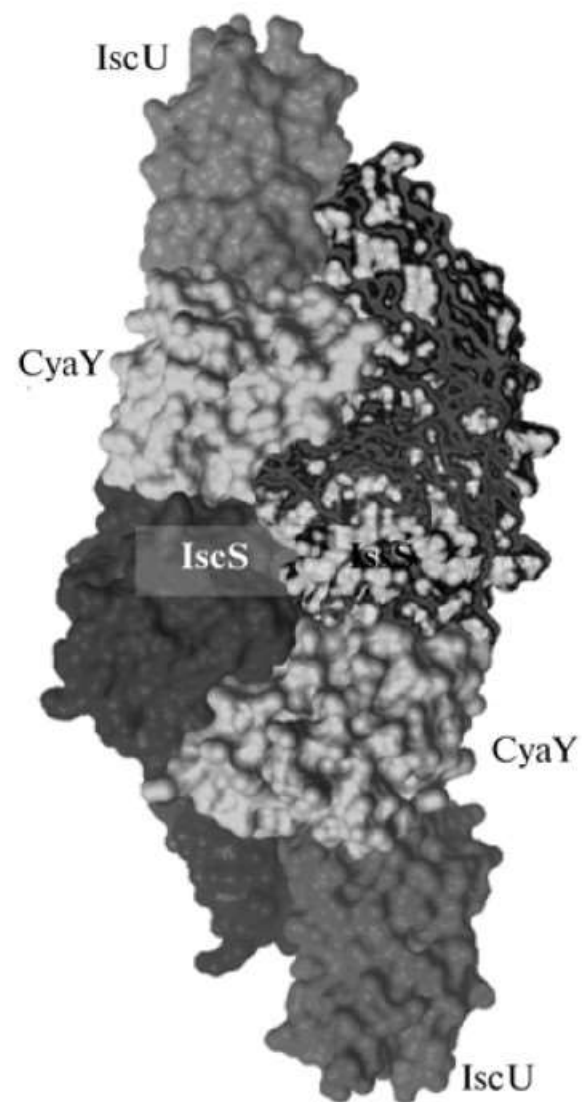
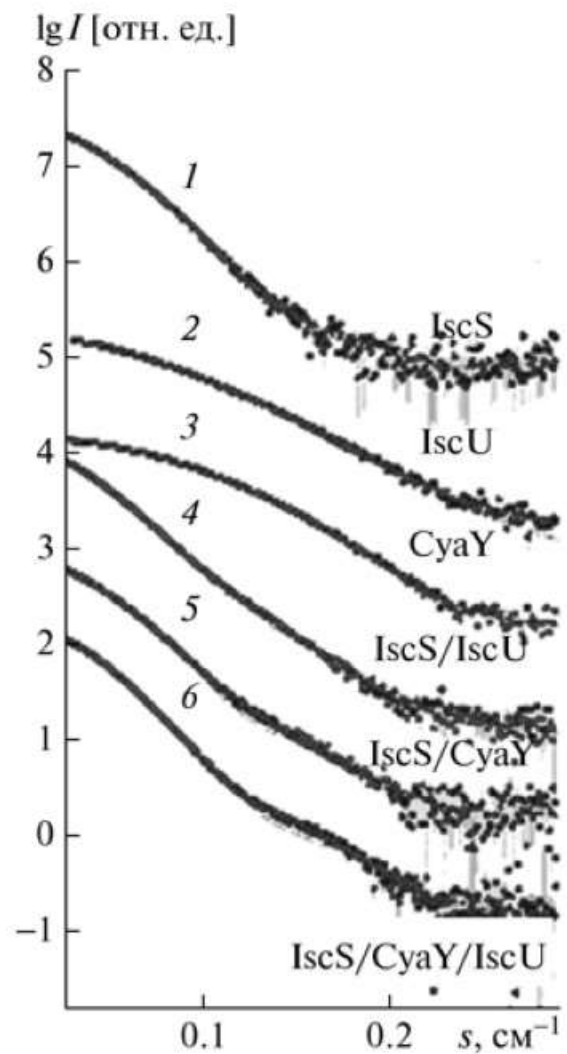
Установление структуры бактериофага



Восстановление функции оболочки для белков с известной структурой



Моделирование комплекса



Спасибо за внимание!

Криоэлектронная микроскопия

Электронная микроскопия

Свойства электронного пучка. Плюсы

- Световая микроскопия ограничена дифракционным пределом
- Рентгеновская микроскопия – сложности фокусировки
- Электроны – заряженные частицы – возможность управления
- Поток электронов обладает волновыми свойствами
- Длина волны зависит от ускоряющего потенциала: $\lambda \text{ (Å)} = 12,25/\sqrt{U \text{ (В)}}$

Электронная микроскопия

- Сканирующая (СЭМ, SEM)/ РЭМ – растровый
 - Регистрируются вторичные электроны
 - Разрешение около 8 \AA
- Просвечивающая (ПЭМ, TEM)
 - Теоретическое разрешение вплоть до $0,04 \text{ \AA}$

Электронная микроскопия

Проблемы

- Электроны взаимодействуют с молекулами воздуха – помещение образца в вакуум
- Вакуум приводит к потере воды из образца и коллапсу исследуемой структуры
- Высокая энергия электронов – разрушение химических связей
- Низкий контраст биоматериала – необходимость высокой дозы электронов
- Высокая доза – разрушение образца / Снижение интенсивности – снижение контраста

Электронная микроскопия

Возможные пути решения и новые проблемы

Охлаждение (заморозка образца)

- Кристаллы воды рассеивают электроны и нарушают структуру образца

Снижение дозы электронов

- Возможность получения только дифракционной картины – теряется преимущество перед рентгеноструктурным анализом

Электронная микроскопия белка

Создание 3D-модели по дифракционной картине

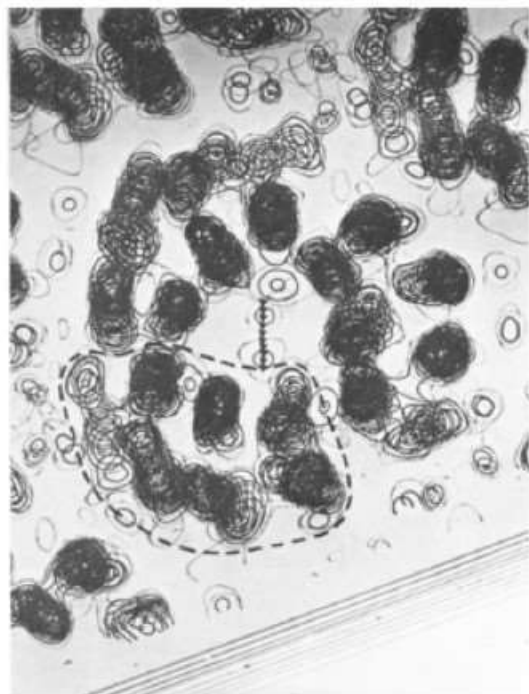


Fig. 4 Part of the three-dimensional potential map showing a region 50 Å thick spanning the membrane. The sections above and below this region contain no features higher than one contour level. The absolute hand is determined by the known direction of specimen tilt. The view shows protein molecules grouped around one of the threefold axes. The probable boundary of one of them is indicated by the broken line. The angle of view is such that the α helices furthest from the threefold axis partly overlap in the protein molecule outlined, but are seen almost end-on in the one on the right.

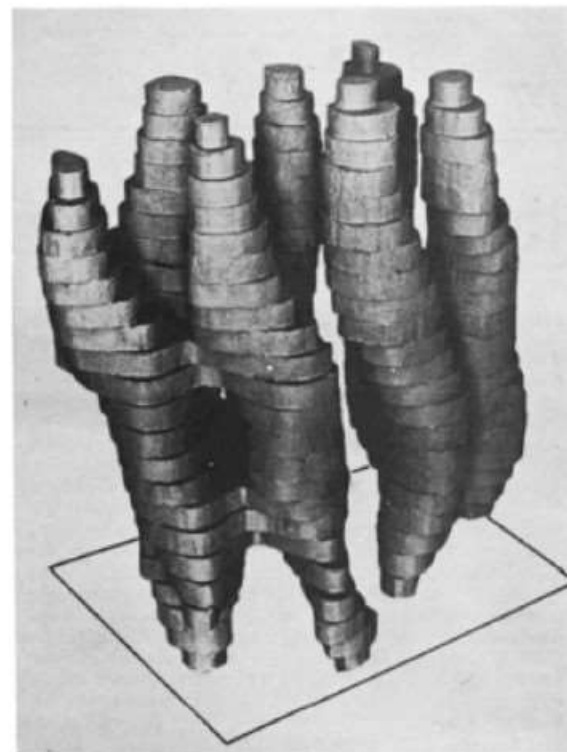


Fig. 5 A model of a single protein molecule in the purple membrane, viewed roughly parallel to the plane of the membrane. The top and bottom of the model correspond to the parts of the protein in contact with the solvent, the rest being in contact with lipid. The most strongly tilted α helices are in the foreground.

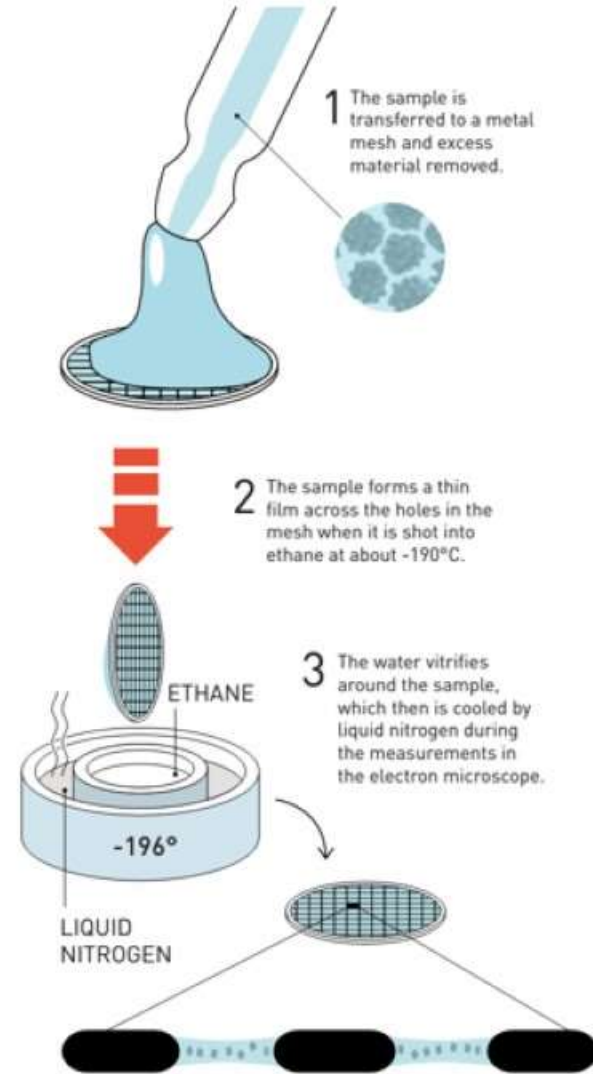
Криоэлектронная микроскопия

Витрификация

Жак Дюбоше

Быстрое охлаждение образца до температур ниже -160°C позволяет перевести воду в аморфное состояние, не повреждая молекулы исследуемого белка

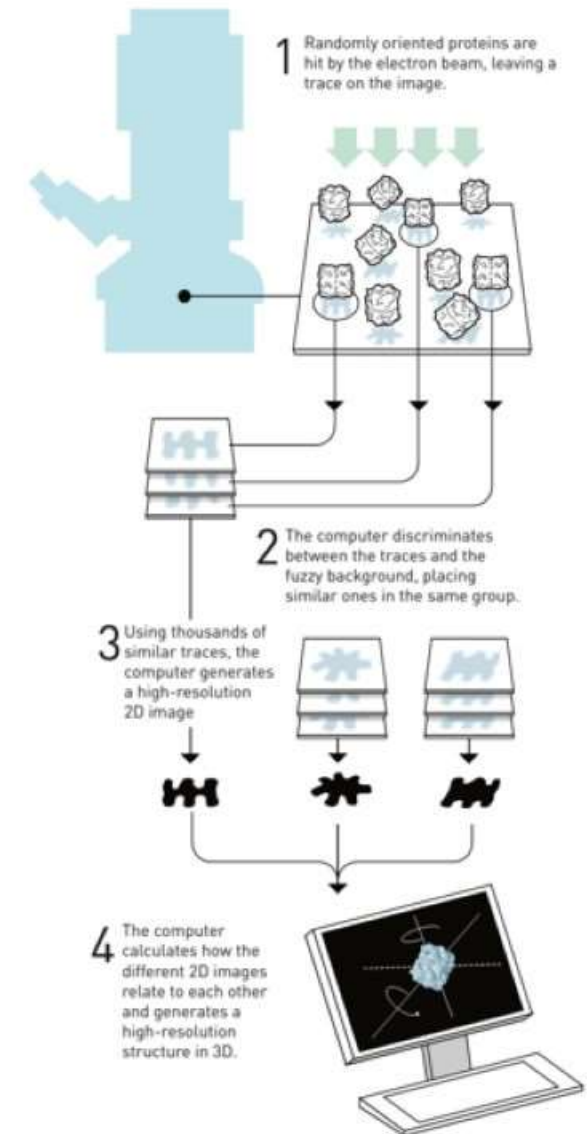
DUBOCHET'S VITRIFICATION METHOD



Криоэлектронная микроскопия

Способ получения изображения

- 1990 Ричард Хендерсон
- Слой одиночных молекул
- Молекулы ориентированы случайным образом
- Пучок электронов оставляет проекции на детекторе
- Огромное количество снимков молекулы с разных сторон
- Сопоставление изображений
- Формирование 2D-изображений
- Формирование 3D-структуры



Криоэлектронная микроскопия

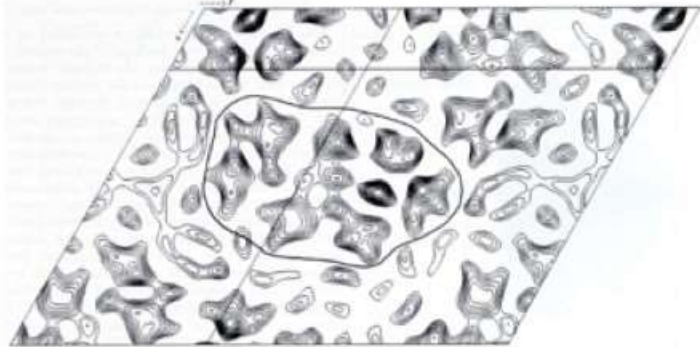


Figure 9. A section through the map parallel to the membrane plane at the level of the β -ionone ring of the retinal, just below the centre of the map. There are 10 equally spaced contours with the maximum density in the ring of the retinal.

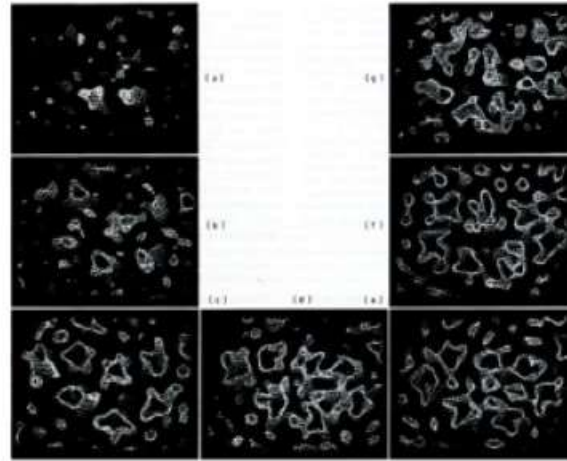


Figure 10. Each panel (a) top, (g) bottom) shows a 7 Å thick slice through the map parallel to the membrane plane, contoured at a level of 20% of the maximum density. There are 7 slices from the top to the bottom. In the section below the central one, the retinal ring can be seen together with several resolved side-chains. This same section is shown with the atomic model superimposed in Fig. 11.

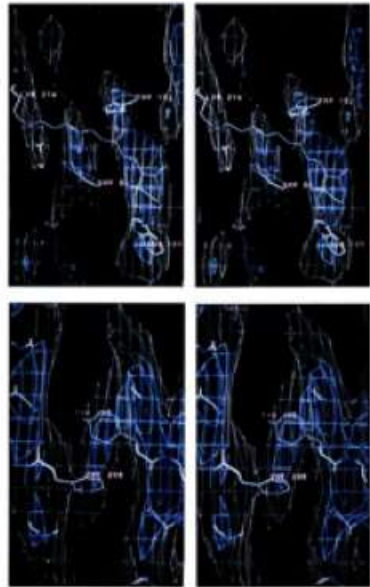


Figure 13. Stereo view of 2 parts of the map to illustrate the poorer vertical resolution and the results of our efforts to interpret the map. (a) The retinal ring viewed parallel to the membrane showing Tyrl99 and Tyrl05. (b) The subtracted density for Tyrl99 from helix F and Tyrl05 from helix G.

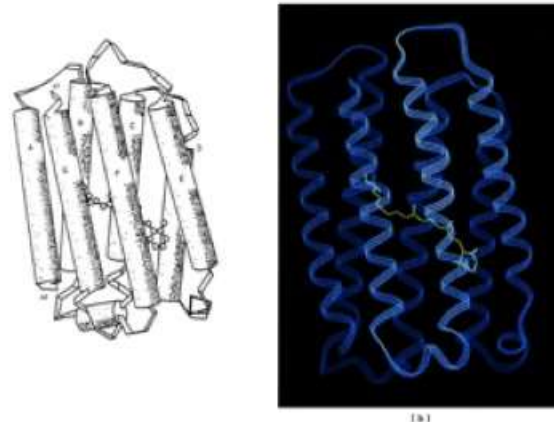
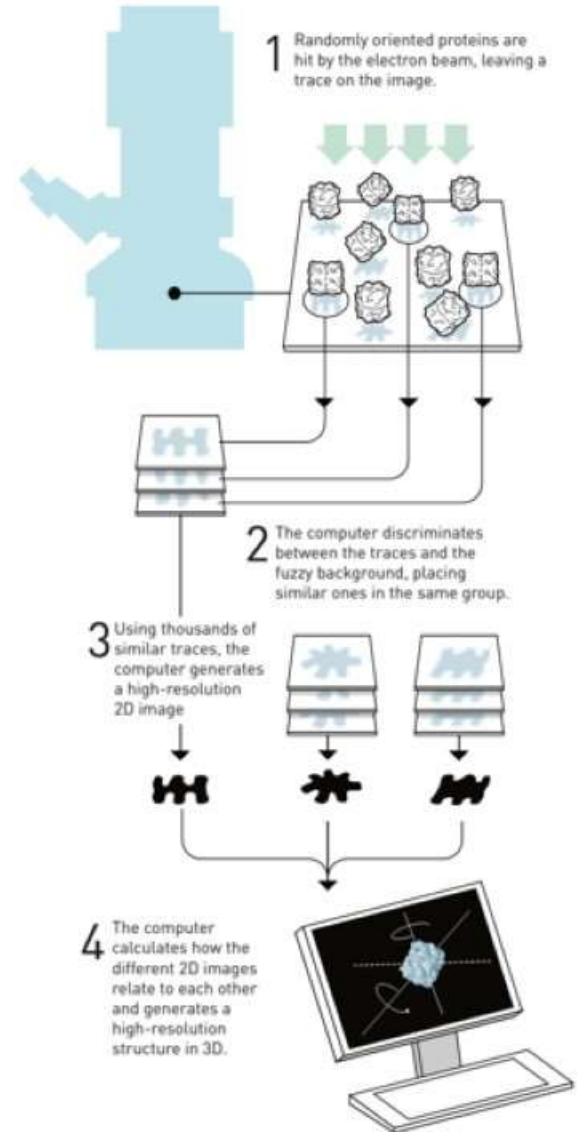


Figure 14. Overall chain trace. (a) A diagram showing helices as solid rods. (b) Ribbon diagram following the backbone of the polypeptide. Helix A, on the left, is connected to helix B at the top; helix B is connected to helix C at the bottom; helix C to helix D at the top; helix D to helix E at the bottom; helix E to helix F at the top; helix F to helix G at the bottom. The N terminus (N) is at the bottom at the extramembrular surface, the C terminus (C) is at the top at the cytoplasmic surface. Both diagrams show the retinal and its connection to Lys218.



Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K. H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929

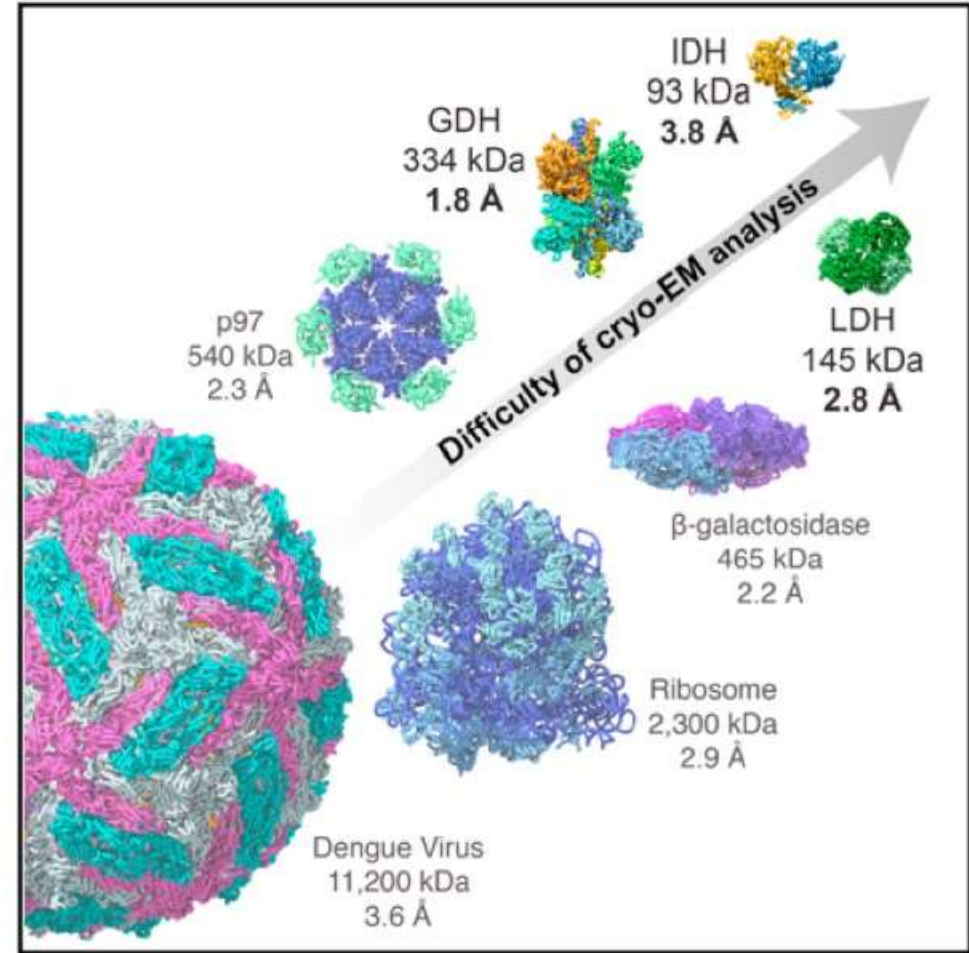
Illustration: ©Johan Jarnestad/
The Royal Swedish Academy of Science

Криоэлектронная микроскопия

Ограничения?

Large virus	300 M	Yes
Small virus	11 M	Yes
Ribosome	3.3 M	Yes
	1.4 M	Yes
Multimeric enzyme	420 K	Possibly
	180 K	Possibly
	52 K	Possibly
Small protein	18 K	No
Very small protein	7 K	No

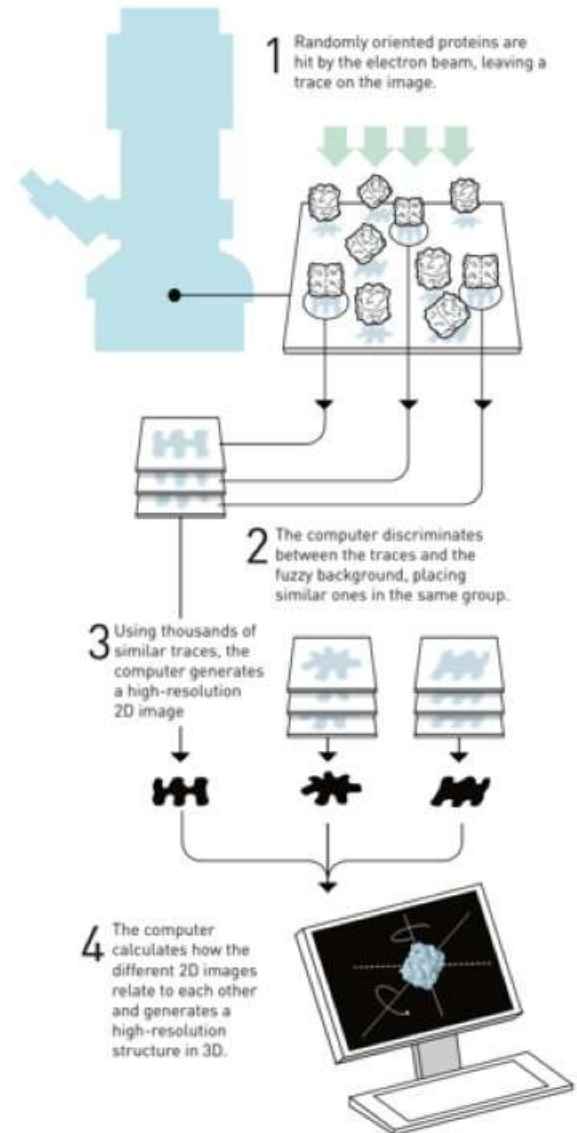
Henderson, R. (1995) The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q. Rev. Biophys.* 28, 171-193



Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., Falconieri, V., Rao, P., Davis, M. I., Pragani, R., Boxer, M. B., Earl, L. A., Milne, J. L. S., and Subramaniam, S. (2016) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell* 165, 1698-1707

Криоэлектронная микроскопия

- 1990 Ричард Хендерсон
- Слой одиночных молекул
- Молекулы ориентированы случайным образом
- Пучок электронов оставляет проекции на детекторе
- Огромное количество снимков молекулы с разных сторон
- Сопоставление изображений
- Формирование 2D-изображений
- Формирование 3D-структуры



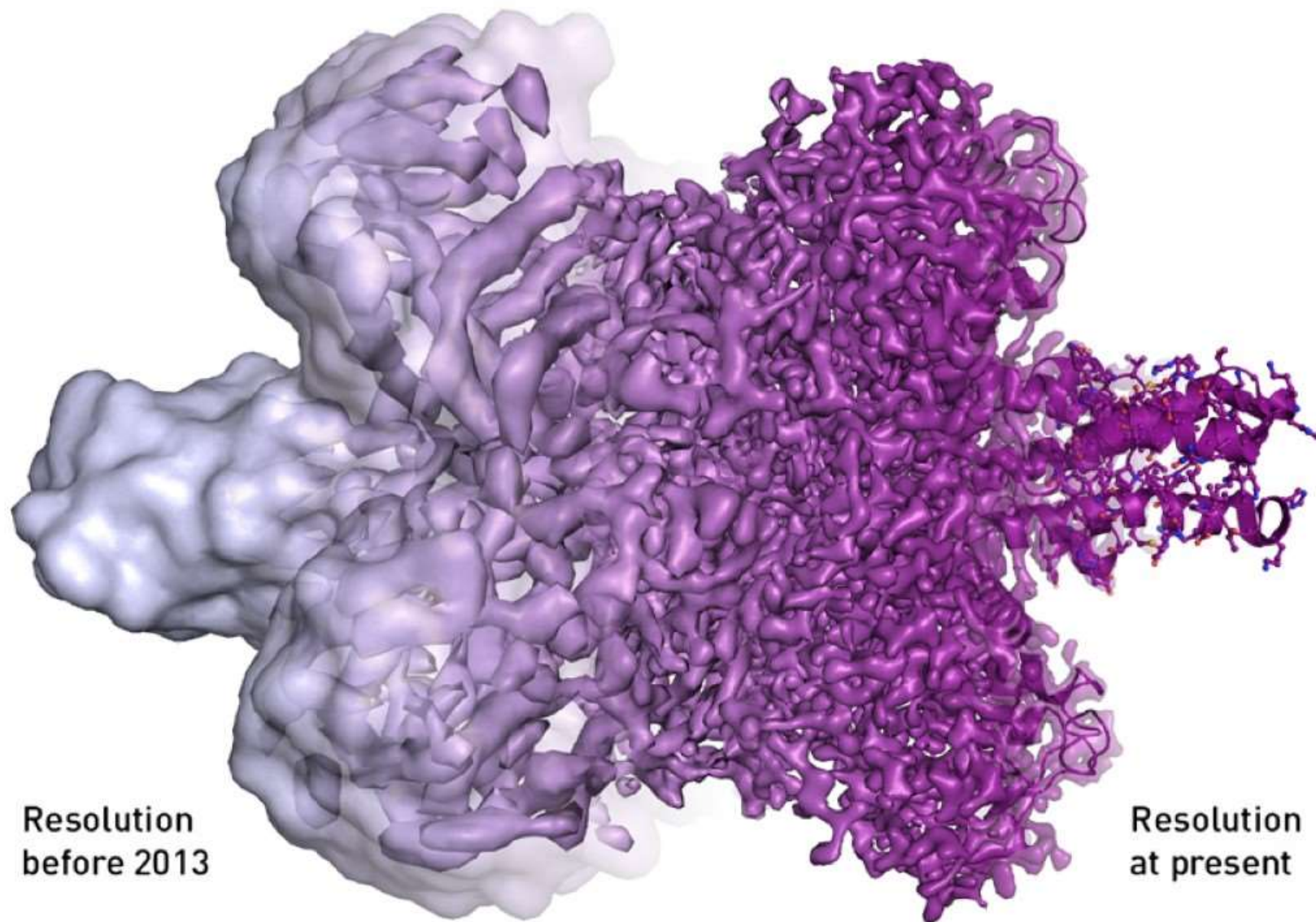
Криоэлектронная микроскопия

Table 1. Summary of Data Collection and Image-Processing Parameters for the Density Maps of LDH, IDH1, and GDH Reported in this Manuscript

	Total number of micrographs	Defocus range (microns)	Starting number of particles	Particles used in final map	Frames used in final map	B-factor for sharpening (\AA^2)	Final resolution (\AA)
LDH-inh	1,707	0.8–2.2	508,402	50,865 (10%)	1–30	–150	2.8
IDH-apo	1,506	0.7–3.0	499,184	49,936 (10%)	1–30	–180	3.8
IDH-inh	820	0.7–2.6	232,343	46,483 (20%)	1–30	–180	3.8
GDH	232	0.8–2.1	45,388	21,818 (48%)	3–9	–90	1.8

Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., Falconieri, V., Rao, P., Davis, M. I., Pragani, R., Boxer, M. B., Earl, L. A., Milne, J. L. S., and Subramaniam, S. (2016) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell* 165, 1698-1707

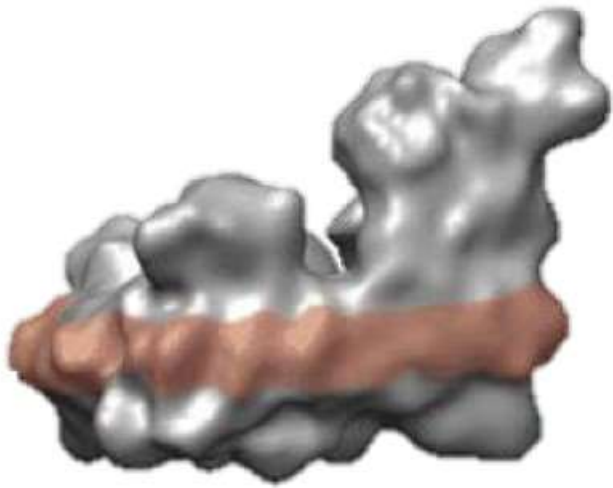
2012 – прямая детекция электронов



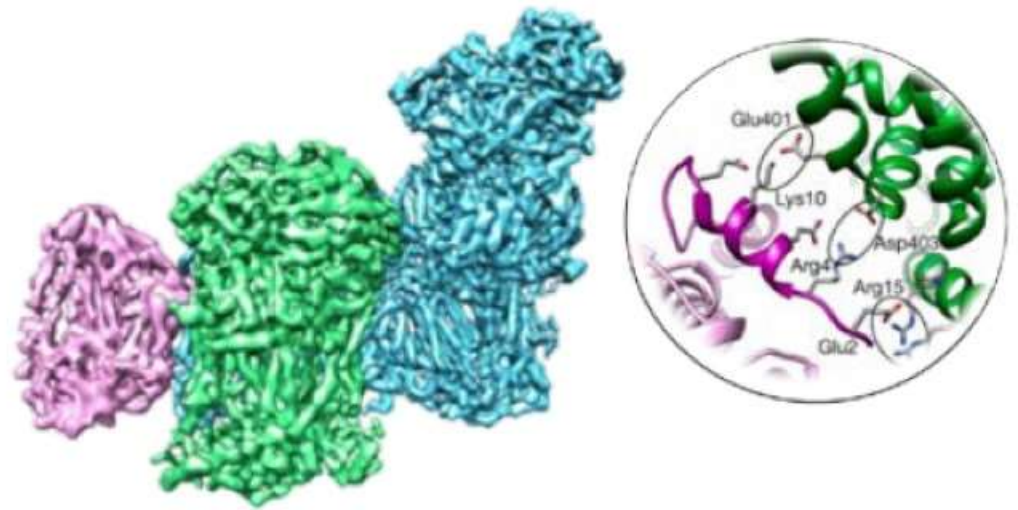
Resolution
before 2013

Resolution
at present

2012 – прямая детекция электронов

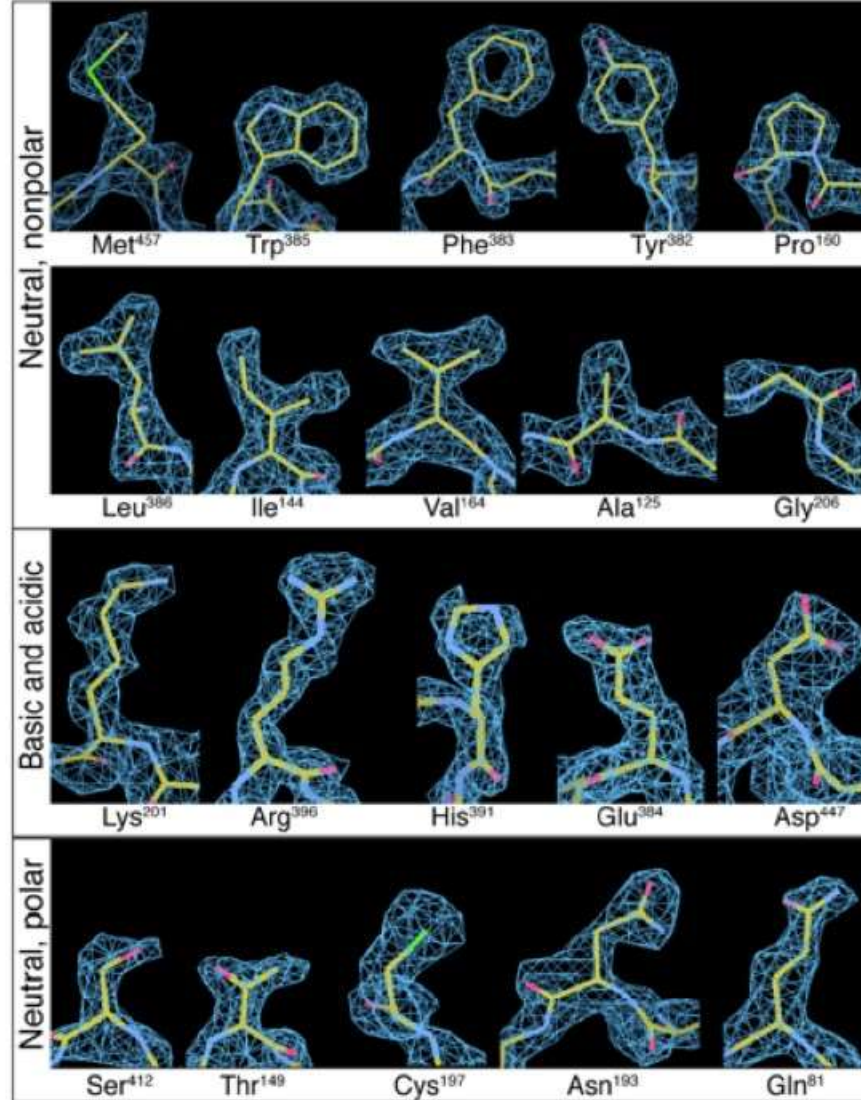


Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J. L., and Kühlbrandt, W. (2011) Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *The EMBO Journal* 30, 4652-4664



Letts, J. A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L. A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 537, 644-648

Криоэлектронная микроскопия



Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., Falconieri, V., Rao, P., Davis, M. I., Pragani, R., Boxer, M. B., Earl, L. A., Milne, J. L. S., and Subramaniam, S. (2016) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell* 165, 1698-1707

X-ray	2.1 Å human apoferritin, PDB: 2clu	1.7 Å human apoferritin, PDB: 2on7	1.6 Å human apoferritin, PDB: 2chl
	2.1 Å	1.26 Å	1.60 Å
CryoEM	400 particles	3,000 particles	8,100 particles
X-ray	1.35 Å frog apoferritin, PDB: 6laf	1.25 Å frog apoferritin, PDB: 6lfp	1.06 Å human apoferritin, PDB: 6btf <i>some densities for H atoms</i>
	1.35 Å <i>some densities for H atoms</i>	1.25 Å	1 Å
CryoEM	163,000 particles	1,000,000 particles	Several billions particles

Ka Man Yip, Niels Fischer, Elham Paknia, Ashwin Chari & Holger Stark. (2020) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature* 587 (7832), 157-161.

Спасибо за внимание!

Спектроскопические методы анализа БММ

Основы спектроскопии

Оптические свойства растворов БММ и методы исследования

- абсорбционная спектроскопия (спектроскопия поглощения)
 - поглощение электромагнитных волн определенной длины в зависимости от структуры БММ
- спектроскопия рассеяния
 - рассеяние света крупными частицами (нефелометрия и турбидиметрия)
- оптическая активность
 - поглощение поляризованного света в зависимости от ориентации БММ (линейный дихроизм)
 - поглощение циркулярно поляризованного света в зависимости от структуры БММ (круговой дихроизм)
- эмиссионные методы
 - флуоресценция
 - люминесценция

Основы абсорбционной спектроскопии

- постулат Бора – **квантование энергии**
- энергетические переходы в атомах и молекулах происходят при **поглощении** строго определенных **порций энергии**
- **связь энергии** кванта и **длины** волны $E = h\nu = hc/\lambda$ (**обратная зависимость**)
 - h – постоянная Планка
 - ν – частота
 - c – скорость света
 - λ – длина волны
- **поглощение** атомами и молекулами фотонов с определенной энергией (света с определенной длиной волны) сопровождается энергетическими переходами
 - УФ – электронные переходы
 - ИК – колебательные и вращательно-колебательные переходы
- в зависимости от структуры молекулы в спектре появляются **характеристические максимумы поглощения**

Основы абсорбционной спектроскопии

Физические основы и терминология

- интенсивность I
- пропускание (transmittance), $T = I/I_0$
- поглощение (absorbance), $A = \lg(1/T) = \lg(I_0/I)$
- оптическая плотность (density), D
- коэффициент молярной экстинкции, ε_λ
- закон Бугера-Ламберта-Бера $A_\lambda = \varepsilon_\lambda cl$

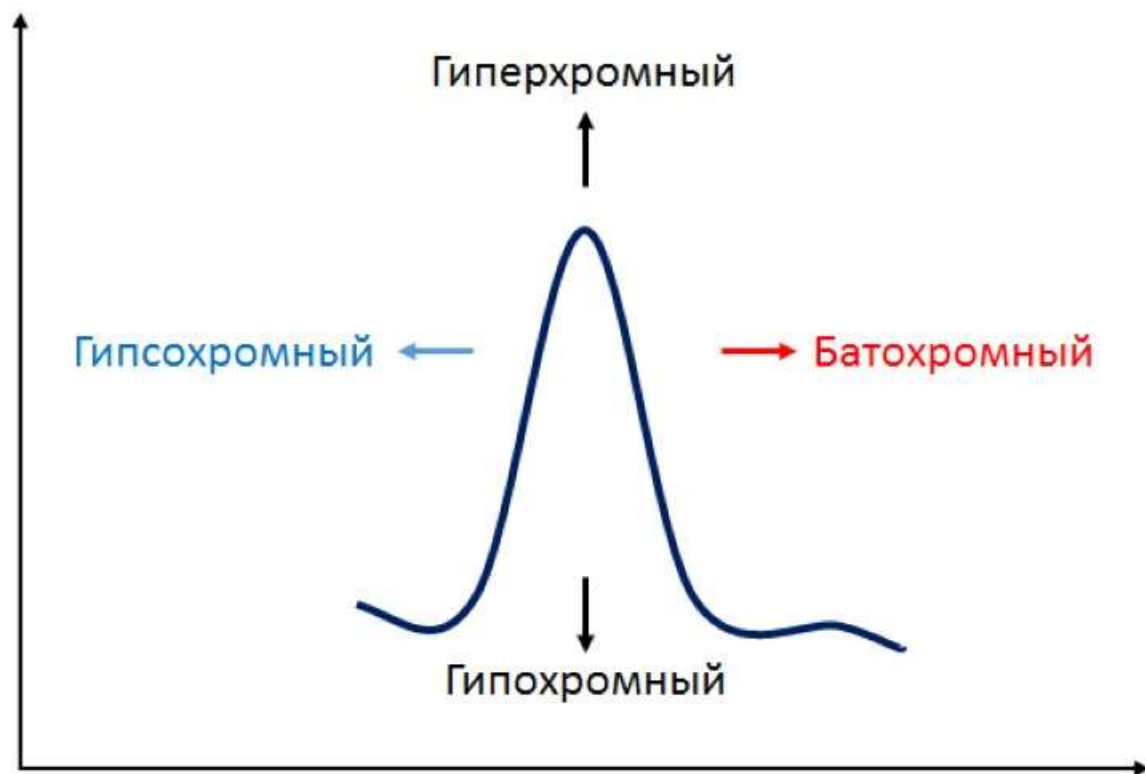
Основы абсорбционной спектроскопии

Области применения спектральных методов

- **качественный** анализ
 - функциональные группы (**хромофоры**) – **характеристические частоты** (максимумы поглощения)
- **структурный** анализ и межмолекулярные **взаимодействия**
 - взаимные влияния групп – **положение и форма спектра** характеристических частот
- **количественный** анализ
 - количество хромофоров – **интенсивность** – концентрация (з-н Бугера-Ламберта-Бера)

Основы абсорбционной спектроскопии

Сдвиги при взаимном влиянии функциональных групп



УФ-спектроскопия поглощения

Хромофоры БММ в УФ-области

- радикалы аминокислот
- пептидные связи
- дисульфидные связи
- простетические группы белков
- азотистые основания

Абсорбционная УФ-спектроскопия нуклеиновых кислот

Оценка качества и количественное определение

- **характеристический** максимум поглощения – **260 нм**
- нативная дцДНК – **гипохромный** эффект по сравнению с простой **суммой** D_{260} всех ее **азотистых оснований**
- **коэффициенты пересчета** на единицу поглощения
 - дцДНК 50 мкг/мл
 - оцДНК 33 мкг/мл
 - оцРНК 40 мкг/мл
- для **олигонуклеотидов** необходим расчет коэффициента экстинкции по составу
- **примесь белка** оценивают по отношению поглощения при 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280})
 - образец ДНК считается чистым от примеси белка при значении A_{260}/A_{280} больше 1,8
 - образец РНК считается чистым от примеси белка при значении A_{260}/A_{280} около 2,0
- **другие примеси** оценивают по отношению A_{260}/A_{230} (для чистого образца более 2,0)
 - остаточный гуанидин, фенол, гликоген и другие примеси повышают поглощение при длине волны 230 нм

ПРИМЕЧАНИЕ: для выявления примесей следует снимать спектр поглощения в диапазоне 220-320нм, а не поглощение при отдельных значениях длин волн

Абсорбционная УФ-спектроскопия белков

- в области дальнего УФ сильно поглощают все аминокислоты, а также пептидные связи
- для ароматических аминокислот характерны максимумы в области 260-280 нм
- при нейтральных значениях pH спектр поглощения белка хорошо совпадает со спектром эквимольной смеси аминокислот

Аминокислота	Максимумы поглощения, нм	ϵ_{λ}	Дополнительные максимумы, нм
Триптофан	279,5	5600	272, 288
Тирозин	275	1380	280
Фенилаланин	257	180	7 максимумов

Абсорбционная УФ-спектроскопия белков

Поглощение ультрафиолета при 280 нм

- **хромофоры** – ароматические радикалы аминокислотных остатков (**Три, Тир, Фен**) и **Цис**
- **характеристический максимум** поглощения белков – **280 нм**
- **коэффициент молярной экстинкции** белка $\epsilon_{280} = 5500 \cdot (n\text{Trp}) + 1490 \cdot (n\text{Tyr}) + 125 \cdot (nCys)$
- **мешают** анализу
 - агрегация белка и **взвеси** (мутный раствор) – необходимо вычислять вклад **светорассеяния**
 - Тритон X-100
 - нуклеиновые кислоты (!)** – необходимо **сравнивать** с поглощением **при 260 нм**
- **определение концентрации**
 - по калибровочной кривой
 - метод Варбурга и Кристиана – определение концентрации белка по таблице или номограмме на основании данных A_{280} и A_{260}
 - определение концентрации белка с использованием коэффициентов пересчета:
 - $C(\text{мг/мл}) = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$ (Layne, 1957)
 - $C(\text{мг/мл}) = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}$ (Kalckar, 1947)

Абсорбционная УФ-спектроскопия белков

Оценка вклада светорассеяния

- **определению концентрации** белка по поглощению при 280 нм **мешают агрегаты** белка и взвесь частиц
- их наличие приводит к **рассеянию света**, что дополнительно **повышает оптическую плотность**
- при **наличии взвеси** определяют оптическую плотность при длинах волн 320, 325, 330 и 335 нм
- экстраполируют кривую методом линейной регрессии для определения логарифма оптической плотности при 280 нм
- вычисляют вклад светорассеяния в оптическую плотность при 280 нм

Абсорбционная УФ-спектроскопия БММ

Основные применения

- количественное определение белков и НК
- анализ содержания примесей в растворах БММ
- различия в поглощении двухцепочечными и одноцепочечными НК
 - изучение температур плавления
 - конформационные изменения
 - межмолекулярные взаимодействия
- микроокружение Три, Тир – сдвиги спектров
 - конформационные изменения белковых молекул
 - межмолекулярные взаимодействия
- преимущества
 - неdestructивный метод
 - скорость исследования
- недостаток – влияние примесей – погрешности

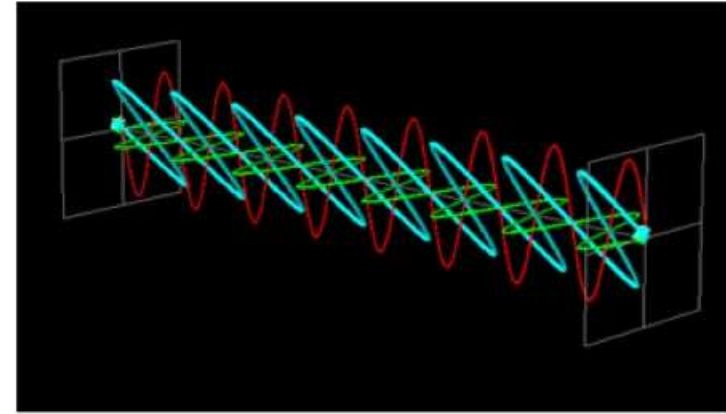
Спектроскопия кругового дихроизма

КД-спектроскопия. Физические основы

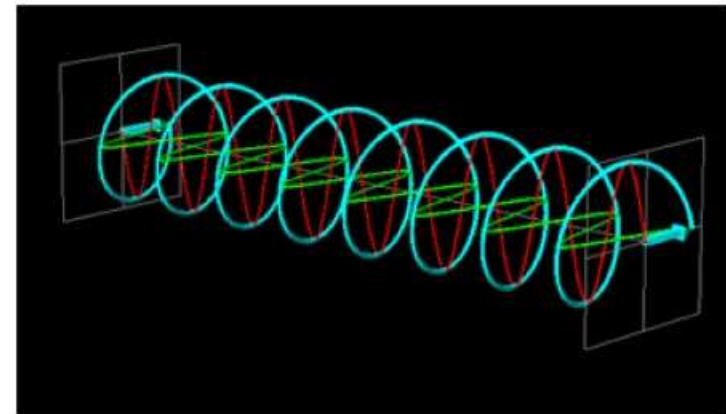
Круговая поляризация

Сложение двух перпендикулярных линейно поляризованных колебаний

с одинаковой амплитудой и фазой –
волна, линейно поляризованная под углом 45°



с одинаковой амплитудой, но разной фазой –
постоянное смещение вектора поляризации
(вершина вектора описывает окружность)

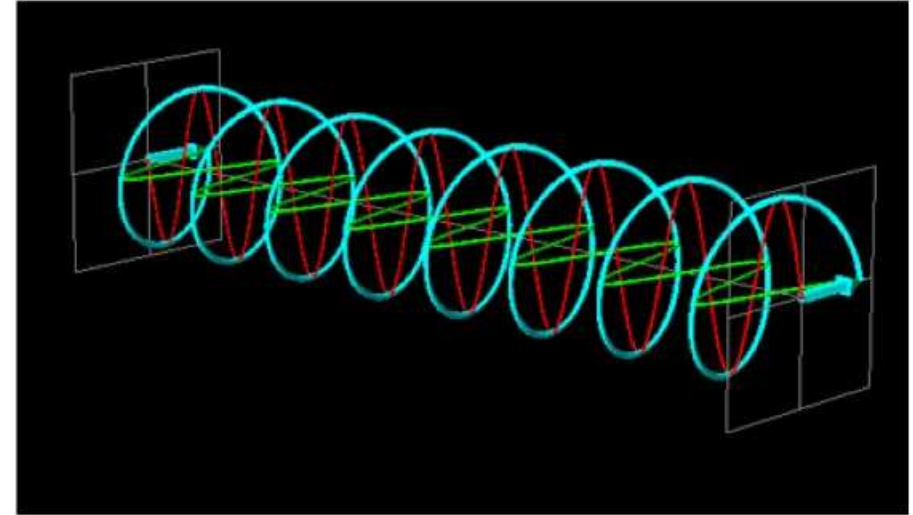


КД-спектроскопия. Физические основы

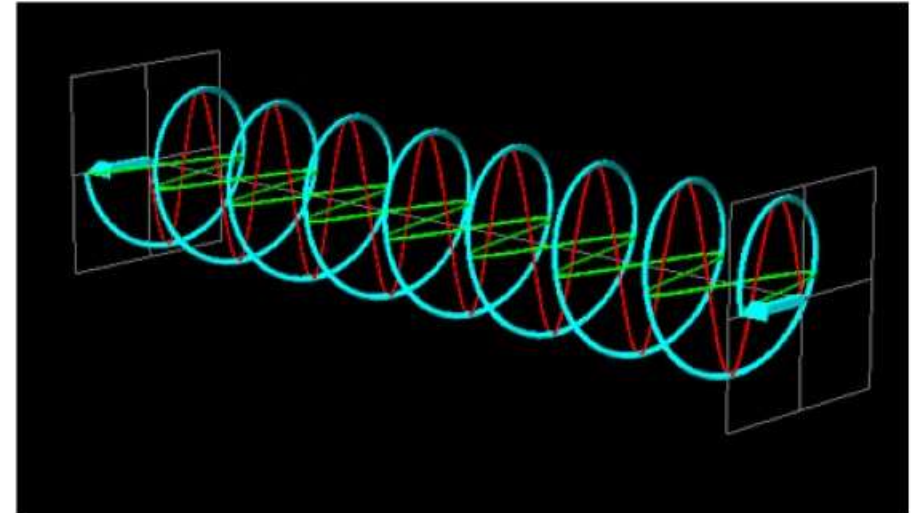
Круговая поляризация

Сложение двух перпендикулярных линейно поляризованных колебаний

левоповорачивающая волна



правоворачивающая волна



КД-спектроскопия

Круговой дихроизм

- круговой дихроизм – разница в поглощении левовращающей (L-CPL) и правовращающей (R-CPL) составляющих циркулярно поляризованного света
- $\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{LCPL} - A(\lambda)_{RCPL}$
- анализируется спектр – ΔA в диапазоне длин волн
- **сигнал КД** может быть **положительным** и **отрицательным**
 - зависит от преимущественного поглощения лево- и правовращающих компонент при данной длине волны
- **единицы измерения**
 - молярный дихроизм $\Delta \varepsilon \equiv \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{A_L - A_R}{cl}$
 - молярная эллиптичность $[\theta] = 3298 \cdot \Delta \varepsilon$ (град · см²/ дмоль)

КД-спектроскопия

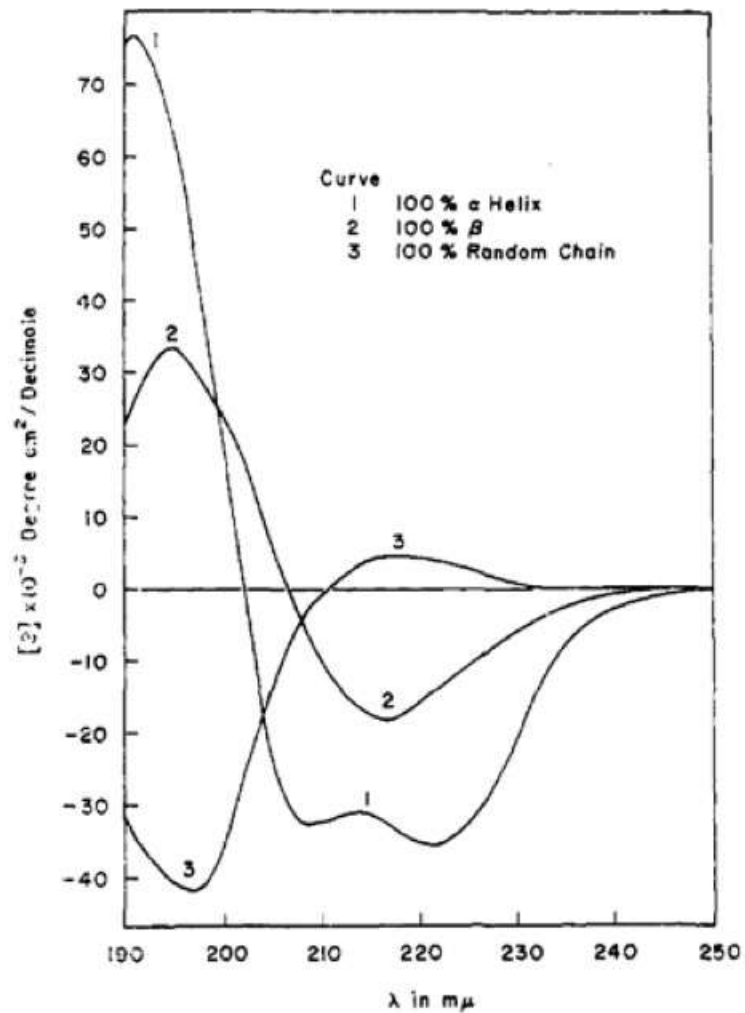


FIGURE 1: Circular dichroism spectra of poly-L-lysine in the α -helical, β , and random conformation.

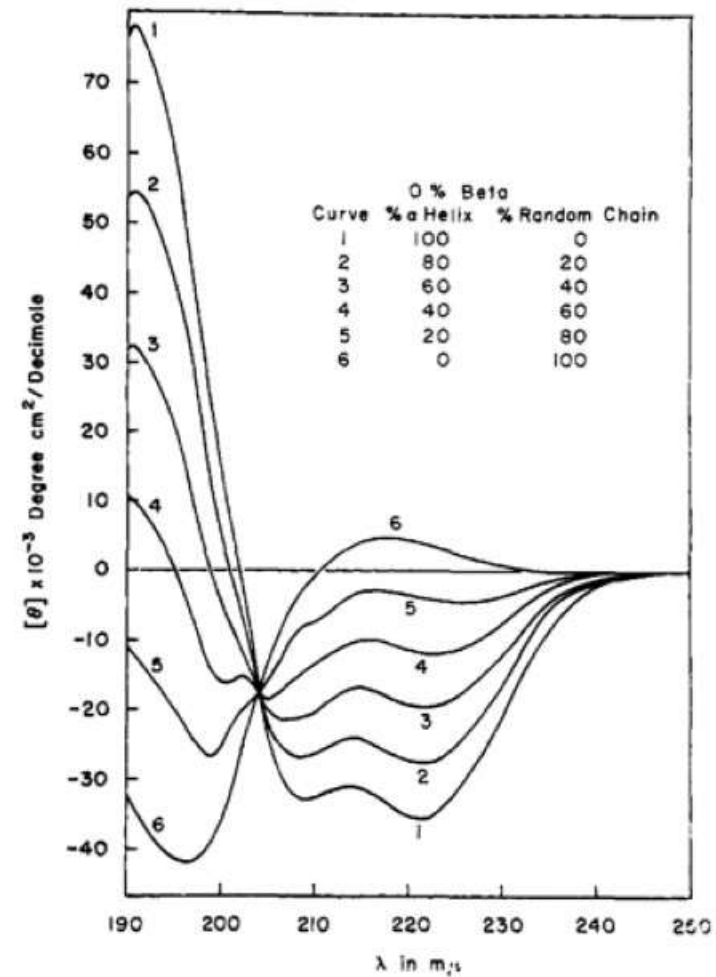


FIGURE 2: Calculated circular dichroism of poly-L-lysine containing 0% β and varying percentages of α helix and random coil, as indicated.

КД-спектроскопия

Применение

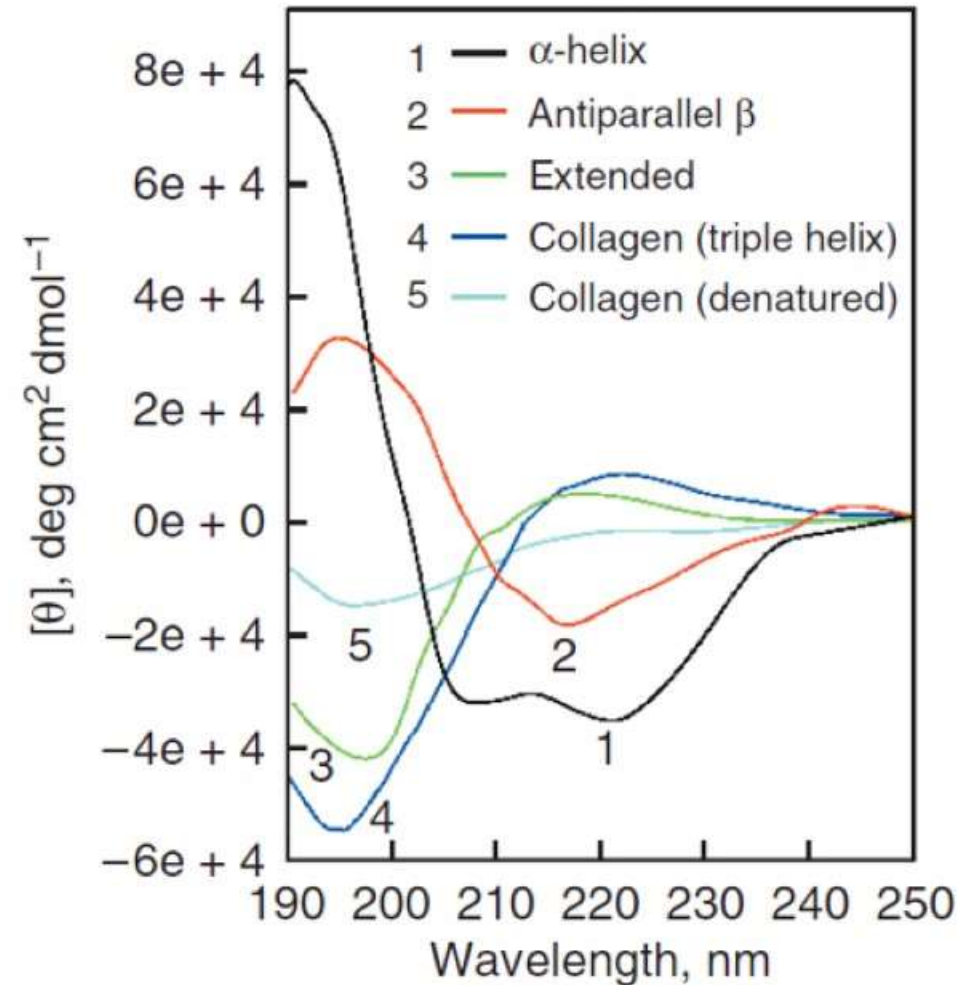
- исследование кругового дихроизма БММ проводят в УФ-области
- **дальняя УФ-область (170-260 нм)** – хромофор – С=О группа пептидной связи
 - анализ **вторичной** структуры
 - денатурация и фолдинг
 - конформационные изменения
 - агрегация (изучение конформационных болезней)
 - количественный анализ – определение концентрации белка
- **ближняя УФ-область (260-320 нм)** – хромофор – ароматические радикалы
 - анализ **третичной** структуры
 - изменение **микроокружения** ароматических радикалов

КД-спектроскопия

Дальняя УФ-область – анализ вторичной структуры

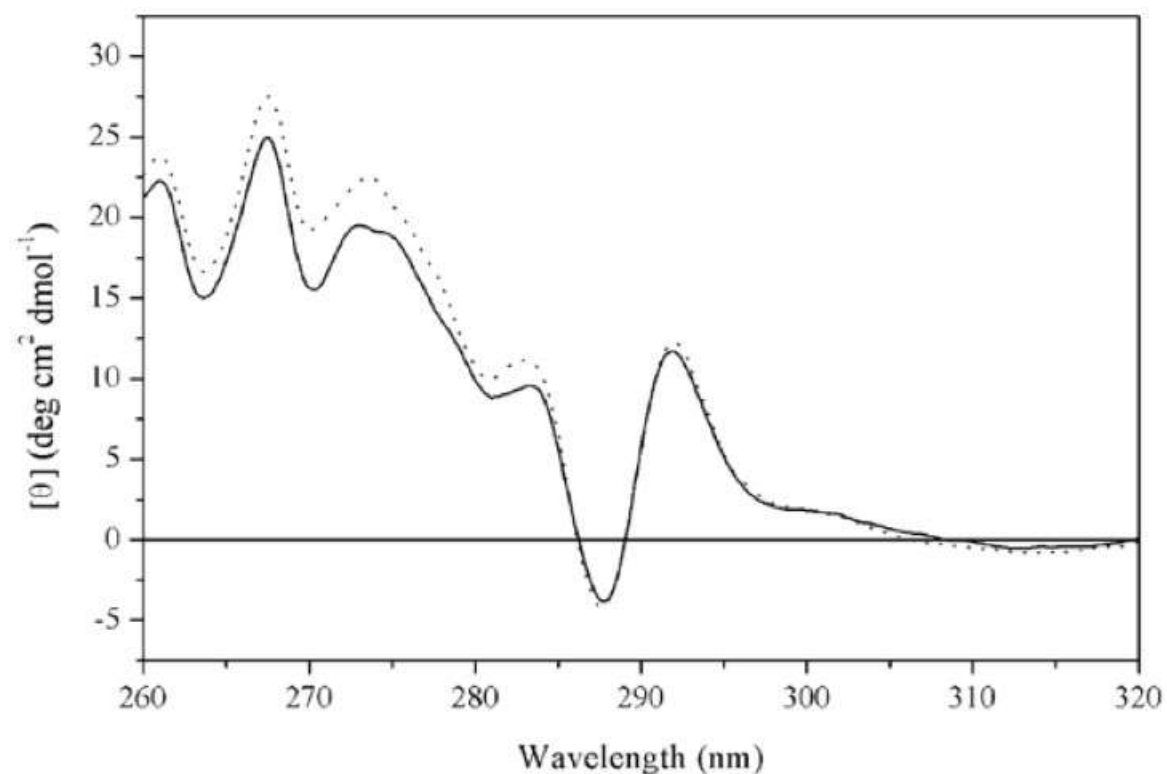
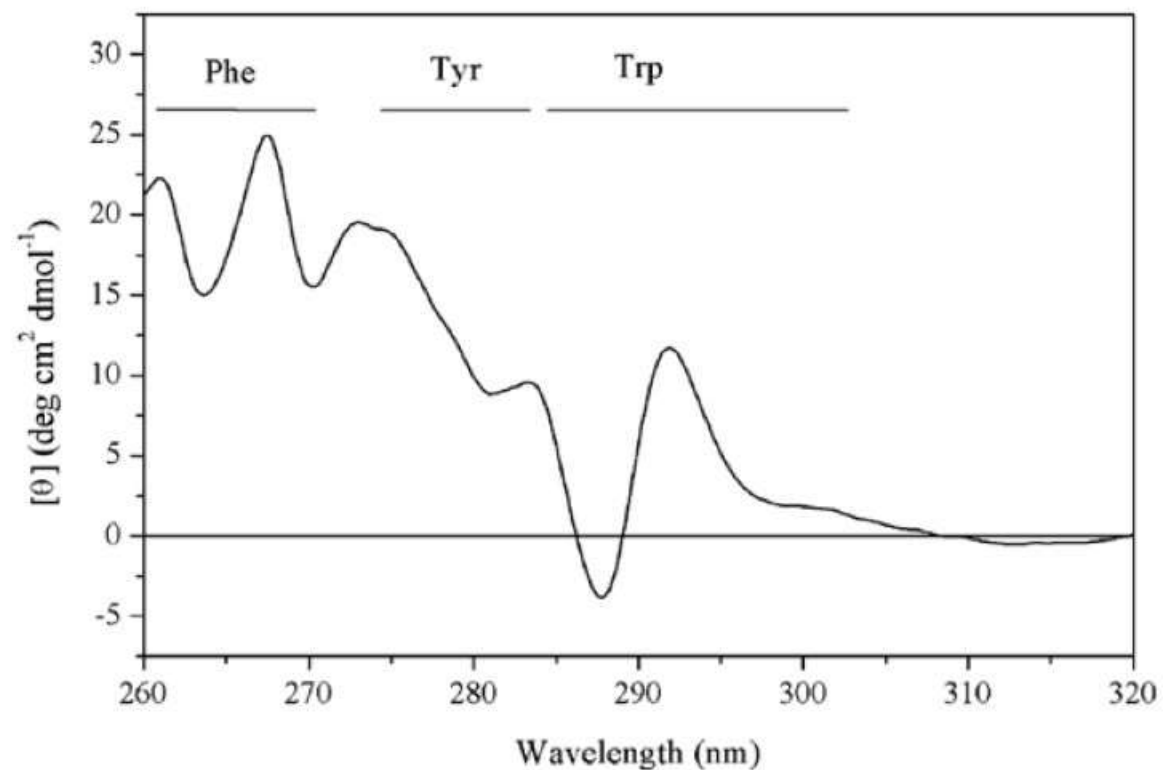
- более упорядоченная структура
 - более выраженная оптическая активность
 - более интенсивный сигнал
- α -спираль – наиболее выраженная оптическая активность
 - характеристические длины волн – ~ 192, 208, 222 нм
- β -слои – менее выраженная оптическая активность
 - характеристические длины волн – ~ 195; ~ 216-218
- неупорядоченный клубок – слабо выраженная оптическая активность

- содержание α -спиралей $\% \alpha = \frac{[\theta]_{208} - 4000^\circ}{33000^\circ - 4000^\circ}$

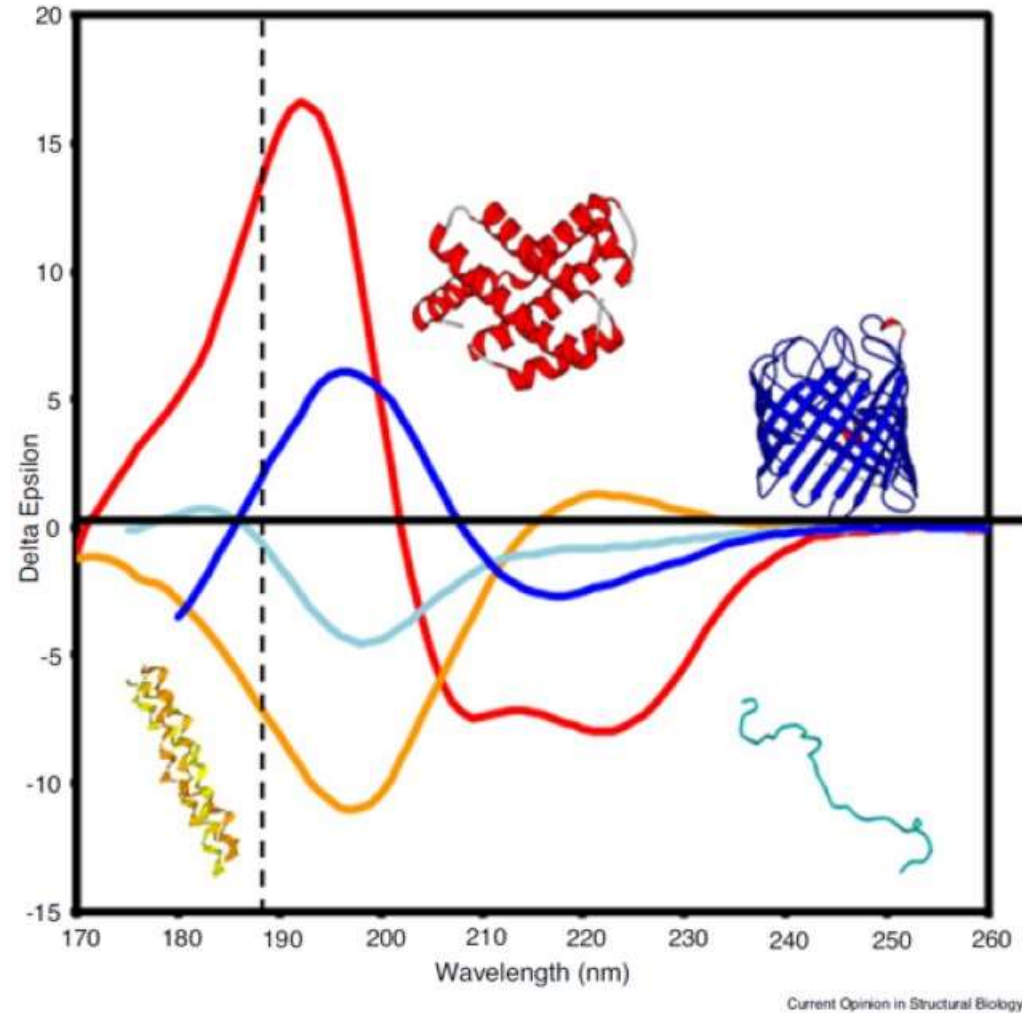


КД-спектроскопия

Ближняя УФ-область – анализ третичной структуры



Оптическая активность. Круговой дихроизм



КД-спектроскопия

Анализ данных

- программное обеспечение
 - программное обеспечение прибора
 - CDToolX
- онлайн-ресурсы
 - DichroWeb
 - BeStSel
 - K2D2
 - PCDDB

ИК-спектроскопия

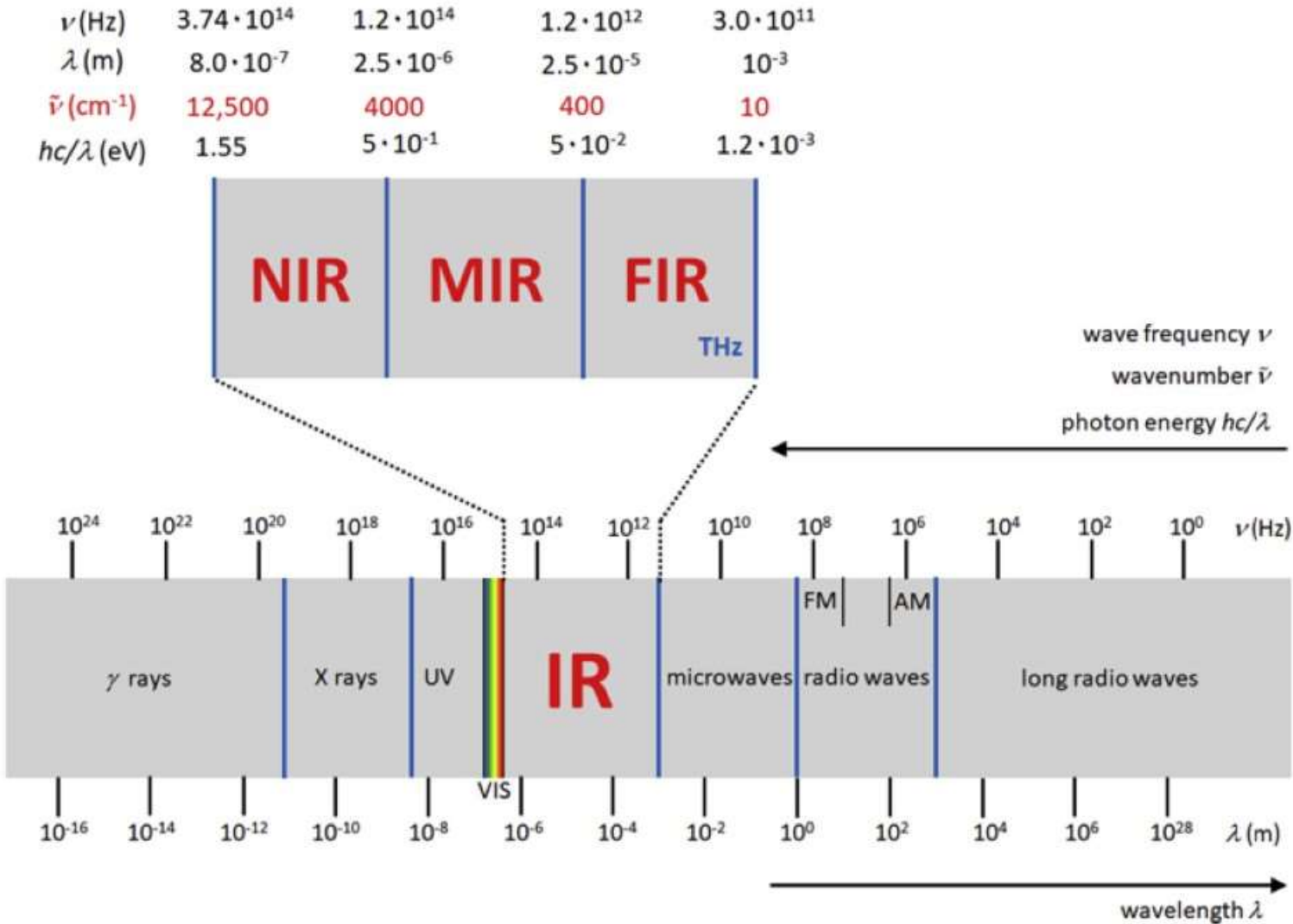
ИК-спектроскопия

ИК-область

- длины волн ~ 780 нм – 1 мм
- используется шкала волновых чисел: от ~ 13000 до 10 см^{-1}
 - число целых длин волн в 1 см ($1/\lambda$)
- диапазоны
 - ближний (БИК): от 13000 до 4000 см^{-1} – высокочастотные колебания
 - средний: от 4000 до 400 см^{-1} – колебательные спектры валентных связей
 - дальний: от 400 до 10 см^{-1} – вращательные спектры

ИК-спектроскопия

ИК-область



Зоны характеристических частот белков в ИК-области

• основные

- Амид А $\sim 3300 \text{ см}^{-1}$ колебания связи NH (влияние водородных связей)
- Амид I $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$ колебания связи C=O (влияние водородных связей)
 - проблема – активное поглощение водой
 - использование дейтерированной воды
- Амид II $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$ колебания связи CN, CH
- Амид III $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$ колебания связи CN, вращение NH
 - 1330-1295 – α -спирали
 - 1295-1270 – β -повороты
 - 1270-1250 – неупорядоченная структура
 - 1250-1220 – β -слои

• дополнительные

- Амид B $\sim 3100 \text{ см}^{-1}$
- Амид IV $\sim 735 \text{ см}^{-1}$
- Амид V $\sim 635 \text{ см}^{-1}$
- Амид VI $\sim 600 \text{ см}^{-1}$
- Амид VII $\sim 200 \text{ см}^{-1}$

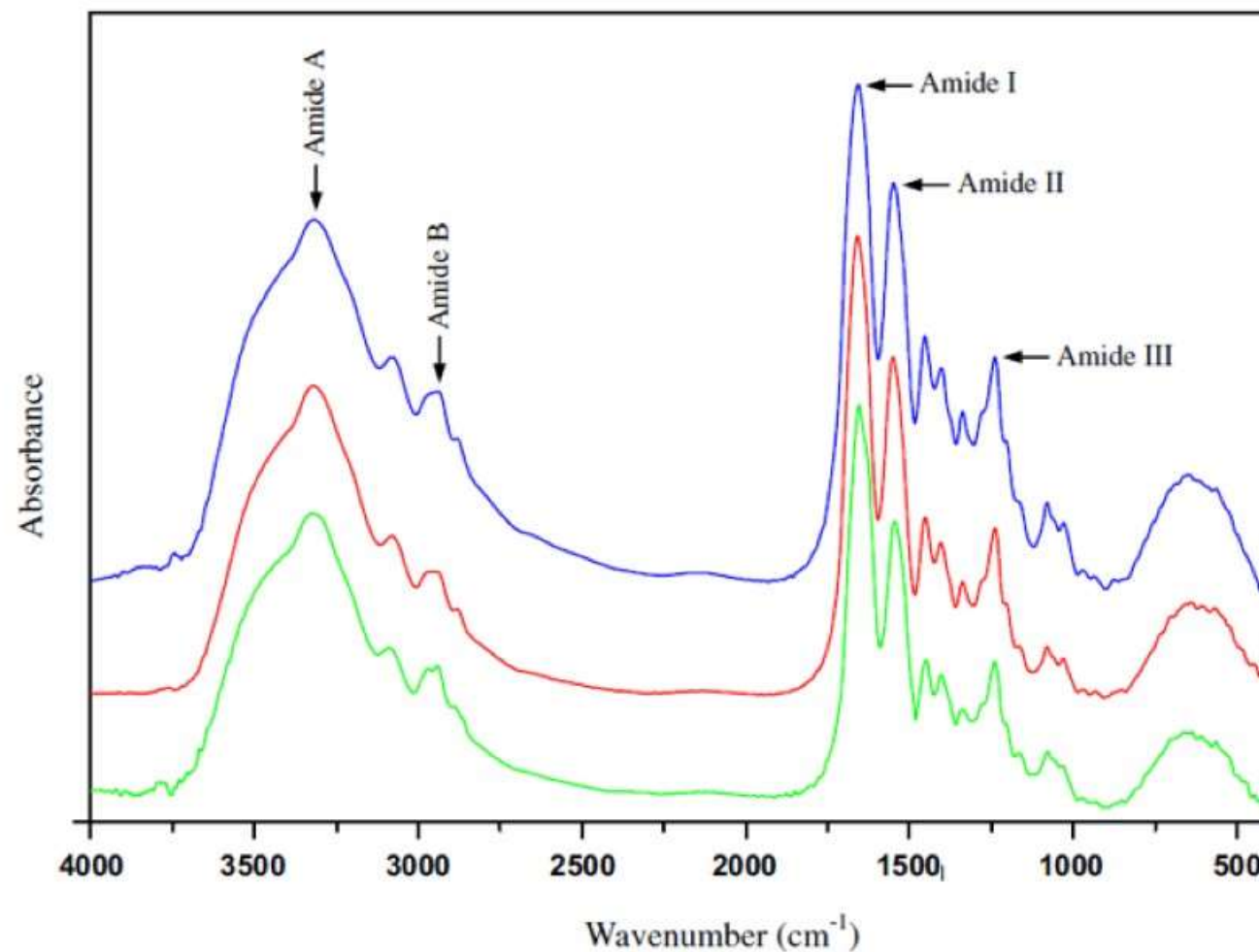
ИК-спектроскопия

Применение в исследовании белков

- количественный анализ
- анализ структуры
 - фибриллярных белков
 - дифференциальная спектроскопия
- преимущества
 - применим для гетерогенных смесей
 - применим для оптически не прозрачных образцов
 - для разных агрегатных состояний

ИК-спектроскопия

Применение в исследовании белков



ИК-спектры коллагена, выделенного по разным технологиям

Спасибо за внимание!

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 4E4C8F6C0D0FDC62FAAF7108E6CEFD6A
Владелец: Глыбочко Петр Витальевич
Действителен: с 19.05.2025 до 12.08.2026