

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»
(ФГБОУ ВО РНИМУ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА МИНЗДРАВА РОССИИ)

КАФЕДРА БИОХИМИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

А.А. Ключникова, К.Г. Кузнецова, А.О. Гончаров, И.Ю. Торопыгин, Е.В. Хряпова,
А.В. Кузиков, В.В. Шумянцева, С.А. Мошковский

ОСНОВЫ ПРОТЕОМИКИ

Учебное пособие к практическим занятиям

Москва

2017

ISBN: 978-5-91615-052-0

УДК 577.112 (075.8)

ББК 28.707.2 я73

ОСНОВЫ ПРОТЕОМИКИ: учебное пособие к практическим занятиям студентов 5 курса кафедры биохимии МБФ//ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Издательство.....

2017 г., 41 с.

Учебное пособие содержит материалы по освоению студентами методов разделения и идентификации белков при помощи гель-электрофореза и времяпролетной масс-спектрометрии.

Пособие составлено в соответствии с действующими ФГОС ВО по специальности «Медицинская биохимия», рабочей программой дисциплины «Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии. Патохимия, диагностика. Биохимия злокачественного роста».

Пособие предназначено для студентов 5 курса медицинского вуза по специальности «Врач-биохимик».

Составители:

Ключникова А.А. - асс. кафедры биохимии Медико-биологического факультета (МБФ) ФГБОУ ВО Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава России (РНИМУ им. Н.И. Пирогова);

Кузнецова К.Г. - м.н.с. лаб. медицинской протеомики ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ);

Гончаров А.О. - студент отделения медицинской биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Торопыгин И.Ю. - к.б.н., с.н.с Центра коллективного пользования ИБМХ;

Хряпова Е.В. – инж. Центра коллективного пользования ИБМХ;

Кузиков А.В. - асс. кафедры биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Шумянцева В.В. – д.б.н., профессор кафедры биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ;

Мошковский С.А. - д.б.н., профессор РАН зав. кафедрой биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. отделом персонализированной медицины ИБМХ.

Рецензенты:

Згода В.Г. - д.б.н., профессор РАН, зав. отделом протеомных исследований и масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ);

Малахов М.В. - к.б.н., в.н.с. отдела медицинской химии и токсикологии, доцент каф. физики и математики, ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Рекомендовано к печати ЦКМС

© Ключникова А.А., Кузнецова К.Г., Гончаров А.О., Торопыгин И.Ю., Хряпова Е.В., Кузиков А.В., Шумянцева В.В., Мошковский С.А.

© ФГБОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова», 2017 г.

Словарь сокращений

APS - персульфат аммония

BSA - бычий сывороточный альбумин (от англ. Bovine serum albumin)

DHB - 2,5 - дигидроксibenзойная кислота

dH₂O – дистиллированная вода

DTT - дитиотреитол

MALDI – опосредованная матрицей лазерная десорбция-ионизация

SDS - додецилсульфат натрия

TEABC - триэтиламмония бикарбонат

TEMED – тетраметилэтилендиамин

TFA - трифторуксусная кислота

TOF - времяпролетная

Tris - трис-(гидроксиметил)-аминометан

Оглавление

Словарь сокращений	3
Введение	5
Занятие 1. Лизис клеток и выделение белка.....	6
Занятие 2. Измерение общей концентрации белка методом Бредфорда.....	7
Занятие 3. Приготовление геля для электрофореза	9
Занятие 4. Электрофорез. Фиксация и окраска	16
Занятие 5. Выбор и вырезание белковых полос. Отмывка	19
Занятие 6. Восстановление, алкилирование и трипсинолиз.....	20
Занятие 7. Остановка трипсинолиза и экстракция пептидов.....	24
Занятие 8. MALDI-масс-спектрометрия	25
Тестовые задания.....	36
Список литературы	440

Введение

Цель данного пособия – освоение студентами пробоподготовки образцов для протеомного анализа.

Задача: Идентифицировать избранные белки из биоматериала.

Материал: культура человеческих клеток, клетки *E. coli*, плазма крови человека.

Основные этапы работы:

1. Лизис клеток, выделение белка.
2. Измерение общей концентрации белка.
3. Разделение белков на гель-электрофорезе.
4. Трипсинолиз выбранных белков.
5. Получение масс-спектров пептидов выбранных белков.
6. Идентификация белков по базам данных.

Реактивы и оборудование, необходимые на всех этапах: дистиллированная вода, пипетки объемов 1000 мкл, 100 мкл, 10 мкл и сменные носики к ним, пластиковые пробирки типа Eppendorf объема 1,5 мл, 5 мл и 15 мл.

Все этапы следует проводить в перчатках, собрав волосы и в целом придерживаться принципа чистоты и аккуратности для того, чтобы не занести контаминанты человеческих белков, в первую очередь кератина, в образцы.

Занятие 1. Лизис клеток и выделение белка

Реактивы: додецилсульфат натрия (SDS), глицерин, трис(гидроксиметил)аминометан (tris), дитиотреитол (DTT), бромфеноловый синий.

Оборудование: центрифуга с возможностью установки центробежного ускорения $g = 10\ 000$, например Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Германия); устройство для ультразвуковой обработки в небольших объемах, например Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия).

Рабочие растворы:

Лизирующий буфер:

2% (мас./об.) SDS

10% (об./об.) глицерин

60 mM tris-Cl

100 mM дитиотреитол (DTT)

Бромфеноловый синий – следовое количество (добавить после измерения концентрации белка)

Буфер можно хранить при температуре -20°C в аликвотах и размораживать 1 раз.

Выполнение:

К замороженному осадку клеток добавить 100 мкл буфера, перемешать и инкубировать в течение 20 минут. Затем на клетки воздействовать ультразвуком амплитудой 30% в течение 5 минут. После лизат отцентрифугировать 15 минут при 10000 g и собрать супернатант.

Буфер для инкубации биологического материала содержит два денатурирующих агента - додецилсульфат натрия (SDS) и дитиотреитол (DTT). SDS добавляют в раствор, т.к. гидрофобное взаимодействие его анионов с белками происходит пропорционально объему и превращает белок в полипептид с неразветвленным стержнем. Последующая обработка клеток ультразвуком используется для разрушения клеточных структур. Далее нерастворимые части осаждают центрифугированием. В надосадочной жидкости будут находиться белки.

Занятие 2. Измерение общей концентрации белка методом Бредфорда

Реактивы: Краситель Coomassie Brilliant Blue G-250, этанол, ортофосфорная кислота, бычий сывороточный альбумин (BSA).

Оборудование: бумажные фильтры; спектрофотометр, например ПЭ-5300ВИ (Экрос-Аналитика, Россия) и кюветы к нему (рекомендуются одноразовые кюветы).

Рабочие растворы:

Раствор Бредфорда: растворить 100 мг красителя в 50 мл 96% (об./об.) этанола, добавить 100 мл 85% (об./об.) фосфорной кислоты. После того, как краситель полностью растворится, довести объем водой до 1 литра. Раствор рекомендуется настаивать 5-7 дней. Хранить при температуре +4°C. Фильтровать через бумажный фильтр непосредственно перед использованием.

Измерение:

Приготовить белковые стандарты BSA и контрольную пробу. Для этого в dH₂O приготовить следующие растворы BSA (табл. 1):

Таблица 1. Приготовление белковых стандартов BSA для построения калибровочной кривой.

Раствор	Состав	Концентрация, мг/мл
A	10 мг BSA + 1 мл dH ₂ O	10
B	250 мкл A + 250 мкл dH ₂ O	5
C	250 мкл B + 250 мкл dH ₂ O	2.5
D	250 мкл C + 250 мкл dH ₂ O	1.25
E	250 мкл D + 250 мкл dH ₂ O	0.625
F	250 мкл E + 250 мкл dH ₂ O	0.312
G	250 мкл F + 250 мкл dH ₂ O	0.156
K	2 мкл dH ₂ O	0

Смешать 2 мл раствора Бредфорда с 2 мкл стандарта и анализируемого раствора (аналита). Инкубировать 5 минут. Измерить поглощение белковых стандартов и исследуемого образца при 595 нм. Построить калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации стандартов (рис. 1) в программе Excel (тип диаграммы – *точечная с гладкими кривыми и маркерами*, с построенной линией и уравнением тренда, оси должны быть подписаны). По уравнению тренда найти концентрацию белка в исследуемом образце.

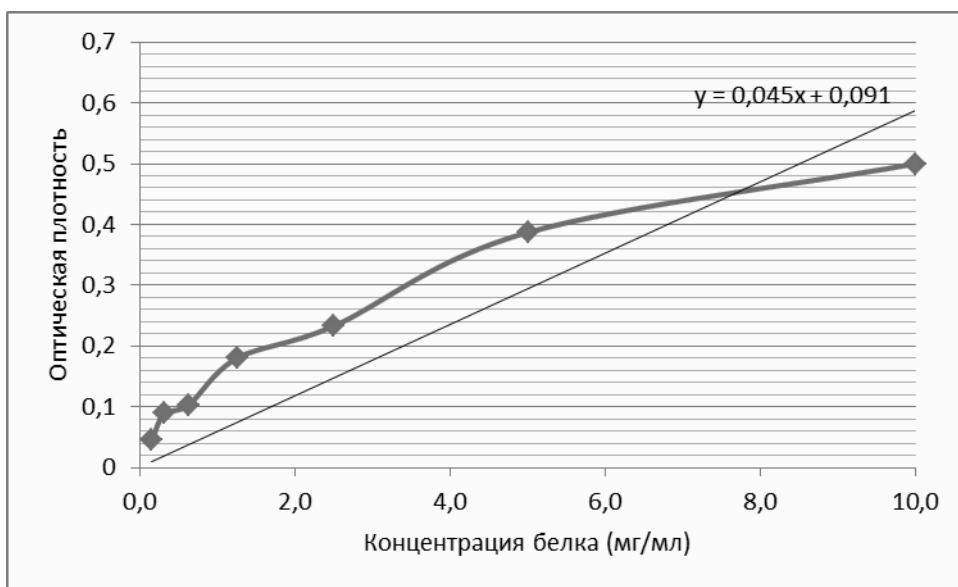


Рисунок 1. Пример графика зависимости оптической плотности от концентрации белковых стандартов.

Важно! При расчете концентрации белка в анализе следует учитывать, что BSA, ввиду своего строения, хорошо связывается с красителем Coomassie. Это делает метод Бредфорда примерно в два раза чувствительнее к чистому BSA по сравнению с «усредненной» смесью белков. В связи с этим, полученное значение концентрации белка в анализе следует умножить на 2.

Занятие 3. Приготовление геля для электрофореза

В настоящем практикуме используется наиболее распространённая разновидность электрофоретического разделения – одномерный денатурирующий диск-электрофорез белков в полиакриламидом геле (англ. SDS PAGE).

Как было указано выше, денатурация белковых молекул происходит с помощью додецилсульфата натрия (SDS) и дитиотреитола (DTT). Благодаря гидрофобному взаимодействию анионов SDS с белками отрицательный заряд распределяется пропорционально объёму молекулы и превращает белок в полипептид с неразветвленным стержнем. Таким образом, перемещение белков в геле под действием электрического поля будет происходить к противоположному заряду – от катода (-) к аноду (+). Белки, имеющие большую молекулярную массу, будут задерживаться в порах геля и иметь меньшую скорость прохождения в сравнении с белками меньшей молекулярной массы.

Диск-электрофорез (от англ. discontinuous — прерывистый) — метод разделения макромолекул, при котором используется неоднородная разделяющая система с полиакриламидным гелем. При данной модификации электрофореза создаются скачкообразные изменения концентрации геля (от чего меняется размер пор), pH и градиента напряжения, за счёт чего достигается лучшее разделение белковых молекул.

Полиакриламидный гель - продукт сополимеризации акриламида, создающего линейные продольные «цепи», и N, N'-метилденбисакриламида, служащего для поперечных «сшивок» линейных структур (рис.2).

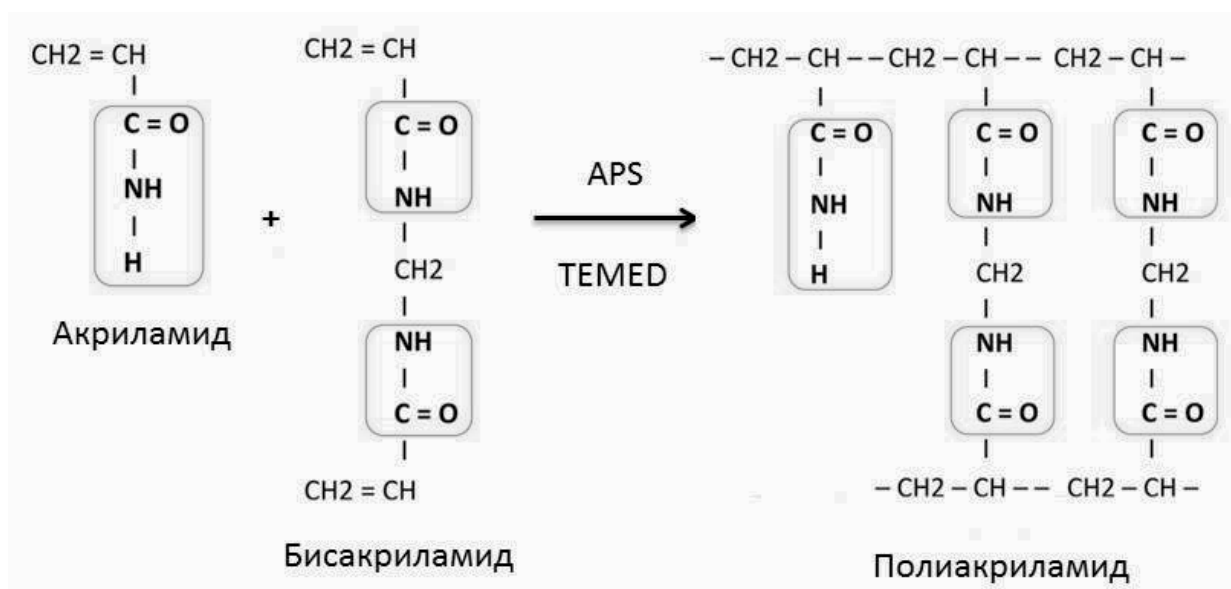


Рисунок 2. Реакция сополимеризации акриламида и N, N'-метилденбисакриламидом с образованием полиакриламида.

Для полимеризации геля нужны инициаторы и катализаторы: окислительно-восстановительные системы, т.е. источники свободных радикалов). Для этого используется система из двух компонентов:

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - персульфат аммония (APS), выступающий в качестве инициатора полимеризации

$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), выступающий как катализатор образования полиакриламида.

Реактивы: акриламид, бис-акриламид, tris, соляная кислота (HCl), персульфат аммония (APS), тетраметилэтилендиамин (TEMED), глицин, SDS, 70% (об./об.) этанол, маркер молекулярной массы (белковые стандарты для электрофореза).

Оборудование: набор оборудования для электрофореза, например фирмы Biorad, США (переднее и заднее стекло, «гребенка», зажимы и штатив для заливки, камера и блок питания); pH-метр, например Seven easy (Mettler Toledo, США); магнитная мешалка, например RH Basic (IKA, Германия).

Рабочие растворы:

Буферы:

1,5 М tris-HCl pH 8,8

0,5 М tris-HCl pH 6,8

При приготовлении tris-буферов с заданным pH следует сначала растворить соль в воде, а затем довести pH до нужного значения постепенным добавлением HCl, контролируя изменение pH при помощи pH-метра.

Раствор смеси акриламида и бисакриламида:

30% (мас./об.) акриламида

0,8% (мас./об.) N,N'-метиленбисакриламида

Электродный буфер десятикратный:

250 mM tris

1920 mM глицин

| 1% (мас./об.) SDS

Разделяющий гель (расчет на 10 мл):

Раствор смеси акриламида и бисакриламида	4 мл
1,5 M tris-HCl (pH 8,8)	2,5 мл
dH ₂ O	3,35 мл
10% (мас./об.) персульфат аммония (добавить непосредственно перед заливкой)	150 мкл ¹
TEMED (добавить непосредственно перед заливкой)	10 мкл

Концентрирующий гель (расчет на 5 мл):

Раствор смеси акриламида и бисакриламида	0,65 мл
0,5 M tris-HCl (pH 6,8)	1,25 мл
dH ₂ O	3 мл
10% (мас./об.) APS (добавить непосредственно перед заливкой)	150 мкл ¹
TEMED (добавить непосредственно перед заливкой)	10 мкл

Буфер Лэммли для нанесения образца на гель четырехкратный:

250 mM tris-Cl (pH 6,8)
10% (мас./об.) SDS
30% (об./об.) глицерин
10 mM DTT

¹ В случае использования персульфата аммония, приготовленного за неделю и ранее, его концентрацию следует увеличить в 1,5–2 раза, для ускорения процесса застывания геля.

| 0.05% (мас./об.) бромфеноловый синий

Выполнение:

Стекла и камеры для электрофореза собрать, основываясь на инструкции от производителя. Обычно вся конструкция состоит из двух стекол: наружного (высокого) и внутреннего (более короткого) и разделяющих их спейсеров, обеспечивающих щель для геля (рис. 3). При сборке стекол и камер самое важное это герметичность, гель при заливке не должен вытекать из стекол, а электродный буфер не должен вытекать из верхней камеры.

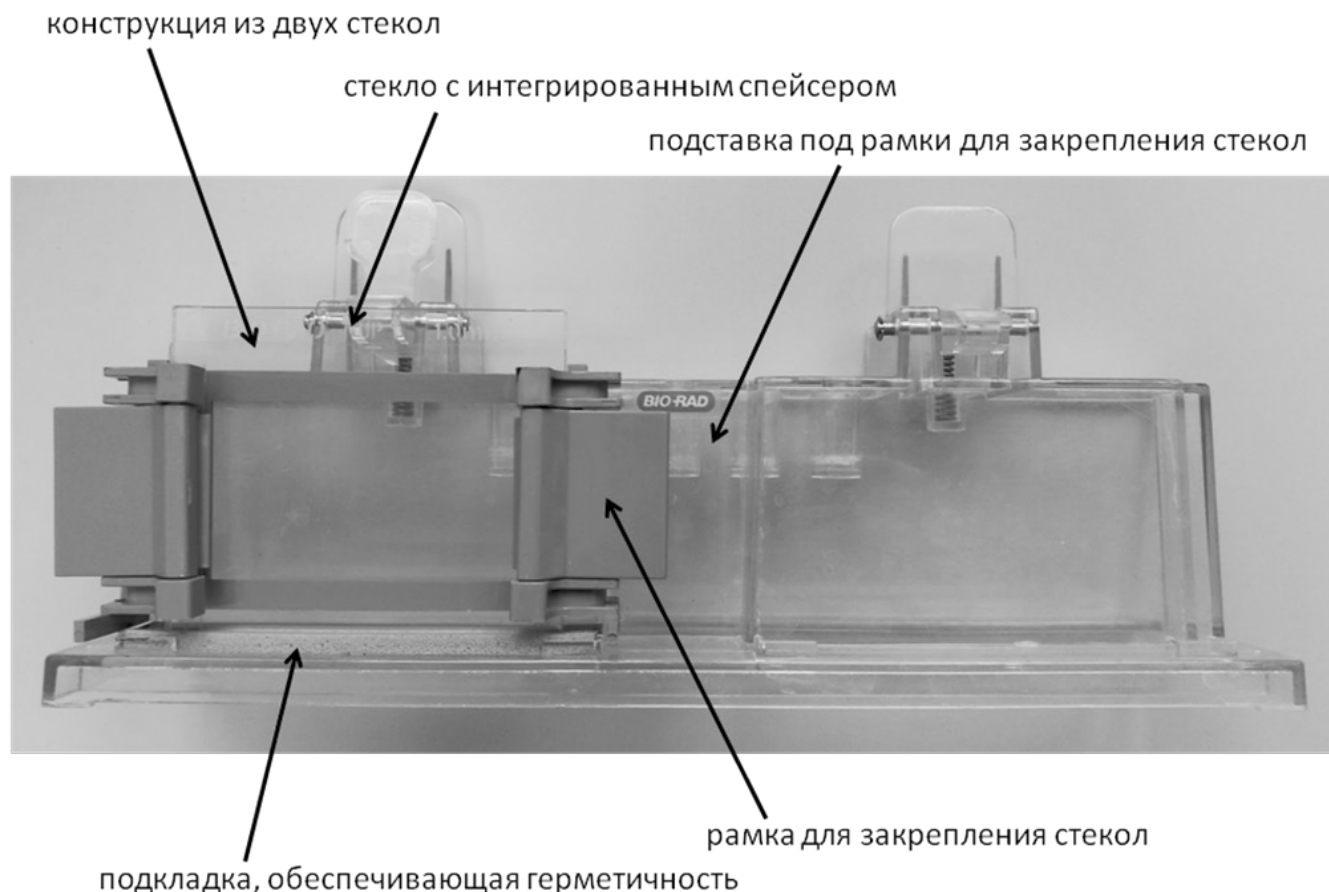


Рисунок 3. Собранная конструкция для заливки геля.

Заливка разделяющего геля. Смешать все ингредиенты разделяющего геля, далее добавить катализаторы полимеризации, персульфат аммония и TEMED, аккуратно перемешать и залить между стеклами, оставив место под гребенку и еще примерно 3 мм. Далее быстро, но очень аккуратно наслоить сверху немного (примерно 5 мм) 70% (об./об.) этанола для защиты поверхности геля от воздуха и для выравнивания

верхней границы геля. Оставить примерно на 20 минут. Полимеризацию геля можно определить визуально по образованию четкой границы между гелем и спиртом.

Заливка концентрирующего геля. После того, как разделяющий гель застыл, следует вылить спирт. Смешать все ингредиенты концентрирующего геля, добавить катализаторы, перемешать и залить раствор в оставшееся место между стеклами практически до верха. Быстро вставить гребенку. Оставить примерно на 20 минут до полного застывания.

После застывания конструкцию из соединенных стекол с залитым между ними гелем и вставленной гребенки, помещенную в dH₂O и герметично запакованную, можно хранить неделю при 4°C.

Занятие 4. Электрофорез. Фиксация и окраска

Нанесение образцов на гель.

После полимеризации (или хранения при вышеуказанных условиях) следует вынуть из геля гребенку и поместить конструкцию из соединенных стекол с залитым между ними гелем в камеру для фореа. В верхнюю камеру для буфера залить электродный буфер, и в нем наносить образцы на гель. В образцы, содержащие лизированные культуры клеток, следует добавить немного красителя бромфенолового синего. Для этого может понадобиться развести его отдельно буфером для нанесения до достижения насыщенного темно-синего цвета. В каждый образец добавить 1-2 мкл красителя в зависимости от объема образцов. Краситель нужен для визуализации фронта в ходе электрофореза. В образцы плазмы перед нанесением на гель следует добавить буфер Лэммли в соотношении 1:4 (объем буфера для нанесения/объем исследуемого образца). Объем образцов следует подбирать исходя из концентрации в них белка так, чтобы в каждой дорожке оказалось примерно 10-50 мкг белка. При этом стоит измерить размер карманов и оценить, поместится ли предполагаемый объем образца в карман. Образцы наносить пипеткой с самым тонким носиком в карманы, не забыть записать порядок, в котором наносили образцы.

В первый или последний карман нанести 5 мкл смеси маркеров молекулярной массы.

В камеру для электрофореза залить электродный буфер.

Аккуратно перенести камеру со стеклами в камеру для электрофореза, закрыть крышку, правильно совместив электроды. Обратить внимание на полярность электродов. Включить блок питания и выбрать программу подачи тока. Для стандартных гелей 1 мм в толщину рекомендуется следующая программа:

1. Вхождение белков в концентрирующий гель. Напряжение 50 В – 10 минут.
2. Белки в концентрирующем геле. Напряжение 100 В – 10 мин.
3. Вхождение белков в разделяющий гель. Напряжение 150 В – 10 мин.
4. Белки вошли в разделяющий гель. Напряжение 200 В – до достижения фронтом конца геля, примерно 30 минут.

Фиксация и окраска

(выполняется в тот же день, что и электрофорез)

Реактивы: этанол, уксусная кислота, краситель Coomassie R-250.

Оборудование: ванночки для гелей; орбитальный шейкер («качалка»), например KS 260 basic (Ika, Германия); бумажные фильтры.

Буферы:

Фиксатор:

10% (об./об.) уксусная кислота

20% (об./об.) этиловый спирт

Раствор для окрашивания:

0.1% (мас./об.) краситель Coomassie Brilliant Blue R-250

10% (об./об.) уксусная кислота

20% (об./об.) этанол

Растворить 0.4г красителя Coomassie Brilliant Blue R-250 в 200 мл 40% (об./об.) этанола. Отфильтровать раствор через бумажный фильтр. Добавить 200 мл 20% (об./об.) уксусной кислоты. Этот раствор следует готовить заранее, настаивать не менее суток и можно использовать повторно в течение нескольких лет.

Раствор для отмывки: 10% (об./об.) уксусная кислота.

Раствор для хранения: 2% (об./об.) уксусная кислота.

Выполнение:

Фиксация. По окончании электрофореза, соединенные стекла с залитым между ними гелем вынуть, верхний буфер вылить и аккуратно раскрыть стекла и перенести гель ванну с фиксатором. Оставить на 15 минут на шейкере, затем слить фиксатор, залить новый и оставить еще на 15 минут.

Окрашивание. Вылить фиксатор и залить краситель. Оставить на 20 минут. Вылить краситель обратно в банку и залить раствор для отмывки.

Отмывка. Когда цвет раствора сравнивается с цветом фона геля, раствор следует сменить на новый. Так повторять до тех пор, пока фон геля не станет прозрачным и бесцветным. После второй смены, гель в растворе для отмывки можно оставить на ночь.

Хранение. Гель можно хранить до 1 недели при температуре 4°C в 2% (об./об.) уксусной кислоте.

Занятие 5. Выбор и вырезание белковых полос. Отмывка

Реактивы: уксусная кислота, этанол, гидрокарбонат аммония, ацетонитрил.

Оборудование: стекло; бритвенное лезвие или скальпель; глазные ножницы; мини-ротатор, например Bio RS-24 (Biosan, Латвия); термошейкер, например TS-100C (Biosan, Латвия).

Рабочие растворы:

Раствор для отмывки от SDS:

40% (об./об.) этиловый спирт

10% (об./об.) уксусная кислота

Раствор для обесцвечивания:

100 мМ гидрокарбонат аммония

10% (об./об.) ацетонитрил

Выполнение:

Вынуть гель и положить на чистое стекло. Вырезать интересующие белковые полосы бритвой или скальпелем и разложить по пробиркам с 2% (об./об.) уксусной кислотой.

Далее следует порезать гель на более мелкие кусочки чистыми ножницами в пробирке. Кусочки должны быть такого размера, чтобы они не проникали в носик от пипетки и не застревали там.

Уксусную кислоту следует убрать из пробирки, залить кусочки геля раствором для отмывки от SDS и поставить на шейкер на 15 минут. Таких смен следует сделать три. Далее сменить раствор на раствор для отмывки от Coomassie R-250 и отмывать в 3 смены по 15 минут при 60°C до обесцвечивания геля.

Занятие 6. Восстановление, алкилирование и трипсинолиз

Реактивы: триэтиламмония бикарбонат (TEABC), дитиотреитол (DTT), трипсин, муравьиная кислота, гидрокарбонат аммония, йодоацетамид, ацетонитрил.

Оборудование: мини-ротатор, например Bio RS-24 (Biosan, Латвия); термостат или термошейкер, например TS-100C (Biosan, Латвия); лакмусовая бумага.

Рабочие растворы:

Раствор для восстановления:

60 мМ DTT

в 100 мМ растворе гидрокарбоната аммония

Раствор для алкилирования: 50 мМ йодоацетамид в 100 мМ растворе гидрокарбоната аммония (NH_4HCO_3)

Буфер для отмывки: 100 мМ раствор гидрокарбоната аммония

Раствор для сушки: 50% (об./об.) ацетонитрил в 50 мМ растворе гидрокарбоната аммония

Буфер для трипсинолиза: трипсин в отношении 1:40 по массе к общему белку в образце в 50 мМ TEABC

Выполнение:

Восстановление:

Т.к. структура белка, стабилизированная дисульфидными связями, является устойчивой к действию SDS и протеолитических ферментов, эти связи нужно восстановить дитиотреитолом для последующего образования стабильных производных цистеина.

Добавить в пробирку с кусочками геля раствор для восстановления. По истечении 30 минут раствор слить.

Алкилирование:

Целью алкилирования является введение в молекулу белка алкильного радикала для образования стабильных производных цистеина.

Молекулы белка с восстановленными дисульфидными связями взаимодействуют с йодацетамидом, как показано на рис. 4.

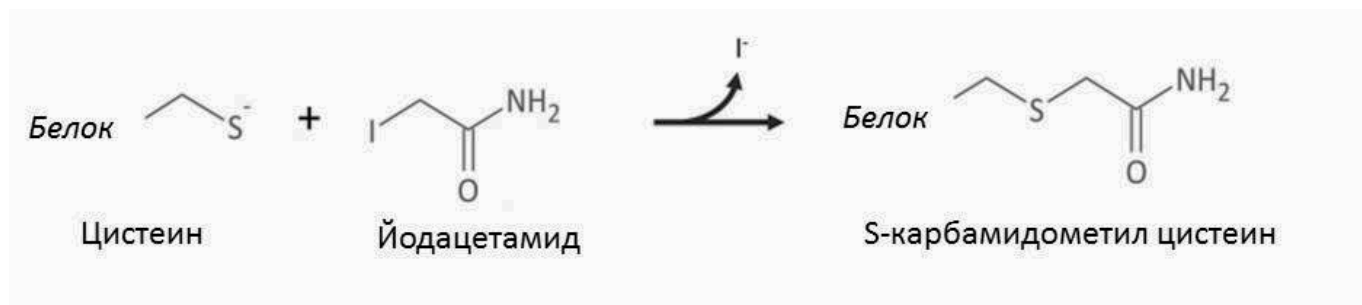


Рисунок 4. Реакция карбамидометилирования цистеина.

При электрофоретическом разделении происходит частичное взаимодействие белка с компонентом геля – акриламидом, стабилизируя таким образом участки с восстановленными дисульфидными связями (рис.5).

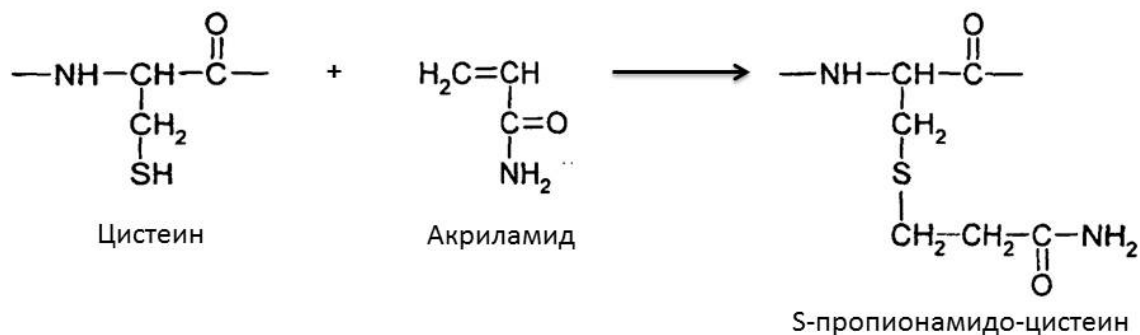


Рисунок 5. Реакция пропионамидирования цистеина.

Добавить в пробирку с кусочками геля раствор для алкилирования. Инкубировать 30 минут в темноте. Раствор слить.

Выполнение этапов восстановления и алкилирования является опциональным, т.к. полиакриламидный гель может выполнять роль алкилирующего агента, а восстановление при помощи DTT происходит в процессе выделения белков и разделения их с помощью электрофореза (буфер Лэммли для нанесения образца на гель содержит DTT). Таким образом, после обесцвечивания геля, можно сразу приступить этапу отмывки.

Отмывка:

Залить гели раствором 100 мМ гидрокарбоната аммония и оставить на 10 минут. По истечении времени раствор слить. Повторить дважды.

Сушка. Визуально оценить объем геля в каждом образце. Это понадобится для оценки нужного объема буфера для трипсинолиза. Кусочки геля залить 50% (об./об.) ацетонитрилом в 50 мМ гидрокарбонат аммония на 15 минут. Далее убрать раствор и залить кусочки 100% (об./об.) ацетонитрилом. После того как кусочки побелели, убрать раствор и оставить пробирки открытыми до полного высыхания кусочков.

Расчет и приготовление трипсина. Разморозить пузырек с трипсином и буфер для разведения трипсина (прилагается в комплекте с реагентом). Залить трипсин 100 мкл буфера и очень аккуратно пипетировать до полного растворения и смывания трипсина со стенок пузырька. В результате получается стоковый раствор трипсина с концентрацией 200 нг/мкл. Разделить раствор трипсина на аликвоты, оставив нужное количество (расчет см. ниже), остальное заморозить на -20°C и использовать в течение не более 2 недель. Трипсин наиболее активен при pH 7,8-8,0 и температуре примерно 37°C. Поэтому хранят трипсин в кислом растворе, а для самой реакции применяют буфер, имеющий более высокий показатель pH.

Рассчитать количество необходимого трипсина. Зная массу белка в каждом образце, следует рассчитать массу трипсина, необходимого для гидролиза этого белка из расчета 1:40 (трипсин: белок). Далее, руководствуясь знаниями о необходимом количестве трипсина в нанограммах и объеме геля перед сушкой, надо рассчитать, сколько микролитров стокового раствора трипсина надо добавить в какой объем 50мМ TEABC для получения рабочего раствора. При этом не стоит забывать про то, что конечный раствор должен примерно соответствовать оптимальным значениям pH для того, чтобы трипсин в нем был активен. Для большей уверенности следует оценить pH получившихся растворов при помощи лакмусовой бумаги. Работать следует быстро, так как при попадании трипсина в щелочной буфер, вскоре начинается процесс автолиза трипсина, и вместо целевых белков фермент начинает расщеплять сам себя.

Трипсинолиз

Трипсин специфически расщепляет пептидные связи по карбоксильной группе лизина и аргинина, т. е. типа -Lys-X- и -Arg-X-. Однако специфичность фермента не абсолютна, например фрагменты -Lys-Pro- и -Arg-Pro- устойчивы к действию трипсина. В результате гидролиза (трипсинолиза) получается набор триптических пептидов массой от 500 до 4000 Да.

Приготовленный раствор капнуть пипеткой непосредственно на кусочки геля. Поставить в холодильник на 5-7 минут, чтобы дать раствору впитаться в гель прежде, чем начнется реакция. Далее перенести в термостат или термошейкер на 37°C и оставить на ночь.

Занятие 7. Остановка трипсинолиза и экстракция пептидов

Реактивы: трифторуксусная кислота (TFA)

Рабочие растворы: 0,7% TFA

Выполнение:

Остановите трипсинолиз, добавив в пробирку 7 мкл 0,7 % раствора TFA. Проинкубируйте пробирку при комнатной температуре 2 часа. Надгелевый раствор используйте для получения MALDI-масс-спектров.

Занятие 8. Масс-спектрометрия MALDI-TOF

MALDI-TOF – метод лазерной десорбции/ионизации из объема специального вещества – матрицы, с времяпролетным детектором (от англ. MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization и TOF, time of flight).

Принципы метода, известного как пептидное картирование (fingerprint в англоязычной литературе), состоят в следующем:

После расщепления образца из геля протеазой (трипсином) и получения набора триптических пептидов проводится анализ методом MALDI-TOF. Затем происходит экспериментальное определение молекулярных масс пептидов. Следующий этап - виртуальный гидролиз трипсином всех белков в базе данных для конкретного изучаемого организма и вычисление массы этих пептидов. В заключение происходит установление соответствия между предсказанными массами и молекулярными массами, полученными экспериментально. Считается, что получено полное соответствие, если несколько экспериментальных пептидов соответствуют одному и тому же белку в базе данных.

Реактивы: трифторуксусная кислота (TFA), 2,5-дигидроксibenзойная кислота (DHB), ацетонитрил.

Рабочие растворы:

Раствор матрицы:

Матрица MALDI – вещество, обладающие низкой энергией десорбции и ионизации, обеспечивающее низкую энергию ионизацию сокристаллизованных с ним анализируемых веществ, так называемую «мягкую» ионизацию. Известно несколько десятков веществ обладающих такими свойствами.

10 мкг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты

50% (об./об.) ацетонитрил

3% (об./об.) TFA

Оборудование: масс-спектрометр Ultraflex II TOF/TOF, Bruker Daltonics, США

Программное обеспечение: Bruker Flex Control. Bruker FlexAnalysis, сервер Mascot Search

Подготовка образцов для масс-спектрометрического исследования

Приготовьте раствор матрицы. Нанесите на мишень 1 мкл раствора матрицы с помощью пипетки. Тщательно перемешайте раствор в пробирке с гелем и добавьте 1 мкл надгелевого раствора к еще не высохшей капле раствора матрицы на мишени. Дождитесь, пока высохнет смесь матрицы и образца, нанесенных на мишень (приблизительно 20 минут при комнатной температуре). Вставьте масс-спектрометрическую мишень в масс-спектрометр Ultraflex для этого:

Нажмите кнопку ***Load/Enject*** на корпусе масс-спектрометра (рис. 6).

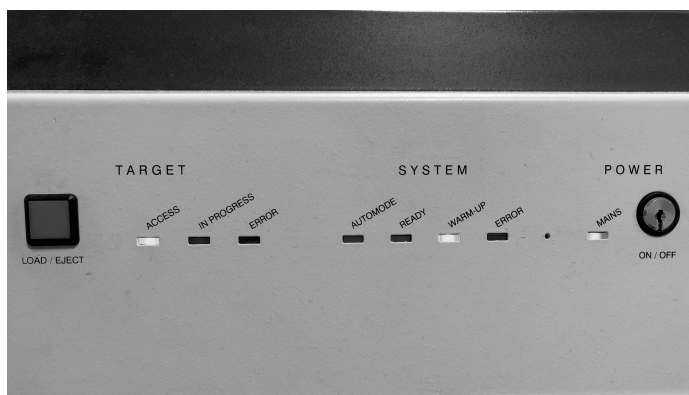


Рисунок 6. Корпус масс-спектрометра.

Дождитесь, когда загорится зеленая индикаторная лампочка “Access” (рис. 6).

Поднимите ручку шлюза в горизонтальное положение, после чего откройте дверку шлюза, переведя ее в горизонтальное положение.



Рисунок 7. Лоток манипулятора шлюза.

Установите мишень в шлюз (рис. 7) и нажмите кнопку Load/Enject еще раз. Подождите пока завершиться процесс перемещения мишени в ионный источник.

Запустите программу **Flex Control** управления масс-спектрометром на управляющем компьютере масс-спектрометра. О готовности прибора к работе будут свидетельствовать зеленые прямоугольные флажки **Sample IN** и **System Ready** в верхнем левом углу окна программы Bruker Flex Control.

Если в течение продолжительного времени прямоугольные флажки остаются окрашенными в желтый или красный цвет обратитесь к руководителю практической работы.

На закладке **Sample Selection** выберите ту позицию на мишени, на которой нанесен образец. Курсором мышки наведите на выбранную вами ячейку, например, A1 (рис. 8).

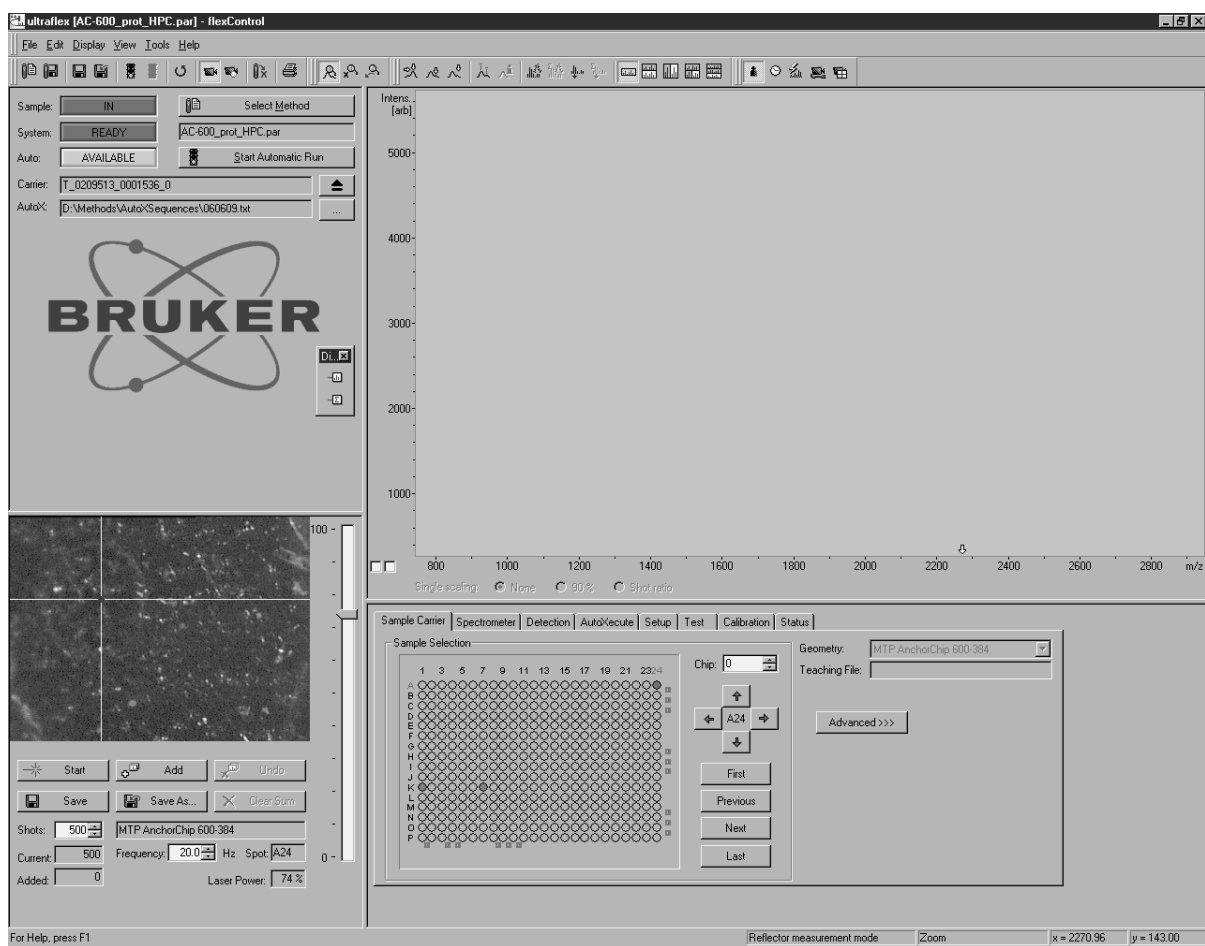


Рисунок 8. Выбор позиции на мишени.

Нажмите кнопку **Select Method**, вызовите меню выбора метода (режима) работы прибора и выберите метод RP_Proteomics.par. Этот метод означает, что съемка спектров будет проходить в рефлекторном режиме в диапазоне масс от 700 до 5000 Да.

Выберите с помощью мышки конкретный участок образца, для регистрации спектра в окне видеомонитора. Нажмите кнопку **Start** в главном окне Bruker_FlexControl.

Вы увидите накапливающийся спектр (рис. 9).

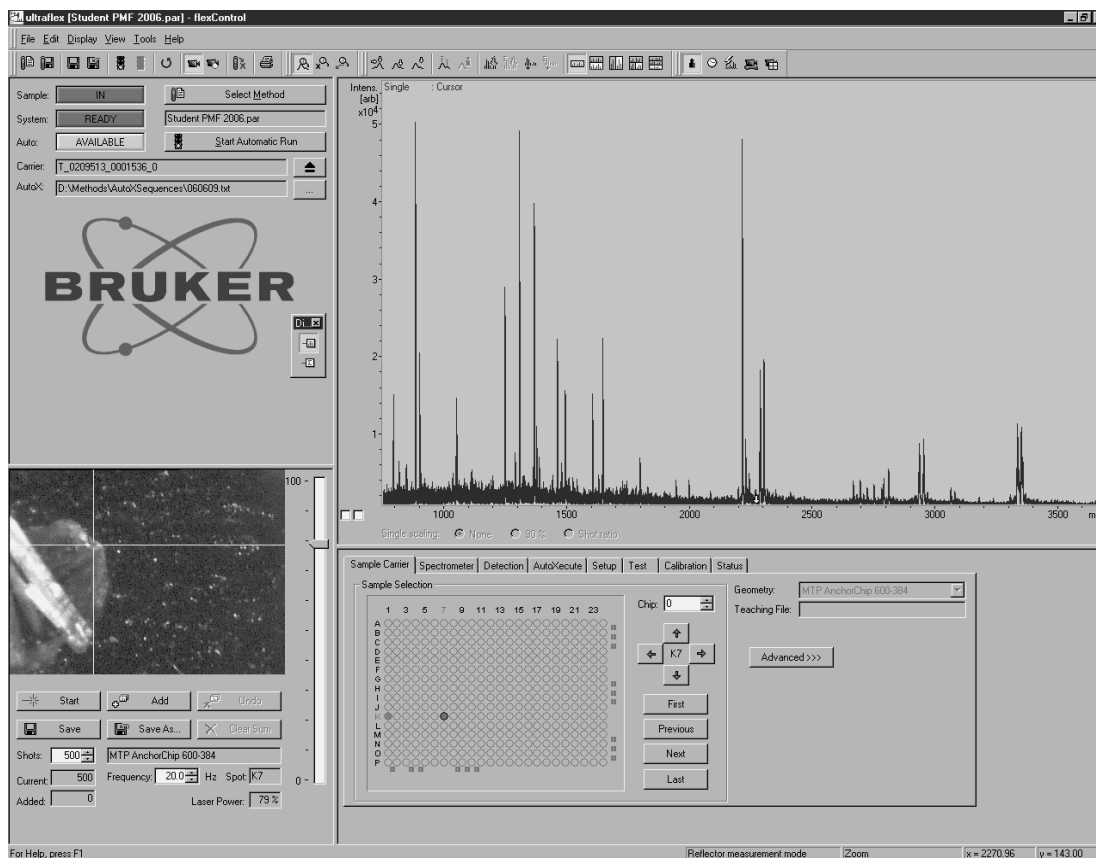


Рисунок 9. Накапливающий спектр.

Наилучшего результата соотношения интенсивности сигналов и разрешения можно добиться, регулируя мышкой мощность лазера. Увеличить выбранный вами пептидный пик можно с помощью инструмента Zoom на мышке компьютера (рис 10).

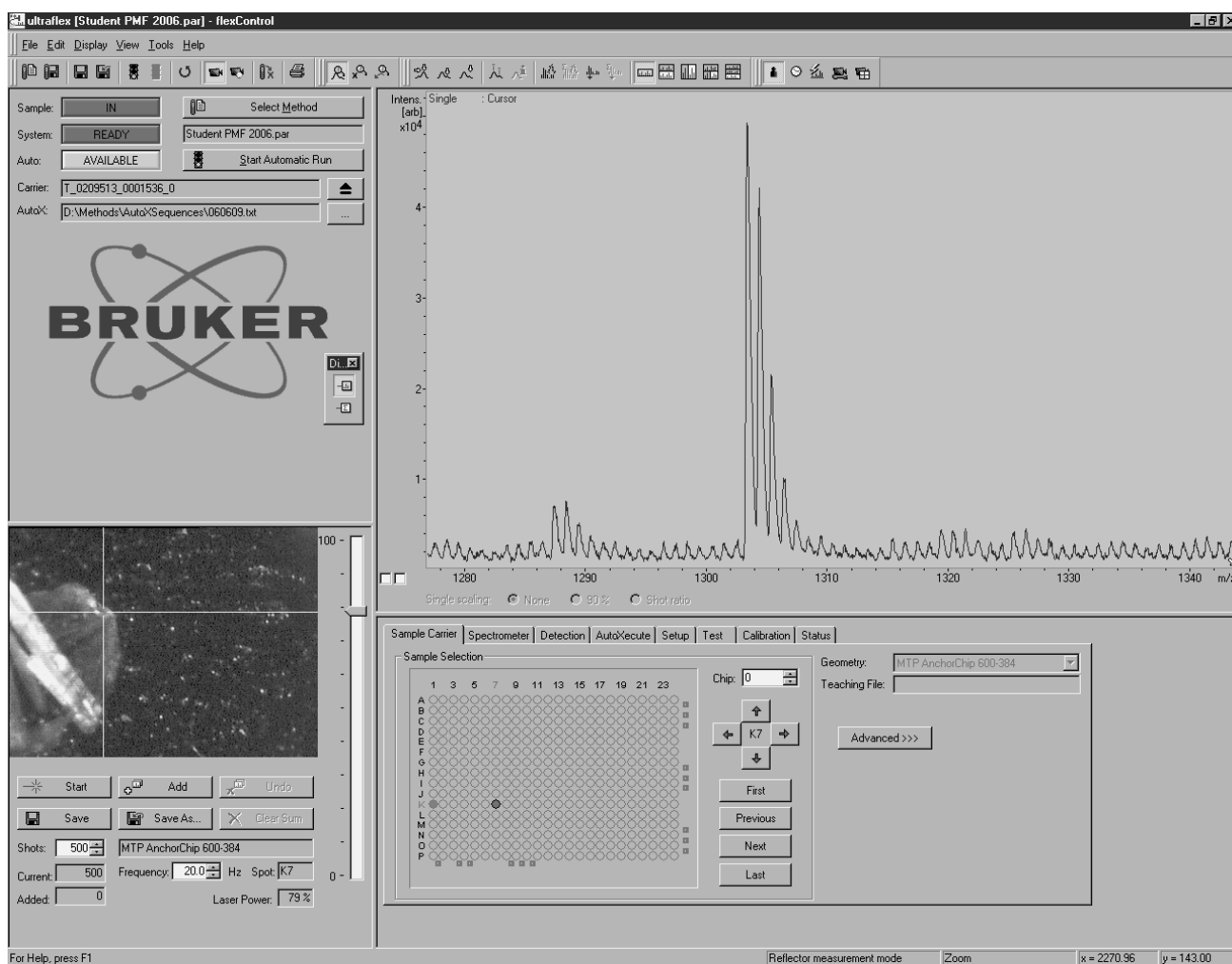


Рисунок 10. Увеличение выбранного пептидного пика.

Обработка спектров

Сохраните те спектры, которые считаете достаточно хорошими в директории /Student/_ Ваша фамилия. Воспользуйтесь кнопкой **Save As**.

Выберите инструмент разметки спектров. Произведите разметку основных сигналов в спектре.

Осуществите калибровку спектра по сигналам пептидов автолиза трипсина. Основными сигналами автолиза трипсина являются массы пептидов 842, 1045, 2211 Да. Воспользуйтесь для этого инструментом “внутренняя калибровка” (**Calibrate – Internal**) (рис. 11).

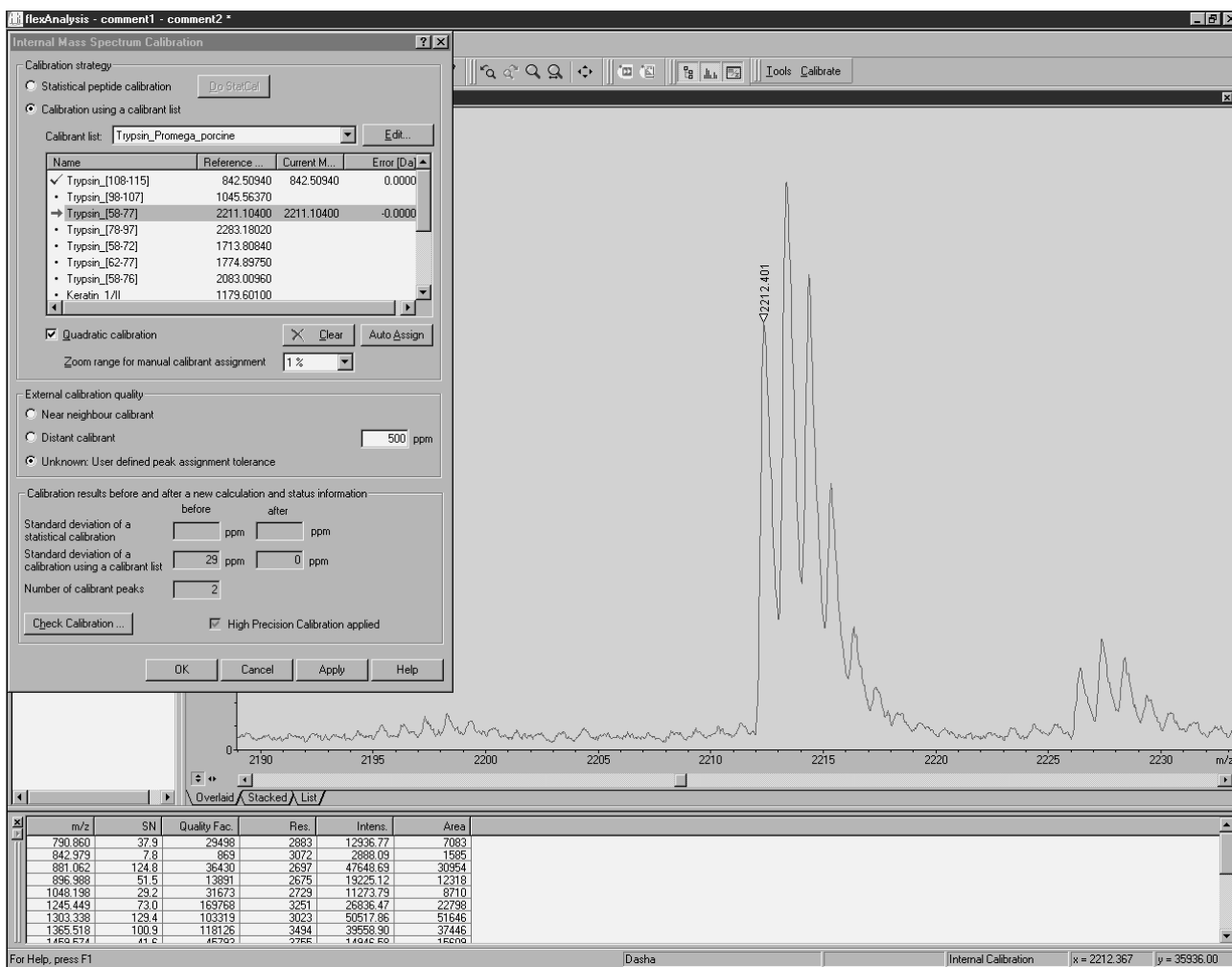


Рисунок 11. Калибровка спектра по сигналам пептидов автолиза трипсина.

Для обработки зарегистрированного спектра запустите программу Bruker Flex Analysis и откройте снятые вами спектры.

Сохраните те спектры, которые считаете достаточно хорошими, в директории Student_ Ваша фамилия, воспользовавшись кнопкой **Save As**.

В случае разметки недостаточного количества пиков, разметка пиков происходит вручную. Внизу (рис. 12) вы сможете увидеть помеченные пептидные пики.

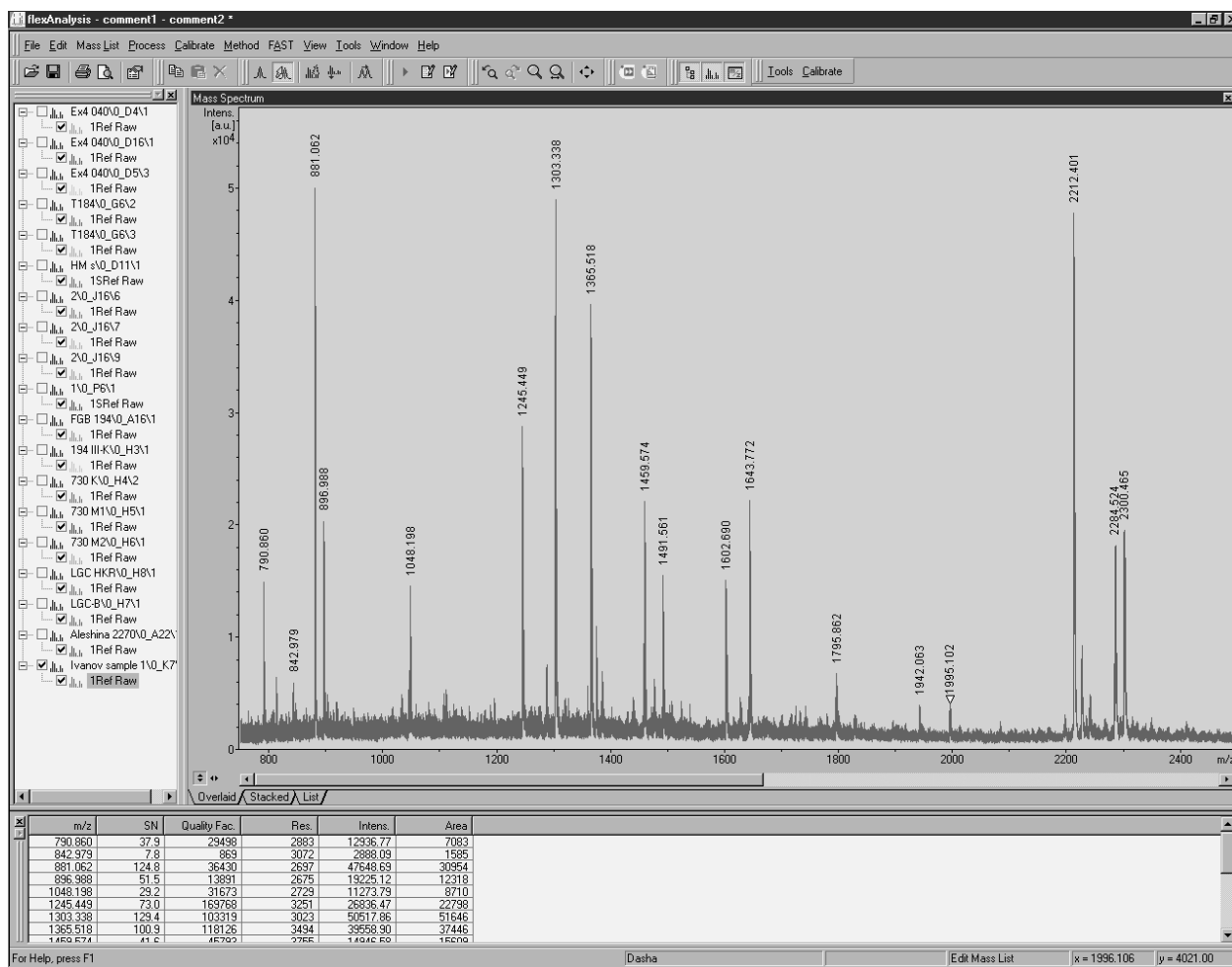


Рисунок 12. Ручная разметка пиков.

Идентификация белка с использованием программы Mascot

Откройте окно запроса Mascot Peptide Mass Fingerprint на локальном или удаленном сервере Mascot.

Скопируйте в программе Bruker Flex Analysis список пептидных масс и поместите его в графу **Query** окна запроса Mascot (рис. 13). Выберите необходимую базу данных, укажите вид организма (или поиск во всех известных геномах). Используемый фермент (трипсин) и точность, с которой было осуществлено измерение молекулярных масс. В качестве фиксированных модификаций («*Fixed modifications*») выберите карбамидометилирование цистеина (*Carbamidomethyl (C)*) и пропионамидирование цистеина (*Propionamide (C)*). В качестве

вариабельных модификаций («Variable modifications») выберите окисление метионина (Oxidation (M)).

Удалите из списка массы известные вам как контаминантные массы (трипсин и кератин).

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name Email

Search title

Database(s)

Environmental_EST
Fungi_EST
Human_EST
Invertebrates_EST
Mammals_EST

 Enzyme

Trypsin

Allow up to

1

 missed cleavages

Taxonomy

All entries

Fixed modifications

--- none selected ---

>

<

Acetyl (K)
Acetyl (N-term)
Acetyl (Protein N-term)
Amidated (C-term)
Amidated (Protein C-term)
Ammonia-loss (N-term C)
Biotin (K)
Biotin (N-term)
Carbamidomethyl (C)
Carbamyl (K)
Carbamyl (N-term)

Display all modifications ☐

Variable modifications

Oxidation (M)
Propionamide (C)

>

<

Protein mass kDa Peptide tol.

±

70

ppm

Mass values ☒ MH⁺ ☐ M, ☐ M-H⁻ Monoisotopic ☒ Average ☐

Data file

Query

812.318560	3922.3408
904.384059	16657.7039
978.534852	12585.7150
1000.529252	4024.2319
1179.577490	25673.0915
1180.561969	71069.0424

Decoy ☐ Report top

20

 hits

Рисунок 13. Окно запроса Mascot.

Нажмите кнопку “***Start Search***”. Через 1-2 мин. Вы увидите результаты поиска в базе данных, выполненные системой Mascot (рис. 14).

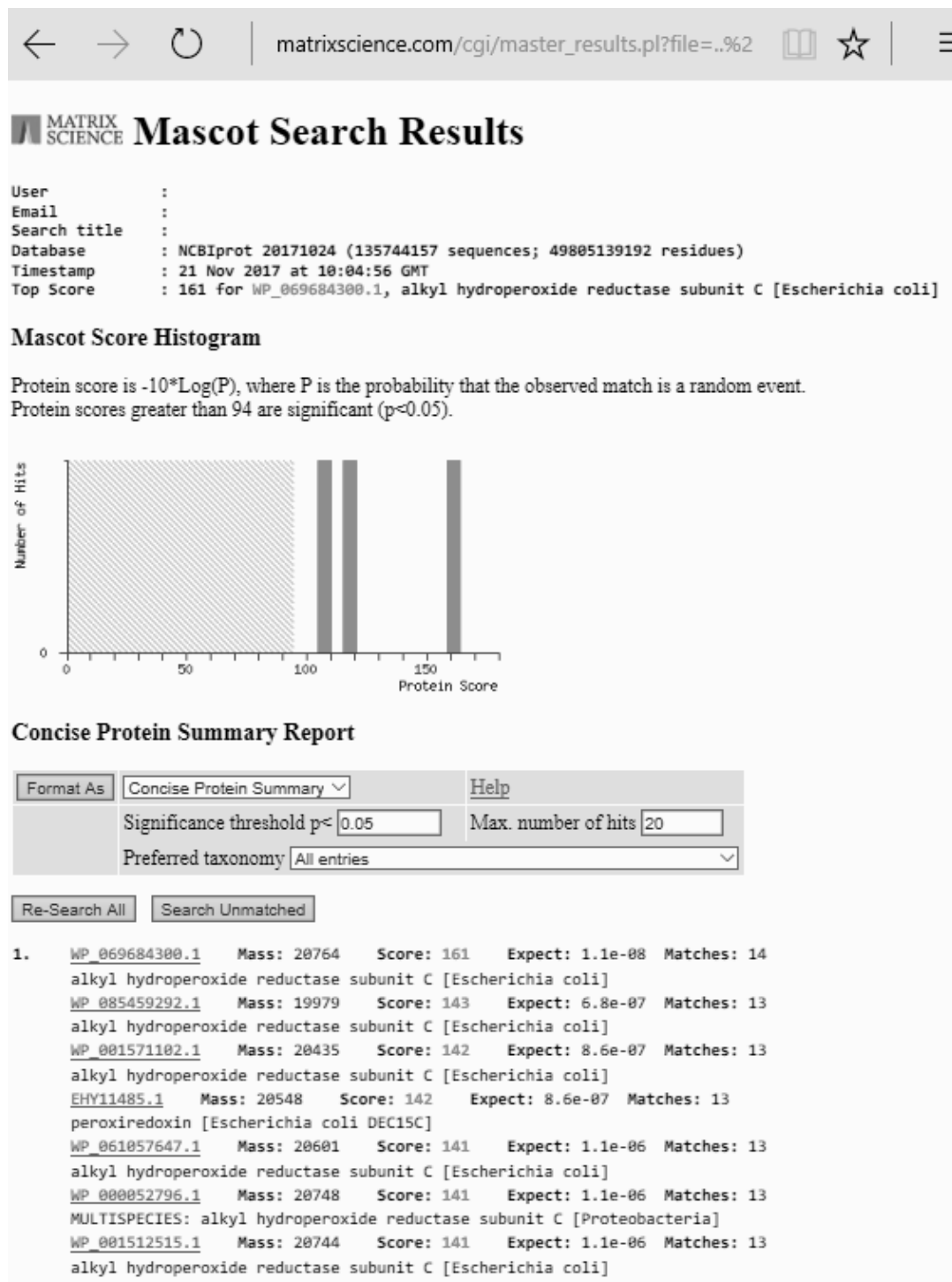


Рисунок 14. Результаты поиска в базе данных.

Щелкнув на ссылку “*Protein Summary Report*” вы сможете увидеть более подробные результаты поиска (рис. 15).

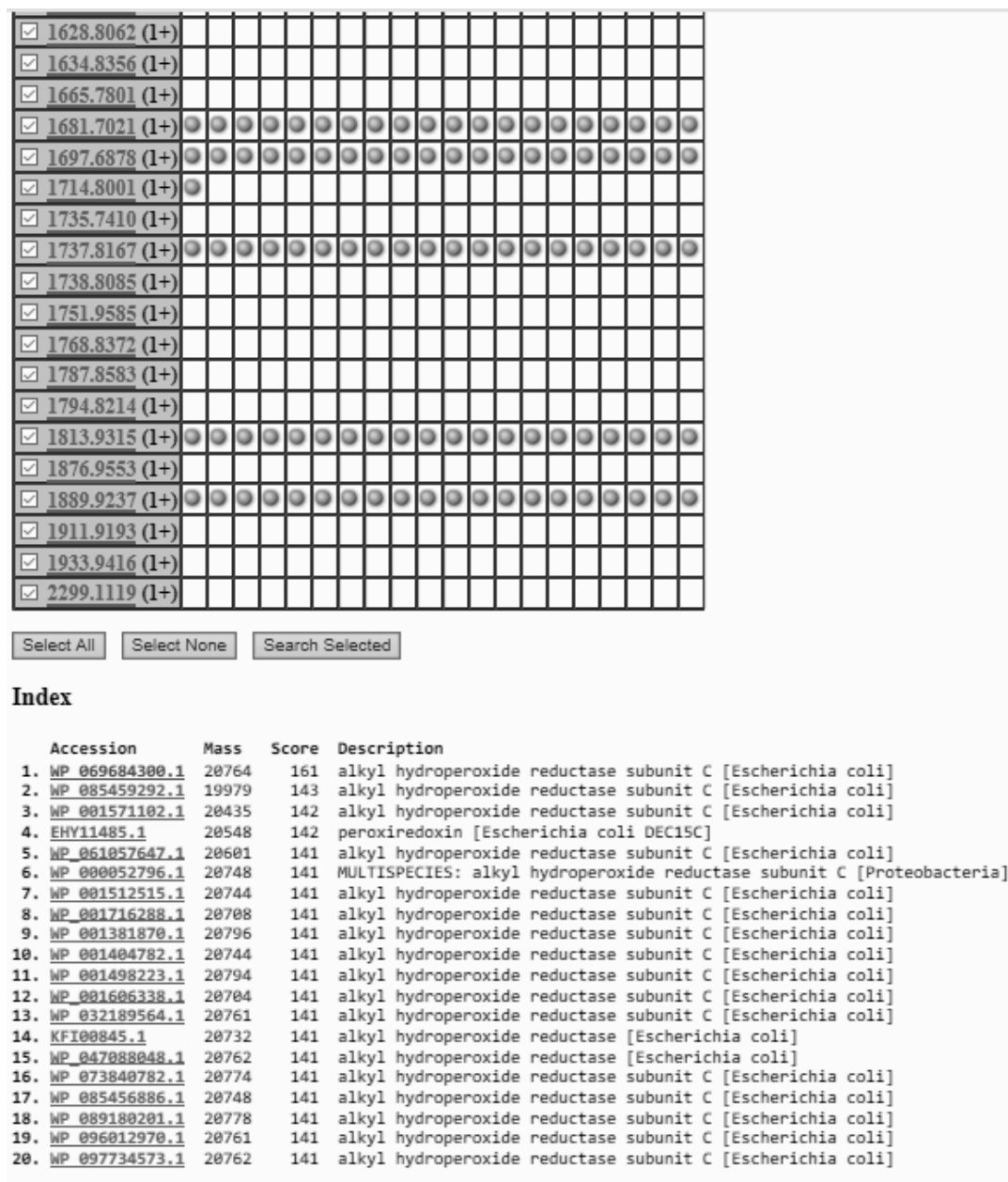


Рисунок 15. Результаты поиска, полученные при переходе по ссылке “*Protein Summary Report*”. Зелеными шарами обозначена принадлежность конкретных пептидных масс определенному белку. Если пептидные массы не отмечены шариками, то они принадлежат либо контаминантам (кератину), либо трипсину. Например массы 1794,82 и 1993,94 Да – продукты гидролиза кератина, 2299,11 Да – продукт аутолиза трипсина.

Через 1-2 мин. вы увидите результаты поиска в базах данных выполненные системой Mascot. Полученные результаты сохраняются путем нажатия file/save as в главном окне в выбранной вами папке.

Тестовые задания

Занятие 1

1. Перчатки и собранные волосы при выполнении протеомного анализа необходимы в первую очередь: (1 вариант ответа (ВО))

- А) чтобы защититься от вреда воздействия реактивов на волосы и кожные покровы
- Б) для удобства выполнения всех действий
- В) чтобы не занести контаминанты человеческих белков, в первую очередь кератина, в образцы
- Г) если речь идет про образцы тканей и культуры клеток человека, то перчатки и собранные волосы не обязательны.

2. Расставьте этапы протеомного анализа в правильном порядке:

1. Трипсинолиз выбранных белков.
2. Лизис клеток, выделение белка.
3. Получение масс-спектров пептидов выбранных белков.
4. Идентификация белков по базам данных.
5. Разделение белков на гель-электрофорезе.
6. Измерение общей концентрации белка.

3. Супернатант, образовавшийся в результате центрифугирования – это (1 ВО)

- А) надосадочная жидкость
- Б) сухой остаток
- В) преципитат
- Г) все содержимое пробирки

Занятие 2

4. Почему метод Бредфорда примерно в два раза чувствительнее к чистому BSA по сравнению с «усредненной» смесью белков? (1 ВО)

- А) BSA, ввиду своего строения, *хорошо* связывается с красителем Coomassie
- Б) BSA, ввиду своего строения, *плохо* связывается с красителем Coomassie

- В) «усредненная» смесь белков не может связываться с красителем
- Г) нет верного утверждения

5. Если для измерения оптической плотности дана только 1 кювета, каким образом стоит проводить измерения? (1 ВО)

- А) От наибольшей концентрации к наименьшей
- Б) От наименьшей концентрации к наибольшей
- В) не важно
- Г) От наименьшей концентрации к наибольшей, контрольная проба в последнюю очередь

6. Каким образом после инкубации раствора Бредфорда с анализируемым веществом можно отличить концентрацию одного аналита от другого? (1 ВО)

- А) По степени окраски: от светло-синей до насыщено-фиолетовой
- Б) По степени окраски: от ярко-оранжевой до темно-бордовой
- В) По наличию осадка: в пробах с наибольшей концентрацией аналита много осадка
- Г) Никак не отличить.

Занятие 3

7. Присутствие додецилсульфата натрия в пробах для электрофоретического разделения белков связано с тем, что он...(1 ВО)

- А) препятствует денатурации молекул
- Б) поддерживает определенный pH
- В) выступает как сильный ионный детергент
- Г) способствует полимеризации геля

8. За счёт чего достигается лучшее разделение белковых молекул при диск-электрофорезе в сравнении с «классическим» методом? (1 ВО)

- А) за счет особой техники нанесения образца на гель
- Б) разделение белков при диск-электрофорезе хуже, чем при использовании «классического» метода
- В) за счет создания градиента pH

Г) за счет разницы температур для застывания гелей

9. Тетраметилэтилендиамин (TEMED) при приготовлении гелей применяется для... (2 ВО)

А) замедления полимеризации акриламидного геля

Б) ускорения полимеризации акриламидного геля

В) остановки полимеризации акриламидного геля

Г) ускорения восстановления персульфата аммония

10. Персульфат аммония, добавленный при приготовлении гелей, выступает как: (2 ВО)

А) источник свободных радикалов

Б) детергент

В) замедлитель полимеризации акриламида

Г) инициатор полимеризации акриламида

Занятие 4

11. Объем образцов следует подбирать исходя из концентрации в них белка так, чтобы в каждой дорожке оказалось примерно...(1 ВО)

А) 0,5-5 мкг белка

Б) 100 мкг белка

В) 200 мкг белка

Г) 10-50 мкг белка

12. Зачем в образцы для проведения электрофореза добавляется краситель? (1 ВО)

А) для оценки концентрации белков, нанесенных в каждый карман

Б) для визуализации фронта в ходе электрофореза

В) для равномерности прохождения белков в геле

Г) краситель не нужен

13. Расположение белков в геле после диск-электрофореза в соответствии с их молекулярной массой: (1 ВО)

- А) на верхней части геля «тяжелые» белки, снизу – «легкие»
- Б) на верхней части геля «легкие» белки, снизу – «тяжелые»
- В) белки разделяются только по заряду, масса не влияет на скорость прохождения в геле
- Г) все белки одного образца концентрируются в одной точке в нижней части концентрирующего геля

Занятие 5

14. Обработка геля раствором, содержащим 10% (об./об.) уксусную кислоту и 20% (об./об.) этиловый спирт, нужна: (1 ВО)

- А) для вымывания белка
- Б) для предотвращения размывания полос и вымывания белка
- В) для окраски геля
- Г) для хранения геля

15. Цвет фона геля после отмывки от Coomassie должен быть: (1 ВО)

- А) голубым
- Б) прозрачным и бесцветным
- В) красным
- Г) светло-оранжевым

16. Как долго и при каких условиях можно хранить гель перед этапом вырезания белковых полос? (1 ВО)

- А) хранить нельзя. Следующий этап начинают в тот же день.
- Б) примерно неделю при температуре 4°C
- В) 1-2 месяца при комнатной температуре
- Г) примерно неделю при температуре 35°C

Занятие 6

17. На каком из этапов работы перчатки не потребуются? (1 ВО)

- А) на этапе фиксации и окраски геля
- Б) на этапе взвешивания реактивов, необходимых для работы
- В) на этапе выбора и вырезания белковых полос
- Г) перчатки обязательны на всех этапах работы

18. Какого размера должны быть куски геля после его нарезания? (1 ВО)

- А) чтобы они могли пролезть в носик пипетки
- Б) чтобы они не пролезали в носик от пипетки и не застревали там
- В) не важно
- Г) гель нельзя нарезать

Занятие 7

19. Этап восстановления белков нужен для того, чтобы: (1 ВО)

- А) образовались стабильные производные цистеина
- Б) белки легче подвергались действию протеолитических ферментов
- В) разрушить дисульфидные связи
- Г) верно все вышеперечисленное

20. Алкилирование производится: (2 ВО)

- А) Йодацетамидом
- Б) Акриламидом
- В) Персульфатом аммония
- Г) Дитиотреитолом

21. Алкилирование нужно для: (1 ВО)

- А) Образования стабильных производных цистеина
- Б) Расщепления пептидных связей по карбоксильной группе лизина и аргинина
- В) Разрушения третичной структуры белка

Г) Верно все вышеперечисленное

22. Трипсин наиболее активен при: (1 ВО)

А) pH 7,8-8,0 и температуре примерно 37°C.

Б) pH 3,5-6,2 и температуре примерно 37°C.

В) pH 7,8-8,0 и температуре примерно 45°C.

Г) pH 3,5-6,2 и температуре примерно 45°C.

23. Почему трипсин не подвергается аутолитическому расщеплению? (1 ВО)

А) из-за подбора определенной температуры

Б) трипсин добавляется в большом избытке для предотвращения этого явления

В) используется химически модифицированный трипсин, устойчивый к аутолизу

Г) из-за подбора определенного pH

24. Трипсин гидролизует связи: (1 ВО)

А) после остатков полярных положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина

Б) после остатков неполярных аминокислот глицина и пролина

В) после остатков ароматических аминокислот фенилаланина, триптофана и тирозина

Г) после остатков полярной незаряженной аминокислоты серина

Занятие 8

25. Ведущим методом в протеомике для поиска биомаркеров является: (1 ВО)

А) Ядерно-магнитный резонанс

Б) Капиллярный электрофорез

В) Масс-спектрометрия

Г) Электронная микроскопия

26. Почему для измерения молекулярной массы молекулы в масс-спектрометре требуется ионизация? (1 ВО)

А) ионизированные молекулы легче растворяются в воде и светочувствительной матрице

Б) для измерения молекулярной массы измеряются параметры движения в электрических и магнитных полях заряженных частиц, эти поля не взаимодействуют с незаряженными частицами.

В) молекулы с более высокой молекулярной массой накапливают большее количество зарядов, что облегчает анализ

Г) ионная сила раствора обуславливает качество анализа

27. Что измеряют детекторы масс-спектрометров: (1 ВО)

А) Ток поступающих на детектор ионов

Б) Энергию ионов

В) Импульс ионов

Г) Массы попавших на детектор ионов

28. Что такое масс-спектр: (1 ВО)

А) График показывающий наличие или отсутствие в образце молекул определенной массы

Б) Зависимость между массой и количеством попавших на детектор ионов

В) Зависимость количества ионов попавших на детектор от их отношения массы к заряду

Г) Зависимость между массой и способностью ионов поглощать излучение в ультрафиолетовом диапазоне

29. В MALDI-TOF масс-спектрометрии ионизация анализируемых соединений осуществляется: (1 ВО)

1) за счет эффекта «попутной» ионизации, при ионизации веществ с низкой энергией ионизации

2) за счет распыления капель жидкости в электрическом поле

3) за счет электронного удара

4) за счет воздействия лазера на распыляемую жидкость

30. При идентификации белка с использованием программы Mascot в качестве модификаций («Fixed modifications» или «Variable modifications») выбирают карбамидометилирование и пропионамидирование цистеина. Вследствие чего они возникают? (1 ВО)

А) Вследствие восстановления

Б) Вследствие алкилирования

В) Вследствие трипсинолиза

Г) Вследствие добавления APS и TEMED при приготовлении геля

Список литературы

Гааль Э., Медбеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.

Говорун В.М., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торопыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И. Сравнительная характеристика протеомных карт клинических изолятов *Helicobacter pylori*. **Биохимия**. 2003. Т. 68(1): С. 52-60.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976. V. 72: P. 248-254.

Karas M., Bachmann D., Bahr D., Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. **Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.** 1987.V. 78: P. 53-68.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 1970. V. 227(5259).P.680-685.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**. 1996. V. 68(5): P. 850-858.

Simpson RJ. Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 2003. P. 926. ISBN: 0-87969-553-6

Rombouts I, Lagrain B, Brunnbauer M, Delcour JA, Koehler P. Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. **Sci Rep**. 2013. V.3:P.2279.

Учебное пособие к практическим занятиям

Ключникова Анна Алексеевна - асс. кафедры биохимии Медико-биологического факультета (МБФ) ФГБОУ ВО Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава России (РНИМУ им. Н.И. Пирогова);

Кузнецова Ксения Глебовна. - м.н.с. лаб. медицинской протеомики ФГБНУ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ);

Гончаров Антон Олегович - студент отделения медицинской биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Торопыгин Илья Юрьевич - к.б.н., с.н.с Центра коллективного пользования ИБМХ;

Хряпова Елена Викторовна – инж. Центра коллективного пользования ИБМХ;

Кузиков Алексей Владимирович - асс. кафедры биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова;

Шумянцева Виктория Васильевна – д.б.н., профессор кафедры биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ;

Мошковский Сергей Александрович - д.б.н., профессор РАН зав. кафедрой биохимии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, зав. отделом персонализированной медицины ИБМХ.

ОСНОВЫ ПРОТЕОМИКИ

Учебное пособие

Подписано в печать 11.12.2017

Формат 60х90/32

Объем 1,5 печ.л.

Тираж 10 экз.

Заказ № 44052

ИД ООО «Роликс».

117218, г. Москва, ул. Кржижановского, 31.

Тел.: 8 (495) 661-46-22

www.roliksprint.ru

