

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
«Ульяновский государственный университет»
ПИШ «ФармИнжиниринг»

Викторов Д.А., Расторгуева Е.В., Хохлова А.В., Юрова Е.В.

Разработка биомедицинских продуктов

Методические указания для самостоятельной работы студентов и выполнению
практических и лабораторных работ
для студентов специальности 06.04.01 «Биология», Биофарминжиниринг

УЛЬЯНОВСК
2024

Утверждено координационным советом Передовой инженерной школы «ФармИнжиниринг»
Ульяновского государственного университета, протокол № 2 от 2024г.
Рекомендовано к введению в образовательный процесс.

Викторов Д.А., Долгова Д.Р., Расторгуева Е.В., Хохлова А.В., Юрова Е.В.

Разработка биомедицинских продуктов: методические указания для самостоятельной работы студентов и выполнению практических и лабораторных работ для студентов специальности 06.04.01 «Биология», Биофарминжиниринг / Д.А. Викторов. – Ульяновск : УлГУ, 2024. – 68 с.

В пособии даны темы и вопросы к ПЗ, ЛР и СРС по предмету «**Разработка биомедицинских продуктов**». Предназначено для студентов высших учебных заведений, специальности 06.04.01 «Биология», Биофарминжиниринг.

© Д.А.Викторов, 2024

© Ульяновский государственный университет, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Самостоятельная работа студентов.....	5
Практические и семинарские занятия.....	10
Лабораторные работы, практикумы.....	16
Примерный список вопросов к экзамену	64
Список используемой литературы	67

ВВЕДЕНИЕ

“Разработка биомедицинских продуктов” является ключевой для подготовки будущего специалиста в области разработки и производства тест-систем, компонентов фармпрепаратов, генно-инженерных и других биомедицинских продуктов. Содержательное наполнение дисциплины направлено на формирование научного мировоззрения и создание единой научной картины окружающего мира; обусловлено кругом задач, которые рассматриваются в дисциплинах естественно-научного цикла.

Цель освоения дисциплины: формирование у студентов знаний об этапах и принципах разработки биомедицинских продуктов, привить им соответствующие умения и навыки по ведению экспериментов, направленных на разработку и анализ характеристик биомедицинских продуктов, а также формирование навыков практической работы в области общей и молекулярной биологии, позволяющих им свободно решать профессиональные задачи.

Задачи освоения дисциплины:

1. Приобретение студентами навыков управления проектами в научной сфере.
2. Формирование представлений об организации и планировании научной деятельности, разработке и валидации методов, научно-технической документации, коммуникации и наукометрии, формирование опыта работы с научными публикациями.
3. Получение навыков по дизайну и планированию этапов разработки нового продукта.
4. Получение навыков по конструированию, изучение характеристик и испытанию нового продукта.
5. Применение полученных знаний для решения задач по разработке биомедицинских продуктов (тест-систем, радиофармпрепаратов, генно-инженерных продуктов).

Самостоятельная работа студентов

Тема 1. Управление проектами в научной сфере

Вопросы к СРС:

1. Ключевые понятия. Объекты управления проектами. Цели проекта.
2. Критерии Успешности. Субъекты управления проектами. Концепция управления проектами.
3. Заинтересованные стороны проекта. Постоянная (родительская) организация. Организационная структура проекта.
4. Этический кодекс руководителя проекта.
5. Команды проекта. Руководитель проекта. Инициация проекта.
6. Особенности проектов, в основе которых лежит заказ, идея, проблема.
7. Основные документы на стадии инициации.
8. Аналитическая работа на стадии инициации.
9. Планирование проекта. Сроки. Бюджет. Структура. Методологии Планирования.
10. Организация и контроль выполнения проекта. Система отчетности. Контроль издержек.
11. Анализ и регулирование выполнения проекта.
12. Информация, отчетность, документация. Завершение проекта.
13. Система проектной отчетности. Аналитика итогов.
14. Оценка степени достижения целевых показателей проекта.
15. Управление рисками проекта. Современная концепция риска. Виды рисков.
16. Концепция управления рисками. Планирование управления рисками.
17. Оценка рисков (выявление и анализ рисков). Обращение с рисками. Мониторинг и документирование рисков.

Тема 2. Организация и планирование научной деятельности, разработка и валидация методов

Вопросы к СРС:

1. Сущность научной деятельности, её отличия от других видов деятельности человека.
2. Компоненты научной деятельности (научный труд, научная база, методы работы, терминология, система обработки информации).
3. История науки в мире, первые научные институты.
4. Современные принципы организации науки в России и мире.
5. Научно-исследовательская работа и её основные этапы.
6. Понятие о проектной деятельности, жизненный цикл проекта.
7. Научно-техническая продукция.
8. Правовая регуляция научно-исследовательской деятельности в РФ.
9. Понятие о научном методе.
10. Теоретические методы научного исследования (индукция, дедукция, аксиома, анализ, синтез).
11. Эмпирические методы научного исследования (наблюдение, эксперимент).
12. Качественные и количественные методы исследования.
13. Валидация методик измерений. Понятие о дизайне эксперимента.

Тема 3. Научно-техническая документация

Вопросы к СРС:

1. Понятие о научно-технической документации, область её применения.
2. Первичная документация при разработке научно-технического продукта (дневник, журнал, ведомость, фото- и видеоматериалы).
3. Техническая документация при разработке научно-технического продукта (технические условия, технические инструкции, технологический регламент, технологический процесс, паспорт безопасности, этикетка, рецептура, паспорт

- качества).
4. Научная документация при разработке научно-технического продукта (отзыв, рецензия, аннотация, паспорт научно-исследовательской работы (НИР), регламент НИР, программа НИР, отчет о НИР с приложениями, доклад о выполненной НИР, технико-экономическое обоснование (ТЭО)).

Тема 4. Научная коммуникация и наукометрия.

Вопросы к СРС:

1. Понятие о научной коммуникации, история её развития.
2. Современный этап развития научной коммуникации, информационный взрыв.
3. Актуальные виды научных коммуникаций (электронные журналы, интернет-публикации, открытые архивы научных статей, препринты, базы экспериментальных данных).
4. Основные показатели публикационной активности (общее число публикаций, индекс цитируемости публикаций, индекс Хирша (h-индекс)).
5. Дополнительные наукометрические показатели (импакт-фактор, i-индекс, g-индекс, суммарное количество цитирований, процентное соотношение публикаций в российских и зарубежных журналах и др.).
6. Квартили.
7. Основные международные базы научного цитирования.

Тема 5. Технологии и инструменты для подготовки научных статей

Вопросы к СРС:

1. Научная статья как результат интеллектуальной деятельности.
2. Виды научных статей (первичные, обзорные).
3. Виды публикаций результатов научной работы (research article, тезисы, proceedings, письмо, отчет, case report, clinical trial).
4. Содержание первичной научной статьи (актуальность проблемы, степень изученности проблемы, цель и задачи исследования, предмет или предлагаемое решение проблемы, его особенности и новизна, методы исследования, наглядное представление результатов исследования, преимущества предложенного решения, область применения и ограничения применения полученных результатов, выводы и рекомендации).
5. Структура первичной научной статьи (название, авторы, аннотация, ключевые слова, введение, методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, благодарности, финансирование, конфликт интересов, заключения комитета по этике, список использованной литературы, приложения).
6. Программное обеспечение для подготовки научной статьи (пакет Microsoft Office и его аналоги, LaTeX, Mendeley).

Трек 1 Разработка тест-системы

Тема 6. Основные этапы разработки тест-систем

Вопросы к СРС:

1. Обсуждение основных этапов разработки тест-систем от идеи до вывода на рынок.
2. Составление технического задания на разработку тест-системы.

Тема 7. Выбор кандидатных мишеней, проверка их специфичности.

Вопросы к СРС:

1. Поиск и анализ литературы по данной тематике.
2. Выбор кандидатных мишеней.
3. Понятие специфичности участка генома.

4. Проверка специфичности выбранных мишеней *in silico*.

Тема 8. Дизайн праймеров для детекции таргетной ДНК/РНК, дизайн флуоресцентных зондов для детекции амплификации в режиме РВ

Вопросы к СРС:

1. Программы для дизайна праймеров и зондов.
2. Подбор праймеров и зондов.
3. Основные параметры праймеров, зондов и ампликонов.
4. Модификации олигонуклеотидов.

Тема 9. Синтез олигонуклеотидов

Вопросы к СРС:

1. Синтаксис для заказа синтеза олигонуклеотидов.
2. Основные стадии синтеза олигонуклеотидов.

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 6. Основные этапы разработки генно-инженерного продукта

Вопросы к СРС:

1. Обсуждение основных этапов разработки генно-инженерного продукта от идеи до вывода на рынок.
2. Составление технического задания на разработку генно-инженерного продукта.

Тема 7. Дизайн гена, кодирующего целевой продукт

Вопросы к СРС:

1. Анализ научных публикаций на тему.
2. Структура прокариотического и эукариотического гена.

Тема 8. Дизайн экспрессионной генетической конструкции и олигонуклеотидов для её амплификации. Программы для подбора праймеров

Вопросы к СРС:

1. Экспрессионные плазмиды.
2. Конструирование рекомбинантной ДНК.
3. Точка Origin, Ori – сайт начала репликации.
4. Экспрессионная кассета. Селективный маркер.
5. Плазмиды для получения белков с афинными олигопептидами (афинными тагами). Лактозный, тетрациклиновый и арабинозный операторы.
6. Штаммы *E. Colli* для экспрессии рекомбинантных белков.
7. Ознакомление с сайтом Национального центра биотехнологической информации США (NCBI: <https://www.softwarcnbi.nlm.nih.gov>).
8. Платформа для подбора и проверки праймеров - BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Тема 9. Синтез олигонуклеотидов

Вопросы к СРС:

1. Синтаксис для заказа синтеза олигонуклеотидов.
2. Основные стадии синтеза олигонуклеотидов.

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 6. Выбор кандидатных мишеней

Вопросы к СРС:

1. Анализ научных публикаций на тему;

2. Поиск и анализ белковых структур рецепторов-мишеней;
3. Поиск и анализ структуры природных лигандов и ингибиторов

Тема 7. Дизайн фармсубстанции

Вопросы к СРС:

1. Построение 2D и 3D моделей белковых структур;
2. Работа с программами по моделированию структур;
3. Анализ белок-белковых взаимодействий;
4. Работа с программами моделирования взаимодействия лиганд-мишень

Тема 8. Химический и радиохимический синтез фармсубстанции и контроль качества

Вопросы к СРС:

1. Способы получения пептидов в лаборатории;
2. Способы активации аминокислот;
3. Способы депротекции аминокислот;
4. Линкеры для твердофазного пептидного синтеза;
5. Химия твердофазного пептидного синтеза;
6. Основные принципы ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии, тонкослойной хроматографии;
7. Хелаторы для радиоизотопов;
8. Радиохимическая чистота и удельная активность; Лиофилизация пептидов

3 семестр

Трек 1 Разработка тест-системы

Тема 10. Сборка лабораторных образцов наборов реагентов из отдельных компонентов

Вопросы к СРС:

1. Компоненты ПЦР и их распределение по компонентам набора реагентов.
2. Состав буфера для ПЦР. Состав смеси олигонуклеотидов.
3. Состав положительного, внутреннего и отрицательного контрольных образцов. Вспомогательные компоненты.
4. Тара и маркировка наборов реагентов.
5. Методика расчета и технология приготовления стоковых растворов и смесей.

Тема 11. Постановка ПЦР с лабораторными образцами

Вопросы к СРС:

1. Виды лабораторных образцов.
2. Порядок приготовления ПЦР-реакций.
3. Программы амплификации.
4. Запуск амплификатора.
5. Интерпретация результатов, основные характеристики результатов ПЦР в геле-электрофорезе и графиков ПЦР в реальном времени.
6. Принятие решения о выборе кандидатных праймеров.

Тема 12. Оптимизация условий полимеразной цепной реакции

Вопросы к СРС:

1. Основные параметры полимеразной цепной реакции и их влияние на результат.
2. Способы варьирования параметров.
3. Проверка влияния температуры отжига, концентрации магния, праймеров, зонда и других компонентов на результат ПЦР.

Тема 13. Изучение аналитических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Вопросы к СРС:

1. Понятие аналитической чувствительности и специфичности.
2. Повторение методов определения концентрации ДНК.
3. Методики определения аналитической чувствительности (предела обнаружения, предела измерения).
4. Методики определения аналитической специфичности.
5. Метод калибровочных графиков для количественной ПЦР.
6. Понятие линейности и эффективности ПЦР.
7. Понятие интерферирующих веществ и методики проверки их влияния.

Тема 14 Изучение клинических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Вопросы к СРС:

1. Понятие клинической чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической ценности, точности.
2. Понятие референсного диапазона и методика его определения.
3. Статистическая обработка результатов клинических испытаний.

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 10. Получение генетической конструкции, амплификация гена

Вопросы к СРС:

1. Получение фрагмента ДНК (с помощью полимеразной цепной реакции, или рестрикции).
2. Основные параметры полимеразной цепной реакции и их влияние на результат

Тема 11. Клонирование гена в плазмидный вектор

Вопросы к СРС:

1. Встраивание клонируемого (чужеродного) фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (рестрикция и лигирование).

Тема 12. Трансформация компетентных клеток

Вопросы к СРС:

1. Проникновение генетической конструкции в бактериальную клетку-хозяина (генетическая трансформация).
2. Трансформация плазмидной ДНК клеток различными методами.
3. Идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, и их отбор (как правило, осуществляется на селективной среде).

Тема 13. Работа с культурами прокариот/эукариот, наработка биомассы

Вопросы к СРС:

1. Получение необходимого количества клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (собственно клонирование).
2. При необходимости индуцируют экспрессию клонированного гена в клетках-хозяевах и получают кодируемый им белок.
3. Культивирование культур клеток, наработка биомассы.
4. Гиперпродукция белков в клетках *E.coli* и получение клеточных экстрактов.

Тема 14. Очистка и анализ рекомбинантного белка

Вопросы к СРС:

1. Очистка белков на Ni-NTA сефарозе.
2. Очистка белков на Strep-tactin сефарозе.
3. Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд.
4. Электрофорез белков в денатурирующих условиях.
5. Окрашивание белковых гелей кумасси синим, нитратом серебра.

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 9. Испытания фармсубстанций in vitro

Вопросы к СРС:

1. Константы связывания и поглощения РФП in vitro;
2. Этапы проведения испытания in vitro;
3. Механизмы биораспределения РФП in vivo;
4. Кинетика биораспределения;
5. Фармакокинетика и фармакодинамика;
6. Доклинические и клинические испытания РФП

Тема 10. Анализ стабильности фармсубстанций

Вопросы к СРС:

1. Анализ стабильности и апирогенности фармсубстанций;
2. Подбор условий стабилизации пептидов;
3. Подбор условий лиофилизации пептидов;
4. Стратегии стабилизации пептидов;
5. Подбор компонентов буфера для стабилизации пептидов

Тема 11. Оптимизация методов синтеза и очистки пептидов

Вопросы к СРС:

1. Подбор защитных групп для аминокислот для синтеза пептидов;
2. Подбор элюентов для очистки пептидов ВЭЖХ;

ПРАКТИЧЕСКИЕ И СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЯ

1 семестр

Тема 1. Управление проектами в научной сфере

Практическое занятие

не предполагается

Тема 2. Организация и планирование научной деятельности, разработка и валидация методов

Практическое занятие

Проанализировать структуру сайта Российского научного фонда www.rscf.ru. Воспользовавшись поиском проектов, выбрать три проекта из своей области знания, успешно завершённых за последние 5 лет. Проанализировать их содержание, цели и результаты каждого этапа выполнения проекта, ознакомиться с опубликованными статьями. Составить аннотацию к каждому проекту, включающую название проекта, имя руководителя, место выполнения, цели, сравнительную характеристику ожидаемых и полученных результатов, практическую значимость результатов выполненной научно-исследовательской работы.

I. Проанализировать следующие лабораторные методы исследования:

1. Метод культуры клеток: необходимые оборудование и материалы, объекты работы, источники получения биологического материала, область применения, ограничения метода, валидация, решение проблем.
2. Метод ПЦР: необходимые оборудование и материалы, виды ПЦР, объекты работы, область применения, ограничения метода, валидация, решение проблем.
3. Белковый гель-электрофорез в полиакриламидном геле: необходимые оборудование и материалы, объект работы, область применения, ограничения метода, валидация, решение проблем.

II. Проанализировать следующие объекты исследования:

1. Культура клеток рака шейки матки HeLa 229 (ATCC, CCL-2.1).

2. Фрагментированная геномная ДНК из клеточной линии человека Raji (Евроген, кат.# NA102).
 3. Рекомбинантный флуоресцентный белок TurboGFP (Евроген, кат.# FP552).
- Предложить методы исследования данных объектов.

III. Составить дизайн исследования, включающий в себя рассмотренные ранее объекты и методы.

Тема 3. Научно-техническая документация

Практическое занятие

Изучить основные требования к ведению лабораторного журнала, завести личный лабораторный журнал для регистрации результатов НИР в рамках выполнения выпускной квалификационной работы.

Изучить структуру сайта Фонда содействия инновациям fasie.ru; выбрать программу УМНИК и заполнить заявку на действующий конкурс проектов, обращая внимание на требования к оформлению конкурсной документации.

Тема 4. Научная коммуникация и наукометрия.

Практическое занятие

Изучить структуру сайта Научной электронной библиотеки elibrary.ru, создать персональный профиль автора. Выбрать три журнала из списка журналов открытого доступа и охарактеризовать их наукометрические показатели; из каждого журнала выбрать по одной научной статье, опубликованной за последние 5 лет, и охарактеризовать публикационную активность первого автора.

Тема 5. Технологии и инструменты для подготовки научных статей

Практическое занятие

Подготовка письменного обзора публикаций и устного выступления по предложенной теме в соответствии с одним из направлений:

1. Разработка тест-систем для ПЦР диагностики.
2. Разработка генно-инженерных продуктов.
3. Разработка радиофармпрепаратов.

2 семестр

Трек 1 Разработка тест-системы

Тема 6. Основные этапы разработки тест-систем

Практическое занятие

не предполагается

Тема 7. Выбор кандидатных мишеней, проверка их специфичности.

Практическое занятие

Ознакомление с сайтом Национального центра биотехнологической информации США (NCBI: <https://www.softwarcnbi.nlm.nih.gov>). Представляет открытый доступ к различным программным ресурсам и международным генетическим базам данных. Одной из таких платформ является BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), которая находит области сходства между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, сравнивает их с базами данных последовательностей и вычисляет статистическую значимость. Онлайн-версия BLAST общедоступна, интегрирована с базами данных NCBI, графически отображает результаты поиска в реальном времени, позволяя синхронно анализировать полученные результаты в различных базах данных NCBI. Имеется возможность загрузить офлайн-версию программы

для Windows или Linux, но в этом случае от пользователя требуется умение работать с командной строкой.

1. Поиск и анализ литературы по тематике ВКР на <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. Выбор кандидатных мишеней с помощью баз данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
3. Проверка специфичности выбранных мишеней *in silico* с помощью программы Nucleotide BLAST.

Тема 7. Дизайн праймеров для детекции таргетной ДНК/РНК, дизайн флуоресцентных зондов для детекции амплификации в режиме РВ

Практическое занятие

1. Для конструирования праймеров используется онлайн-блок Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), в котором пользователь самостоятельно задает конкретные параметры праймеров, выбирает целевую базу данных, далее программа подключается к базам данных и серверам NCBI обрабатывает запрос и отправляет результаты обратно в браузер пользователя в графическом формате. На экране браузера результат выводится в виде списка со всеми найденными совпадениями, включая графическое изображение, что позволяет быстро оценить приемлемость расположения праймеров относительно целевого участка ДНК, который необходимо амплифицировать.
2. Изучение основных параметров праймеров, зондов и ампликонов.
3. Введение модификаций олигонуклеотидов.
4. Представление результатов

Тема 8. Синтез олигонуклеотидов

Практическое занятие

1. Изучение правил синтаксиса для заказа синтеза олигонуклеотидов.
2. Работа с протоколом по синтезу олигонуклеотидов;
3. Знакомство с прибором, программой синтеза;
4. Самостоятельный пробный запуск прибора

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 6. Дизайн гена, кодирующего целевой продукт

Практическое занятие

Практическое занятие 1

1. Работа со статьями в базах NCBI и PubMed;
2. Оценка состояния и уровень разработок в данной теме;
3. Представление результатов по анализу литературы

Практическое занятие 2

1. Выбор синтезируемого продукта, дизайн выбранного гена, подбор литературы.
2. Разработка протоколов работы
3. Представление результатов

Практическое занятие 3

1. Анализ проделанной работы, проработка материала.

Тема 7. Дизайн экспрессионной генетической конструкции и олигонуклеотидов для её амплификации

Практическое занятие

1. Подбор плазмиды (вектора).

Интернет-ресурсы:

1. NCBI (The National Center for Biotechnology Information) – Адрес доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2. EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) – Адрес доступа: <http://www.ebi.ac.uk>
 3. ExPASy (Expert Protein Analysis System) – Адрес доступа: <http://www.expasy.org>
 4. BRENDA (The Comprehensive Enzyme Information System) – Адрес доступа: <http://www.brenda-enzyme.org>
 5. GeneBee (Molecular Biology Server) Адрес доступа: <http://www.genebee.msu.ru>
 6. REBASER (The Restriction Enzyme Database) – Адрес доступа: <http://rebase.neb.com>
 7. VectorDB (Molecular Biology Vector Sequence Database) – Адрес доступа: <http://genome-www.stanford.edu/vectordb>
 8. Molbiol.ru (Классическая и молекулярная биология) – Адрес доступа: www.molbiol.ru
 9. eLIBRARY.RU – Адрес доступа: www.elibrary.ru
 10. Parabiosys (Parallel Biological Systems) – Адрес доступа: <http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys>
2. Представление результатов проделанной работы

Тема 8. Программы для подбора праймеров

Практическое занятие

1. Ознакомление с сайтом Национального центра биотехнологической информации США (NCBI: <https://www.softwarcnbi.nlm.nih.gov>). Представляет открытый доступ к различным программным ресурсам и международным генетическим базам данных. Одной из таких платформ является BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), которая находит области сходства между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, сравнивает их с базами данных последовательностей и вычисляет статистическую значимость. Онлайн-версия BLAST общедоступна, интегрирована с базами данных NCBI, графически отображает результаты поиска в реальном времени, позволяя синхронно анализировать полученные результаты в различных базах данных NCBI. Имеется возможность загрузить офлайн-версию программы для Windows или Linux, но в этом случае от пользователя требуется умение работать с командной строкой.
2. Для конструирования праймеров используется онлайн-блок Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome), в котором пользователь самостоятельно задает конкретные параметры праймеров, выбирает целевую базу данных, далее программа подключается к базам данных и серверам NCBI обрабатывает запрос и отправляет результаты обратно в браузер пользователя в графическом формате. На экране браузера результат выводится в виде списка со всеми найденными совпадениями, включая графическое изображение, что позволяет быстро оценить приемлемость расположения праймеров относительно целевого участка ДНК, который необходимо амплифицировать.
3. Представление результатов

Тема 9. Синтез олигонуклеотидов

Практическое занятие 1

1. Работа с протоколом по синтезу олигонуклеотидов;
2. Представление результатов.

Практическое занятие 2

1. Знакомство с прибором, программой синтеза;
2. Представление результатов

Практическое занятие 3

1. Самостоятельный пробный запуск прибора
2. Представление результатов

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 6. Выбор кандидатных мишеней

Практическое занятие

Практическое занятие № 1

1. Работа со статьями в базах NCBI и PubMed для анализа типа заболевания и для подбора кандидатной мишени;
2. Оценка состояния и уровень разработок в данной теме;

Практическое занятие № 2

1. Работа в базах RCSB PDB и PDBj для анализа молекулярной структуры мишени;
2. Поиск естественных лигандов для мишени с использованием баз данных NCBI и PubMed.

Практическое занятие № 2

1. Написание отчета о проделанной работе

Тема 7. Дизайн фармсустанции

Практическое занятие №1

1. Построение 2D и 3D белковых структур с специальных программах
2. Моделирование белок-белкового взаимодействия с использованием молекулярного докинг

Тема 8. Химический и радиохимический синтез фармсустанции и контроль качества

Практическое занятие №1

1. Анализ хроматограмм пептидов после синтеза и очистки
2. Анализ масс-спектров пептидов после синтеза и очистки

Практическое занятие №2

Написание отчета о проделанной работе

3 семестр

Трек 1 Разработка тест-системы

Тема 10. Сборка лабораторных образцов наборов реагентов из отдельных компонентов

Практическое занятие

1. Методика расчета и технология приготовления стоковых растворов и смесей: буфера для ПЦР,
2. смеси олигонуклеотидов,
3. положительного,
4. внутреннего
5. отрицательного контрольных образцов.
6. Технология фасовки компонентов.
7. Маркировка компонентов.

Тема 11. Постановка ПЦР с лабораторными образцами

Практическое занятие

1. Приготовление ПЦР-реакций. Раскапка реакций. Программирование и запуск амплификатора.
2. Интерпретация результатов, основные характеристики результатов ПЦР в геле-электрофорезе и графиков ПЦР в реальном времени.
3. Принятие решения о выборе кандидатных праймеров.

Тема 12. Оптимизация условий полимеразной цепной реакции

Практическое занятие

1. Проверка влияния температуры отжига на результат ПЦР
2. Проверка влияния концентрации магния,
3. Проверка влияния концентрации праймеров, зонда
4. Проверка влияния других компонентов.
5. Коррекция параметров ПЦР с помощью физических и химических факторов.

Тема 13. Изучение аналитических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Практическое занятие

1. Повторение методов определения концентрации ДНК на спектрофотометре, флуориметре, методом количественной ПЦР.
2. Методики определения аналитической чувствительности (предела обнаружения, предела измерения).
3. Методики определения аналитической специфичности.
4. Метод калибровочных графиков для количественной ПЦР. Определение линейности и эффективности ПЦР.
5. Определение влияния интерферирующих веществ.

Тема 14 Изучение клинических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Практическое занятие

1. Определение и расчёт клинической чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической ценности, точности.
2. Определение референсного диапазона.
3. Статистическая обработка результатов клинических испытаний.

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 10. Получение генетической конструкции, амплификация гена

Практическое занятие

Практическая работа 1

1. Проработка протокола по выделению НК (фенол, хроформ) прокариот, протокола амплификации
2. Для построения карт рестрикции: Web Map (адрес доступа: http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/resources/software_tools.php); NEBcutter v2,0 (адрес доступа: <http://tools.neb.com/NEBcutter2>)

Практическая работа 2

1. Протокол Выделение плазмид из бактериальных клеток
2. Протокол амплификации целевого фрагмента ДНК методом ПЦР

Практическая работа 3

1. Представление результатов проделанной работы

Тема 11. Клонирование гена в плазмидный вектор

Практическое занятие

Практическая работа 1

1. Проработка протокола по клонированию гена в плазмидный вектор
2. Для построения карт рестрикции: Web Map (адрес доступа: http://pga.mgh.harvard.edu/Parabiosys/resources/software_tools.php); NEBcutter v2,0 (адрес доступа: <http://tools.neb.com/NEBcutter2>)

Практическая работа 2

1. Проработка протокола по выделению плазмид из бактериальных клеток

Практическая работа 3

1. Представление результатов проделанной работы

Тема 12. Трансформация компетентных клеток

Практическое занятие

Практическая работа 1

1. Проработка протоколов по трансформации компетентных клеток

Практическая работа 2

1. Подбор нужного метода трансформации.

Практическая работа 3

1. Представление результатов проделанной работы

Тема 13. Работа с культурами прокариот/эукариот, наработка биомассы

Практическое занятие

Практическая работа 3

1. Проработка протоколов по скринингу, гиперпродукции белков и получение клеточных экстрактов (2пары)

Практическая работа 3

1. Особенности наработки биомассы.

Практическая работа 3

1. Представление результатов проделанной работы

Тема 14. Очистка и анализ рекомбинантного белка.

1. Проработка протоколов очистки, определению концентрации белка.
2. Возможные проблемы и способы их решения.
3. Представление результатов проделанной работы

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 9. Испытания фармсубстанций и анализ пригодности фармсубстанций

Практическое занятие №1

1. Составление протокола мечения пептида меткой
2. Составление протокола эксперимента для определения связывания пептида с клеточными культурами

Тема 10. Анализ стабильности фармсубстанций

Практическое занятие №1

1. Составление протокола испытаний стабильности пептида методом ВЭЖХ
2. Составление протокола испытаний стабильности радиофармпрепарата методом ТСХ

Тема 11. Оптимизация методов синтеза и очистки пептидов

Практическое занятие №1

1. Анализ литературы для выбора подходящего метода стабилизации пептида
2. Анализ литературы для выбора подходящего метода очистки пептида после синтеза

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ

Трек 1 Разработка тест-системы

Тема 6. Основные этапы разработки тест-систем

Лабораторные работы

не предусмотрены

Тема 7. Выбор кандидатных мишеней, проверка их специфичности.

Лабораторные работы

1. Поиск и анализ литературы по данной тематике.
2. Выбор кандидатных мишеней.
3. Понятие специфичности участка генома.
4. Проверка специфичности выбранных мишеней in silico.

Тема 8. Дизайн праймеров для детекции таргетной ДНК/РНК, дизайн флуоресцентных зондов для детекции амплификации в режиме РВ

Лабораторные работы

Цель работы: овладеть навыком подбора праймеров, научиться работать в программном обеспечении.

Программное обеспечение: PrimerBLAST, в базе данных NCBI

Для получения целевого фрагмента в ПЦР используют два праймера, нуклеотидная последовательность каждого из которых комплементарна противоположным концам определенной цепи целевого фрагмента ДНК: прямой (forward) праймер соответствует началу амплифицируемого участка ДНК, обратный (reverse) праймер — концу амплифицируемого участка ДНК. Таким образом, прямой и обратный праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК, что позволяет многократно амплифицировать именно целевой фрагмент ДНК, ограниченный этими праймерами.

При выборе праймеров рекомендуется соблюдать следующие правила:

- Нуклеотидная последовательность праймеров должна быть высокоспецифична матрице ДНК, чтобы обеспечить амплификацию чистого монопродукта в результате ПЦР без амплификации неспецифичных фрагментов ДНК.
- Нуклеотидная последовательность праймеров должна быть максимально (в идеале полностью) комплементарна последовательности ДНК, которые в геноме встречаются не чаще одного раза.
- Последние три нуклеотида 3'-конца праймера должны быть обязательно полностью комплементарны матрице ДНК, так как ДНК-полимераза присоединяет новые нуклеотиды к гидроксильным группам 3'-конца растущей цепи, и для успешного присоединения полимеразе требуется полное конформационное совпадение концевых нуклеотидов на 3'-конце.
- Нуклеотидная последовательность праймеров не должна содержать повторяющиеся элементы и палиндромы, поскольку это может привести к неизбирательному отжигу и, как следствие, к получению неспецифичного продукта.
- Область отжига праймеров должна происходить на консервативном участке матрицы ДНК, т. е. располагаться вне зон точечных мутаций, делеций или инсерций. При попадании праймера на зону с мутациями возможно отсутствие ПЦР-продукта из-за несоответствия нуклеотидной последовательности праймера к области отжига на матрице, синтез неспецифического продукта из-за некорректного отжига праймера в другой области.
- Оптимальная длина праймера от 16 до 25 нуклеотидов, так как более короткие праймеры могут слабо связываться с матрицей из-за малого количества образующихся водородных связей, быть менее специфичными, поскольку чем короче последовательность праймера, тем менее она уникальна и тем чаще она может встречаться в геноме.
- Соотношение АТ и GC нуклеотидов в последовательности праймера должно быть близко к 1:1. Следует учитывать, что большое количество АТ-оснований приводит к снижению температуры плавления праймеров, а большое количество GC-оснований — соответственно, к ее увеличению.
- Разница в температурах отжига прямого и обратного праймеров должна быть в пределах 1-2 градусов, при увеличении разницы в температуре отжига между праймерами на 3 и более градусов оптимальную температуру отжига подбирают экспериментальным путем, при этом повышается вероятность амплификации неспецифических продуктов. Повышение температуры отжига праймеров улучшает качество ПЦР-продукта за счет уменьшения неспецифичного связывания праймера с матрицей, но при этом количество ПЦР-продукта может быть невелико. Понижение температуры отжига праймеров исключает преждевременную диссоциацию праймеров с матрицей на этапе элонгации ДНК, что дает увеличение количество ПЦР-продукта, но при этом есть риск появления неспецифичных ПЦР-продуктов.
- Для улучшения качества отжига праймеров рекомендуется подбирать нуклеотидные последовательности праймеров так, чтобы последние 2-4 нуклеотида на 3'-конце праймера содержали GC-основания. Для праймера с высоким содержанием GC-оснований данное условие становится менее строгим и позволяет допустить наличие 1-2 АТ-оснований на 3'-конце праймера.

- На 3'-конце праймера не должно быть моно-(например, CCCC), ди- (например, GCGCGC) или тринуклеотидных повторов, поскольку такие повторы могут существенно уменьшать специфичность отжига праймеров, так как достаточно часто встречаются в геноме.
- Нуклеотидные последовательности праймеров не должны образовывать стабильные вторичные структуры, быть само- или взаимодоплементарными. Наличие вторичных структур на праймере, в том числе шпильки на 3'-конце праймера, приводит к уменьшению эффективности связывания праймера с матрицей, затруднению присоединения ДНК-полимеразы и, соответственно, отсутствию элонгации. Взаимная комплементарность праймеров между собой (как прямых, так и обратных) и друг с другом особенно на 3'-концах приводит к образованию и амплификации димеров праймеров в ущерб целевому продукту, при этом чем длиннее участки взаимной комплементарности, тем эффективнее проходит амплификация димеров праймеров.

Размер ПЦР-продукта зависит от поставленной задачи. Для клонирования допустим ПЦР-продукт размером до 1500 п.о., для секвенирования по Сэнгеру он может быть до 1000 п.о. При секвенировании больших фрагментов может потребоваться подбор внутреннего праймера. Поиск целевой последовательности ДНК для подбора праймеров с использованием онлайн-ресурса Gene Online-ресурс Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>) содержит различную информацию о широком круге видов, включая номенклатуру, референсные (эталонные) последовательности (RefSeqs), генетические вариации, фенотипы и локус-специфичные ресурсы.

Для поиска целевой последовательности ДНК в строке поиска необходимо указать название гена (например, *men1 1* или *MEN1*) и нажать Enter. В выпадающем списке результатов, в котором будут даны все варианты данного гена, имеющиеся в базе данных NCBI, необходимо выбрать ген, соответствующий анализируемому виду, например *Homo sapiens*. В браузере откроется страница (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4221>), содержащая подробную информацию о данном гене, в том числе информацию о структуре и хромосомной локализации гена, в случае аннотированных генов — информацию о геномных регионах, транскриптах и продуктах, уровне экспрессии, ссылки на дополнительные и библиографические ресурсы. Для дальнейшего поиска праймеров в видимом диапазоне геномного браузера используется онлайн-ресурс Primer-BLAST (Visible Range). В сложных случаях внутри выбранного фрагмента геномной ДНК можно выделить участки для поиска разных вариантов праймеров с использованием онлайн-ресурса Primer-BLAST (Selection). Например, для поиска праймеров в заданных конкретных участках ДНК выделяются диапазоны 1 и 2 или 1 и 3 (при нажатии Ctrl), и далее активируется запуск команды Primer-BLAST (Selection).

Поиск праймеров с использованием PrimerBLAST

Инструмент Primer-BLAST откроется в новом окне, при этом геномный браузер остается открытым. Выбор потенциальных участков матрицы ДНК для поиска праймеров проводился с использованием баз данных NCBI, конструирование праймеров будет проходить с использованием ресурса BLAST. В этом разделе будут рассмотрены только компоненты, которые нужны для дизайна праймеров. В программе BLAST для каждого компонента есть комментарии и объяснения, чтобы их получить, достаточно нажать круглый значок вопроса. Вкладка Primers for target on the template Раздел PCR Template В поле Range будут автоматически проставлены хромосомные позиции — границы диапазона, которые были выбраны ранее для конструирования праймеров. Эти значения являются обязательными, изменять их не следует.

Основные параметры праймеров, зондов и ампликонов - изучаются такие параметры, как длина, GC-состав, температура плавления и их влияние на параметры будущей ПЦР.

Модификации олигонуклеотидов - изучаются модификации нуклеотидов, влияющие на температуру плавления (такие как LNA и MGB), флуоресцентные красители и гасители (тушители), фосфорилирование и гидроксिलирование конца олигонуклеотида и т.д. Оформление результатов в виде пар праймеров.

Тема 9. Синтез олигонуклеотидов

Лабораторные работы

Изучение правил синтаксиса для заказа синтеза олигонуклеотидов.

Цель работы: получить навыки синтеза олигонуклеотидов на приборе Синтезатор ДНК/РНК ASM800 (БИОССЕТ).

Реактивы:

- 1) **CapA** 15% Propionic anhydride в THF (150 мл Propionic anhydride (пропионовый ангидрид) + 850 мл THF)
- 2) **CapB** 16% MeIm в THF (160 мл MeIm (метилимидазол) + 840 мл THF (тетрагидрофуран))
- 3) **Oxd** 0.015M I₂ in THF/Py/H₂O (90:1:9) (4 г I₂ + 900 мл THF + 10 мл Py + 90 мл H₂O)
- 4) **Dbl** 3% DCA в DCM (30 мл DCA + 970 мл DCM)
- 5) **R₂** (CH₂Cl₂)
- 6) **Act** 0.25M ETT в MeCN (3,2 г ETT + 100 мл MeCN)
- 7) **Мономеры** 0.075M (A,C,G) и 0.08M (T) (0,75 г мономера + 11 мл MeCN)
- 8) **W2** (Ацетонитрил для ВЭЖХ MeCN с содержанием воды не более 200 ppm.)
- 9) **W1** (Сухой ацетонитрил MeCN с содержанием воды не более 40 ppm.)

Оборудование:

1. Синтезатор ДНК/РНК ASM800 (БИОССЕТ)
2. Вакуумный концентратор Concentrator plus (Eppendorf)
3. Вытяжной шкаф
4. Аналитические весы
5. Автоматические дозаторы с переменным объемом

Расходные материалы:

2,0 и 1,5 мл микроцентрифужные пробирки (эппендорфы), стерильные наконечники, лабораторные стаканы, лабораторный шпатель, ёмкости для реактивов 11 мл, комплект колонок для синтеза.

Порядок работы:

1. Подготовка реактивов . Сухие реактивы взвешиваются в соответствии с прописанными в протоколе концентрациями и указанными массами. Мономер dA 160мг, мономеры Ac-dC, dG, dT по 250 мг.
2. Ввод синтезируемых последовательностей
3. Подготовка колонок, в соответствии с номерацией.
4. Запуск и управление процессом синтеза.
5. Удаление олигонуклеотида с колонок.
6. Подготовка образцов для электрофореза и хроматографии.
7. Анализ полученных олигонуклеотидов.

Оформление результатов.

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 8. Программы для подбора праймеров

Лабораторная работа

Цель работы: овладеть навыком подбора праймеров, научиться работать в программном обеспечении.

Программное обеспечение: PrimerBLAST, в базе данных NCBI

Для получения целевого фрагмента в ПЦР используют два праймера, нуклеотидная последовательность каждого из которых комплементарна противоположным концам определенной цепи целевого фрагмента ДНК: прямой (forward) праймер соответствует началу амплифицируемого участка ДНК, обратный (reverse) праймер — концу амплифицируемого участка ДНК. Таким образом, прямой и обратный праймеры комплементарны

противоположным цепям ДНК, что позволяет многократно амплифицировать именно целевой фрагмент ДНК, ограниченный этими праймерами.

При выборе праймеров рекомендуется соблюдать следующие правила:

- Нуклеотидная последовательность праймеров должна быть высокоспецифична матрице ДНК, чтобы обеспечить амплификацию чистого монопродукта в результате ПЦР без амплификации неспецифичных фрагментов ДНК.
- Нуклеотидная последовательность праймеров должна быть максимально (в идеале полностью) комплементарна последовательности ДНК, которые в геноме встречаются не чаще одного раза.
- Последние три нуклеотида 3'-конца праймера должны быть обязательно полностью комплементарны матрице ДНК, так как ДНК-полимераза присоединяет новые нуклеотиды к гидроксильным группам 3'-конца растущей цепи, и для успешного присоединения полимеразе требуется полное конформационное совпадение концевых нуклеотидов на 3'-конце.
- Нуклеотидная последовательность праймеров не должна содержать повторяющиеся элементы и палиндромы, поскольку это может привести к неизбирательному отжигу и, как следствие, к получению неспецифичного продукта.
- Область отжига праймеров должна происходить на консервативном участке матрицы ДНК, т. е. располагаться вне зон точечных мутаций, делеций или инсерций. При попадании праймера на зону с мутациями возможно отсутствие ПЦР-продукта из-за несоответствия нуклеотидной последовательности праймера к области отжига на матрице, синтез неспецифического продукта из-за некорректного отжига праймера в другой области.
- Оптимальная длина праймера от 16 до 25 нуклеотидов, так как более короткие праймеры могут слабо связываться с матрицей из-за малого количества образующихся водородных связей, быть менее специфичными, поскольку чем короче последовательность праймера, тем менее она уникальна и тем чаще она может встречаться в геноме.
- Соотношение АТ и GC нуклеотидов в последовательности праймера должно быть близко к 1:1. Следует учитывать, что большое количество АТ-оснований приводит к снижению температуры плавления праймеров, а большое количество GC-оснований — соответственно, к ее увеличению.
- Разница в температурах отжига прямого и обратного праймеров должна быть в пределах 1-2 градусов, при увеличении разницы в температуре отжига между праймерами на 3 и более градусов оптимальную температуру отжига подбирают экспериментальным путем, при этом повышается вероятность амплификации неспецифических продуктов. Повышение температуры отжига праймеров улучшает качество ПЦР-продукта за счет уменьшения неспецифичного связывания праймера с матрицей, но при этом количество ПЦР-продукта может быть невелико. Понижение температуры отжига праймеров исключает преждевременную диссоциацию праймеров с матрицей на этапе элонгации ДНК, что дает увеличение количество ПЦР-продукта, но при этом есть риск появления неспецифичных ПЦР-продуктов.
- Для улучшения качества отжига праймеров рекомендуется подбирать нуклеотидные последовательности праймеров так, чтобы последние 2-4 нуклеотида на 3'-конце праймера содержали GC-основания. Для праймера с высоким содержанием GC-оснований данное условие становится менее строгим и позволяет допустить наличие 1-2 АТ-оснований на 3'-конце праймера.
- На 3'-конце праймера не должно быть моно-(например, CCCC), ди- (например, GCGCGC) или тринуклеотидных повторов, поскольку такие повторы могут существенно уменьшать специфичность отжига праймеров, так как достаточно часто встречаются в геноме.
- Нуклеотидные последовательности праймеров не должны образовывать стабильные вторичные структуры, быть само- или взаимокплементарными. Наличие вторичных структур на праймере, в том числе шпильки на 3'-конце праймера, приводит к уменьшению эффективности связывания праймера с матрицей, затруднению присоединения ДНК-полимеразы и, соответственно, отсутствию элонгации. Взаимная комплементарность

праймеров между собой (как прямых, так и обратных) и друг с другом особенно на 3'-концах приводит к образованию и амплификации димеров праймеров в ущерб целевому продукту, при этом чем длиннее участки взаимной комплементарности, тем эффективнее проходит амплификация димеров праймеров.

Размер ПЦР-продукта зависит от поставленной задачи. Для клонирования допустим ПЦР-продукт размером до 1500 п.о., для секвенирования по Сэнгеру он может быть до 1000 п.о. При секвенировании больших фрагментов может потребоваться подбор внутреннего праймера. Поиск целевой последовательности ДНК для подбора праймеров с использованием онлайн-ресурса Gene Online-ресурс Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>) содержит различную информацию о широком круге видов, включая номенклатуру, референсные (эталонные) последовательности (RefSeqs), генетические вариации, фенотипы и локус-специфичные ресурсы.

Для поиска целевой последовательности ДНК в строке поиска необходимо указать название гена (например, *menin 1* или *MEN1*) и нажать Enter. В выпадающем списке результатов, в котором будут даны все варианты данного гена, имеющиеся в базе данных NCBI, необходимо выбрать ген, соответствующий анализируемому виду, например *Homo sapiens*. В браузере откроется страница (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4221>), содержащая подробную информацию о данном гене, в том числе информацию о структуре и хромосомной локализации гена, в случае аннотированных генов — информацию о геномных регионах, транскриптах и продуктах, уровне экспрессии, ссылки на дополнительные и библиографические ресурсы. Для дальнейшего поиска праймеров в видимом диапазоне геномного браузера используется онлайн-ресурс Primer-BLAST (Visible Range). В сложных случаях внутри выбранного фрагмента геномной ДНК можно выделить участки для поиска разных вариантов праймеров с использованием онлайн-ресурса Primer-BLAST (Selection). Например, для поиска праймеров в заданных конкретных участках ДНК выделяются диапазоны 1 и 2 или 1 и 3 (при нажатии Ctrl), и далее активируется запуск команды Primer-BLAST (Selection).

Поиск праймеров с использованием PrimerBLAST

Инструмент Primer-BLAST откроется в новом окне, при этом геномный браузер остается открытым. Выбор потенциальных участков матрицы ДНК для поиска праймеров проводился с использованием баз данных NCBI, конструирование праймеров будет проходить с использованием ресурса BLAST. В этом разделе будут рассмотрены только компоненты, которые нужны для дизайна праймеров. В программе BLAST для каждого компонента есть комментарии и объяснения, чтобы их получить, достаточно нажать круглый значок вопроса. Вкладка Primers for target on the template Раздел PCR Template В поле Range будут автоматически проставлены хромосомные позиции — границы диапазона, которые были выбраны ранее для конструирования праймеров. Эти значения являются обязательными, изменять их не следует.

Оформление результатов в виде пар праймеров.

Тема 9. Синтез олигонуклеотидов

Лабораторная работа

Цель работы: получить навыки синтеза олигонуклеотидов на приборе Синтезатор ДНК/РНК ASM800 (БИОССЕТ).

Реактивы:

- 1) **CapA** 15% Propionic anhydride в THF (150 мл Propionic anhydride (пропионовый ангидрид) + 850 мл THF)
- 2) **CapB** 16% MeIm в THF (160 мл MeIm (метилимидазол) + 840 мл THF (тетрагидрофуран))
- 3) **Oxd** 0.015M I₂ in THF/Py/H₂O (90:1:9) (4 г I₂ + 900 мл THF + 10 мл Py + 90 мл H₂O)
- 4) **Dbl** 3% DCA в DCM (30 мл DCA + 970 мл DCM)
- 5) **R₂** (CH₂Cl₂)
- 6) **Act** 0.25M ETT в MeCN (3,2 г ETT + 100 мл MeCN)
- 7) **Мономеры** 0.075M (A,C,g) и 0.08M (T) (0,75 г мономера + 11 мл MeCN)

8) **W2** (Ацетонитрил для ВЭЖХ MeCN с содержанием воды не более 200 ppm.)

9) **W1** (Сухой ацетонитрил MeCN с содержанием воды не более 40 ppm.)

Оборудование:

6. Синтезатор ДНК/РНК ASM800 (БИОССЕТ)
7. Вакуумный концентратор Concentrator plus (Eppendorf)
8. Вытяжной шкаф
9. Аналитические весы
10. Автоматические дозаторы с переменным объемом

Расходные материалы:

2,0 и 1,5 мл микроцентрифужные пробирки (эппендорфы), стерильные наконечники, лабораторные стаканы, лабораторный шпатель, ёмкости для реактивов 11 мл, комплект колонок для синтеза.

Порядок работы:

8. Подготовка реактивов . Сухие реактивы взвешиваются в соответствии с прописанными в протоколе концентрациями и указанными массами. Мономер dA 160мг, мономеры Ac-dC, dG, dT по 250 мг.
9. Ввод синтезируемых последовательностей
10. Подготовка колонок, в соответствии с номерацией.
11. Запуск и управление процессом синтеза.
12. Удаление олигонуклеотида с колонок.
13. Подготовка образцов для электрофореза и хроматографии.
14. Анализ полученных олигонуклеотидов.

Оформление результатов.

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 6. Выбор кандидатных мишеней

Не подразумевается

Тема 7. Дизайн фармсубстанции

Лабораторная работы

Лабораторная работы №1 Дизайн молекул и молекулярный докинг

Цель работы: создать оценить степень связывание 3D модели структуры лиганда с рецептором-мишенью

Программное обеспечение: PepFold 2.0 (<https://mobylye2.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>); HawkDock (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>); Molegro Molecular viewer; Avogadro

Теоретическая часть:

Молекулярный докинг - метод, который включает в себя прогнозирование взаимодействия между малой молекулой и белком на атомном уровне. Это позволяет изучать поведение малых молекул в месте связывания целевого белка и понимать фундаментальный биохимический процесс, лежащий в основе этого взаимодействия. Метод основан на структуре и требует высокоразрешающего трехмерного представления целевого белка, полученного с помощью таких методов, как рентгеновская кристаллография, ядерно-магнитная резонансная спектроскопия или криоэлектронная микроскопия. Существует несколько вычислительных инструментов и алгоритмов, доступных для методов молекулярной стыковки, как коммерческих, так и бесплатных. Вычислительная электростатика комплекса лиганд-рецептор может быть оценена, проверена и предсказана с помощью исследования стыковки. Это исследование обычно следует двум отдельным этапам. Во-первых, конформации лиганда отбираются в соответствии с активным сайтом белка. Во-вторых, конформации ранжируются в соответствии с функцией подсчета очков. Алгоритмы

отбора образцов должны теоретически воспроизводить экспериментальные режимы связывания, а полученные подтверждения должны ранжироваться в соответствии с функцией подсчета очков

Практическая часть:

Ход работы:

I. Построение 3D моделей пептидов

1. Записать аминокислотную последовательность пептида в формате FASTA.
2. Загрузить последовательность в программу PepFold 2.0.
3. Запустить программу и дождаться результата
4. Выгрузить из программы файл с пептидом в формате PDB
5. Открыть файл с пептидом в программе Avogadro
6. Во вкладке Build выбрать Add Hydrogens
7. Выгрузить из программы конечный файл через File - Save as
8. Выгрузить из базы данных. в которой была найдена молекула-мишень, файл со структурой в формате PDB
9. Открыть файл с молекулой-мишенью в программе Molegro Molecular viewer, загрузив все типы молекул, нажав на загрузочном экране кнопку Import
10. Во вкладке View выбрать Secondary Structure View и проанализировать все типы молекул
11. Удалить лишние молекулы. оставив только целевую, нажав во вкладке Items - Backbone и убрав галочки с лишних молекул
12. Сохранить файл через File - Export molecules - формат PDB
13. В программе HawkDock ввести название работы и загрузить файлы PDB с молекулой-мишенью и пептидом в аналогично названные окна (если известен активный центр молекулы-мишени, ввести координаты во вкладке Advanced options)
14. Запустить молекулярный докинг
15. Дождаться окончания работы программы и проанализировать результаты

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Результаты докинга выписать в соответствии с моделью

Тема 8. Химический и радиохимический синтез фармсустанции и контроль качества

Лабораторная работы №1. Твердофазный синтез пептидов на автоматическом пептидном синтезаторе

Цель работы: Получение пептида в лабораторных условиях с использованием пептидного синтезатора

Реактивы: Fmoc-L-аминокислоты: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, трис-DOTA, Смола TentaGel, Связывающий агент - 5% уксусный ангидрид в DMF, Активатор – HSTU, Депротектор – N,N-метилпиперидин, Катализатор - NMM, Растворители – DMF, NMP, DCM.

Оборудование и посуда: Пептидный синтезатор ResPer SL, Центрифуга с охлаждением 1-23000g, Вакуумный концентратор Concentrator plus, Вытяжной шкаф, Аналитические весы, Автоматические дозаторы с переменным объемом; 15 мл центрифужные пробирки, 34 мл пробирки, 50 мл центрифужные пробирки, 2,0 и 1,5 мл микроцентрифужные пробирки (эппендорфы), стерильные наконечники, лабораторные стаканы, лабораторный шпатель, 200 мл баночки для синтеза, 1-5 мкмоль колонки для синтеза.

Теоретическая часть: Аминокислоты имеют два реакционноспособных конца: аминогруппу и карбоксигруппу, которые необходимо соединить для образования пептидной связи. Другие

реактивные группы в боковой цепи маскируются защитными группами во время синтеза. Чтобы стать реактивным, карбоксигруппа должна быть активирована активирующим реагентом. Затем она может быть связана со свободной аминогруппой. Чтобы предотвратить полимеризацию и убедиться, что только одна молекула соединяется в пептидной цепи, аминокислотные строительные блоки несут временную защитную группу на их аминогруппах. Данная группа называется Fmoc-защитная группа, а принцип синтеза с использованием этой группы называется Fmoc-химия.

Каждое добавление аминокислоты называется циклом синтеза. Цикл обычно начинается со снятия защиты со смолы, аминокислоты, присоединенной к карбоксильному линкеру, или снятия защиты с растущей пептидной цепи во время синтеза. Снятие защиты - это термин, используемый для удаления аминозащитной группы (Fmoc). Реагент, используемый для удаления защиты, - это пиперидин, который затем необходимо тщательно промыть.

Далее идет активация аминокислотного строительного блока для связывания. Это достигается путем добавления активатора и раствора катализатора к производной аминокислоты. После активации вся смесь добавляется к смоле, и одна молекула на цепь может присоединиться. Реакция соединения обычно идет около 1 часа. Избыток реагента тщательно вымывается, прежде чем следующий цикл можно будет снова начать со снятия защиты с Fmoc.

После того, как полная последовательность собрана, происходит окончательное снятие защиты с Fmoc и промывка смолы. Затем смолу сушат, и пептид отщепляют трифторуксусной кислотой (TFA). На этом этапе добавляются специальные реагенты-поглотители для защиты боковых цепей от модификаций. Линкер и защитные группы боковой цепи отщепляются одновременно. Затем пептид отделяют от раствора TFA путем осаждения эфиром. Осадок снова промывают эфиром, растворяют в воде и сушат вымораживанием. Аминокислотные последовательности синтезируемых пептидов записывались в диалоговом окне программы от N-конца с NH₂ группой к C-концу с COOH-группой согласно номенклатуре пептидов, отдельно вносились данные для производной tris-DOTA.

Практическая часть:

Ход работы:

I. Работа с ПО

Для работы с программным обеспечением необходимо записать аминокислотную последовательность от N-конца с NH₂ группой к C-концу с COOH-группой с пробелами и внести данные для дополнительной производной - DOTA. Ввод последовательностей осуществляется в диалоговом окне программы во вкладке Edit Sequence, затем последовательность распечатывается. Во вкладке Edit Method устанавливается необходимый размер синтеза (2мкмоль). Из вкладки Show Report распечатывается протокол приготовления растворов.

II. Взвешивание сухих реактивов

Сухие реактивы взвешиваются в соответствии с прописанными в протоколе концентрациями и указанными массами. Смола взвешивается в соответствии с объемом синтеза – для 2 мкмоль - масса смолы 10 мг для одного пептида.

Материалы: лабораторные весы, лабораторный стакан, лабораторный шпатель, фольга, 15 мл центрифужные пробирки, 50 мл центрифужные пробирки, 1,5 мл микроцентрифужные пробирки, бинтовые салфетки, 34 мл пробирки.

1. Перед взвешиванием включить весы для прогрева
2. Достать из морозильной камеры аминокислоты и, не открывая, оставить при комнатной температуре на 20 минут
3. Подписать пробирки и микроцентрифужные пробирки в соответствии с взвешиваемыми реактивами
4. Подготовить кусочки фольги для взвешивания
5. Подготовить рабочее место рядом с весами

6. Откалибровать весы
7. Взвесить фольгу и сбросить вес тары
8. С помощью шпателя аккуратно перенести сухой реактив из упаковки на фольгу в соответствии с проколом
9. Дождаться уравнивания весов в закрытом состоянии
10. При необходимости добавить или убрать реактив
11. Аккуратно перенести реактив с фольги в соответствующую пробирку и плотно закрыть
12. Использованную фольгу выкинуть в лабораторный стакан
13. Протереть шпатель и весы от оставшегося реактива салфеткой
14. Повторить процедуру для каждого реактива
15. Взвесить смолу, исходя из молярности синтеза, в каждый отдельный эппендорф для каждого пептида
16. По окончании взвешивания протереть весы
17. Убрать рабочее место

III. Высушивание реактивов

Открытые пробирки поставить в центрифужный испаритель при режиме D-AQ на 1 час

IV. Приготовление растворов

Растворы готовятся в соответствии с прописанными в протоколе процентными соотношениями. Аминокислоты, кроме Fmoc-гистидина, Fmoc-фенилаланина и Fmoc-пролина, HSTU и tris-DOTA растворяются в DMF, Fmoc-гистидин, Fmoc-фенилаланин и Fmoc-пролин растворяются в NMP. NMM и N-метилпиперидин разбавляются до необходимого процента DMF.

1. Подготовить рабочее место в вытяжном шкафу
2. Подписать 50 мл пробирки
3. Подготовить пробирки с аминокислотами
4. Поочередно открывать пробирки с аминокислотами и добавлять необходимый объем DMF или NMP с помощью автоматического дозатора
5. Плотно закрыть крышку
6. После добавления несколько минут аккуратно перемешивать раствор до полного растворения аминокислоты
7. Повторить манипуляции для каждой аминокислоты
8. Готовые растворы аминокислот перенести в аминокислотную стойку для синтезатора и плотно прикрутить крышку с силиконовой прокладкой
9. Открыть пробирку с HSTU и добавить необходимый объем DMF
10. Аккуратно перемешать
11. В мерный цилиндр налить необходимый объем NMM для приготовления 44% DMF
12. Затем добавить необходимый объем NMM
13. Перенести раствор в 50 мл пробирку
14. В мерный цилиндр налить необходимый объем DMF для приготовления 20% N-метилпиперидина
15. Затем добавить необходимый объем N-метилпиперидина
16. Перенести раствор в 200 баночку для синтеза
17. Перелить чистый DCM в 50 мл центрифужную пробирку
18. Перелить уксусный ангидрид в DMF в 50 мл центрифужную пробирку
19. Перелить NMP в 34 мл пробирку

V. Подготовка колонок для синтеза

Для синтеза берутся оригинальные для пептидного синтезатора колонки и подписываются спирто-устойчивым маркером в соответствии с количеством синтезируемых пептидов

VI. Подготовка смолы

1. Поставить каждую колонку для синтеза в подставку с закрытым дном
2. Приготовить раствор из DMF и DCM в соотношении 2:1 в объеме равном 500 мкл на одну колонку, умноженному на количество колонок

3. Добавить в эппендорф со смолой 500 мкл раствора
4. Хорошо отпипетировать
5. Перенести раствор со смолой из эппендорфа в колонку по порядку
6. Оставить набухать смолу на 10-15 минут

VI. Промывка синтезатора

1. В диалоговом окне ПО во вкладке Manual пошагово выбрать разные типы промывки
2. Проконтролировать, чтобы в системе шлангов синтезатора не было воздуха

VII. Загрузка синтеза

1. Поместить колонки со смолой в ячейки на панели синтезатора
2. Включить во вкладке Manual насос в ручном режиме
3. Дождаться, когда весь раствор откачается из колонок
4. Проверить правильность записи последовательностей и необходимого метода
5. В подставку аминокислот в каждую позицию поместить 5мл пробирки для смешивания реактивов
6. Загрузить реактивы на стойке согласно протоколу
7. Запустить синтез

VIII. Подготовка смолы с пептидами после синтеза

1. Подготовить эппендорфы и пронумеровать их в соответствии с количеством пептидов
2. По окончании синтеза перенести смолу с пептидом из каждой колонки в соответствующий эппендорф с помощью шпателя
3. Испарить остатки растворителей в смоле с пептидом в вакуумном концентраторе на режиме V-NV 10 минут

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №2. Первичная очистка пептидов после синтеза

Цель работы: Первичная очистка пептидов после синтеза

Оборудование и посуда: автоматические дозаторы с переменным объемом, лабораторный стакан, бинтовые салфетки, стерильные наконечники, 15 мл центрифужные пробирки, 50 мл центрифужные пробирки;

Реактивы: трифторуксусная кислота (TFA), трет-метилбутиловый эфир (MTBE), триизопропил силан (TIPS), деионизированная вода

Теоретическая часть: Успешно синтезировав защищенный пептид, исследователь сталкивается со сложной задачей одновременного отсоединения пептида от смоляной подложки и удаления всех защитных групп боковой цепи аминокислотных остатков для получения желаемого пептида. В Fmoc SPPS этот шаг обычно выполняется путем обработки пептидильной смолы TFA. Во время этого процесса из защитных групп и линкеров на смоле образуются высокорекреационноспособные катионные виды, и они могут, если не захвачены, реагировать с теми остатками, которые содержат нуклеофильные функциональные группы: Trp, Met, Tyr и Cys, и, следовательно, модифицировать их. Чтобы предотвратить это, в TFA добавляют различные нуклеофильные реагенты (известные как поглотители), чтобы погасить эти ионы.

Было предложено множество универсальных смесей для расщепления, самой популярной из которых является реагент K (TFA/вода/фенол/тиоанизол/EDT). Однако благодаря достижениям в технологии защитных групп и линкеров, в частности, введению производных Fmoc-Trp(Boc) и Fmoc-Arg(Pmc/Pbf), такие сложные смеси, содержащие токсичные и зловонные реагенты, больше не нужны, за исключением исключительных обстоятельств.

Удаление N-концевой группы Fmoc

Перед тем, как можно будет выполнить кислотное расщепление пептидильной смолы, необходимо удалить N-концевую Fmoc-группу с помощью пиперидина.

Подготовка пептидной смолы к расщеплению

Пептидную смолу следует тщательно промыть, особенно если в процессе синтеза используется ДМФ, поскольку он нелетуч, а остаточный основной ДМФ может оказывать заметное ингибирующее действие на ацидолиз ТФА. Для носителей на основе ПЭГ и полиакриламида желательнее промывание слабокислым реагентом, таким как уксусная кислота, которая не вызывает высвобождения пептида, поскольку эти типы смол имеют тенденцию удерживать ДМФ. Перед расщеплением необходимо провести тщательную промывку и сушку.

Расщепление и снятие защиты ТФА

Оптимальные условия расщепления во многом зависят от присутствующих отдельных аминокислотных остатков, их количества и последовательности, защитных групп боковой цепи и типа линкера, прикрепленного к смоле.

В связи с изменчивостью поведения различных пептидных смол рекомендуется провести предварительное расщепление пептидной смолы в небольшом масштабе с использованием образца массой 20–50 мг для определения оптимальных условий расщепления, таких как выбор поглотителя(ей) и продолжительность реакции.

Это позволит определить степень расщепления (например, с помощью количественного анализа референтной аминокислоты, присоединенной к линкеру, где это уместно) и качество сырого расщепленного пептида (с помощью ВЭЖХ и аминокислотного анализа). Для большинства пептидов расщепление может быть осуществлено с помощью ТФА/TIS/воды (95:2,5:2,5). В случаях, когда возникают проблемы добавление EDT к вышеуказанной смеси, как правило, обеспечивает удовлетворительное решение.

В случае смолы Rink Amide связь фенилбензилового эфира, которая соединяет линкер со смолой, чувствительна к кислоте и может быть разорвана, особенно когда высвобождение продукта происходит медленно во время реакции расщепления, что приводит к образованию окрашенных побочных продуктов, которые нелегко удалить из продукта простыми промывками. Этого можно избежать, используя двухэтапную процедуру, описанную в Методе 3, или лучше, используя поглотители силана. Эти этапы не нужны для смол, включающих более стабильные модифицированные линкеры Rink, такие как смолы Rink Amide AM, Rink Amide MBHA и NovaSyn® TGR.

Метионин, цистеин и триптофан чрезвычайно восприимчивы к алкилированию катионами, образующимися в процессе расщепления. Реакция триптофана, метионина или цистеина с *t*-бутильными катионами приводит к модификации пептида продукта; реакция с катионом-линкером приводит к необратимому повторному присоединению пептида к смоле. С метионином может произойти дальнейшая реакция, приводящая к образованию гомосерина и фрагментации пептидной цепи. Добавляя поглотители в смесь для расщепления, эти побочные реакции можно в значительной степени подавить. Одним исключением является сульфирование триптофана продуктами, образующимися при расщеплении остатков аргинина, защищенных Mtr, Pmc и Pbf. Эту побочную реакцию можно устранить с помощью Fmoc-Trp(BOC). Это производное также подавляет повторное присоединение остатков C-терминала Trp к катиону, образующемуся на линкере смолы.

Практическая часть:

Ход работы:

I. Приготовление раствора для отсоединения пептидов от смолы

1. Подготовить рабочее место в вытяжном шкафу
2. Подписать пробирки для TFA-mix и MTBE
3. Рассчитать необходимый объем реактивов из соотношения: 95% TFA, 5% TIPS и в 10-кратном объеме по отношению к массе смолы
4. Рассчитать необходимый объем эфира в соответствии с 5-кратным избытком эфира по отношению к объему смолы и трехкратной отмывки одного пептида
5. Приготовить TFA-mix в соответствии с расчетами в 15 мл центрифужной пробирке

6. Перелить МТВЕ в 50 мл центрифужные пробирки в соответствии с расчетами и положить в морозильную камеру на -20°C

II. Отсоединение пептидов от смолы

1. В каждый эппендорф добавить объем TFA-mix в 10-кратном избытке по отношению к массе смолы
2. Хорошо отпипетировать каждый раствор смола-пептид-TFA-mix отдельным наконечником
3. Оставить смесь на 3 часа, периодически аккуратно перемешивая

III. Очистка смеси от TFA

1. Достать из морозильной камеры МТВЕ
2. Подготовить 50 мл центрифужную пробирку для использованного эфира
3. В каждый эппендорф со смесью смола-пептид-TFA-mix добавить эфир в 5-кратном избытке по отношению к объему TFA-mix
4. Хорошо отпипетировать каждый пептид отдельным наконечником
5. Отцентрифугировать смесь в лабораторной центрифуге с охлаждением при 10 000g
6. Аккуратно перенести супернатант, не затрагивая осадок, из каждого эппендорфа отдельным наконечником в пробирку с использованным эфиром
7. Добавить свежий ледяной эфир в том же объеме
8. Отцентрифугировать
9. Убрать супернатант
10. Повторить процесс еще раз
11. После третьего раза аккуратно убрать весь эфир
12. Поместить эппендорфы со смолой и пептидом в вакуумный концентратор для удаления остатков эфира

IV. Растворение пептидов

1. Набрать свежей деионизированной воды
2. В каждый эппендорф со смолой и пептидом набрать по 2 мл деионизированной воды
3. Оставить растворяться в холодильнике при $+4^{\circ}\text{C}$ до полного растворения

V. Очистка растворов пептидов от смолы

1. Достать пептиды из холодильника и оставить при комнатной температуре на 15-20 минут
2. Подготовить 2,0 мл эппендорфы и подписать в соответствии с количеством пептидов
3. Аккуратно перенести раствор пептидов в воде, не затрагивая осадок со смолой

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №3. Анализ результатов синтеза методом ВЭЖХ

Цель работы: Провести анализ пептидов после синтеза методом обращенно-фазовой хроматографии

Оборудование и посуда: 1. Хроматографическая система Shimadzu LC-20AD хр. Система является модульной и включает следующие компоненты: 1.1. Поточный дегазатор Shimadzu DGU-20A3R; 1.2. Системный контроллер Shimadzu CBM-20Alite; 1.3. Модуль подачи растворителя Shimadzu LC-20ADxr; 1.4. Колоночный термостат Shimadzu CTO-10ASvp; 1.5. Диодно-матричный детектор Shimadzu SPD-20A; 2. 2 бутылки 500 мл градуированные; 3. Колонка хроматографическая аналитическая, обращенно-фазовая; 4. Шприц хроматографический аналитический 50 μL ; 5. Весы аналитические; 6. Ультразвуковая ванна; 7. Стакан химический; 8. Автоматическая пипетка на 1000 мкл; 9. Вортекс лабораторный. 10. Дозаторы с переменным объемом до 1000 мкл 11. Наконечники на 1000 мкл

Реактивы: метанол ОСЧ Сорт 1; Бычий сывороточный альбумин, деионизированная вода

Теоретическая часть:

Хроматография – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой перемещаются вдоль стационарной фазы, которую обычно помещают в колонку (стеклянную или металлическую трубку). Если молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью, то время их пребывания в неподвижной фазе, а следовательно, и средняя скорость передвижения по колонке различны. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Так достигается разделение компонентов. Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях.

С помощью хроматографии возможны: разделение сложных смесей органических и неорганических веществ на отдельные компоненты, очистка веществ от примесей, концентрирование веществ из сильно разбавленных растворов, качественный и количественный анализ исследуемых веществ.

В зависимости от цели проведения хроматографического процесса различают аналитическую хроматографию (качественный и количественный анализ) и препаративную хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей).

Принцип действия жидкостного хроматографа заключается в следующем: раствор анализируемой смеси с помощью узла ввода пробы вводится в верхнюю часть хроматографической колонки. С помощью насоса анализируемая смесь прокачивается элюентом (подвижная фаза – ПФ) через хроматографическую колонку, в которой происходит разделение анализируемой смеси на отдельные вещества (компоненты). Вытекающий из колонки элюат, содержащий отдельные компоненты анализируемой смеси, детектируется детектором, показания которого регистрируются регистратором. Если необходимо выделение из смеси какого-либо вещества, элюат с этим веществом собирается коллектором (препаративный вариант).

Таким образом, жидкостный хроматограф предназначен для разделения сложных смесей веществ на отдельные компоненты и проведения качественного и количественного анализа компонентов разделяемой смеси. Препаративный вариант хроматографа предназначен для выделения и очистки веществ и оснащается дополнительно коллектором фракций.

Из всех вариантов хроматографического исследования биомолекул наиболее популярной является обращенно-фазовая (ОФ) хроматография. Ее привлекательность определяется методической простотой и универсальностью, во многих случаях — простотой механизма сорбции и предсказуемостью поведения веществ на основании их строения. По разным оценкам, этим методом выполняется сейчас 70—90% всех опубликованных в литературе разделений.

В ОФ хроматографию еще называют хроматографией неполярных взаимодействий. В данном методе сорбент является неполярным, а подвижная фаза – смесью полярного и неполярного раствора.

Важнейшую роль в понимании механизма удерживания обращенно-фазовой хроматографии сыграли работы Хорвата и его школы.

Суть теории Хорвата заключается в следующем: существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей («нормально-фазовый режим») и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на поверхностях неполярных (обращенно-фазовый режим). В первом случае между молекулами сорбатов и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или

водородных связей. Во втором случае причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции. Таким образом, причиной сорбции в обращенно-фазовой хроматографии служит сильное притяжение полярных молекул растворителя одна к другой, как бы «прижимающее» растворенные менее полярные молекулы к неполярной поверхности. Из сказанного следует, что по сравнению с нормально-фазовой хроматографией в обращенно-фазовой роль химической природы неподвижной фазы относительно мала, так как взаимодействие сорбат—сорбент ограничивается слабыми дисперсионными силами.

Сорбенты для ОФ хроматографии представляют собой силикагелевые глобулы, к которым химически пришиты различные неполярные группы. В зависимости от назначения колонки размер глобул силикагеля и размер пор в них может меняться. Предпочтение силикагелю в качестве основы для ОФ сорбента объясняется высокой структурной прочностью силикагеля – он способен выдерживать высокие значения давления (до 100 мПа для хроматографии ультравысокого давления).

Количество привитых неполярных фаз в коммерческих сорбентах огромно. Они отличаются по силе удержания неполярных компонентов и по селективности по отношению к конкретным группам соединений.

Однако наиболее распространенным, наиболее универсальным сорбентом является ОФ сорбент с привитой октодецильной фазой (С18). Хотя, если честно, нет причин изначально отдавать предпочтение этому сорбенту, просто для сорбентов С18 есть огромное количество документированных и валидированных методик.

Учитывая популярность сорбента с привитой С18 фазой существуют различные модификации данного сорбента.

Наиболее распространенная – так называемое эндкеппирование. В чем суть? В процессе производства силикагеля, на поверхности силикагелевых частиц образуются «побочные» силанольные группы. Силанольные группы, располагающиеся на поверхности силикагеля, обладают слабокислыми свойствами и способны, поэтому сильнее удерживать вещества с основными свойствами. Для уменьшения числа силанольных групп на поверхности проводят дополнительную обработку сорбента хлорсиланами. И такую обработку называют энкэппингом (end capping).

Другая модификация сорбента С18 носит коммерческое название Luna С18 (2). Кроме эндкеппирования этот сорбент отличается более широким рабочим диапазоном рН, чем у обычных силикагелевых сорбентов.

Также есть сорбенты со смесовыми привитыми фазами, где октодецил комбинируется с другими неполярными фазами.

Само собой, в хроматографии белков и пептидов наиболее распространен именно С18 с его различными модификациями. Но стоит упомянуть, что существуют и несиликагелевые неполярные сорбенты, состоящие из различных неполярных гидрофобных полимеров.

В ОФ хроматографии применяется огромное количество разнообразных неполярных растворителей. Они различаются по элюирующей силе, оптической прозрачности, вязкости и т.д.

В ОФ хроматографии белков и пептидов применяют чаще всего водно-метанольные, водно-ацетонитрильные или водно-ацетонитрил-метанольные смеси. Изопропанол и ТГФ, хотя и являются лучшими растворителями, чем метанол и ацетонитрил, их используют значительно реже. Чаще их используют в некоторых экзотичных методиках и при тех. обслуживании хроматографических систем.

ОФ хроматография позволяет реализовывать изократическое и градиентное элюирование.

Изократическое элюирование – элюирование, при котором состав подвижной фазы (элюента) не изменяется в процессе реализации метода.

Градиентное элюирование – элюирование, при котором состав подвижной фазы меняется. В процессе реализации метода происходит замена одного элюента на другой. Различают дву- и многокомпонентное элюирование. В хроматографии белков и пептидов распространено двухэлюентное градиентное элюирование в 4 этапа:

1-й этап – линейный, система промывается чистым 1-м, «слабым» элюентом. На данном этапе происходит уравнивание колонки – вымывание из нее остатков предыдущих растворителей и создания динамического равновесия в системе сорбент-элюент. Недоуравновеска колонки может привести к ухудшению разрешения, ухудшению формы пиков, непостоянному времени удержания компонентов.

2-й этап - линейный, система промывается чистым 1-м, «слабым» элюентом. На данном этапе происходит загрузка образца в систему и его транспорт в колонку, где образец концентрируется в головной ее части.

3-й этап – непосредственно градиентное элюирование со сменой состава подвижной фазы. «слабый» элюент заменяется «сильным», по мере смены элюента происходит десорбция компонентов пробы по силе их взаимодействия с сорбентом – от слабого к сильному.

4-й этап – линейное элюирование «сильным» элюентом. Этот этап еще называют регенерацией колонки. На этом этапе происходит десорбция наиболее сильно удерживаемых компонентов.

Практическая часть:

Ход работы:

I. Приготовление подвижных фаз:

1. Подготовить емкость с метанолом. Открыть емкость с метанолом, открыть бутылку. Налить метанол из емкости в бутылку до отметки 500 мл. Закрыть емкость с метанолом, закрыть бутылку.
2. Подготовить емкость с деионизированной водой. Открыть емкость с деионизированной водой, открыть бутылку. Налить деионизированную воду из емкости в бутылку до отметки 500 мл. Закрыть бутылку.
3. Приготовить ультразвуковую ванну: наполнить ультразвуковую ванну на 2/3 объема водопроводной водой, включить ультразвуковую ванну в сеть.
4. Поставить бутылки с растворами в корзину ультразвуковой ванны. Немного открутить крышки бутылок. Установить таймер на ультразвуковой ванне на 60 минут (после установки времени на таймере ультразвуковая ванна включится автоматически).
5. Через 60 минут, после автоматического выключения ультразвуковой ванны, вытащить бутылку, плотно закрутить крышки бутылок. Бутылки протереть салфеткой от лишней влаги. Ультразвуковую ванну выключить из сети, воду из ультразвуковой ванны вылить в канализацию.

II. Подготовка образцов

1. Подготовить Бычий сывороточный альбумин, весы аналитические, ложку химическую, фольгу для проведения химических навесок.
2. Включить аналитические весы.
3. Из фольги вырезать небольшой квадрат.
4. Открыть емкость с Бычьим сывороточным альбумином. Положить квадрат фольги на чашу весов. С помощью химической ложки пересыпать из емкости на фольгу на чаше весов 6,9 грамма Бычьего сывороточного альбумина. Закрыть емкость с Бычьим сывороточным альбумином. Открыть пробирку 1 мл, пересыпать Бычий сывороточный альбумин с фольги в

пробирку 1 мл, закрыть пробирку. Чистой салфеткой протереть чашу весов. Маркером пометить, что пробирка содержит 100мМ раствор Бычьего сывороточного альбумина.

5. Приготовить деионизированную воду, автоматическую пипетку на 1000 мкл, наконечники для пипетки на 1000 мкл, пробирки с высушенными пептидами для анализа, вортекс лабораторный.

6. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 1000 мкл. Одеть на автоматическую пипетку наконечник на 1000 мкл. Налить в химический стакан деионизированную воду. Забрать автоматической пипеткой деионизированную воду из химического стакана, открыть пробирку с Бычьим сывороточным альбумином, слить забранную автоматической пипеткой деионизированную воду в пробирку с Бычьим сывороточным альбумином. Ресуспендировать Бычий сывороточный альбумин с помощью лабораторного вортекса.

7. Подготовить пробирки с высушенными пептидами. К имеющимся на пробирках маркировке добавить номер группы анализируемых пептидов и номер пептида внутри анализируемой группы.

8. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 100 мкл. Одеть на автоматическую пипетку наконечник на 1000 мкл. Налить в химический стакан деионизированную воду. Забрать автоматической пипеткой деионизированную воду из химического стакана, открыть пробирку с анализируемым пептидом, слить забранную автоматической пипеткой деионизированную воду в пробирку с анализируемым пептидом. Ресуспендировать анализируемый пептид с помощью лабораторного вортекса. Повторить данный пункт для всех пробирок с анализируемыми пептидами.

III. Подготовка хроматографической системы

1. В лоток для подвижных фаз на хроматографе поставить подготовленные ранее растворы. Открыть бутылки с приготовленными растворами, погрузить в бутылки заборные трубки.

2. Включить хроматографическую систему нажатием кнопок на корпусах модулей. Запустить на управляющем компьютере программу Clarity. В появившемся окне нажать кнопку “Установить соединение”, в окне подтверждения действия нажать кнопку “Ок”.

3. После подключения программы к хроматографу открывается окно управления хроматографом. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Слежение за работой прибора”. В появившемся окне нажать кнопку “Промывка”, и выставить следующие параметры: суммарный поток - 5, %А - 100, давление - 10, затем нажать кнопку “Ок”. Одновременно с этим повернуть вентиль на панели модуля подачи растворителя против часовой стрелки на три полных оборота. Через две минуты после запуска насоса в окне “Слежение за работой прибора” нажать кнопку “Остановка” и повернуть вентиль на панели модуля подачи растворителя по часовой стрелке на три полных оборота.

4. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Слежение за работой прибора”. В появившемся окне нажать кнопку “Промывка”, и выставить следующие параметры: суммарный поток - 5, %В - 100, давление - 10, затем нажать кнопку “Ок”. Одновременно с этим повернуть вентиль на панели модуля подачи растворителя против часовой стрелки на три полных оборота. Через две минуты после запуска насоса в окне “Слежение за работой прибора” нажать кнопку “Остановка” и повернуть вентиль на панели модуля подачи растворителя по часовой стрелке на три полных оборота.

4. Приготовить хроматографическую колонку Dr.Maisch Luna C18 (2). Убрать заглушки хроматографической колонки. Убрать коннектор, соединяющий жидкостный тракт от дозатора к детектору. Прикрутить фиттинг трубки от инжектора к хроматографической колонке, прикрутить фиттинг трубки, ведущей к детектору, к хроматографической колонке. Важно, чтобы стрелка, нарисованная на хроматографической колонке, указывала по направлению потока от инжектора в сторону детектора.

5. После установки колонки в окне управления хроматографом нажать кнопку “Загрузить метод”, в появившемся окне выбрать метод “Dr.Maisch Luna C18 (2)”, в появившемся окне

передачи метода прибору нажать “Ок”. Данный метод включает автоматическую промывку системы элюирующими растворами в течении 1 часа.

6. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Одиночный анализ”. В появившемся окне нажать кнопку “Пуск”.

IV. Проверка пригодности хроматографической системы

1. Подготовить пробирку с 1мл со 100мМ раствором Бычьего сывороточного альбумина, шприц хроматографический аналитический 50 мкл, химический стакан.

2. В химический стакан налить дистиллированную деионизированную воду.

3. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Одиночный анализ”. В появившемся окне ввести название образца “System stability DATE”, где вместо “DATE” ввести дату проведения анализа. Нажать кнопку “Отправить метод”.

4. Сразу после запуска анализа открыть пробирку с раствором Бычьего сывороточного альбумина, хроматографическим шприцом забрать из пробирки 30 мкл раствора Бычьего сывороточного альбумина. Важно следить за тем, чтобы во внутреннем объеме шприца не было пузырей воздуха. Если во внутреннем объеме шприца после забора раствора будет воздух, следует сбросить содержимое шприца обратно в пробирку и повторить забор.

5. Хроматографический шприц с раствором Бычьего сывороточного альбумина вставить в порт дозатора и загрузить раствор Бычьего сывороточного альбумина в дозатор. Затем, не вынимая шприц из порта дозатора, повернуть кран дозатора по часовой стрелке резким движением до упора. Это действие приведет к запуску анализа.

6. Через две минуты повернуть кран дозатора против часовой стрелки резким движением до упора. Вынуть хроматографический шприц из порта дозатора, погрузить шприц в химический стакан с дистиллированной деионизированной водой и промыть, поднимая и опуская поршень шприца.

7. После окончания метода результаты автоматически сохраняются на рабочем столе управляющего компьютера. После обработки хроматограммы анализа, оценивается время выхода пика Бычьего сывороточного альбумина. Время выхода не должно отличаться от такового из предыдущих анализов не более, чем на 2%.

V. Проведение хроматографического анализа

1. Подготовить пробирки с растворами с анализируемыми пептидами, шприц хроматографический аналитический 50 мкл, химический стакан.

2. В химический стакан налить дистиллированную деионизированную воду.

3. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Одиночный анализ”. В появившемся окне ввести название анализа, состоящее из номера группы анализируемых пептидов и номера пептида внутри этой группы. Нажать кнопку “Отправить метод”.

4. Сразу после запуска анализа открыть пробирку с анализируемым пептидом, хроматографическим шприцом забрать из пробирки 30 мкл раствора анализируемого пептида. Важно следить за тем, чтобы во внутреннем объеме шприца не было пузырей воздуха. Если во внутреннем объеме шприца после забора раствора будет воздух, следует сбросить содержимое шприца обратно в пробирку и повторить забор.

5. Хроматографический шприц с раствором анализируемого пептида вставить в порт дозатора и загрузить раствор анализируемого пептида в дозатор. Затем, не вынимая шприц из порта дозатора, повернуть кран дозатора по часовой стрелке резким движением до упора. Это действие приведет к запуску анализа.

6. Через две минуты повернуть кран дозатора против часовой стрелки резким движением до упора. Вынуть хроматографический шприц из порта дозатора, погрузить шприц в химический стакан с дистиллированной деионизированной водой и промыть, поднимая и опуская поршень шприца.

7. После окончания метода результаты автоматически сохраняются на рабочем столе управляющего компьютера.

VI. Консервация системы после анализа

1. В окне управления хроматографом нажать кнопку “Одиночный анализ”. В появившемся окне ввести название анализа “Wash”. Нажать кнопку “Отправить метод”, затем кнопку “Пуск”.
2. Не менее чем через 30 минут после запуска анализа, в окне управления одиночным анализом нажать кнопку “Остановка”.

VII. Анализ результатов

1. На рабочем столе управляющего компьютера найти файл хроматограммы с названием нужного пептида.
2. Двойным щелчком мыши запустить файл хроматограммы. После запуска файла программа автоматически рассчитывает параметры пиков, дополнительное редактирование не требуется.
3. Открыть в окне программы вкладку “Файл”. Во вкладке нажать кнопку “Запись в PDF”. В появившемся окне нажать кнопку “Ок”. Отчет формируется автоматически, имя файла отчета автоматически дублирует название анализа.

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №4. Очистка пептидов после синтеза методом ВЭЖХ

Цель работы: очистить пептид после синтеза гель-фильтрующей хроматографией

Реактивы: спирт этиловый 95% ХЧ; Бычий сывороточный альбумин, дистиллированная вода, сорбент BioGel P-4 fine.

Оборудование и посуда: Хроматографическая система NGC Scout компании Bio-Rad. Система является модульной и включает следующие компоненты: 1.1. Двухъярусная базовая рама NGC; 1.2. 2 насосных модуля NGC F10; 1.3. Градиентный миксерный модуль NGC; 1.4. Одноволновой УФ-детектор с кондуктометрическим детектором NGC; 1.5. Инжекционный клапан NGC; 1.6. Инжекционная петля объемом 1 мл; 1.7. Буферный смеситель NGC; 1.8. Детектор pH NGC; 1.9. Коллектор фракций BioFrac NGC; 2. 2 бутылки 500 мл градуированные; 3. Колонка хроматографическая пустая, 1x30см; 4. Шприц хроматографический препаративный 1мл; 5. Колба коническая 1л; 6. Ультразвуковая ванна; 7. Мерный цилиндр 500 мл, градуированный; 8. Стакан химический 150 мл; 9. Автоматическая пипетка на 1000 мкл; 10. Вортекс лабораторный; 11. Вакуумный концентратор; 12. Штатив; 13. Аналитические весы; 14. Фольга для проведения химических навесок; Химическая ложка; наконечники для пипетки на 1000 мкл, пробирки 1 мл, пробирки для коллектора фракций BioFrac.

Теоретическая часть:

Одним из вариантов очистки биомолекул является гель-фильтрующая хроматография. Гель-фильтрующая (ГФ) хроматография, или эксклюзионная (size-exclusion chromatography), или ситовая, или гель-фракционная – хроматографический метод разделения молекул в соответствии с их размером. Метод отличается технической и методической простотой.

В отличие от остальных методов хроматографии, где происходит взаимодействие между пробой и сорбентом, в эксклюзионной хроматографии разделение происходит за счет разной способности молекул разного размера проникать сквозь поры, или пространственную сеть неподвижной фазы.

Молекулы, размер которых больше размера пор сорбента, не могут проникать в них и проходят между частицами сорбента, выходя с колонки самыми первыми.

Молекулы промежуточного размера, способные проникать только в часть пор, удерживаются в колонке в соответствии с их размером. Чем меньше молекула – тем через большее число пор она сможет пройти, и тем дольше она будет находиться в колонке.

Еще одна особенность метода – состав подвижной фазы не оказывает существенного влияния на процесс разделения (можно сказать, вовсе не влияет), что дает методу очень важное преимущество – условия реализации метода могут быть изменены в соответствии с требованиями образца, или эксперимента. Так, метод очень хорошо подходит для молекул, чувствительных к температуре, значению pH, составу среды.

К гель-фильтрующим сорбентам применяется два правила:

- Сорбент должен иметь строго определенное распределение размеров пор.
- Анализируемые вещества не должны химически взаимодействовать с сорбентом.

В ГФ хроматографии используют два типа сорбента - жесткие неорганические (силикагель) и органические полимеры.

Сорбенты для ГФ имеют чаще всего вид сферических пористых гранул различного размера. Для очистки и разделения белков и пептидов чаще всего применяют органические полимеры или модифицированные полисахаридами макропористые силикагели. Все эти гели имеют универсальные коммерческие имена: сефадексы, супердексы, сефакрилы (БиоРад, например, вообще не парится, называя свои ГФ сорбенты Биогель А, Биогель Б, Биогель S-X).

ГФ сорбент имеет две характеристики:

- Диапазон фракционирования - диапазон масс молекул, который может поделить сорбент. Зависит от количества и размера пор сорбента.
- Размер частиц сорбента. Влияет на упаковку сорбента (насколько сорбент будет сопротивляться потоку) и на ширину хроматографических пиков.

Разные по природе ГФ сорбенты имеют разные диапазоны фракционирования.

ГФ хроматография - тот метод, где размер колонки играет достаточно важную роль - чем она длиннее, тем выше итоговое разрешение и селективность (в рамках диапазона фракционирования). И чем больше диаметр колонки, тем уже получаются пики.

Выбор подвижной фазы (ПФ) не влияет на эффективность разделения. Однако, при выборе ПФ нужно учитывать две вещи - ПФ не должна разрушать сорбент и в ПФ должен полностью растворяться образец (тут еще стоит учитывать, что некоторые сорбенты плохо дружат со спиртами, и при определенных концентрациях спиртов в ПФ сорбент может натурально скукожить). Такая нетребовательность позволяет использовать широкий диапазон ПФ в зависимости от целей, требований образца и возможностей лаборатории.

Однако, существует возможность модификации подвижной фазы с целью улучшения разрешения пиков (больше применимо при аналитической хроматографии). Цель модификации ПФ - подавление неспецифических взаимодействий пробы с сорбентом (полярных, ионных). Для этих целей в ПФ добавляют органические растворители (до 20% объема ПФ) и натрий/калий хлористый (до 150 мМоль).

Практическая часть:

Ход работы:

I. Приготовление подвижных фаз.

1. Приготовить две пустую бутылки 500 мл, градуированные. Маркером на одной бутылке пометить, что она содержит 20% этанол (бутылка 1), на другой – что бутылка содержит чистую дистиллированную воду (бутылка 2)
2. Подготовить емкость с 95% этанолом. Открыть емкость с 95% этанолом, открыть бутылку 2. Налить 95% этанол из емкости в бутылку до отметки 100 мл. Закрыть емкость с 95% этанолом, закрыть бутылку 1.
3. Приготовить мерный цилиндр 500 мл градуированный. Приготовить дистиллированную воду. Приготовить бутылку 1. В мерный цилиндр налить дистиллированную воду до отметки 375 мл. Открыть бутылку 1, перелить воду из мерного цилиндра в бутылку 1, закрыть бутылку 1.
4. Приготовить бутылку 2, подготовить дистиллированную воду. Открыть бутылку 2, наполнить ее дистиллированной водой до отметки 500 мл, закрыть бутылку 2.
5. Приготовить ультразвуковую ванну: наполнить ультразвуковую ванну на 2/3 объема водопроводной водой, включить ультразвуковую ванну в сеть.
6. Поставить бутылки 1 и 2 в корзину ультразвуковой ванны. Немного открутить крышки бутылок. Установить таймер на ультразвуковой ванне на 60 минут (после установки времени на таймере ультразвуковая ванна включится автоматически).
7. Через 60 минут, после автоматического выключения ультразвуковой ванны, вытащить бутылки 1 и 2, плотно закрутить крышки бутылок. Бутылки протереть салфеткой от лишней

влаги. Ультразвуковую ванну выключить из сети, воду из ультразвуковой ванны вылить в канализацию.

II. Приготовление образцов.

1. Подготовить Бычий сывороточный альбумин, весы аналитические, ложку химическую, фольгу для проведения химических навесок.
2. Включить аналитические весы.
3. Из фольги вырезать небольшой квадрат.
4. Открыть емкость с Бычьим сывороточным альбумином. Положить квадрат фольги на чашу весов. С помощью химической ложки пересыпать из емкости на фольгу на чаше весов 6,9 грамма Бычьего сывороточного альбумина. Закрыть емкость с Бычьим сывороточным альбумином. Открыть пробирку 1 мл, пересыпать Бычий сывороточный альбумин с фольги в пробирку 1 мл, закрыть пробирку. Чистой салфеткой протереть чашу весов. Маркером пометить, что пробирка содержит 100мМ раствор Бычьего сывороточного альбумина.
5. Приготовить дистиллированную воду, автоматическую пипетку на 1000 мкл, наконечники для пипетки на 1000 мкл, пробирки с высушенными пептидами для анализа, вортекс лабораторный.
6. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 1000 мкл. Одеть на автоматическую пипетку наконечник на 1000 мкл. Налить в химический стакан дистиллированную воду. Забрать автоматической пипеткой дистиллированную воду из химического стакана, открыть пробирку с Бычьим сывороточным альбумином, слить забранную автоматической пипеткой дистиллированную воду в пробирку с Бычьим сывороточным альбумином. Ресуспендировать Бычий сывороточный альбумин с помощью лабораторного вортекса.
7. Подготовить пробирки с высушенными пептидами. К имеющимся на пробирках маркировке добавить добавить номер группы очищаемых пептидов и номер пептида внутри группы.
8. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 1000 мкл. Одеть на автоматическую пипетку наконечник на 1000 мкл. Налить в химический стакан дистиллированную воду. Забрать автоматической пипеткой дистиллированную воду из химического стакана, открыть пробирку с очищаемым пептидом, слить забранную автоматической пипеткой дистиллированную воду в пробирку с очищаемым пептидом. Ресуспендировать очищаемый пептид с помощью лабораторного вортекса. Повторить данный пункт для всех пробирок с очищаемыми пептидами.

III. Подготовка хроматографической колонки.

1. Подготовить сорбент BioGel P-4 fine, фольгу для проведения химических навесок, ложку химическую, химический стакан, аналитические весы, салфетки, дистиллированную воду.
2. Включить аналитические весы.
3. Из фольги вырезать небольшой квадрат.
4. Открыть емкость с сорбентом BioGel P-4 fine. Положить квадрат фольги на чашу весов. С помощью химической ложки пересыпать из емкости на фольгу на чаше весов 6 грамм сорбента BioGel P-4 fine. Закрыть емкость с сорбентом BioGel P-4 fine. Взять химический стакан, пересыпать сорбент BioGel P-4 fine из фольги в химический стакан. Чистой салфеткой протереть чашу весов. С помощью маркера пометить, что стакан содержит сорбент BioGel P-4 fine.
5. Сорбент в химическом стакане залить дистиллированной водой до отметки 100 мл. Оставить стакан с сорбентом и водой на 5 часа для гидратации.
6. Через 5 часа слить из стакана излишек воды, добавить свежей дистиллированной воды до отметки 100 мл.
7. Включить вакуумный концентратор.
8. Поставить стакан с сорбентом в вакуумный концентратор. Закрыть крышку концентратора. На панели управления концентратора выбрать опцию "D-AQ", установить таймер на 15 минут, нажать кнопку "Start". После выключения вакуумного концентратора, открыть крышку вакуумного концентратора, вынуть стакан с сорбентом из вакуумного концентратора.

9. Подготовить штатив, хроматографическую колонку пустую, дистиллированную воду, стакан с сорбентом. Закрепить пустую хроматографическую колонку на штативе, поставить под хроматографическую колонку пустой химический стакан, снять крышку с хроматографической колонки, перекрыть выходной вентиль хроматографической колонки. Заполнить пустую хроматографическую колонку на 10% объема дистиллированной водой. Взять стакан с сорбентом, осторожно залить сорбент с хроматографическую колонку, избегая образования пузырей, при заполнении хроматографической колонки на половину объема открыть нижний выходной вентиль хроматографической колонки. После полного наполнения хроматографической колонки сорбентом, перекрыть нижний выходной вентиль хроматографической колонки, долить деионизированную воду в хроматографическую колонку до верхней риски, закрыть хроматографическую колонку крышкой.

IV. Подготовка хроматографической системы.

1. Отсоединить пробирку, находящуюся на левой стенке хроматографической системы, от трубок системы промывки поршней насосов. Наполнить пробирку 20% этанол из ранее приготовленной бутылки с 20% этанолом на половину объема. Подключить пробирку, наполненную 20% этанолом обратно к системе промывки поршней насосов.

2. В лоток для подвижных фаз на хроматографе поставить подготовленные ранее растворы. Открыть бутылку, содержащую 20% этанол, погрузить в бутылку с 20% этанолом заборную трубку от насоса Б. Открыть бутылку, содержащую дистиллированную воду, погрузить в бутылку с дистиллированной водой заборную трубку от насоса А.

3. Погрузить выходные трубки хроматографической системы в коническую колбу.

4. Загрузить пробирки для коллектора фракций в лоток для пробирок в коллекторе фракций.

5. Включить хроматографическую систему нажатием кнопки на левой стенке хроматографической системы. Включить коллектор фракций переключением тумблера на задней панели коллектора фракций. На управляющем компьютере запустить программу ChromLab. В окне программы нажать кнопку "Connect to system". В появившемся окне выбора хроматографической системы выбрать систему NGC Scout, нажать кнопку "Connect".

6. После подключения программы к хроматографу открывается окно управления хроматографом. В окне управления хроматографом нажать на пиктограмму инжектора, переключить инжектор в положение "Pump to waste". Затем нажать на пиктограмму насоса, в открывшемся окне настройки насосов установить скорость потока равной 10 мл/мин, значение "%B" установить равное 100, значение "duration" установить равным 10 мл, затем нажать кнопку "Start". После остановки насоса в окне настройки насосов установить скорость потока равной 10 мл/мин, значение "%B" установить равное 0, значение "duration" установить равным 10 мл, затем нажать кнопку "Start".

7. После остановки насоса проверить установлена ли на инжекторе инжекционная петля объемом 1 мл. При ее отсутствии подготовить инжекционную петлю объемом 1 мл, прикрутить фитинги инжекционной петли к портам инжектора "Loop E" и "Loop F". В окне управления хроматографом нажать на пиктограмму инжектора, переключить инжектор в положение "System Pump Inject Loop". Затем нажать на пиктограмму насоса, в открывшемся окне настройки насосов установить скорость потока равной 10 мл/мин, значение "%B" установить равное 0, значение "duration" установить равным 10 мл, затем нажать кнопку "Start". После остановки насоса в окне настройки насосов установить скорость потока равной 0,1 мл/мин, значение "%B" установить равное 0, значение "duration" установить равным 0 мл, затем нажать кнопку "Start".

8. Приготовить хроматографическую гель-фильтрующую колонку. Убрать коннектор, соединяющий жидкостный тракт от инжектора к детектору. Открыть оба выходных вентиля хроматографической колонки. Прикрутить фитинг трубки от инжектора к хроматографической колонке, прикрутить фитинг трубки, ведущей к детектору, к хроматографической колонке. Важно, чтобы колонка была установлена вертикально, открывающаяся крышка находилась сверху.

9. После остановки насоса в программе ChromLab, во вкладке “Home”, нажать кнопку “Open Method”. В открывшемся окне методов выбрать метод “Size Exclusion”, нажать кнопку “Open”. В открывшемся окне метода нажать кнопку “Start Run”. В открывшемся меню “Start Run” нажать кнопку “Start”. Для хроматографической очистки был разработан следующий протокол: 1. Хроматографическая колонка промывается в течении 20 минут дистиллированной водой. В это время раствор очищаемого пептида объемом 1мл загружается в инжектор с помощью препаративного шприца объемом 1 мл. 2. В течении 10 минут раствор пептида вымывается из инжектора в хроматографический тракт. 3. Хроматографический тракт промывается дистиллированной водой в течении 7 часов. В это время происходит сбор фракций разделенных компонентов раствора пептида. Объем одной фракции - 1мл.

V. Проверка пригодности хроматографической системы.

1. Подготовить пробирку с 1мл со 100мМ раствором Бычьего сывороточного альбумина, шприц хроматографический аналитический 50 μ L, химический стакан.
2. В химический стакан налить 20% этанол из ранее приготовленной бутылки с 20% этанолом.
3. В программе ChromLab, во вкладке “Home”, нажать кнопку “Open Method”. В открывшемся окне методов выбрать метод “Size Exclusion”, нажать кнопку “Open”. В открывшемся окне метода нажать кнопку “Start Run”. В открывшемся меню “Start Run”, в строке “Run name” ввести название анализа “System stability DATE”, где вместо “DATE” ввести дату проведения анализа. Нажать кнопку “Start”. Для хроматографической очистки был разработан следующий протокол: 1. Хроматографическая колонка промывается в течении 20 минут дистиллированной водой. В это время раствор очищаемого пептида объемом 1мл загружается в инжектор с помощью препаративного шприца объемом 1 мл. 2. В течении 10 минут раствор пептида вымывается из инжектора в хроматографический тракт. 3. Хроматографический тракт промывается дистиллированной водой в течении 7 часов. В это время происходит сбор фракций разделенных компонентов раствора пептида. Объем одной фракции - 1мл.
4. Сразу после запуска анализа открыть пробирку с раствором Бычьего сывороточного альбумина, хроматографическим шприцом забрать из пробирки 30 мкл раствора Бычьего сывороточного альбумина. Важно следить за тем, чтобы во внутреннем объеме шприца не было пузырей воздуха. Если во внутреннем объеме шприца после забора раствора будет воздух, следует сбросить содержимое шприца обратно в пробирку и повторить забор.
5. Хроматографический шприц с раствором Бычьего сывороточного альбумина вставить в порт инжектора и загрузить раствор Бычьего сывороточного альбумина в инжектор. Затем, не вынимая шприц из порта инжектора, на сенсорном дисплее хроматографической системы, в окне управления хроматографической системой, нажать кнопку “Next step”.
6. Вынуть хроматографический шприц из порта инжектора, погрузить шприц в химический стакан с 20% этанолом и промыть, поднимая и опуская поршень шприца.
7. Пункт 10.4 нужно повторить 3 раза. В итоге оценивается время выхода пика Бычьего сывороточного альбумина. Все 3 раза оно не должно различаться более, чем на 2 %.

VI. Проведение хроматографической очистки пептидов.

1. Подготовить пробирки с растворами очищаемых пептидов, шприц хроматографический препаративный 1 мл, химический стакан.
2. В химический стакан налить 20% этанол из ранее приготовленной бутылки с 20% этанолом.
3. В программе ChromLab, во вкладке “Home”, нажать кнопку “Open Method”. В открывшемся окне методов выбрать метод “Size Exclusion”, нажать кнопку “Open”. В открывшемся окне метода нажать кнопку “Start Run”. В открывшемся меню “Start Run”, в строке “Run name” ввести название анализа, состоящее из номера группы анализируемых пептидов и номера пептида внутри этой группы. Нажать кнопку “Start”. Для хроматографической очистки был разработан следующий протокол: 1. Хроматографическая колонка промывается в течении 20 минут дистиллированной водой. В это время раствор очищаемого пептида объемом 1мл загружается в инжектор с помощью препаративного шприца объемом 1 мл. 2. В течении 10 минут раствор пептида вымывается из инжектора в хроматографический тракт. 3. Хроматографический тракт промывается дистиллированной водой в течении 7 часов. В это

время происходит сбор фракций разделенных компонентов раствора пептида. Объем одной фракции - 1мл.

4. Сразу после запуска анализа открыть пробирку с раствором очищаемого пептида, хроматографическим шприцом забрать из пробирки 1 мл раствора очищаемого пептида. Важно следить за тем, чтобы во внутреннем объеме шприца не было пузырей воздуха. Если во внутреннем объеме шприца после забора раствора будет воздух, следует сбросить содержимое шприца обратно в пробирку и повторить забор.

5. Хроматографический шприц с раствором очищаемого пептида вставить в порт инжектора и загрузить раствор анализируемого пептида в инжектор. Затем, не вынимая шприц из порта инжектора, на сенсорном дисплее хроматографической системы, в окне управления хроматографической системой, нажать кнопку "Next step".

6. Вынуть хроматографический шприц из порта инжектора, погрузить шприц в химический стакан с 20% этанолом и промыть, поднимая и опуская поршень шприца.

7. В процессе очистки объемы подвижной фазы, соответствующие хроматографическим пикам и содержащие разделяемые компоненты (фракции), сливаются коллектором фракций в подготовленные пробирки в штативе, в коллекторе фракций. Для дальнейшей работы отбираются пробирки с фракциями, соответствующими первому вышедшему пику.

8. Повторить пункты 3-8 для каждого из анализируемых пептидов. Результаты анализов автоматически сохраняются в программе.

VII. Консервация хроматографической системы.

Консервация системы проводится в конце рабочего дня, после проведения всех запланированных работ.

1. Вытащить заборную трубку насоса А из бутылки с дистиллированной водой и погрузить в бутылку с 20% этанолом. Закрыть бутылку с дистиллированной водой

2. В программе ChromLab, в окне управления хроматографом нажать на пиктограмму инжектора, переключить инжектор в положение "Pump to waste". Затем нажать на пиктограмму насоса, в открывшемся окне настройки насосов установить скорость потока равной 10 мл/мин, значение "%B" установить равное 100, значение "duration" установить равным 10 мл, затем нажать кнопку "Start". После остановке насоса в окне управления хроматографом нажать на пиктограмму инжектора, переключить инжектор в положение "Pump to waste". Затем нажать на пиктограмму насоса, в открывшемся окне настройки насосов установить скорость потока равной 10 мл/мин, значение "%B" установить равное 0, значение "duration" установить равным 10 мл, затем нажать кнопку "Start"

3. После остановки насоса, в окне управления хроматографической системой, нажать на пиктограмму инжектора, переключить инжектор в положение "System Pump Inject Loop". Затем нажать на пиктограмму насоса, в открывшемся окне настройки насосов установить скорость потока равной 0,1 мл/мин, значение "%B" установить равное 100, значение "duration" установить равным 30 мл, затем нажать кнопку "Start".

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №4. Лиофилизация пептидов

Цель работы: получить лиофилизированный пептид

Реактивы: жидкий азот, деионизированная вода

Оборудование: Сублимационная сушка серии Vaco 2; Автоматические дозаторы; Ламинарный шкаф; Сосуд Дьюара

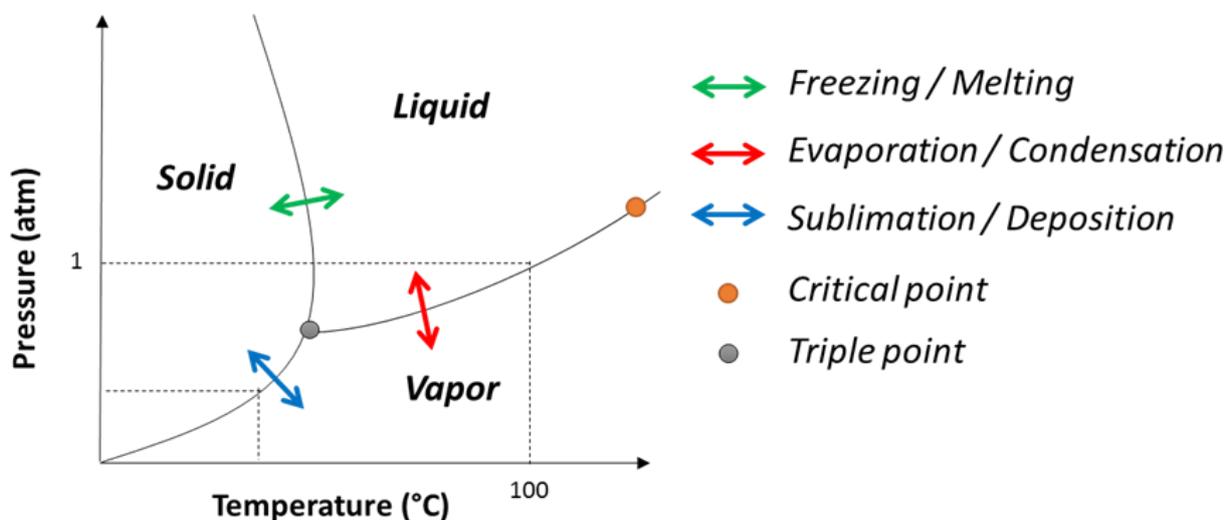
Теоретическая часть:

Лиофилизация — это процесс удаления воды, который обычно используется для сохранения скоропортящихся материалов, продления срока годности или для того, чтобы сделать материал более удобным для транспортировки.

3 основных этапа лиофилизации:

Фаза замораживания

Существуют различные методы заморозки продукта. Заморозка может осуществляться в морозильной камере, охлаждающей ванне (морозильной камере), в жидком азоте или на полке в сублимационной сушилке. Охлаждение материала ниже тройной точки гарантирует, что произойдет сублимация, а не плавление. Это сохраняет его физическую форму.



Лиофилизацию проще всего осуществить с использованием крупных кристаллов льда, которые можно получить путем медленного замораживания или отжига. Однако в случае с биологическими материалами, когда кристаллы слишком велики, они могут разрушить стенки клеток, и это приводит к неидеальным результатам сублимационной сушки. Чтобы предотвратить это, замораживание проводят быстро. Для материалов, которые склонны к осаждению, можно использовать отжиг. Этот процесс включает быстрое замораживание, а затем повышение температуры продукта, чтобы позволить кристаллам вырасти.

Фаза первичной сушки (сублимации)

Вторая фаза лиофилизации — первичная сушка (сублимация), при которой давление понижается, а к материалу добавляется тепло для сублимации воды. Вакуум ускоряет сублимацию. Холодный конденсатор обеспечивает поверхность для прилипания и затвердевания водяного пара. Конденсатор также защищает вакуумный насос от водяного пара. На этой фазе удаляется около 95% воды из материала. Первичная сушка может быть медленным процессом. Слишком много тепла может изменить структуру материала.

Фаза вторичной сушки (адсорбции)

Заключительная фаза лиофилизации — вторичная сушка (адсорбция), во время которой удаляются ионно-связанные молекулы воды. При повышении температуры выше, чем в первичной фазе сушки, связи между материалом и молекулами воды разрываются. Лиофилизированные материалы сохраняют пористую структуру. После завершения процесса лиофилизации вакуум можно разрушить инертным газом, прежде чем материал будет запечатан. Большинство материалов можно высушить до остаточной влажности 1–5%.

Практическая часть:

Ход работы:

I. Подготовка образцов

1. подписать микроцентрифужные пробирки в соответствии с номером образца
2. сконцентрировать образцы до 1 мл
3. перенести образцы из эппендорфов в микроцентрифужные пробирки 1,5-2 мл с юбкой и завинчивающейся крышкой

II. Заморозка образцов

1. охладить камеру сублимационной сушки до -86°C .

2. заморозить микроцентрифужные пробирки с образцами в жидком азоте в течение 10 минут.
3. перенести замороженные микроцентрифужные пробирки в охлажденную камеру сушки и включить вакуум.

III. Сублимационное высушивание образцов

1. установить режим высушивания при -86°C и при давлении 0,2 мбар на 24 часа.
2. по окончании сублимации плотно завинтить микроцентрифужные пробирки с образцами.

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

3 семестр

Трек 1 Разработка тест-систем

Тема 10. Сборка лабораторных образцов наборов реагентов из отдельных компонентов

Лабораторные работы

Изучение компонентов ПЦР и их распределение по компонентам набора реагентов на примере какого-либо набора для ПЦР-диагностики, например, UROGEN-тест производства ООО «Тестген».

Состав буфера для ПЦР

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси следующих компонентов:

· буферный раствор (стандартный: 10-50 мМ Трис-НСl, pH=8,3; до 50 мМ КCl, 1,5 мМ и выше MgCl₂; ± желатин или бычий сывороточный альбумин, до 100 мкг/мл; и/или неионные детергенты, 0,05-0,1% v/v); как правило, прилагается к соответствующему ферменту.

Методика расчета и технология приготовления стоковых растворов на примере 100 мкМ олигонуклеотидов.

Разведение сухих олигонуклеотидов.

Приготовление стокового 100 мкМ раствора.

1. Материалы:

- 1.1. В качестве разбавителя используется RNase-free water,
- 1.2. Наконечники с аэрозольным барьером, свободные от ДНК и ДНаз, объемом 5-50, 20-200, 200-1000, 1000-5000 мкл,
- 1.3. Штатив для пробирок на 1,5 – 2,0 мл минимум на 10 мест;
- 1.4. Комплект спецодежды;
- 1.5. Салфетки;
- 1.6. 0,1% раствор «ДП-2Т»;
- 1.7. 70% этиловый спирт для обработки;
- 1.8. Ёмкость для сброса отработанных наконечников с одноразовым пакетом.

2. Оборудование.

- 2.1. ПЦР-бокс или ламинарный шкаф с отключенным воздушным потоком;
- 2.2. Автоматические пипетки переменного объема 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл;
- 2.3. Центрифуга с оборотами не менее 10 тыс. g;
- 2.4. Вортекс и центрифуга с оборотами не менее 1 тыс. g, либо автоматическая центрифуга-вортекс;
- 2.5. Морозильная камера от минус 24 до минус 16 $^{\circ}\text{C}$;
- 2.6. Холодильник от 2 до 8 $^{\circ}\text{C}$.

3. Процедура.

- 3.1. Надеть комплект спецодежды для подготовки рабочего места.

- 3.2. Внести в ПЦР-бокс необходимые расходные материалы (наконечники с аэрозольным барьером, свободные от ДНК и ДНаз, объемом 5-50, 20-200, 200-1000, 1000-5000 мкл), предварительно протерев внешние поверхности коробок с наконечниками салфеткой, смоченной в 70% спирте для обработки.
- 3.3. Достать из морозильной камеры от минус 24°C до минус 16°C, либо из холодильника от 2 до 8°C полученный препарат лиофилизированного олигонуклеотида и оставить на лабораторном столе для нагревания до комнатной температуры (от 18 до 25°C) на 20 минут. Не ставить пробирки с олигонуклеотидами под включенный ультрафиолет!!!
- 3.4. Достать из холодильника от 2 до 8°C флакон с RNase-free water. Оставить RNase-free water на лабораторном столе для нагревания до комнатной температуры (от 18 до 25°C) на 20 минут. Допускается оставлять RNase-free water в ламинаре при включенном ультрафиолете.
- 3.5. Провести влажную уборку в ламинарном или ПЦР-боксе перед работой и включить УФ-обработку на 20 минут.
- 3.6. После обработки УФ надеть комплект чистой спецодежды для работы с чистыми компонентами.
- 3.7. Поместить пробирки с сухими олигонуклеотидами в центрифугу, соблюдая балансировку, открутить 5 минут на скорости не менее 10 тыс. g для сброса всех частичек на дно.
- 3.8. После центрифугирования и окончания УФ-обработки ПЦР-бокса, аккуратно внести пробирки с сухими олигонуклеотидами в ПЦР-бокс, не переворачивая и не наклоняя их, расставить в штатив.
- 3.9. Индивидуально для каждого олигонуклеотида рассчитать количество добавляемой воды в мкл путём деления количества пМоль олигонуклеотида на 10, (например, для 73250 пмоль получаем 732,5 мкл воды).
- 3.10. Новым наконечником соответствующего объёма с аэрозольным барьером аккуратно добавить рассчитанное количество RNase-free water, тем же наконечником пипетировать с визуальным контролем до полного растворения сухого осадка.
- 3.11. Закрыть крышки и оставить пробирки в штативе на 15 минут, каждые 2-3 минуты перемешивается вортированием. Или поместить пробирки в автоматическую центрифугу-вортекс и включить программу для перемешивания в течение 15 минут.
- 3.12. После перемешивания сбросить капли на центрифуге с оборотами не менее 1 тыс. g в течение 1 минуты.
- 3.13. Стоки олигонуклеотидов с концентрацией 100 мкМ готовы, маркерам подписать на пробирках с олигонуклеотидами дату разведения.
- 3.14. Поместить пробирки в полиэтиленовый пакет с застежкой Zip-lock, на пакете написать дату разведения, название проекта.
- 3.15. Хранить при температуре от минус 25 до минус 15 °C.
Убрать рабочее место.

Методика расчета и технология приготовления смеси олигонуклеотидов.

Описание техпроцесса «Приготовление 5x праймер-микса»

Праймер-микс является одним из компонентов набора реагентов для ПЦР-диагностики, представляет собой смесь из 2-15 олигонуклеотидов с концентрациями от 100 до 5000 нМ (обычно пятикратная концентрация относительно готовой ПЦР-смеси) и готовится путём смешивания стоковых растворов олигонуклеотидов с исходной концентрацией 100 мкМ (реже 1 мМ) и деионизованной воды. Рецепт приготовления рассчитывается исходя из концентраций, которые необходимо получить в итоговом праймер-миксе. В некоторых случаях в состав праймер-микса вводятся консерванты, которые добавляются также в виде стоковых растворов (например, с концентрацией 5%) и доводятся до итоговой рабочей концентрации в праймер-миксе (например, 0,05%).

Пример технологической карты приготовления праймер-микса:

Наименование	Начальная концентрация		Концентрация в 5х праймер-миксе		Количество на указанный объём	
Деионизованная вода	-	-	-	-	1 298	мкл
Р-р 5 % консерванта	5	%	0,05	%	15	мкл
F1	100	мкМ	2000	нМ	30	мкл
R1	100	мкМ	2000	нМ	30	мкл
Z1	100	мкМ	1000	нМ	15	мкл
F2	100	мкМ	2000	нМ	30	мкл
R2	100	мкМ	2000	нМ	30	мкл
Z2	100	мкМ	1000	нМ	15	мкл
F3	100	мкМ	1000	нМ	15	мкл
R3	100	мкМ	1000	нМ	15	мкл
Z3	100	мкМ	500	нМ	7,5	мкл

Стандартная операционная процедура «Приготовление 5х праймер-микса»

1. Одеть комплект спецодежды для выполнения СОП «Подготовка рабочего места к работе».
2. Выполнить влажную уборку ПЦР-бокса (ламинарного бокса) согласно СОП «Подготовка рабочего места к работе и уборка после работы».
3. Достать из холодильника все необходимые для работы компоненты: стоковый раствор консерванта, деионизованную воду, и поместить в ПЦР-бокс (ламинарный бокс) для УФ-обработки.
4. Достать из шкафа все необходимые для работы компоненты: пластиковые пробирки на 2 мл с резьбовой крышкой и поместить в ПЦР-бокс (ламинарный бокс) для УФ-обработки.
5. Включить УФ-обработку ПЦР-бокса (ламинарного бокса) на 30 минут.
6. Достать из морозильной камеры все необходимые для работы компоненты: стоки олигонуклеотидов по списку (см. таблицу), поместить на стол при комнатной температуре, не подвергая воздействию УФ-излучения, на 20-30 минут.
7. С помощью магнита прикрепить к верхней панели ПЦР-бокса (ламинарного бокса) распечатку с рецептурой приготовления 5х праймер-микса.
8. После завершения УФ-обработки ПЦР-бокса (ламинарного бокса) и размораживания стоков олигонуклеотидов, одеть комплект спецодежды для выполнения чистых работ в ПЦР-боксе (ламинарном боксе).
9. Взять пробирки с размороженными стоками олигонуклеотидов и расставить в ПЦР-боксе (ламинарном боксе) в штативе для пробирок в таком порядке, чтобы олигонуклеотиды, которые вносятся в одинаковом объёме, оказались рядом: F1 (30 мкл), R1 (30 мкл), F2 (30 мкл), R2 (30 мкл), Z1 (15 мкл), Z2 (15 мкл), F3 (15 мкл), R3 (15 мкл), Z3 (7,5 мкл).
10. Перемешать ёмкость с консервантом, переворачивая 10 раз при закрытой крышке.
11. Поочерёдно перемешать каждую пробирку со стоками олигонуклеотидов на вортексе в течение 3-5 секунд, складывая обратно в штатив. При наличии вортекса с посадочным местом на несколько пробирок установить на него пробирки и включить на 3-5 секунд. При наличии автоматического вортекса-центрифуги установить в него пробирки и включить программу перемешивания (3-5 секунд) и центрифугирования для сброса капель (5-10 секунд), а этом случае п. 12 не выполнять.
12. Сбросить капли на центрифуге при 500-3000 g, установить пробирки обратно в штатив.
13. Промаркировать пробирку на 2 мл с резьбовой крышкой, в которой будет готовиться праймер-микс – нанести маркером название или артикул праймер-микса, номер партии, дату приготовления, либо наклеить этикетку, содержащую эти данные.

14. Открыть крышку пробирки и установить в пустой штатив. Крышку положить в перевёрнутом виде на поверхность ПЦР-бокса, где её нельзя задеть при работе.
15. Взять дозатор на 100-1000 мкл (дозатор, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму) и установить объём 649 мкл, убрать дозатор на место.
16. Открыть крышку ёмкости с деионизованной водой и положить на поверхность ПЦР-бокса в перевёрнутом виде.
17. Взять дозатор на 100-1000 мкл с установленным объём 649 мкл, надеть наконечник на 1000 мкл с фильтром (наконечник, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму).
18. Нажать на поршень дозатора до первого положения и погрузить наконечник на 5-10 мм в деионизованную воду, не задевая дозатором внутренних стенок ёмкости, пропипетировать 2-3 раза (2-3 раза аккуратно набрать и выпустить жидкость ходом поршня между нулевым и первым положением), после чего набрать в наконечник жидкость, аккуратно отпустив поршень до нулевого положения.
19. Ввести наконечник в пробирку для приготовления микса на 2-10 мм, не касаясь наконечником пробирки, и внести жидкость, аккуратно нажав на поршень до первого положения.
20. Повторить пункт 18. Общий объём внесённой в пробирку деионизованной воды составит 1 298 мкл.
21. Аккуратно сбросить наконечник в ёмкость для отходов, нажав на дозаторе кнопку для сброса.
22. Закрыть крышку ёмкости с деионизованной водой.
23. В правую руку взять дозатор на 5-50 мкл (дозатор, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму) и установить объём 30 мкл.
24. Надеть наконечник на 100 мкл с фильтром (наконечник, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму).
25. В левую руку взять пробирку со стоком олигонуклеотида F1, большим пальцем левой руки открыть крышку (для пробирок типа Эппендорф). Не допускается касание перчаткой внутренней поверхности крышки, соприкасающейся с содержимым, при необходимости можно отогнуть крышку пробирки наконечником, надетым на дозатор.
26. Нажать на поршень дозатора до первого положения и погрузить наконечник на 1-5 мм в стоковый раствор олигонуклеотида, не задевая наконечником внутренних стенок пробирки, пропипетировать 2-3 раза (2-3 раза аккуратно набрать и выпустить жидкость ходом поршня между нулевым и первым положением), после чего набрать в наконечник жидкость, аккуратно отпустив поршень до нулевого положения.
27. Закрыть пробирку с олигонуклеотидом и убрать в другой ряд штатива или в другой штатив, чтобы не допустить повторного взятия той же пробирки.
28. Ввести наконечник в пробирку для приготовления микса, погрузить в жидкость на 1-5 мм, внести стоковый раствор олигонуклеотида, нажав на поршень до первого положения, пропипетировать 5-6 раз и нажать на поршень до второго положения, вынуть наконечник из жидкости и убедиться, что в нём не осталось содержимого. (В случае наличия содержимого выдавить его на стенку пробирки для приготовления микса. В случае налипания капель на внутреннюю поверхность наконечника, аккуратно пропипетировать содержимое пробирки для приготовления микса ещё раз, чтобы капли смылись. В случае налипания капель на внешнюю поверхность наконечника, аккуратно погрузить его в жидкость содержимого пробирки для приготовления микса и вынуть, чтобы капли остались в содержимом)
29. Аккуратно сбросить наконечник в ёмкость для отходов, нажав на дозаторе кнопку для сброса.
30. Повторить пункты 23-29 для всех стоковых растворов олигонуклеотидов, которые требуется внести в количестве 30 мкл (R1 (30 мкл), F2 (30 мкл), R2 (30 мкл)).
31. В правую руку взять дозатор на 2-20 мкл (дозатор, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму) и установить объём 15 мкл.
32. Надеть наконечник на 20 мкл с фильтром (наконечник, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму).
33. В левую руку взять пробирку со стоком олигонуклеотида Z1, большим пальцем левой руки открыть крышку (для пробирок типа Эппендорф). Не допускается касание перчаткой

- внутренней поверхности крышки, соприкасающейся с содержимым, при необходимости можно отогнуть крышку пробирки наконечником, надетым на дозатор.
34. Нажать на поршень дозатора до первого положения и погрузить наконечник на 1-5 мм в стоковый раствор олигонуклеотида, не задевая наконечником внутренних стенок пробирки, пропипетировать 2-3 раза (2-3 раза аккуратно набрать и выпустить жидкость ходом поршня между нулевым и первым положением), после чего набрать в наконечник жидкость, аккуратно отпустив поршень до нулевого положения.
 35. Закрыть пробирку с олигонуклеотидом и убрать в другой ряд штатива или в другой штатив, чтобы не допустить повторного взятия той же пробирки.
 36. Ввести наконечник в пробирку для приготовления микса, погрузить в жидкость на 1-5 мм, внести стоковый раствор олигонуклеотида, нажав на поршень до первого положения, пропипетировать 5-6 раз и нажать на поршень до второго положения, вынуть наконечник из жидкости и убедиться, что в нём не осталось содержимого. (В случае наличия содержимого выдавить его на стенку пробирки для приготовления микса. В случае налипания капель на внутреннюю поверхность наконечника, аккуратно пропипетировать содержимое пробирки для приготовления микса ещё раз, чтобы капли смылись. В случае налипания капель на внешнюю поверхность наконечника, аккуратно погрузить его в жидкость содержимого пробирки для приготовления микса и вынуть, чтобы капли остались в содержимом)
 37. Аккуратно сбросить наконечник в ёмкость для отходов, нажав на дозаторе кнопку для сброса.
 38. Повторить пункты 31-37 для всех стоковых растворов олигонуклеотидов, которые требуется внести в количестве 15 мкл (Z2 (15 мкл), F3 (15 мкл), R3 (15 мкл)).
 39. Повторить пункты 31-37 для стокового раствора консерванта, в данном случае он вносится в том же количестве – 15 мкл.
 40. В правую руку взять дозатор на 1-10 мкл (дозатор, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму) и установить объём 7,5 мкл.
 41. Надеть наконечник на 10 мкл с фильтром (наконечник, максимальный объём которого ближе к дозируемому объёму).
 42. В левую руку взять пробирку со стоком олигонуклеотида Z3, большим пальцем левой руки открыть крышку (для пробирок типа Эппендорф). Не допускается касание перчаткой внутренней поверхности крышки, соприкасающейся с содержимым, при необходимости можно отогнуть крышку пробирки наконечником, надетым на дозатор.
 43. Нажать на поршень дозатора до первого положения и погрузить наконечник на 1-5 мм в стоковый раствор олигонуклеотида, не задевая наконечником внутренних стенок пробирки, пропипетировать 2-3 раза (2-3 раза аккуратно набрать и выпустить жидкость ходом поршня между нулевым и первым положением), после чего набрать в наконечник жидкость, аккуратно отпустив поршень до нулевого положения.
 44. Закрыть пробирку с олигонуклеотидом и убрать в другой ряд штатива или в другой штатив, чтобы не допустить повторного взятия той же пробирки.
 45. Ввести наконечник в пробирку для приготовления микса, погрузить в жидкость на 1-5 мм, внести стоковый раствор олигонуклеотида, нажав на поршень до первого положения, пропипетировать 5-6 раз и нажать на поршень до второго положения, вынуть наконечник из жидкости и убедиться, что в нём не осталось содержимого. (В случае наличия содержимого выдавить его на стенку пробирки для приготовления микса. В случае налипания капель на внутреннюю поверхность наконечника, аккуратно пропипетировать содержимое пробирки для приготовления микса ещё раз, чтобы капли смылись. В случае налипания капель на внешнюю поверхность наконечника, аккуратно погрузить его в жидкость содержимого пробирки для приготовления микса и вынуть, чтобы капли остались в содержимом)
 46. Аккуратно сбросить наконечник в ёмкость для отходов, нажав на дозаторе кнопку для сброса.
 47. Плотнo, но не слишком туго закрутить крышку (п. 14) пробирки с приготовленным миксом.
 48. Перемешать пробирку с приготовленным миксом на вортексе в течение 3-5 секунд. При наличии автоматического вортекса-центрифуги установить в него пробирки и включить

программу перемешивания (3-5 секунд) и центрифугирования для сброса капель (5-10 секунд), а этом случае п. 49 не выполнять.

49. Сбросить капли на центрифуге при 500-3000 g.
50. Поместить полученный продукт в пакет с замком zip-lock, промаркировать пакет – нанести маркером название или артикул праймер-микса, номер партии, дату приготовления, либо наклеить этикетку, содержащую эти данные.
51. Убрать полученный продукт для хранения при соответствующих условиях (морозильная камера с температурой -18...-25 °С).
52. Убрать используемое сырьё (олигонуклеотиды) в морозильную камеру,
53. Убрать используемое сырьё (стоковый раствор консерванта, деионизованную воду) в холодильник.
54. Надеть комплект спецодежды для выполнения СОП «Подготовка рабочего места к работе».
55. Выполнить влажную уборку ПЦР-бокса (ламинарного бокса) согласно СОП «Подготовка рабочего места к работе и уборка после работы».
56. Включить УФ-обработку ПЦР-бокса (ламинарного бокса) на 30 минут.
57. Сделать отметку о выполнении процедуры (для списания сырья и материалов и постановки продукта на баланс).

Надетым наконечником нельзя касаться внешних поверхностей пробирок, флаконов, других емкостей, а также штативов, оборудования и поверхностей ПЦР-бокса.

Состав положительного, внутреннего и отрицательного контрольных образцов

1. Назначение ПКО, ОКО и ВКО в ПЦР.
2. Понятие о плазидах и геномной ДНК, используемых в качестве ПКО.
3. Приготовление препаратов ДНК с определенной концентрацией (стандартизация).
4. Постановка контрольной ПЦР для оценки правильности полученного ПКО.
5. Понятие о ВКО и его виды.
6. Состав ОКО.

Вспомогательные компоненты.

1. Использование минерального масла для ПЦР.

Тара и маркировка наборов реагентов.

1. Изучение тары для ПЦР-реагентов и её объёма,
2. Правила фасовки, осуществление фасовки модельного раствора по пробиркам.
3. Изучение правил маркировки компонентов ПЦР-наборов.

Сборка готового набора реагентов для ПЦР.

Тема 11. Постановка ПЦР с лабораторными образцами

Лабораторные работы

Виды лабораторных образцов.

Лабораторная работа 1. Постановка ПЦР

Цель работы

1. Протестировать подобранные праймеры и зонды в ПЦР в реальном времени.
2. Познакомиться с организацией работы в ПЦР-лаборатории.
3. Приобрести навыки постановки полимеразной цепной реакции.
4. Приобрести навыки планирования и моделирования ПЦР и подбора праймеров для исследования различных образцов биоматериала.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси следующих компонентов:

- буферный раствор (стандартный: 10-50 мМ Трис-НСl, рН=8,3; до 50 мМ КСl, 1,5 мМ и выше MgCl₂; ± желатин или бычий сывороточный альбумин, до 100 мкг/мл; и/или неионные детергенты, 0,05-0,1% v/v); как правило, прилагается к соответствующему ферменту;
- смесь четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 50-200 мкМ каждого;
- два синтетических олигонуклеотидных праймера длиной 17-25 нуклеотидов (концентрация 0,2-1 мкМ), комплементарных соответствующим участкам ДНК-мишени;
- ДНК-мишень – анализируемый образец нуклеиновых кислот, содержащий искомый фрагмент ДНК; при отсутствии ДНК-мишени специфический продукт не образуется;
- термостабильная ДНК-полимераза (0,5-1 ед. активности).

При постановке ПЦР основной задачей является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

- 1) длина праймеров - 17-25 нуклеотидов;
- 2) T_m праймеров - 50-70 °С;
- 3) температура плавления двух праймеров должна отличаться не более, чем на 2-4 °С;
- 4) наличие на 3'-конце праймеров G, C, GC, CG;
- 5) отсутствие стабильных вторичных структур и возможности формирования димеров праймеров.

При выполнении лабораторной работы в качестве целевого гена, амплифицируемого в ходе работы, используются мишени, подобранные на предыдущем этапе работы.

Реактивы и материалы

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы (в концентрации 10хбуфер)
3. Смесь дНТФ (dNTP)
4. Праймеры f и г для амплификации целевого гена
5. Термостабильная ДНК-полимераза (например, Taq-ДНК-полимераза)
6. Препарат суммарной геномной ДНК, содержащий целевой ген
8. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл

Оборудование

1. Амплификатор
2. Микроцентрифуга
3. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)
4. Дозатор одноканальный (20-200 мкл)
5. Дозатор одноканальный (0,5-20 мкл)

Выполнение работы (на примере постановки ПЦР для амплификации гена 16S рРНК бактерий)

1. Для получения препарата суммарной геномной ДНК использовать суточную культуру бактерий. 1 колонию перенести петлей в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавить 100 мкл деионизованной воды и нагреть на водяной бане при 100 °С в течение 10 минут для лизиса клеток.
2. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут. Супернатант использовать как препарат суммарной геномной ДНК для постановки ПЦР.
3. В тонкостенную пробирку для ПЦР добавить следующие реактивы (общий объем реакционной смеси – 25 мкл):
 - a. Деионизованная вода – 12 мкл;
 - b. Буфер для ДНК-полимеразы – 2,5 мкл;
 - c. Смесь дНТФ – 2,5 мкл (конечная концентрация нуклеотидов 0,1 мМ);
 - d. Праймер f – 1 мкл (конечная концентрация праймера 0,2 мкМ);
 - e. Праймер г – 1 мкл (конечная концентрация праймера 0,2 мкМ);
 - f. Препарат суммарной ДНК – 5 мкл;
 - g. ДНК-полимераза – 1 мкл.
5. Задать режим работы амплификатора согласно следующей схеме:
1 цикл: денатурация – 94 °С, 5 минут;

30 циклов: денатурация – 94 °С, 30 секунд, отжиг – 55 °С, 30 секунд, элонгация – 72 °С, 90 секунд;

1 цикл: достраивание – 72 °С, 5 минут.

6. Поместить пробирки с реакционной смесью в ячейки прибора. Плотнo закрыть гнезда прибора крышкой. Запустить программу амплификации целевого гена.

7. Проанализировать графики результатов ПЦР в реальном методе (опционно электрофореза в агарозном геле (нанести на гель аликвоту реакционной смеси 5 мкл)).

Принятие решения о выборе кандидатных праймеров.

Оформление результатов работы.

Тема 12. Оптимизация условий полимеразной цепной реакции

Лабораторные работы

1. Постановка ПЦР в градиенте температуры отжига праймеров и оценка результатов.
2. Постановка ПЦР с разными концентрациями праймеров и оценка результатов.
3. Постановка ПЦР с разными концентрациями зонда и оценка результатов.
4. Постановка ПЦР с разными концентрациями магния и оценка результатов.
5. Постановка ПЦР с разными концентрациями полимеразы и оценка результатов.

Тема 13. Изучение аналитических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Лабораторные работы

1. Повторение методов определения концентрации ДНК на спектрофотометре, флуориметре и с помощью количественной ПЦР.
2. Определение аналитической чувствительности (предела обнаружения, предела измерения) лабораторного образца набора реагентов на разведениях контрольного образца с известной концентрацией. Различные представления концентрации ДНК/РНК.
3. Определения аналитической специфичности лабораторного образца набора реагентов на панели контрольных образцов.
4. Постановка ПЦР на разведениях и построение калибровочного графика. Измерение концентрации с помощью количественно ПЦР. Определение линейности и эффективности ПЦР.
5. Постановка ПЦР с различными концентрациями интерферирующих веществ (на примере гемоглобина или другого ингибитора), оценка результатов, определение минимальной ингибирующей концентрации.

Тема 14 Изучение клинических характеристик лабораторных образцов тест-системы

Лабораторные работы

1. Определение клинической чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической ценности, точности лабораторных образцов тест-системе с помощью панели клинических образцов с известным результатом, влияние наборов для выделения ДНК на результатах.
2. Определение воспроизводимости.
3. Статистическая обработка результатов клинических испытаний.
4. Определение референсного диапазона.

Трек 2 Разработка генно-инженерного продукта

Тема 10. Получение генетической конструкции, амплификация гена

Лабораторные работы

Лабораторная работа 1. СИНТЕЗ ЦЕЛЕВОГО ФРАГМЕНТА ДНК МЕТОДОМ ПЦР

Цель работы

1. Методом ПЦР наработать целевой фрагмент.
2. Познакомиться с организацией работы в ПЦР-лаборатории.

3. Приобрести навыки постановки полимеразной цепной реакции.

4. Приобрести навыки планирования и моделирования ПЦР и подбора праймеров для исследования различных образцов биоматериала.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси следующих компонентов:

- буферный раствор (стандартный: 10-50 мМ Трис-НСl, рН=8,3; до 50 мМ КСl, 1,5 мМ и выше MgCl₂; ± желатин или бычий сывороточный альбумин, до 100 мкг/мл; и/или неионные детергенты, 0,05-0,1% v/v); как правило, прилагается к соответствующему ферменту;
- смесь четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов, 50-200 мкМ каждого;
- два синтетических олигонуклеотидных праймера длиной 17-25 нуклеотидов (концентрация 0,2-1 мкМ), комплементарных соответствующим участкам ДНК-мишени;
- ДНК-мишень – анализируемый образец нуклеиновых кислот, содержащий искомый фрагмент ДНК; при отсутствии ДНК-мишени специфический продукт не образуется;
- термостабильная ДНК-полимераза (0,5-1 ед. активности).

В настоящее время метод ПЦР активно используется для синтеза на основе препарата суммарной геномной ДНК донорного организма целевого фрагмента (гена) для клонирования данного фрагмента, определения его структуры и применения в генной инженерии для введения в другие организмы.

При постановке ПЦР основной задачей является правильный подбор праймеров, которые должны отвечать ряду критериев:

- 1) длина праймеров - 17-25 нуклеотидов;
- 2) T_m праймеров - 50-70 °С;
- 3) температура плавления двух праймеров должна отличаться не более, чем на 2-4 °С;
- 4) наличие на 3'-конце праймеров G, C, GC, CG;
- 5) отсутствие стабильных вторичных структур и возможности формирования димеров праймеров.

При выполнении лабораторной работы в качестве целевого гена, амплифицируемого в ходе работы, используются гены ферментов, катализирующих реакции с образованием цветного продукта, гены флуоресцентных белков либо гены 16S рРНК бактерий.

Реактивы и материалы

1. Деионизованная вода
2. Буфер для ДНК-полимеразы (в концентрации 10хбуфер)
3. Смесь дНТФ (dNTP)
4. Праймеры 1f и 2r для амплификации целевого гена
5. Термостабильная ДНК-полимераза (например, Taq-ДНК-полимераза)
6. Препарат суммарной геномной ДНК, содержащий целевой ген
8. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл

Оборудование

1. Амплификатор
2. Микроцентрифуга
3. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)
4. Дозатор одноканальный (20-200 мкл)
5. Дозатор одноканальный (0,5-20 мкл)

Выполнение работы (на примере постановки ПЦР для амплификации гена 16S рРНК бактерий)

1. Для получения препарата суммарной геномной ДНК использовать суточную культуру бактерий. 1 колонию перенести петлей в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавить 100 мкл деионизованной воды и нагреть на водяной бане при 100 °С в течение 10 минут для лизиса клеток.
2. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут. Супернатант использовать как препарат суммарной геномной ДНК для постановки ПЦР.

3. В тонкостенную пробирку для ПЦР добавить следующие реактивы (общий объем реакционной смеси – 25 мкл):
 - a. Деионизованная вода – 12 мкл;
 - b. Буфер для ДНК-полимеразы – 2,5 мкл;
 - c. Смесь дНТФ – 2,5 мкл (конечная концентрация нуклеотидов 0,1 мМ);
 - d. Праймер 1f – 1 мкл (конечная концентрация праймера 0,2 мкМ);
 - e. Праймер 2г – 1 мкл (конечная концентрация праймера 0,2 мкМ);
 - f. Препарат суммарной ДНК – 5 мкл; g. ДНК-полимераза – 1 мкл.
 5. Задать режим работы амплификатора согласно следующей схеме:
 - 1 цикл: денатурация – 94 °С, 5 минут;
 - 30 циклов: денатурация – 94 °С, 30 секунд, отжиг – 55 °С, 30 секунд, элонгация – 72 °С, 90 секунд;
 - 1 цикл: достраивание – 72 °С, 5 минут.
 6. Поместить пробирки с реакционной смесью в ячейки прибора. Плотно закрыть гнезда прибора крышкой. Запустить программу амплификации целевого гена.
 7. Проанализировать результаты ПЦР методом электрофореза в агарозном геле (нанести на гель аликвоту реакционной смеси 5 мкл).
 8. Вырезать участок геля, содержащий амплифицированный фрагмент ДНК. Выделить амплифицированный фрагмент из геля с помощью соответствующего набора реагентов.
- Оформление результатов работы.

Лабораторная работа 2. ОБЪЕДИНЕНИЕ ВЕКТОРА И ЧУЖЕРОДНОГО ЦЕЛЕВОГО ФРАГМЕНТА ДНК РЕСТРИКТАЗНО-ЛИГАЗНЫМ МЕТОДОМ

Цель занятия

1. Изучить свойства и механизм действия рестриктаз и лигаз.
 2. Выработать представление о векторах для клонирования фрагментов ДНК в клетках *E. coli*.
 3. Приобрести навыки направленного встраивания клонируемого фрагмента в вектор.
- Для объединения фрагментов ДНК при создании генетических конструкций используется рестриктазно-лигазный метод.
- Рестриктазы – эндонуклеазы, узнающие специфичные участки в составе ДНК и разрезающие двунитевую ДНК на фрагменты. В генной инженерии применяют рестриктазы класса II, которые узнают специфичные палиндромные нуклеотидные последовательности двухцепочечной ДНК длиной от 4 до 8 п.н. (сайты рестрикции) и разрезающие ДНК внутри данных участков строго определенным образом. Ряд рестриктаз расщепляет ДНК строго по оси симметрии сайта рестрикции, что приводит к образованию фрагментов ДНК с тупыми концами. Другие ферменты расщепляют сайты рестрикции с образованием взаимокomплементарных одноцепочечных выступающих (липких) концов. Если гидролизовать молекулы ДНК определенной рестриктазой все образуемые фрагменты будут иметь идентичные липкие концы. При смешивании разных препаратов фрагментов ДНК с комплементарными липкими концами в определенных условиях липкие концы могут реассоциировать (слипаться) за счет комплементарных взаимодействий, и таким образом могут объединяться фрагменты молекул ДНК из разных источников.
- Большой интерес для экспериментов по клонированию фрагментов ДНК представляют рестриктазы, которые, узнавая различные сайты рестрикции, дают при гидролизе ДНК одинаковые комплементарные липкие концы.
- Для направленного встраивания клонируемого фрагмента ДНК в вектор используют пару рестриктаз, отвечающих следующим критериям:
- 1) для каждой из рестриктаз в составе вектора есть только один (уникальный) сайт узнавания (сайт рестрикции);

2) клонируемый фрагмент ДНК (целевой ген) не содержит сайтов узнавания (рестрикции) данных рестриктаз;

3) обе рестриктазы при гидролизе своих сайтов рестрикции формируют липкие концы фрагментов ДНК, не комплементарные друг другу (липкие концы, формируемые одной рестриктазой, не комплементарны липким концам, формируемым вторым ферментом).

Для встраивания клонируемого фрагмента ДНК вектор обрабатывают двумя выбранными рестриктазами, в результате чего происходит удаление небольшого фрагмента ДНК между двумя сайтами рестрикции данных рестриктаз и линейаризация вектора. При амплификации целевого гена в состав праймеров со стороны 5'-концов включают сайты рестрикции выбранных рестриктаз, что позволяет в ходе ПЦР присоединить сайты узнавания соответствующих рестриктаз к началу (сайт узнавания первой рестриктазы) и концу (сайт узнавания второй рестриктазы) клонируемого фрагмента. Для обеспечения эффективной работы рестриктаз необходимо, чтобы со стороны 5'-концов праймеров находились дополнительные нуклеотиды.

Внесение большого избытка рестриктазы класса II в реакционную смесь может вызвать наряду с гидролизом специфичных сайтов рестрикции расщепление ДНК по дополнительным участкам. Нарушение специфичности действия рестриктаз может также происходить при снижении ионной силы, повышении pH раствора, при введении в раствор органических растворителей или ионов Mn^{2+} .

Лигазы – ферменты, катализирующие образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатным (5'-P) и 3'-гидроксильным (3'-ОН) концами цепей ДНК.

При клонировании используют два типа ДНК-лигаз: ДНК-лигазу *E. coli* и ДНКлигазу фага T4, которые различаются по потребности в кофакторах. ДНКлигаза *E. coli* в качестве кофактора требует НАД⁺, в то время как лигаза фага T4 – АТФ. Кроме того, в отличие от ДНК-лигазы *E. coli* ДНК-лигаза фага T4 способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами (без перекрывающихся одноцепочечных комплементарных участков). Поэтому в настоящее время в геной инженерии предпочитают использовать ДНК-лигазу фага T4, как более универсальный фермент, для воссоединения разрывов в цепях ДНК и для объединения фрагментов ДНК.

Реактивы и материалы

1. Буфер для рестриктаз;
2. Рестриктаза Pst I;
3. Рестриктаза XhoI;
4. Смесь фенол-хлороформ (в соотношении 1:1)
5. Этанол
6. Буфер для лигирования, 10x (660 mM Трис, pH=7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM ДТТ);
7. 10 mM АТФ;
8. ДНК-лигаза фага T4;
9. Клонированный фрагмент ДНК (продукт ПЦР с присоединенными сайтами узнавания рестриктаз);
10. Вектор для клонирования (вектор серии pET)

Оборудование

1. Термостат твердотельный
2. Холодильник бытовой
3. Дозатор одноканальный (0,5-20 мкл)
4. Центрифуга MiniSpin (Eppendorf).

Выполнение работы

Рестрикция

1. В 2 пластиковые пробирки объемом 1,5 мл отобрать по 20 мкл буфера для рестриктаз. Добавить в одну пробирку аликвоту раствора вектора, содержащую 0,1-1 мкг ДНК, в другую – аналогичную аликвоту препарата клонируемого фрагмента ДНК. Добавить в каждую

пробирку аликвоты растворов рестриктаз PstI и XhoI, содержащие 1 единицу активности ферментов.

2. Инкубировать пробирки 1 час при 37 °С.

3. Удалить фермент из растворов ДНК смесью фенол-хлороформ (в соотношении 1:1). Переосадить ДНК вектора и клонируемого фрагмента из растворов этанолом. Растворить в 10 мкл H₂O.

Лигирование

4. В пластиковую пробирку объемом 1,5 мл отобрать 3 мкл буфера для лигирования (с концентрацией 10x). Добавить аликвоты препаратов вектора и клонируемого фрагмента ДНК в соотношении 1:3 -1:5 (по молям), общая концентрация ДНК – до 1 мкг. Добавить 3 мкл 10 мМ раствора АТФ. Добавить H₂O до общего объема 30 мкл.

5. Добавить ДНК-лигазу фага T4 (1-3 единиц активности).

6. Инкубировать ночь при 12-16°С.

7. Препарат после лигирования использовать для трансформации клеток E. coli.

Тема 11. Клонирование гена в плазмидный вектор

Лабораторная работа

Цель: Клонирование фрагмента ДНК в плазмидный вектор.

Этапы:

1) Получение фрагмента ДНК (с помощью полимеразной цепной реакции, или рестрикции)

2) Встраивание клонируемого (чужеродного) фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (рестрикция и лигирование);

Задание 1. Определение концентрации нуклеиновых кислот

Для многих методик манипуляции с ДНК (ПЦР, рестрикция, лигирование) необходимо знать ее концентрацию. Довольно часто количественную и качественную оценку препарату выделенной ДНК можно оценить при гель электрофорезе, следующим, как правило, сразу за процедурой выделения. Для этого визуально сравнивают на соседних дорожках геля интенсивность свечения в ультрафиолете полученного образца с образцом известной концентрации (с маркерами молекулярной массы, концентрация которых указывается в описании).

Определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты, можно с помощью спектрофотометра, что точнее и быстрее. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм. Нуклеиновые кислоты (НК) поглощают УФ излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания нуклеиновых кислот, особенно пиримидиновые. Пиримидины поглощают УФ свет примерно в 10–20 раз интенсивнее, чем хромофоры белковых молекул – триптофан, тирозин и фенилаланин имеющих максимум поглощения при 280 нм. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей полученных при измерении 260 нм и 280 нм должно быть более 1,8. Оптическая плотность раствора нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм, равная 1, соответствует 50 мкг/мл двухцепочечных ДНК и РНК, 40 мкг/мл одноцепочечных ДНК и РНК и 20 мкг/мл олигонуклеотидов.

По известной оптической плотности раствора можно рассчитать концентрацию, мкг/мкл, по соответствующим формулам: для двух цепей полинуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.05$;

для одиночных цепей ДНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.037$;

для одиночных цепей РНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.04$;

для олигонуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.02$, где ΔA_{260} - разница оптических плотностей раствора нуклеиновых кислот и растворителя, которым практически всегда является стерильная деионизованная вода.

Задание 2. Рестрикция

Эндонуклеазы рестрикции - это ферменты, которые распознают определенные участки на чужеродной ДНК и разрезают фосфодиэстеразную связь между нуклеотидами. Впервые подобный фермент был получен из E. coli (разрезал ДНК в случайных сайтах). Сейчас

используются рестриктазы типа II - они обладают только рестрикционной активностью, разрезают ДНК в строго определенных сайтах, не требуют АТФ для проявления активности. Сейчас коммерческие ферменты выпускаются с приложенным оптимальным буфером. Все фирмы – производители имеют свою систему буферов, поэтому необходимо смотреть подходящий буфер на сайте производителя, его концентрацию и условия рестрикции. За единицу активности рестриктазы принимают количество фермента, способное за 1 ч в оптимальных для него условиях полностью гидролизовать 1 мкг ДНК фага λ.

Для проведения успешной рестрикции необходимо соблюдать ряд условий.

- 1) Использовать корректный буфер (прилагаемый к ферменту)
- 2) Количество ДНК: От 1 до 10 мкг, поскольку большие количества ДНК увеличивают вязкость раствора, что приводит к ингибированию реакции
- 3) Количество фермента: 1 единица на 1 мкг ДНК. Избыток фермента может приводить к неспецифическому распознаванию ДНК
- 4) Объем смеси: от 10 до 50 мкл
- 5) Время рестрикции – 1-4 часа. В некоторых случаях допускается проводить рестрикцию в течение ночи малым количеством фермента.

1. В микропробирку внести 1 мкг плазмидной ДНК
2. Внести 3 мкл рестрикционного буфера
3. Внести рестриктазу в объеме, соответствующем 1 единице активности,
4. Довести объем смеси до 30 мкл деионизованной водой, и поставить в термостат на 2 часа. Результат рестрикции проверить методом электрофореза.

Задание 3. Дефосфорилирование ДНК

При использовании только одной рестриктазы большинство молекул вектора будет залипать сама на себя и в результате образуется большое количество исходного вектора, не несущего вставку. Чтобы избежать этого, проводят дефосфорилирование для удаления фосфатных групп с 5'-концов фрагментов ДНК, полученных в результате гидролиза эндонуклеазами рестрикции. Поскольку дефосфорилированные концы не сшиваются ДНКлигазой, то такая обработка позволяет предотвратить самолигирование фрагментов ДНК, например, плазмидных векторов, предназначенных для последующего клонирования. Наиболее часто используется щелочная фосфатаза из кишечника теленка (CIP).

1. На 50 мкл реакционной смеси добавить: 5 мкл десятикратного буфера, 0.5-5 мкг ДНК, деионизованная вода – до 50 мкл, 1-2 мкл (5-10 ед.) щелочной фосфатазы (порядка 1-2 ед. на 1 мкг ДНК).
2. Инкубировать в течение 0,5-1 часа при 37°C.
3. Очистить ДНК гель-фильтрацией, на спин-колонках или путем экстракции фенолом-хлороформом с последующим высаживанием 96%-ным этанолом для удаления фосфатазы.

Реакцию можно проводить прямо после реакции рестрикции, внося фосфатазу непосредственно в рестрикционную смесь. В

некоторых случаях бывает удобно использовать термолабильную щелочную фосфатазу из *A. undina* P2. В этом случае необходимо инкубировать при 25°C!!! (Инкубация при 37°C приводит к частичной инактивации фермента).

Задание 4. Лигирование ДНК

Лигаза (лат. ligāre — сшивать, соединять) — фермент, катализирующий соединение двух молекул ДНК с образованием новой фосфорноэфирной связи (лигирование). Буфер для лигирования как правило поставляется в комплекте с ферментом и содержит АТФ. Поэтому данный буфер не следует размораживать много раз во избежание распада АТФ. При первой разморозке буфера рекомендуется слегка нагреть его (до 35-37 °C) и несколько раз встряхнуть до полного растворения осадка. Затем расфасовать его небольшими объемами (20- 50 мкл) в отдельные пробирки, заморозить и использовать эти аликвоты не более 2-3 раз. Реакцию лигирования следует проводить в минимальном объеме (10-20 мкл) с целью увеличения концентрации концов ДНК, и, соответственно эффективности сшивки. Рекомендуемая концентрация концов ДНК – от 0.1 до 1 мкМ. Следует учесть, что эффективность сшивки

выступающих «липких» концов выше, чем «тупых» концов. Соответственно, более протяженные «липкие» концы сшиваются лучше коротких. Стандартную реакцию лигирования можно проводить при 16 °С в течение 0.5-2 час. Но в большинстве случаев наилучшие результаты достигаются при инкубировании реакционной смеси в течение ночи при 4-6 °С. Соотношение сшиваемых фрагментов ДНК подбирается экспериментальным путем. Например, при необходимости сшивки векторной плазмиды и фрагмента(ов) геномной ДНК можно использовать соотношения от 1:5 до 1:0.5, соответственно.

1. На 10 мкл реакционной смеси смешать
Реакционный буфер (десятикратный) – 1 мкл;
Фрагмент ДНК 1 (0.1 мг/мл) – 1 мкл;
Фрагмент ДНК 2 (0.1 мг/мл) – 1-5 мкл;
0.5-1 мкл (100 ед.) Т4 ДНК лигазы.
Вода (Milli-Q) – до конечного объема 10 мкл
2. Инкубировать в течение 16 час при 4-6 °С.
3. Полученная лигазная смесь используется для трансформации бактерий

Тема 12. Трансформация компетентных клеток

Лабораторная работы

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *E. coli* РЕКОМБИНАНТНЫМИ ПЛАЗМИДНЫМИ ВЕКТОРАМИ.

Цель работы

1. Освоить Ca^{2+} -зависимый метод трансформации клеток *E. coli* плазмидными векторами.
2. Изучить методы отбора (скрининга) клонов, несущих целевой фрагмент ДНК.

Процесс, в результате которого экзогенная (рекомбинантная) ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называется трансформацией. Генетически трансформированные клетки принято называть трансформантами. Физиологическое состояние клетки, в котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется компетентностью. Ряд бактерий обладают природной компетентностью, однако многие бактерии, а также дрожжи и культивируемые клетки растений и животных природной компетентностью не обладают, поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют путем физического или химического воздействия.

Доступным и эффективным методом трансформации клеток *E. coli* является $CaCl_2$ -зависимая солевая трансформация: в присутствии ионов Ca^{2+} и одновалентных катионов на холоде (0 °С) с последующим тепловым шоком (42 0 °С) клетки поглощают добавленную в среду экзогенную ДНК. Наиболее эффективно компетентность индуцируется в активно делящихся клетках *E. coli*.

Разработан ряд модификаций данного метода, повышающих эффективность трансформации клеток.

В последнее время для индукции компетентности и трансформации клеток активно используют метод электропорации: кратковременное воздействие (5-20 мс) электрического поля высокой напряженности на клеточную мембрану приводит к формированию пор, время существования и размер которых достаточен для перехода в клетку молекул ДНК из внешней среды под действием осмотических сил.

Задание 1. Получение компетентных клеток *E. coli*

Реактивы и материалы

1. Клетки *E. coli*, штаммы DH5, HB101, JM109 или другие;
2. Среда LB (1 г пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl растворить в 100 мл воды; довести рН до 7,5 с помощью NaOH; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин);
3. Суточная культура клеток *E. coli* на чашках Петри с агаром LB (К 100 мл среды LB добавить 1,5 г агара; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин; охладить до температуры 50 °С, разлить в чашки Петри. После застывания агара чашки подсушить.

Посеять на чашки с агаром LB культуру клеток *E. coli*, инкубировать чашки в термостате при 37 °С 16-20 часов до появления видимых колоний диаметром 2-3 мм);

4. Раствор RFI (К 130 мл воды добавить 2,4 г RbCl, 1,98 г $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 6 мл 1 М раствора ацетата К с рН = 7,5, 0,3 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Довести рН раствора до 5,8 с помощью 0,2 М уксусной кислоты. Добавить 30 г глицерина, довести водой объем раствора до 200 мл. Стерилизовать полученный раствор пропусканием через мембранный фильтр с порами диаметром 0,22 мкм);

5. Раствор RFII (К 150 мл воды добавить 4 мл 0,5 М MOPS буфера с рН = 6,8, 0,24 г RbCl, 2,2 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Довести рН раствора до 6,8 с помощью NaOH. Добавить 30 г глицерина, довести водой объем раствора до 200 мл.

Стерилизовать полученный раствор пропусканием через мембранный фильтр с порами диаметром 0,22 мкм);

6. Лед

7. Пробирки пластиковые объемом 1,5 мл и 2 мл;

8. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл.

Оборудование

1. Шейкер термостатируемый с платформой для шейкера (37 С)

2. Спектрофотометр

3. Центрифуга

4. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)

5. Стерильные пипетки (объем 5 мл и 10 мл)

6. Стерильные флаконы (объем 20 мл и 500 мл)

7. Петля бактериологическая

8. Стерильные центрифужные пробирки (объем 50 мл)

9. Стерильные эппендорфы

Выполнение работы

1. В стерильный флакон стерильной пипеткой отобрать 5 мл среды LB.

2. С чашки с суточной культурой клеток *E. coli* петлей отобрать одну хорошо изолированную колонию диаметром 2-3 мм и ресуспендировать ее в 5 мл среды LB. Инкубировать полученную суспензию клеток *E. coli* при встряхивании (на качалке) при 37 С 12-16 часов.

3. Стерильной пипеткой отобрать 1 мл полученной культуры клеток *E. coli* и добавить его к 100 мл среды LB. Инкубировать суспензию клеток *E. coli* при встряхивании при 37 С. Периодически стерильно отбирать пробы и определять оптическую плотность суспензии клеток при длине волны 590 нм (D_{590}). Подрастить культуру клеток *E. coli* до плотности, при которой $D_{590} = 0,5$.

4. Стерильно разлить полученную суспензию клеток *E. coli* в 4 центрифужные пробирки по 24 мл ($V_{нач}$). Инкубировать пробирки во льду 15 минут.

5. Центрифугировать суспензию клеток в режиме 3000 об/мин, 4 С, 10 минут.

6. Слить надосадочную жидкость. К осадку клеток в центрифужных пробирках добавить охлажденный во льду раствор RFI ($1/3V_{нач}$, т.е. 8 мл). Осторожно ресуспендировать клетки, вращая пробирки между ладонями. Инкубировать пробирки во льду 40 мин.

7. Центрифугировать суспензию клеток в режиме 3000 об/мин, 4 С, 10 минут.

8. Слить надосадочную жидкость. К осадку клеток в центрифужных пробирках добавить охлажденный во льду раствор RFII ($1/12,5V_{нач}$, т.е. 1,92 мл). Осторожно ресуспендировать клетки, вращая пробирки между ладонями.

9. Разлить полученную суспензию клеток *E. coli* в стерильные эппендорфы по 0,2 мл, заморозить клетки в жидком азоте и хранить при -70 С.

Задание 2. Трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидными векторами.

Реактивы и материалы

1. Суспензия компетентных клеток *E. coli*, замороженная и хранящаяся при температуре -70 С;

2. Препарат вектора со вставкой целевого фрагмента ДНК;

3. Среда LB (1 г пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl растворить в

- 100 мл воды; довести рН до 7,5 с помощью NaOH; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин);
4. Ампициллин (водный раствор с концентрацией антибиотика 100 мг/мл);
 5. Чашки Петри с агаром LB, содержащем ампициллин (К 100 мл среды LB добавить 1,5 г агара; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин; охладить до температуры 50 С, добавить ампициллин в соотношении 1:1000, разлить в чашки Петри)
 6. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл.

Оборудование

1. Водяная баня (42 °С)
2. Шейкер термостатируемый с платформой для шейкера (37 °С)
3. Центрифуга MiniSpin (Eppendorf).
4. Термостат для чашек Петри (37 °С)
5. Дозатор одноканальный (0,5-10 мкл)
6. Дозатор одноканальный (20-200 мкл)
7. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)

Выполнение работы

1. Пробирка с замороженными компетентными клетками *E. coli* (объем суспензии клеток 0,2 мл) оттаивает во льду.
 2. Добавить 10 мкл препарата вектора со вставкой целевого фрагмента ДНК (после процедуры лигирования); осторожно перемешать содержимое пробирки, вращая пробирку между ладонями. (Концентрация вектора в препарате после лигирования 1 мкг/мл).
 3. Инкубировать пробирку во льду 40 минут.
 4. Тепловой шок. Осторожно поместить пробирку на 90 секунд на водяную баню с температурой 42 °С.
 5. Инкубировать пробирку во льду 30 минут.
 6. Добавить 1 мл среды LB без антибиотика. Инкубировать культуру при слабом встряхивании или в сухом термостате 45 минут при 37 °С.
 7. Добавить антибиотик ампициллин в соотношении 1:1000 (концентрация исходного раствора ампициллина 100 мг/мл).
 8. Отобрать 0,2 мл суспензии клеток и посеять их на чашку Петри, содержащую агаризованную среду LB с ампициллином. Растереть стерильным шпателем.
 9. Остаток культуры клеток в пробирке сконцентрировать путем центрифугирования при 9000 об/мин 1 минуту. Большую часть надосадочной жидкости удалить пипеткой. Осадок клеток ресуспендировать и посеять на чашку Петри, содержащую агаризованную среду LB с ампициллином. Растереть стерильным шпателем.
 10. Инкубировать чашки 16-20 часов в термостате при 37 °С (чашки в термостат ставить в перевернутом положении агаром вверх!). Чашки с выросшими колониями клеток являются библиотекой. Хранить их в холодильнике при 4-8 °С в перевернутом положении (агаром вверх!).
 11. После появления видимых колоний клеток *E. coli* диаметром 2-3 мм с помощью нитроцеллюлозного фильтра сделать отпечаток колоний на свежую чашку Петри с агаризованной средой LB и ампициллином. Или с помощью стерильных спичек пересеять выросшие колонии на свежие чашки Петри с агаром LB и ампициллином штрихами в определенном порядке. Инкубировать новые чашки Петри 16-20 часов в термостате при 37°С (чашки в термостат ставить в перевернутом положении агаром вверх!) до появления видимых колоний. Данные чашки Петри использовать для поиска (скрининга) колоний, содержащих вектор с целевым фрагментом ДНК.
- Оформление результатов работы

Тема 13. Работа с культурами прокариот/эукариот, наработка биомассы

Лабораторная работы

Цель работы

1. Освоить работу с культурами клеток, наработку биомассы.
2. Изучить методы отбора рекомбинантных штаммов, обладающих максимальной гиперпродукцией белков.

Растворы: ИПТГ 0.1М = 0.024 г на 1 мл деионизованной воды, добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии; АГТ 2 мг/мл = 0.002 г на 1 мл 96% этанола, разбавить в 10 раз этанолом и добавлять 1 мкл на 1 мл клеточной суспензии.

1. Одну колонию с чашки с трансформантами перенести в 1 мл LB с соответствующим антибиотиком, и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин. *

* Количество отдельных колоний варьируется от 1 до максимального (до 9 или 18 и т. д., чтобы поместилось на один или два и т. д. ПААГ-гелей). Одна колония является контрольной – в нее не добавляется индуктор.

2. 200 мкл ночной культуры рекомбинантных штаммов *E. coli* перенести в 2 мл среды LB и выращивать 2–3 часа на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин при 37 °С до достижения ОП600=0.8.

3. Для снятия репрессии и индукции гиперпродукции белка внести ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ (для плазмид с лактозным оператором), или АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл (для плазмид с тетрациклиновым оператором), или арабинозу до конечной концентрации 0.2% (для плазмид с арабинозным оператором), и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкереинкубаторе при 200 об/мин.

4. 30 мкл суспензии клеток смешать с 10 мкл 4-кратного буфера SB (см. раздел 2.8) и инкубировать при 95 °С в течение 10 мин.

5. Пробы анализировать с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

6. Оставшиеся после приготовления проб для электрофореза клетки собрать центрифугированием в течение 2 мин при 13 тыс. об/мин либо в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Удалить надосадочную жидкость. Хранить при -20 °С.

Лабораторная работа 2. Гиперпродукция белков в клетках *E. coli* и получение клеточных экстрактов

1. Соскрести с чашки некоторое количество клеток рекомбинантного штамма *E. coli* и перенести их в 50 мл среды LB с соответствующим антибиотиком и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.

2. В 450 мл среды LB с соответствующим антибиотиком засеять 50 мл ночной культуры рекомбинантного штамма *E. coli* и инкубировать в течение 2 часов при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин до ОП600~0.8.

3. Добавить ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, либо АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл, либо L-арабинозу до конечной концентрации 0.2% и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкереинкубаторе при 200 об/мин.

4. Клетки собрать с помощью центрифугирования в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин.

5. Клетки ресуспендировать в 20 мл буфера DB для последующей очистки на Ni-NTA сефарозе либо в 20 мл StW буфера для последующей очистки на стреп-тактин сефарозе.

6. Разрушить клетки на ультразвуковом дезинтеграторе при 22 кГц во льду (7–10 озвучиваний по 1 мин с перерывами по 1 мин для охлаждения).

Для этого фалкон с суспензией клеток поместить в круглую колбу с плоским дном (объемом либо 100, либо 250 мл) предварительно наполненную льдом и водой; опустить в фалкон с суспензией клеток кончик УЗ-зонда, как показано на рисунке ниже.

7. Полученный клеточный экстракт центрифугировать в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С для удаления крупных клеточных обломков (дебриса).

8. Полученный клеточный экстракт перенести в эппендорфы и центрифугировать в течение 15 мин при 13 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С 20 для удаления мелких клеточных обломков и затем использовать для аффинной хроматографии.

Оформление результатов работы

Тема 13. Очистка и анализ рекомбинантного белка

Лабораторные работы

Цель работы

1. Освоить работу по очистке рекомбинантного белка.
2. Изучить методы анализа рекомбинантного белка.

Лабораторная работа 1. Очистка белков на Ni-NTA сефарозе

Хроматографию белков, содержащих гексагистидиновый таг проводить на Ni-NTA сефарозе.

1. 2 мл суспензии Ni-NTA сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.
2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера HisW.
3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку как описано в предыдущей лабораторной работе.
4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).
5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.
6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).
7. Колонку промыть буфером HisW, наличие не связавшегося с носителем белка проверять при помощи раствора Брэдфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Брэдфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Брэдфорд необходимо 5 мл раствора Брэдфорд смешать с 5 мл деионизованной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

8. Связавшийся белок элюировать буфером HisE. Элюировать до тех пор, пока раствор Брэдфорд подтверждает наличие белка во фракции (синеет).

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

9. После элюции промыть колонку 5 мл буфера HisW. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

10. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

Со временем Ni-NTA сефароза теряет связывающие свойства и ее нужно промывать и перезаряжать.

Для регенерации Ni-NTA сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизованной воды.
2. Колонку промыть 5 мл 0.2М ЭДТА pH 8.0 (смывает ионы никеля).
3. Колонку промыть 5 мл 6М гуанидина гидрохлорида (удаляет неспецифически сорбированные белки).
4. Колонку промыть 10 мл деионизованной воды.
5. Зарядить колонку 2 мл 0.2М NiSO₄.
6. Промыть сефарозу от несвязавшихся ионов никеля 2 мл деионизованной воды.
7. Промыть колонку 10 мл буфера HisW.
8. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 2. Очистка белков на Strep-tactin сефарозе

Очистку белков со strep-тагом проводить на стреп-тактин сефарозе.

1. 2 мл суспензии стреп-тактин сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.
2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера StW.

3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку.
4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).
5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.
6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).
7. Колонку промыть буфером StW, наличие не связавшегося с носителем белка проверять при помощи раствора Брэдфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Брэдфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Брэдфорд необходимо 5 мл раствора Брэдфорд смешать с 5 мл деионизированной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

8. Связавшийся белок элюировать буфером StE. Элюировать до тех пор, пока раствор Брэдфорд подтверждает наличие белка во фракции (синеет).

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

9. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

10. После элюции промыть колонку 7 мл буфера для регенерации StR.

11. Промыть колонку 15 мл буфера StW.

12. Промыть колонку 5 мл 0.1M NaOH.

13. Хранить колонку в холодильнике в 0.1M NaOH.

Со временем стреп-тактин сефароза накапливает на себе неспецифически сорбированные белки, поэтому ее нужно очищать.

Для регенерации стреп-тактин сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизированной воды.

2. Колонку промыть 5 мл 6M гуанидина гидрохлорида для удаления неспецифически сорбированных белков.

3. Колонку промыть 10 мл деионизированной воды.

4. Колонку промыть 10 мл буфера StW.

5. Хранить колонку в холодильнике в буфере StW

Раствор для регенерации StR = 0.012 г 2-[4-гидроксибензеназо] бензойной кислоты (НАВА) на 50 мл буфера StW;

0.1M NaOH = 0.2 г на 50 мл деионизированной воды.

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 3. Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]

Приготовление раствора Брэдфорд:

1. 0.02 г кумасси G-250 растворить в 10 мл этанола.

2. Добавить 20 мл ортофосфорной кислоты.

3. Довести объем раствора до 200 мл деионизированной воды.

4. Полученный раствор отфильтровать через бумажный фильтр.

Построение калибровочной кривой:

1. Приготовить водный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин) 10 мг/мл.

2. Развести водный раствор БСА водой в 10 раз (100 мкл БСА 10 мг/мл + 900 мкл деионизированной воды) до 1 мг/мл.

3. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизированную воду.

4. Разлить по 1 мл по 6 эппендорфам полученный раствор.
5. Добавить в эппендорфы 1, 2, 4, 8 и 16 мкл БСА 1 мг/мл.
6. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов против контроля при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
7. Построить точечную диаграмму, выставить линию тренда, вывести уравнение на график. Коэффициент перед X – коэффициент раствора Брэдфорд.

Определение концентрации белка:

1. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизованную воду.
2. В 1 мл полученного раствора внести 1 мкл исследуемой пробы белка (если 1 мкл недостаточно, то внести еще; затем учесть это при расчете).
3. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
4. Концентрацию белка рассчитать по формуле:

число, полученное на ФЭК × коэфф. р – ра Брэдфорд /объем иссл. пробы белка в мкл = количество белка в мг/мл

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 4. Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Электрофорез белков в денатурирующих условиях по методу Лэммли [Laemmli, 1970] в 10–15%-ном полиакриламидном геле в зависимости от размеров разделяемых молекул, 10% – для белков, размером больше 50 кДа, 15% – для белков, размером меньше 50 кДа.

1. Подготовить электрофоретические стекла для заливки гелей.
2. Залить свежеприготовленный разрешающий гель на 3/4 высоты «бутерброда» из стекла. Следом залить до краев деионизованной воды для формирования ровной границы геля. Дождаться полного застывания геля (примерно 20 мин). Застывание геля определяется появлением четкой границы разделения между гелем и водой.
3. Слить воду и промокнуть остатки фильтровальной бумагой.
4. Залить свежеприготовленный концентрирующий гель и осторожно, не создавая пузырей, поместить между гелей гребенку. Дождаться полного застывания геля (примерно 20 мин).
5. Поместить стекла с гелями в электрофоретический модуль, извлечь гребенку.
6. Поместить модуль в ячейку и залить в них необходимое количество однократного TGB буфера.
7. Внести в лунки исследуемые пробы, предварительно смешанные 3:1 с буфером для внесения и нагретые в течение 10 мин при 95 °С, а также маркер белкового веса.
8. Надеть крышку с электродами, подключить источник питания, соблюдая полярность (красный к красному, черный к черному).
9. Задать нужные параметры и запустить электрофорез. Электрофорез проводить при значении напряжения 100 В в концентрирующем геле и 180 В – в разрешающем.
10. После того, как фронт красителя подойдет к нижнему краю геля, прибор отключить от электропитания, гель осторожно вынуть из стекол, отрезать концентрирующую часть геля (верхняя часть геля с лунками; выбросить) и окрасить гель кумасси синим или нитратом серебра.

Оформление результатов работы

Трек 3 Разработка радиофармпрепаратов

Тема 9. Испытания фармсубстанций in vitro

Лабораторная работы

Лабораторная работы №1. Мечение пептида флуоресцентной меткой

Цель работы: Пометить пептид флуоресцентным зондом FAM-6 эфир

Реактивы: Активированный эфир FAM-6, бикарбонат натрия, деионизованная вода, ДМСО, 96% этанол

Оборудование: Центрифуга с охлаждением, вортекс

Практическая часть:

Ход работы:

I. Мечение пептида с помощью FAM-6 эфир

1. Рассчитайте необходимое количество активированного эфира, используя приведенную ниже формулу:

$$\text{Масса Активированного Эфира [мг]} = 8 \times \text{Масса Амина [мг]} \times \frac{\text{Молекулярная Масса Активированного Эфира [Да]} / \text{Молекулярная Масса Амина [Да]}}{\text{Число 8 — избыток активированного эфира.}}$$

2. Определите объем реакционной смеси. Реакцию можно проводить на любой шкале от наномолей до десятков граммов. При мечении минимальных количеств используйте минимальный объем реакции (10-20 мкл). Оптимальная концентрация белка для мечения составляет 1-10 мг на мл смеси и более.

3. Растворите активированный эфир в 1/10 реакционного объема воды, ДМФ или ДМСО. Вода или ДМФ, не содержащий диметиламина, являются предпочтительными растворителями. Водные растворы NHS-эфиров следует использовать сразу после приготовления.

4. Растворите пептид в буфере с pH 8.3-8.5 объемом 9/10 реакционной смеси. Обычно используют 0.1 М раствор бикарбоната натрия (NaHCO₃). В качестве альтернативы можно использовать 0.1 М фосфатный буфер. Значение pH буфера наиболее важно для качества реакции. Избегайте использования буферов, содержащих амины. Можно использовать буферы на основе Tris, однако это не рекомендуется, поскольку Tris содержит аминокгруппу (хотя ее сродство к активированным сложным эфирам незначительно). При мечении значительных количеств веществ (когда количество активированного эфира составляет сотни миллиграмм) следует учитывать тенденцию к закислению смеси при гидролизе активированного эфира. Необходимо использовать более концентрированный буфер и следить за значением pH.

5. Добавьте раствор активированного эфира к раствору амина в буфере и хорошо размешайте на вортексе. Инкубируйте на льду в течение ночи, или при комнатной температуре в течение от 1 до 4 часов.

II. Очистить меченый пептид от несвязавшегося красителя

1. Подготовить объем спирта в 10 раз превышающий объем реакционной смеси и добавить к смеси

2. Открутить на вортексе

3. Инкубировать при -80 минимум 2 часа

4. Открутить на центрифуге при 14 000g, 4 градусах в течении 30 минут

5. Повторить процедуру

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №2. Анализ связывания меченого пептида с клеточной культурой

Цель работы: Определить связывающую способность флуоресцентно меченого пептида с поверхностью клеточных культур

Реактивы и посуда: флакон с культурой, PBS, готовая среда RPMI-1640, 15-мл пробирки, 50-мл пробирки, FAM-меченый пептид, 48-луночный планшет, дозаторы с переменным объемом, наконечники.

Оборудование и программное обеспечение: CO₂-инкубатор, ламинар, флуоресцентный инвертированный микроскоп;

Практическая часть:

Ход работы:

1. Подготовить 50 мл свежей среды RPMI-1640
2. Трипсинизировать клетки с поверхности культурального флакона
3. Подсчитать концентрацию клеток в 1 мл

4. Засеять в два 48-луночных планшета 18 ячеек с концентрацией клеток 30 000 на лунку в 1 мл среды
5. Оставить инкубироваться на 24 часа в CO₂-инкубаторе
6. Подготовить FAM-меченый пептид в необходимой стоковой концентрации для приготовления трех рабочих концентраций 1x, 10x и 100x, растворив осадок после мечения в деионизированной воде (все расчеты проводить, исходя из рабочей концентрации 1x)
7. Добавить необходимый объем FAM-меченого пептида в 7 мл свежей среды, чтобы получить каждую из рабочих концентраций
8. Сменить в планшете, исходя из групп повторностей, среду на среду, содержащую FAM-меченый пептид в каждой из рабочих концентраций. В контрольной группе сменить среду на свежую.
9. Оставить инкубироваться в CO₂-инкубаторе один планшет на 3 часа, второй - на 24 часа.
10. Через 3 часа убрать среду, содержащую FAM-меченый пептид, промыть каждую ячейку 500 мкл холодного PBS два раза
11. С использованием флуоресцентного микроскопа сделать в программе NIS Element 2 фото без смещения фокуса и положения: первое на видимом свете (exposition 40 ms, gain 1.2), второе - на голубом фильтре (exposition 800 ms, gain 1.2)
12. Сохранить данные в папке с названием эксперимента

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Лабораторная работы №2. Анализ результатов связывания FAM-меченого пептида с поверхностью клеток с использованием программы ImageJ

Цель работы: Проанализировать результат эксперимента с FAM-меченым пептидом

Оборудование и программное обеспечение: программа ImageJ

Практическая часть:

Ход работы:

1. Открыть программу ImageJ
2. Открыть две одинаковые и соответствующие друг другу фотографии: одна в видимом спектре, вторая в голубом спектре.
3. Через вкладку Image - Overlay - Add image наложить цветную фотографию поверх черной
4. Нажать клавишу "T", что открылось информационное окно
5. С помощью инструмента произвольного выделения обвести 25 клеток и 5 фонов (каждое добавление клетки сопровождается нажатием клавиши "T")
6. В информационном окне нажать Measure для выгрузки данных в формате Excel
7. Повторить для каждого повтора внутри ячейки и между ячейками
8. Сохранить все данные в единый файл Excel
9. Вычислить среднее Mean для каждого фона каждой группы
10. С помощью формулы вычесть $CTCF = IntDen - Area * \text{ср. по фону}$
11. Рассчитать среднее значение CTCF для каждой группы
12. Вычислить стандартное отклонение для каждой группы
13. Построить диаграмму по полученным результатам

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы; описать полученные результаты с приложенным графиком.

Тема 10. Анализ стабильности фармсубстанций

Лабораторная работы №1. Анализ химической и радиохимической стабильности пептида методом ВЭЖХ

Цель работы:**Реактивы:** NaCl ХЧ; деионизированная вода**Оборудование и посуда:** Весы аналитические; Ложка химическая; стакан химический 150 мл; Автоматическая пипетка на 1000 мкл; Вортекс лабораторный; Термошейкер; Фольга для проведения химических навесок; Пипетка автоматическая на 5 мл; наконечники для пипетки на 1000 мкл, пробирки 1 мл, наконечники для пипетки на 5 мл, пробирки 15 мл.**Практическая часть:****Ход работы:****I. Приготовление физиологического раствора.**

1. Приготовить ложку химическую, стакан химический, фольгу для проведения химических навесок, весы аналитические.
2. Включить аналитические весы.
3. Из фольги вырезать небольшой квадрат.
4. Положить квадрат из фольги на чашу аналитических весов. Открыть емкость с NaCl (ХЧ), используя химическую ложку пересыпать из емкости на фольгу 900 мг NaCl. Закрыть емкость с NaCl.
5. Взять химический стакан. Пересыпать NaCl с фольги в химический стакан. Протереть чашу аналитических весов салфеткой.
6. Приготовить деионизированную воду. Наполнить стакан с NaCl до объема 100 мл. С помощью маркера отметить на стакане, что он содержит 0,9% физиологический раствор.

II. Приготовление растворов пептидов.

1. Приготовить ложку химическую, стакан химический, фольгу для проведения химических навесок, весы аналитические.
2. Включить аналитические весы.
3. Из фольги вырезать несколько небольших квадратов, по количеству исследуемых пептидов.
4. Положить квадрат из фольги на чашу аналитических весов. Открыть емкость с пептидом, используя химическую ложку пересыпать из емкости на фольгу 0,49 мг пептида. Закрыть емкость с пептидом.
5. Приготовить деионизированную воду, пипетку автоматическую 1000 мкл, наконечники для пипетки 1000 мкл, маркер, вортекс лабораторный. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 1000 мкл. Включить лабораторный вортекс. Открыть пробирку с пептидом. Одеть наконечник на автоматическую пипетку на 1000 мкл. Автоматической пипеткой забрать деионизированную воду, слить забранную деионизированную воду в пробирку с пептидом. Закрыть пробирку с пептидом. Сбросить наконечник автоматической пипетки на 1000 мкл в мусорку. Ресуспендировать пептид с помощью лабораторного вортекса. Маркером пометить на пробирке исходную маркировку пептида, дата начала исследования, порядковый номер пробы.
6. Повторить пункты 4-5 для всех исследуемых пептидов.

III. Проведение исследования стабильности пептида.

1. Приготовить термошейкер. Включить термошейкер, выставить на панели термошейкера температуру 20 градусов.
2. Приготовить автоматическую пипетку на 5 мл, наконечники для автоматической пипетки на 5 мл, приготовленный ранее физиологический раствор, маркер. Одеть наконечник на автоматическую пипетку на 5 мл. Выставить на автоматической пипетке забираемый объем 4 мл. Открыть пробирку с раствором пептида, забрать автоматической пипеткой физиологический раствор, слить физиологический раствор в пробирку с раствором пептида, закрыть пробирку с раствором пептида. Сбросить наконечник автоматической пипетки в мусор. Перемешать содержимое пробирки с помощью лабораторного вортекса.
3. Приготовить пробирку на 1 мл, автоматическую пипетку 1000 мкл, наконечники для автоматической пипетки 1000 мкл. Одеть наконечник на автоматическую пипетку 1000 мкл.

Выставит на автоматической пипетке забираемый объем 1000 мкл. Открыть пробирку с раствором пептида, открыть пустую пробирку на 1 мл. Забрать автоматической пипеткой раствор пептида, слить раствор пептида в пустую пробирку, закрыть пробирки с растворами пептидов. Сбросить наконечник пипетки в мусорку. Маркером продублировать на пробирке с раствором пептида объемом 1 мл маркировку пробирки с раствором пептида объемом 15 мл.

4. Пункты 2-3 повторить для всех растворов исследуемых пептидов.

5. Поместить пробирки с растворами исследуемых пептидов в термошейкер с установленной температурой 20 градусов.

Оформление результатов

Записать ход выполнения работы

Тема 11. Оптимизация методов синтеза и очистки пептидов

Не подразумевается

ПРИМЕРНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ

1. Определите основные этапы разработки биомедицинских продуктов.
2. Какие методы используются для оценки эффективности и безопасности биомедицинских продуктов?
3. Объясните роль клинических испытаний в процессе разработки биомедицинских продуктов.
4. Опишите процесс валидации методов и технологий, используемых в разработке биомедицинских продуктов.
5. Какие современные технологии используются для разработки биомедицинских продуктов, и как они влияют на результаты?
6. Каковы основные проблемы, с которыми сталкиваются разработчики биомедицинских продуктов на этапе клинических испытаний?
7. Каковы перспективы развития биомедицинских продуктов в свете новых технологий, таких как генная терапия и регенеративная медицина?
8. Обсудите влияние цифровизации и биоинформатики на разработку биомедицинских продуктов.

Трек “разработка тест-систем”

9. Дайте определение тест-системы и объясните ее роль в биомедицинских исследованиях.
10. Перечислите основные этапы разработки тест-систем.
11. Охарактеризуйте различные типы тест-систем, используемых в биомедицине (иммуоферментные, молекулярно-генетические, биосенсорные и др.).
12. Объясните принципы работы наиболее распространенных методов, лежащих в основе тест-систем (ИФА, ПЦР, Вестерн-блот и др.).
13. Какие аналитические характеристики тест-систем необходимо оценивать при разработке (чувствительность, специфичность, воспроизводимость и др.)?
14. Опишите методы определения аналитической чувствительности и специфичности тест-систем.
15. Как оценивается воспроизводимость результатов при использовании тест-систем?
16. Объясните понятие "предел обнаружения" и его значение для тест-систем.
17. Что включает в себя процесс валидации тест-систем и каковы его основные этапы?
18. Какие нормативные документы регламентируют требования к разработке и валидации тест-систем?
19. Каковы принципы стандартизации тест-систем и их компонентов?
20. Объясните роль референсных материалов в стандартизации тест-систем.
21. Какие факторы необходимо учитывать при выборе матрицы для тест-системы?

22. Как осуществляется подбор специфических реагентов (праймеров и др.) для тест-систем?
23. Объясните важность контроля качества на всех этапах производства тест-систем.
24. Каковы тенденции развития тест-систем в свете новых технологий (микрофлюидика, нанотехнологии, омиксные методы и др.)?
25. Обсудите роль тест-систем в персонализированной медицине и прогнозировании заболеваний.
26. Как тест-системы могут способствовать ранней диагностике и мониторингу терапии социально значимых заболеваний?

Трек “разработка генно-инженерного продуктов”

1. Определите понятие "генно-инженерный продукт" и его значение в биофарминжиниринге.
2. Какие этапы включает в себя процесс разработки генно-инженерного продукта?
3. Объясните основные методы генной инженерии, используемые для создания новых продуктов.
4. Каковы ключевые различия между трансгенными и нативными организмами?
5. Как осуществляется выбор вектора для введения гена в клетку?
6. Опишите процесс трансформации клеток и методы, используемые для этого (например, электропорация, химическая трансформация).
7. Какие факторы влияют на экспрессию гена в генно-инженерных продуктах?
8. Как проводится отбор и анализ успешных трансформантов?
9. Каковы этические аспекты, связанные с разработкой и использованием генно-инженерных продуктов?
10. Обсудите важность соблюдения стандартов безопасности при работе с генетически модифицированными организмами (ГМО).
12. Каковы основные области применения генно-инженерных продуктов?
13. Опишите роль генно-инженерных продуктов в производстве вакцин и терапевтических белков.
14. Как генно-инженерные продукты могут быть использованы для решения проблем устойчивости к антибиотикам?
15. Обсудите перспективы использования генно-инженерных продуктов в регенеративной медицине.
16. Как современные технологии, такие как синтетическая биология, влияют на разработку генно-инженерных продуктов?
17. Каковы тенденции и вызовы в области генной инженерии на ближайшие годы?
18. Обсудите роль междисциплинарного подхода в разработке и внедрении генно-инженерных продуктов.
19. Каковы перспективы применения CRISPR-технологий в различных областях биомедицины?
20. Какие вызовы стоят перед разработчиками генно-инженерных продуктов в условиях быстро меняющегося научного и регуляторного ландшафта?

Трек “разработка радиофармпрепаратов”

21. Дайте определение радиофармпрепарата (РФП) и объясните его роль в ядерной медицине.
22. Перечислите основные этапы разработки РФП.
23. Охарактеризуйте различные типы РФП, используемых в диагностике и терапии (меченые антитела, пептиды, аптамеры и др.).
24. Объясните принципы выбора радионуклида для разработки РФП.
5. Какие нормативные документы регламентируют требования к разработке и производству РФП?

6. Как оценивается радиохимическая чистота и удельная активность РФП?
7. Каковы основные требования к стерильности и апиrogenности РФП?
8. Объясните принципы радиационной безопасности при работе с РФП.
9. *Опишите основные методы радиоактивной метки белков, пептидов и олигонуклеотидов. Опишите способы конъюгирования радиоизотопа и белков, пептидов и олигонуклеотидов. Хелаторы*
10. Какие факторы влияют на выбор радиоактивной метки для создания РФП и метода мечения?
11. *Как оценивается сохранение биологической активности меченых биомолекул?*
- Механизм биораспределения РФП в живом организме
12. Объясните принципы очистки меченых биомолекул от свободного радионуклида.
13. Каковы основные этапы доклинических исследований РФП?
14. Как оценивается фармакокинетика и фармакодинамика РФП в доклинических исследованиях?
15. Опишите основные этапы клинических испытаний РФП.
16. Какие факторы влияют на выбор дозы РФП для введения пациенту?
10. Какие технологии используются для производства радионуклидов для РФП (генераторы, циклотроны, автоматизированные синтезаторы)?
11. Как осуществляется контроль качества на различных этапах производства РФП?
12. Какие методы применяются для анализа качественного и количественного состава РФП?
13. Объясните принципы организации радиохимической лаборатории для производства РФП.
14. Твердофазный пептидный синтез. Защитные группы и линкеры
15. Дайте краткую характеристику основным типам хроматографии
16. Опишите основные принципы масс-спектрометрии и используемые детекторы
17. Особенности ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии при работе с РФП.
18. Основные принципы анализа пригодности РФП на стадии *in vitro*

Список используемой литературы

а) Список рекомендуемой литературы:

1. Климанов В. А. Ядерная медицина. Радионуклидная диагностика: учебное пособие / В. А. Климанов. - 2-е изд. ; испр. и доп. - Москва : Юрайт, 2024. - 307 с. - (Высшее образование). - URL: <https://urait.ru/bcode/539235> . - Режим доступа: Электронно-библиотечная система Юрайт, для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-534-06485-8 : 1279.00. URL: https://lib.ulsu.ru/MegaPro/UserEntry?Action=Link_FindDoc&id=520882&idb=0

2. Клиническая генетика : учебник / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина ; под ред. Н. П. Бочкова. - 4-е изд. , доп. и перераб. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. - 592 с. - ISBN 978-5-9704-7934-6. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970479346.html>

3. Джайн, К. К. Основы персонализированной медицины : медицина XXI века : омикс-технологии, новые знания, компетенции и инновации / Джайн К. К. , Шарипов К. О. - Москва : Литтерра, 2020. - 576 с. - ISBN 978-5-4235-0343-7. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785423503437.html> (дата обращения: 19.08.2024). - Режим доступа : по подписке.

дополнительная:

1. Молекулярная биология. Практикум : учебное пособие для вузов / А.С. Коничев, И.Л. Цветков, А.П. Попов [и др.] ; А. С. Коничев [и др.] ; под редакцией А. С. Коничева. - 2-е изд. - Москва : Юрайт, 2023. - 169 с. - (Высшее образование). - URL: <https://urait.ru/bcode/517094> (дата обращения: 10.02.2023). - Режим доступа: Электронно-библиотечная система Юрайт, для авториз. пользователей. - Электрон. дан. - ISBN 978-5-534-12544-3 : 749.00.

URL: https://lib.ulsu.ru/MegaPro/UserEntry?Action=Link_FindDoc&id=499046&idb=0

2. Бекман, И. Н. Ядерная медицина: физические и химические основы : учебник для вузов / И. Н. Бекман. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2023. — 400 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-00691-9. — Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/513458>

3. Алферова Г. А. Генетика : учебник / Г. А. Алферова, Г. П. Подгорнова, Т. И. Кондаурова. - 3-е изд. ; испр. и доп. - Москва : Юрайт, 2024. - 200 с. - (Высшее образование). - URL: <https://urait.ru/bcode/537581> . - Режим доступа: Электронно-библиотечная система Юрайт, для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-534-07420-8 : 889.00. URL: https://lib.ulsu.ru/MegaPro/UserEntry?Action=Link_FindDoc&id=530190&idb=0

4. Осовская, И. И. Синтетические и природные полимеры в биоинженерии : учебное пособие / И. И. Осовская, С. А. Горбачев. - Москва : Инфра-Инженерия, 2023. - 100 с. - ISBN 978-5-9729-1363-3. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785972913633.html>

5. Кошкина, Л. Ю. Инжиниринг биотехнологических процессов и систем : учебное пособие / Кошкина Л. Ю. , Понкратов А. С. , Понкратова С. А. - Казань : КНИТУ, 2019. - 104 с. - ISBN 978-5-7882-2583-8. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785788225838.html>

Профессиональные базы данных, информационно-справочные системы

1. Электронно-библиотечные системы:

1.1. Цифровой образовательный ресурс IPRsmart : электронно-библиотечная система : сайт / ООО Компания «Ай Пи Ар Медиа». - Саратов, [2024]. – URL: <http://www.iprbookshop.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.2. Образовательная платформа ЮРАЙТ : образовательный ресурс, электронная библиотека : сайт / ООО Электронное издательство «ЮРАЙТ». – Москва, [2024]. - URL: <https://urait.ru> . – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.3. База данных «Электронная библиотека технического ВУЗа (ЭБС «Консультант студента») : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Политехресурс». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.studentlibrary.ru/cgi-bin/mb4x>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.4. Консультант врача. Электронная медицинская библиотека : база данных : сайт / ООО «Высшая школа организации и управления здравоохранением-Комплексный медицинский консалтинг». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.rosmedlib.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.5. Большая медицинская библиотека : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Букап». – Томск, [2024]. – URL: <https://www.books-up.ru/ru/library/> . – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.6. ЭБС Лань : электронно-библиотечная система : сайт / ООО ЭБС «Лань». – Санкт-Петербург, [2024]. – URL: <https://e.lanbook.com>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.7. ЭБС Znanium.com : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Знаниум». - Москва, [2024]. - URL: <http://znanium.com> . – Режим доступа : для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

2. КонсультантПлюс [Электронный ресурс]: справочная правовая система. / ООО «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва : КонсультантПлюс, [2024].

3. eLIBRARY.RU: научная электронная библиотека : сайт / ООО «Научная Электронная Библиотека». – Москва, [2024]. – URL: <http://elibrary.ru>. – Режим доступа : для авториз. пользователей. – Текст : электронный

4. Федеральная государственная информационная система «Национальная электронная библиотека» : электронная библиотека : сайт / ФГБУ РГБ. – Москва, [2024]. – URL: <https://нэб.рф>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.

5. Российское образование : федеральный портал / учредитель ФГАУ «ФИЦТО». – URL: <http://www.edu.ru>. – Текст : электронный.

6. Электронная библиотечная система УлГУ : модуль «Электронная библиотека» АБИС Мега-ПРО / ООО «Дата Экспресс». – URL: <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.