Современные проблемы биохимии

Методы исследований

Современные проблемы биохимии

Методы исследований

Допущено
Министерством образования
Республики Беларусь
в качестве учебного пособия
для магистрантов учреждений
высшего образования,
по биологическим
и медицинским специальностям

Под редакцией профессора А.А. Чиркина

Минск
«Вышэйшая школа»
2013

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73
С56

Авторы: Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, О.И. Валентюкевич, А.И. Грицук, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, И.Б. Заводник, Л.Б. Заводник, Д.Я. Задорожный, Л.М. Караедова, В.Н. Кипень, Е.И. Коваленко, Е.А. Лапшина, Т.Л. Лебедь, О.Я. Лукивская, Г.В. Ляхнович, А.Ф. Макарчиков, С.Б. Мельнов, Е.В. Морозова, И.М. Морозова, Л.И. Надольник, Е.Е. Нарута, В.Н. Никандров, Л.Н. Николаевич, Н.В. Пивень, Н.С. Пыжова, В.Ю. Смирнов, Э.П. Титовец, Т.А. Толкачева, В.В. Хрусталев, В.Т. Чещевик, А.А. Чиркин

Рецензенты: кафедра биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета (заведующий кафедрой доцент *И.В. Семак*); заведующий отделом биохомии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» доктор биологических наук *В.Н. Решетников*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства

Современные проблемы биохимии. Методы исследо-
С56 ваний : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – 491 с. : ил.

ISBN 978-985-06-2192-4.

Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь.

Изложено 190 методик биохимического исследования различных биологических объектов на различных уровнях их организации.

Для магистрантов учреждений высшего образования по биологическим и медицинским специальностям.

Может быть полезно студентам биологических, медицинских, ветеринарных и фармацевтических специальностей, а также исследователям-биохимикам.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-06-2192-4

© Оформление. УП «Издательство "Вышэйшая школа"», 2013

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие создано в соответствии с учебным планом и базовой программой подготовки студентов по специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность); специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия. Этот предмет завершает подготовку специалистов в 10-м семестре обучения студентов и предназначен для ознакомления обучаемых с характером биохимических исследований, проводимых в ряде вузов Министерства образования и научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Республики Беларусь. Учебное пособие не претендует на исчерпывающую информацию о многогранных биохимических исследованиях белорусских ученых. Данное издание должно продемонстрировать то, что биохимические методы исследования активно внедряются в фундаментальные и прикладные исследования не только в общепризнанных и авторитетных научных и педагогических центрах г. Минска, но и в других городах республики.

Изучение современных проблем биохимии служит для достижения основной цели: подготовить выпускника-биохимика к профессиональной деятельности и сократить время его адаптации к решению научных, производственных и учебных биохимических задач. В соответствии с этим пособие включает материалы по применению биохимических методов *in silico* (компьютерное моделирование), *in vitro* и *in vivo*. В материалах книги содержится более 190 методик биохимического анализа, 50 таблиц, более 90 рисунков, около 200 источников литературы. Потребность в таком издании вызвана тем, что стремительное развитие технологий биохимических исследований сокращает навыки биохимика-исследователя до этапа пробоподготовки, а остальное выполняют приборы.

Наряду с классическими методами выделения и изучения ферментов, оценки обмена белков, углеводов, липидов, нукле-

иновых кислот, состояния энергетического обмена, свободнорадикальных процессов в пособии представлены методы иммунохимического анализа, молекулярно-генетических исследований, анализа данных банков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей макромолекул, исследование нанофлюидики. В практическом отношении будут полезными методики изучения фагоцитоза, апоптоза, некроза, биохимических характеристик тканей животного и растительного происхождения.

Глава 1 написана В.В. Хрусталевым, Е.В. Барковским, Д.Я. Задорожным; гл. 2 – А.С. Дроздовым, С.Б. Бокутем; гл. 3 – А.Ф. Макарчиковым; гл. 4 – Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирновым; гл. 5 – В.Н. Никандровым, Н.С. Пыжовой; гл. 6 – Л.И. Надольник, О.И. Валентюкевичем; гл. 7 – А.И. Грицуком; гл. 8 – Э.П. Титовцом; гл. 9 – Л.М. Караедовой; гл. 10 – А.Н. Бородинским, И.К. Дремзой; гл. 11 – В.У. Буко, О.Я. Лукивской, Е.Е. Нарутой; гл. 12 – Л.Б. Заводником, Е.А. Лапшиной, В.Т. Чещевиком, И.К. Дремзой, И.Б. Заводником; гл. 13 – Е.И. Коваленко, А.А. Чиркиным; гл. 14 – Е.О. Данченко; гл. 15 – Н.В. Пивень; гл. 16 – С.Б. Мельновым, Т.Л. Лебедь, В.Н. Кипенем; гл. 17 – Т.А. Толкачевой, И.М. Морозовой, Г.В. Ляхновичем; гл. 18 – Е.В. Морозовой, Л.Н. Николаевич, А.А. Чиркиным.

ГЛАВА 1. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОТБОРА КОМПОНЕНТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Создание *синтетических вакцин* – одно из перспективных направлений в современной иммунохимии. К преимуществам синтетических вакцин (по сравнению с аттенуированными и инактивированными) относятся: безопасность, более высокая специфичность, снижение вероятности развития аллергических реакций. В состав синтетических вакцин входят короткие пептиды, соответствующие В-клеточным или Т-клеточным эпитопам полноразмерных вирусных белков.

В последнее время синтез пептидов длиной до 30 аминокислотных остатков – рутинная и относительно недорогая процедура (для этого используются полностью автоматизированные синтезаторы). Короткие пептиды стало целесообразней синтезировать, чем получать с использованием биотехнологии. Не менее важным путем применения синтетических пептидов, соответствующих наименее мутабельным и наиболее консервативным В-клеточным эпитопам вирусных белков, является использование их в качестве антигенов для создания иммуноферментных тест-систем, которые можно использовать как в диагностических целях, так и для оценки напряженности иммунитета после вакцинации.

1.1. Схема отбора компонентов для синтетических вакцин

Идея создания синтетических вакцин получила распространение еще в 1980-е гг., однако реализация таких проектов оказалась затруднительной по нескольким причинам.

Первой причиной неудач является то, что не все участки белка иммуногенны. Проблему отбора наиболее иммуногенных фрагментов белка пытались решить путем создания способов предсказания линейных и конформационных В-клеточных эпитопов. Широкую известность получили шкалы гидрофильности и акрофильности аминокислотных остатков [1]. Однако даже те короткие участки белка, которые обладают наиболее выраженными антигенными свойствами, зачастую не дают перекрестных реакций с полноразмерными белками. Причиной является то, что далеко не каждый пептид сохраняет структуру, схожую с такой же структурой у соответствующей части полноразмерной молекулы. В связи с этим многие исследователи предпочитают работать над созданием рекомбинантных вакцин, основой которых, как правило, являются более крупные фрагменты белков (домены) [2]. В настоящей главе описывается процесс использования методов, позволяющих выделить наиболее иммуногенные участки белков, а также предлагается особый подход для отбора тех участков, которые должны с высокой долей вероятности сохранять свою структуру, будучи «изолированными» от оставшейся части полипептида.

Второй причиной неудач в процессе создания синтетических вакцин является высокая частота мутаций, присущая многим вирусам. До создания метода выделения наименее мутабельных (наименее подверженных аминокислотным заменам) участков белков [3], которому посвящена большая часть данной главы, эту проблему решали путем определения тех фрагментов белков, которые являются наиболее консервативными в процессе эволюции. По нашему мнению, данные подходы являются взаимодополняющими [4].

Предложенная схема работы по отбору компонентов для синтетических вакцин состоит из пяти этапов: 1) определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене; 2) выделение наиболее иммуногенных областей в соответствующем вирусном белке; 3) предсказание вторичной структуры и сайтов гликозилирования для выделенных наиболее иммуногенных областей; 4) определение уровней мутабельности выделенных эпитопов; 5) оценка их консервативности. На каждом из последних четырех этапов число «кандидатов» на включение в состав синтетической вакцины может существенно сократиться. В результате

такого отбора с помощью биоинформатических методов существенно сокращаются расходы на проведение последующих этапов исследования: синтеза пептидов, оценки их антигенных свойств с использованием аффинной хроматографии и иммуноферментного анализа, иммунизации лабораторных животных.

Основой для первого и четвертого этапов работы является теория направленного мутационного давления, согласно которой определенные типы нуклеотидных мутаций в данном гене происходят с большей частотой, чем другие [5]. Определить, какие именно типы мутаций происходят чаще, можно путем изучения частот использования нуклеотидов в тех сайтах нуклеотидных последовательностей, в которых они являются нейтральными [5].

С применением описанных ниже биоинформатических методов был выделен наименее мутабельный эпитоп поверхностного белка gp120 вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ1) [3]. Соответствующий ему пептид, состоящий из 21 аминокислотного остатка, сохранил свои антигенные свойства: в крови 80,2 % людей с впервые выявленной ВИЧ1-инфекцией были обнаружены антитела, перекрестно реагирующие с ним [6].

В данной главе сконцентрировано внимание на гемагглютинине того штамма вируса гриппа H1N1, который вызвал эпидемию в 2009 г. [7]. По данным филогенетического анализа, этот штамм вируса гриппа (известный как «свиной грипп») продолжает циркулировать в человеческой популяции до настоящего времени.

Инактивированная вакцина Vaxigrip против гриппа изготавливается следующим образом: вирусы трех наиболее распространенных в текущем году штаммов культивируются на куриных эмбрионах, затем полученные вирионы разрушаются детергентом Triton X-100 и инактивируются раствором формальдегида. В результате данных процедур могут существенно изменяться антигенные свойства вирусных белков. Эффективность вакцинации (по данным производителя) достигает 70 %. Использование синтетической вакцины может сократить количество аллергических реакций, обеспечить выработку антител к наименее мутабельным эпитопам поверхностных белков вируса (гемагглютинина и нейраминидазы), обладающих нейтрализирующей активностью, повысив эффективность вакцинации.

1.2. Определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене

Для того чтобы определить основные направления мутационного давления в гене вируса, на первом этапе необходимо произвести расчет частот использования нуклеотидов в его четырехкратно и двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов. С помощью алгоритма VVK Sliding Window (www.barkovsky.hotmail.ru) можно произвести расчет данных частот на протяжении одной нуклеотидной последовательности с использованием методики скользящего окна. Нуклеотидная последовательность копируется в обозначенную ячейку на листе «sequence», в другой ячейке на том же листе указывается длина скользящего окна в кодонах. После этого на листе «results» появляется номер ячейки, которой необходимо заканчивать графики. Сами графики находятся на соответствующих листах файла MS Excel. Использование MS Excel в качестве программной оболочки для подобных алгоритмов позволяет с легкостью использовать преимущества данной программы в процессе статистического анализа и визуализации данных.

Четырехкратно вырожденные сайты – сайты, в которых любая нуклеотидная замена является синонимичной (не вызывает замены аминокислотного остатка в кодируемом белке).

Двукратно вырожденные сайты третьих положений кодонов – сайты, в которых синонимичной является только транзиция, но не две возможные трансверсии.

Путем сравнения частот использования нуклеотидов в четырехкратно вырожденных сайтах можно определить преимущественное направление *трансверсий*, путем сравнения частот использования нуклеотидов в двукратно вырожденных сайтах – преимущественное направление *транзиций*.

На рис. 1.1, *а* видно, что частота использования (измеряется в долях единицы) аденина в четырехкратно вырожденных сайтах (A4f) на протяжении гена, кодирующего гемагглютинин штамма A/New York/INS151/2009 вируса гриппа H1N1, значительно превышает частоту использования цитозина (C4f). Для построения графиков, изображенных на рис. 1.1, использовалось скользящее окно длиной 100 кодонов с шагом в 1 кодон. В столбцах на листе «results» содержатся частоты использования нуклеотидов в соответствующих сайтах в каждом окне. С использованием функции MS Excel под названием

«TTEST» можно проверить, достоверна ли разница между A4f и C4f на протяжении одного отдельно взятого гена по значению *P* (сравнение проводится с помощью попарного *t*-теста). Поскольку частоты использования нуклеотидов на протяжении гена подвержены колебаниям в довольно широких пределах, в том числе и вследствие случайных причин, целесообразней сравнивать уровни A4f и C4f попарно. Значение *P* для парной разности между A4f и C4f было меньше 0,001. Значение *P* для парной разности между частотами использования гуанина и урацила в четырехкратно вырожденных сайтах (G4f и U4f соответственно) составило 0,176, что свидетельствует о том, что разность эта недостоверна (см. рис. 1.1, *б*). Наиболее высокой в четырехкратно вырожденных сайтах является частота использования аденина.

Согласно теории мутационного давления [6], повышенная частота использования аденина в четырехкратно вырожденных сайтах является следствием того, что замены других нуклеотидов на аденин происходят чаще, чем замены аденина на другие нуклеотиды. Значительный вклад в это мутационное A-давление должны вносить трансверсии цитозина на аденин.

В двукратно вырожденных сайтах третьих положений кодонов разность между частотами использования урацила и цитозина (U2f3p и C2f3p) является достоверной ($P < 0{,}001$), несмотря на наличие участка (начиная с кодона 400 до терминального кодона), в котором уровень C2f3p превышает уровень U2f3p (см. рис. 1.1, *в*). Частота использования аденина в двукратно вырожденных сайтах достоверно превышает частоту использования гуанина ($P < 0{,}001$). Судя по этим данным, на участке, кодирующем гемагглютинин данного штамма вируса гриппа, транзиции гуанина на аденин и цитозина на урацил происходят чаще, чем обратные замены: транзиции аденина на гуанин и урацила на цитозин.

Если для четырехкратно вырожденных сайтов характерна картина A-давления, то для двукратно вырожденных сайтов характерна картина AU-давления. Почему частота использования урацила не достигла более высокого уровня в четырехкратно вырожденных сайтах? Наиболее вероятной причиной тому являются замены урацила на аденин, которые происходят в два этапа. Сначала возникает транзиция урацила на цитозин, а затем трансверсия цитозина на аденин. Последняя замена является синонимичной только в четырехкратно вырожденных сайтах.

Второй этап определения основных направлений мутационного давления осуществляется с помощью алгоритма VVK VarInvar (www.barkovsky.hotmail.ru). Этот алгоритм способен обработать до 100 выровненных нуклеотидных последовательностей одновременно. Выровненные нуклеотидные последовательности необходимо скопировать в соответствующие ячейки на листе «sequences». На листе «results» после этого появятся результаты: количество каждого из вариабельных сайтов.

Всего в международной базе данных Influenza Virus Resource (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/) на момент проведения данного исследования содержалось 1743 полные нуклеотидные последовательности участка, кодирующего гемагглютинин из эпидемических штаммов вируса гриппа H1N1, геном которых был полностью просеквенирован. Последовательности разбиты на 18 групп (17 групп численностью по 100 последовательностей и 1 группа, состоящая из 43 последовательностей). В каждой группе рассчитано процентное соотношение вариабельных сайтов. Всего существует 11 типов таких сайтов: CU, AG, CG, AU, CA, GU, AUG, AUC, GCA, GCU, AUGC. В вариабельном сайте CU у какой-то части последовательностей находится цитозин, у другой части – урацил. В сайте AUC у одной части последовательностей находится аденин, у второй – урацил, у третьей – цитозин.

Результаты для каждой из восемнадцати выборок были обработаны с помощью методов *параметрической статистики*. Среднее процентное содержание различных типов вариабельных сайтов представлено на рис. 1.2 в виде среднего арифметического и ошибки. Для выяснения вопроса о достоверности различий между процентным содержанием двух типов вариабельных сайтов необходимо вновь прибегнуть к попарному *t*-тесту. Значения *P* при сравнении процентов, приходящихся на наиболее часто встречающиеся типы вариабельных сайтов, были ниже 0,05, что свидетельствует о достоверности различий.

Поскольку вариабельные сайты, содержащие гуанин и аденин, встречаются чаще, чем сайты, содержащие цитозин и урацил, транзиции гуанина на аденин должны происходить более часто, чем транзиции цитозина на урацил. Так как наиболее вероятным молекулярным механизмом обоих типов транзиций является дезаминирование цитозина, логично предположить, что в минус-цепях РНК данный процесс протекает более интенсивно, чем в плюс-цепях.

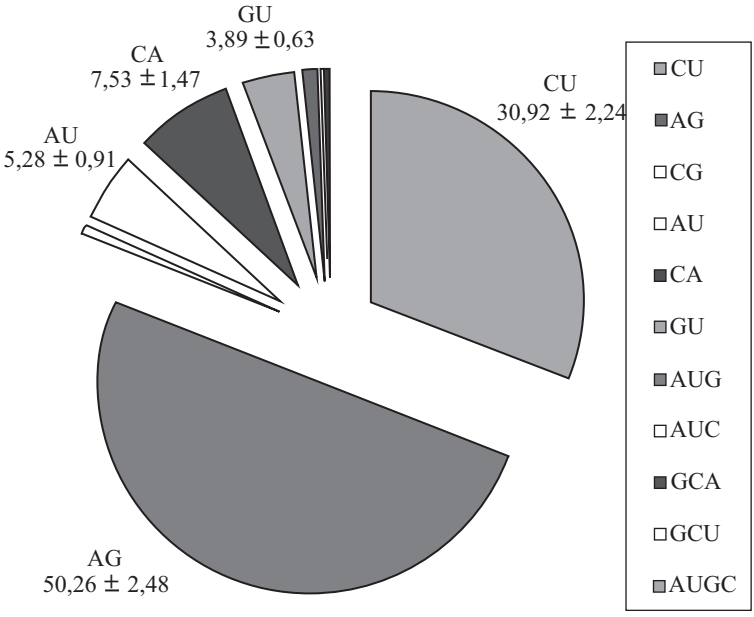

Рис. 1.2. Среднее процентное соотношение различных типов вариабельных сайтов между 1743 последовательностями участков, кодирующих гемагглютинин различных изолятов эпидемического вируса гриппа H1N1

Вариабельные сайты, содержащие цитозин и аденин, встречаются более часто, чем сайты, содержащие гуанин и урацил. Это свидетельствует о том, что трансверсии цитозина на аденин происходят чаще, чем трансверсии гуанина на урацил. Наиболее вероятным молекулярным механизмом обоих типов трансверсий является окисление гуанина. Судя по результатам исследований авторов главы, в минус-цепях РНК гуанин подвергается окислению чаще, чем в плюс-цепях.

Алгоритм VVK VarInvar вычисляет частоту использования каждого из четырех нуклеотидов в каждом из трех положений кодонов. Среднее значение частоты использования аденина в третьих положениях кодонов среди 1743 изученных последовательностей составило 35,34339 ± 0,00008 %; урацила – 25,43647 ± 0,00008; цитозина – 20,15522 ± 0,00007; гуанина – 19,06492 ± 0,00007 %.

Последний этап определения основных направлений мутационного давления – сравнение средних частот использова-

ния нуклеотидов в третьих положениях кодонов с их частотами в инвариантных сайтах из этих же положений кодонов. *Инвариантные сайты* – это те сайты, в которых не произошла нуклеотидная замена ни в одной из последовательностей данной выборки. Если частота использования данного нуклеотида в инвариантных сайтах третьих положений кодонов выше, чем средняя частота его использования в третьих положениях кодонов всей выборки последовательностей (и в вариабельных, и в инвариантных сайтах), то замены данного нуклеотида на остальные нуклеотиды происходят реже, чем замены последних на данный нуклеотид [5].

Средние значения частот использования нуклеотидов в третьих положениях кодонов 3A, 3U, 3G, 3C рассчитаны для каждой из 18 выборок так же, как и частоты их использования в инвариантных сайтах третьих положений кодонов 3Ai, 3Ui, 3Gi, 3Ci. Далее было произведено их сравнение с помощью попарного *t*-теста. Средние значения этих показателей приведены на рис. 1.3. Несмотря на небольшую величину, средняя для 18 выборок разность между 3Ai и 3A достоверна (1,18085 ± 0,24874; $P < 0{,}001$). Средняя разность между 3Ui и 3U также является положительной величиной (0,66821 ± ± 0,14013; $P < 0{,}001$). Средние разности между 3Gi и 3G (–1,17110 ± 0,14753; $P < 0{,}001$), так же как и между 3Ci и 3C (–0,67796 ± 0,17472; $P < 0{,}01$), являются отрицательными величинами.

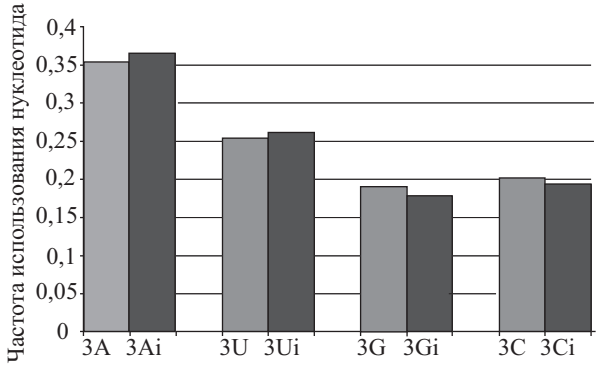

Рис. 1.3. Средние частоты использования нуклеотидов в третьих положениях кодонов 3A, 3U, 3G, 3C и в инвариантных сайтах из третьих положений кодонов 3Ai, 3Ui, 3Gi, 3Ci 1743 последовательностей участков, кодирующих гемагглютинин различных изолятов эпидемического вируса H1N1

Эти данные еще раз подтверждают гипотезу о том, что аденин и урацил мутируют в четвертом сегменте РНК вируса гриппа H1N1 реже, чем гуанин и цитозин, т.е. сегмент подвержен мутационному АТ-давлению.

1.3. Выделение наиболее иммуногенных областей вирусного белка

Существует большое количество методов предсказания иммуногенных областей белка. Первые методы основывались на шкалах гидрофобности и гидрофильности аминокислотных остатков. Известна шкала гидрофобности, предложенная Д. Кейтом и Р. Дулитлом, в которой наивысшее значение гидрофобности принадлежит изолейцину (4,5), а наименьшее – аргинину (–4,5). С использованием этой шкалы можно вычислить среднюю гидрофобность определенного фрагмента белка. Чем больше содержание аминокислотных остатков с высоким уровнем гидрофобности в данном фрагменте белка, тем меньше вероятность того, что данный участок будет экспонирован водному окружению.

Шкала акрофильности аминокислотных остатков Т.П. Хоппа и К.Р. Вудса предложена после анализа известных на момент ее создания трехмерных структур белков [1]. Для каждого аминокислотного остатка была рассчитана вероятность того, что он является экспонированным водному окружению. Как оказалось, шкалы гидрофобности и акрофильности не всегда согласуются друг с другом. Наиболее акрофильными аминокислотными остатками, согласно шкале Хоппа – Вудса, являются глицин и пролин [1].

Шкала гидрофобности, предложенная Д. Эйзенбергом, является комбинированной.

Программа VVK Unique Antigen (www.barkovsky.hotmail.ru) рассчитывает «обратную гидрофобность» по шкалам Эйзенберга и Кейта – Дулитла, а также акрофильность по шкале Хоппа – Вудса в скользящем окне на протяжении введенной аминокислотной последовательности белка. Размер скользящего окна можно изменять, шаг остается постоянным – один аминокислотный остаток.

Особенностью программы VVK Unique Antigen является то, что она рассчитывает произведение значений «обратной гидрофобности» по шкалам Эйзенберга и Кейта – Дулитла и акрофильности по шкале Хоппа – Вудса для каждого окна.

В результате на графике для первого полипептида HA1, образующегося в результате посттрансляционного процессинга гемагглютинина (рис. 1.4), становятся хорошо заметны четкие пики в местах скопления гидрофильных и акрофильных аминокислотных остатков.

На графике также приведены результаты предсказания линейных B-клеточных эпитопов с помощью алгоритма BepiPred 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/). Этот алгоритм был создан по результатам исследования аминокислотного состава и вторичной структуры линейных B-клеточных эпитопов из международных баз данных. В качестве исходного материала использовались трехмерные структуры белков со связанными с ними антителами [8]. Алгоритм BepiPred 1.0 выдает конечный результат в виде таблицы, в которой указывается, включен ли данный аминокислотный остаток в линейный B-клеточный эпитоп. В качестве исходного материала используется аминокислотная последовательность белка.

Линейный B-клеточный эпитоп – это антигенная детерминанта, представленная аминокислотными остатками, расположенными непосредственно друг за другом в цепи полипептида. Большинство же (~ 80 %) антигенных детерминант представлены конформационными эпитопами. Как правило, конформационные эпитопы включают несколько линейных эпитопов, которые располагаются в третичной структуре рядом друг с другом, несмотря на то что могут находиться далеко друг от друга в цепи полипептида. Одним из алгоритмов, способных определять аминокислотные остатки, формирующие конформационные B-клеточные эпитопы, является DiscoTope 1.2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/) [9]. Исходным материалом для алгоритма является не аминокислотная последовательность, а файл из базы данных PDB (http://www.pdb.org), содержащий сведения о трехмерном строении белка.

Фрагменты белка, экспонированные водному окружению, могут содержать сайты для гликозилирования. Сайт для N-гликозилирования («секвон») имеет следующую консенсусную последовательность: Asn–Xaa–Ser/Thr. Непосредственной мишенью для присоединения углевода является группа NH_2 остатка аспарагина. Компьютерный алгоритм NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) предсказывает расположение сайтов N-гликозилирования, используя в качестве исходного материала аминокислотную последовательность белка. Далеко не для каждого «секвона» характерна высокая

вероятность гликозилирования. В частности, если между остатками аспарагина и серина (или треонина) располагается пролин, N-гликозилирование не происходит.

Предсказанные сайты для N-гликозилирования обозначены на рис. 1.4 и 1.5. Те фрагменты белков, которые обладают выраженными антигенными свойствами, но содержат сайты для N-гликозилирования, не следует рассматривать в качестве возможных кандидатов для включения в состав синтетических вакцин. Гликан (углевод, присоединенный к белку) значительно изменяет антигенные свойства данного эпитопа.

Сайты для O-гликозилирования в белках можно предсказать с помощью алгоритма NetOGlyc 2.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/). Мишенью для O-гликозилирования являются остатки серина и треонина (их OH-группы), расположенные рядом с акрофильными аминокислотными остатками (в частности, рядом с пролином). Было показано, что частота сайтов для O-гликозилирования находится в прямой зависимости от насыщенности генов гуанином и цитозином. Поскольку геном вируса гриппа подвержен мутационному АТ-давлению, сайты для O-гликозилирования на гемагглютинине отсутствуют.

В процессе выделения наиболее иммуногенных B-клеточных эпитопов необходимо руководствоваться не только результатами предсказания VVK Unique Antigen, BepiPred 1.0

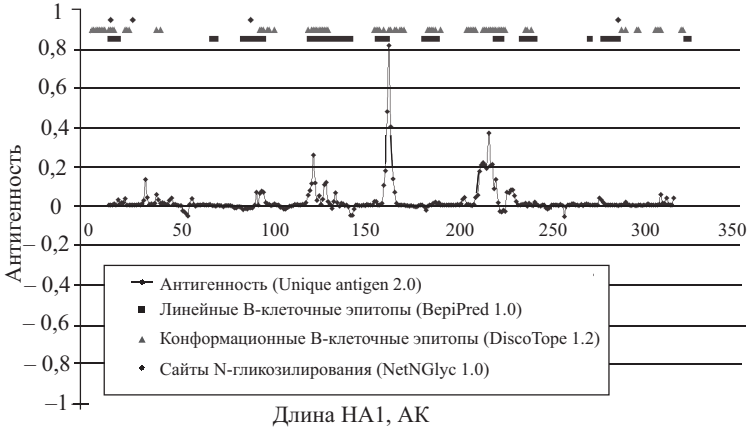

Рис. 1.4. Антигенность на протяжении аминокислотной последовательности HA1 вируса гриппа H1N1, штамма A/NewYork/INS151/2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ 3

ГЛАВА 1. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОТБОРА КОМПОНЕНТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН 5

1.1. Схема отбора компонентов для синтетических вакцин 5
1.2. Определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене 8
1.3. Выделение наиболее иммуногенных областей вирусного белка 14
1.4. Предсказание вторичной структуры для выделенных В-клеточных эпитопов 21
1.5. Оценка уровней мутабельности В-клеточных эпитопов вирусного белка 23
1.6. Оценка консервативности В-клеточных эпитопов вирусного белка 29

Литература 34

ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МИНОРНОЙ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА A_2 34

2.1. Обзор методов кристаллизации белковых молекул 36
2.2. Стратегии кристаллизации белковых молекул 51
2.3. Получение кристаллов гемоглобина A_2 55

Литература 64

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ 65

3.1. Количественное определение белка 66
3.2. Общие правила работы с ферментами 75
3.3. Определение активности ферментов 77
3.4. Выделение и очистка ферментов 79
3.5. Частичная очистка растворимой НТФазы из почек быка . . . 91
3.6. Исследование свойств ферментов 99

Литература 104

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ 104

4.1. Аналитические задачи, требующие аминокислотного анализа 104

4.2. Определение свободных аминокислот с помощью ионообменной хроматографии 107

4.3. Высокоэффективная ионно-обменная хроматография (ВЭЖХ) 117

Литература 131

ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИЗА 132

5.1. Биологическая роль протеолиза 133

5.2. Методы определения активности протеолитических ферментов 135

5.3. Препаративные методы при анализе протеолитической активности 152

Литература 156

ГЛАВА 6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ 158

6.1. Определение показателей, характеризующих активность свободнорадикальных процессов 159

6.2. Определение концентрации диеновых конъюгатов в микросомальной фракции печени крыс 163

6.3. Определение концентрации вторичных продуктов ПОЛ и скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот с тиобарбитуровой кислотой 164

6.4. Определение скорости ПОЛ в микросомальной фракции печени крыс в присутствии прооксидантов 167

6.5. Оценка окислительной модификации белков 170

6.6. Определение показателей АОС 173

6.7. Метод определения антиоксидантной активности смесей веществ или биологических жидкостей с использованием микросомальной фракции печени крыс в качестве модельной системы окисления 193

Литература 195

ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ 196

7.1. Полярографический метод 197
7.2. Исследование тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий 199
7.3. Преимущества изучения митохондриального окисления целой ткани 206

Литература 212

ГЛАВА 8. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА 213

8.1. Тканевой цилиндр Крога 213
8.2. Концепция конвективного механизма транспорта кислорода 217
8.3. Методы исследования осцилляторного массопереноса воды и кислорода 223
8.4. Математическое моделирование дыхания и оксигенации 226
8.5. Диффузионный и осцилляторный механизмы оксигенации 228

Литература 231

ГЛАВА 9. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ 232

9.1. Роль цикла трикарбоновых кислот в обмене веществ 232
9.2. Методы определения активности ферментов ЦТК 234
9.3. Определение содержания субстратов ЦТК 249

Литература 254

ГЛАВА 10. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА 255

10.1. Биологическое значение гликолиза 255
10.2. Определение содержания некоторых субстратов гликолитического пути 258
10.3. Определение активности важнейших ферментов гликолитического пути 266

Литература 272

ГЛАВА 11. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ 273

11.1. Экстракция липидов из крови и тканей 273
11.2. Исследование состава липидов методом тонкослойной хроматографии 274
11.3. Количественное определение триглицеридов сыворотки крови 282
11.4. Качественный и количественный анализ высших жирных кислот методом газожидкостной хроматографии 284

Литература 292

ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН 293

12.1. Микросомальные мембраны и метаболизм ксенобиотиков 293
12.2. Выделение микросом. Количественное определение цитохромов 298
12.3. Определение активности некоторых ферментов лекарственного метаболизма 299
12.4. Определение активности системы метаболизма ксенобиотиков в целом организме 302
12.5. Митохондриальные мембраны. Электрон-транспортная цепь митохондрий 305
12.6. Биохимический анализ мембран митохондрий 309

Литература 317

ГЛАВА 13. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ ФАГОЦИТОЗА 318

13.1. Выделение нейтрофилов крови человека 320
13.2. Определение жизнеспособности клеток 322
13.3. Исследование генерации АФК 326
13.4. Изучение процессов активации клеток, связанных с изменением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле 330
13.5. Методы регистрации внутриклеточной концентрации Ca^{2+} 333

Литература 341

ГЛАВА 14. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА В ПЕЧЕНИ 341

14.1. Методики воспроизведения повреждения печени 342
14.2. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот 343
14.3. Определение содержания гликогена в печени по Р. Крисман 354
14.4. Определение содержания холестерола в печени 356
14.5. Оценка цитотоксичности гепатотропных препаратов ***in vitro*** 357
14.6. Методы оценки апоптоза гепатоцитов 364
14.7. Оценка цитотоксичности с использованием культуры клеток Hep2 (на примере гемолимфы куколок дубового шелкопряда) 368

Литература 370

ГЛАВА 15. СОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: ПРИНЦИПИАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ, РАЗНОВИДНОСТИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 371

15.1. Иммунохимический анализ: основные термины и понятия 372
15.2. Радиоиммунологический анализ 377
15.3. Иммуноферментный анализ 387
15.4. Развитие методов ИХА 392
15.5. Методы современного экспрессного иммунохимического анализа 394
15.6. Иммунохроматографический анализ 398
15.7. Перспективы развития средств иммунохимического анализа 401

Литература 404

ГЛАВА 16. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА 404

16.1. ДНК-матрица 405
16.2. Праймеры (олигонуклеотиды) 407
16.3. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы 415
16.4. Проведение ПЦР 417
16.5. Методы ПЦР 419

16.6. Секвенирование ДНК 432
Литература 438

ГЛАВА 17. ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ СТРЕССЕ И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ 438

17.1. Подготовка материала для исследований 439
17.2. Воспроизведение стресса у растений 442
17.3. Методы исследования продуктов окислительной деградации макромолекул 444
17.4. Методы исследования антиоксидантной системы растительного организма 446
17.5. Рутинные биохимические параметры растительных объектов 457
17.6. Методы исследования растительных фенолов 462
17.7. Молекулярно-генетические исследования растительных объектов 466
Литература 468

ГЛАВА 18. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ PPAR 469

18.1. Структура и механизмы функционирования 470
18.2. Экспрессия генов ***PPAR*** в организме 472
18.3. Выделение и очистка суммарной РНК из животных тканей 474
18.4. Синтез кДНК на РНК-матрице 479
18.5. Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени 481
Литература 485

Учебное издание

Барковский Евгений Викторович
Бокуть Сергей Борисович
Бородинский Александр Николаевич и др.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Учебное пособие

Редактор *А.В. Новикова*
Художественный редактор *Т.В. Шабунько*
Технический редактор *Н.А. Лебедевич*
Корректоры *Т.К. Хваль*, *Н.Г. Баранова*
Компьютерная верстка *А.Н. Бабенковой*

Подписано в печать 11.03.2013. Формат 84×108/32. Бумага офсетная.
Гарнитура «Times New Roman». Офсетная печать. Усл. печ. л. 26,04.
Уч.-изд. л. 28,05. Тираж 400 экз. Заказ 541.

Республиканское унитарное предприятие «Издательство "Вышэйшая школа"».
ЛИ № 02330/0494062 от 03.02.2009. Пр. Победителей, 11, 220048, Минск.
e-mail: market@vshph.com http://vshph.com

Филиал № 1 открытого акционерного общества «Красная звезда».
ЛП № 02330/0494160 от 03.04.2009. Ул. Советская, 80, 225409, Барановичи.