

# Введение в молекулярную биоинженерию

Молекулярные инструменты для  
флуоресцентного анализа:

*Флуорогенные и хромогенные субстраты  
ферментов*

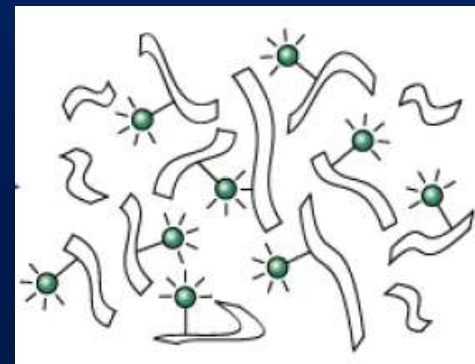
**Алексей Валерьевич Феофанов**

*Кафедра биоинженерии*

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии  
биомолекул*

**ИБХ РАН**

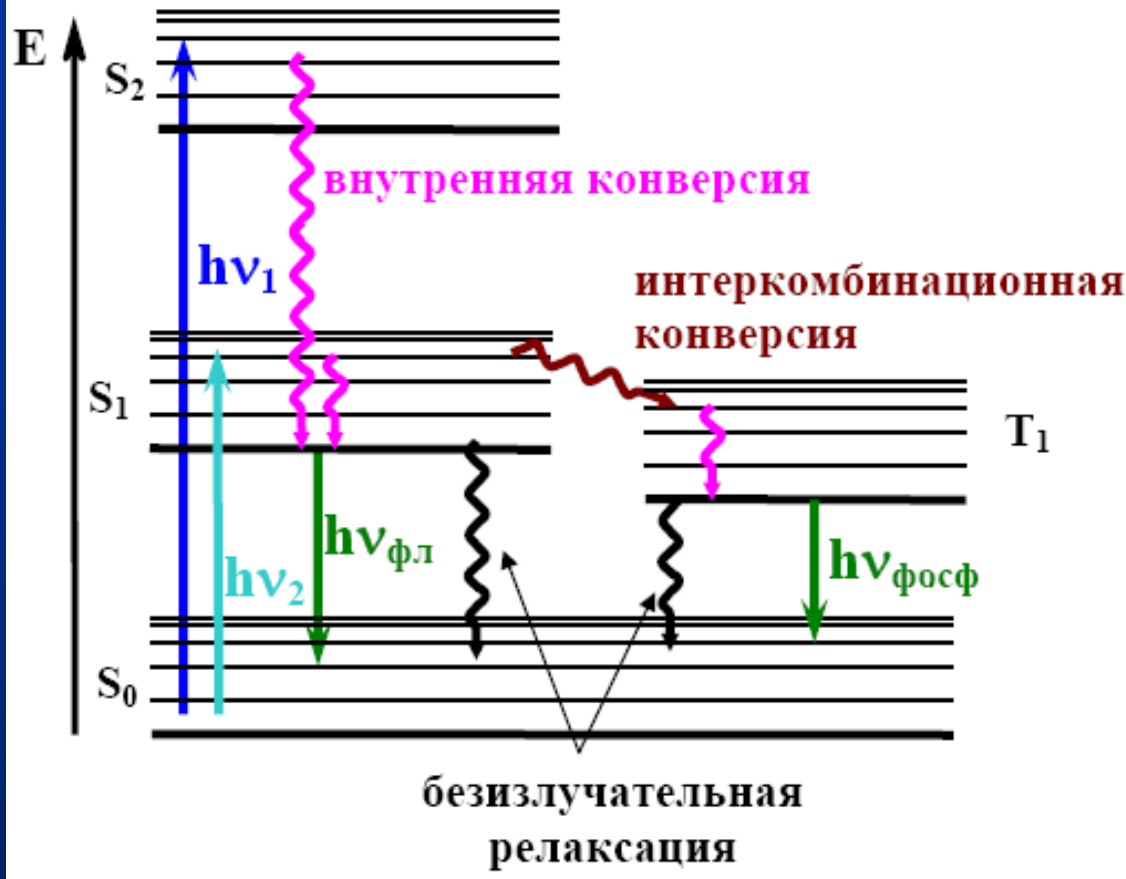


**Люминесценция – это эффект испускания кванта света при релаксации молекулы из возбужденного в основное электронное состояние.**



**Люминесценция = Флуоресценция + Фосфоресценция**

## Основы эффекта люминесценции



### Характерные времена

Поглощение кванта (возбуждение флуорофора) -

$10^{-15}$  сек

Внутренняя конверсия и колебательная релаксация -

$10^{-14}$  -  $10^{-11}$  сек

Флуоресценция -

$10^{-9}$  -  $10^{-7}$  сек

Фосфоресценция -

$10^{-3}$  -  $10^2$  сек

# Приборы и методы, использующие эффект флуоресценции

## Спектрофлуориметры и планшетные флуориметры:

измерения растворов и взвесей в кюветах и многолуночных планшетах ( $V \approx$  мкл - мл)

## Флуоресцентные микроскопы:

измерения пространственного распределение флуоресценции в объектах размером меньше 10 мм

## Флуоресцентные сканеры:

измерения пространственного распределение флуоресценции в макро-объектах (электрофорезные гели, блоты и хроматограммы)

## Проточные цитометры:

измерения флуоресценции клеток в проточных капиллярах

Приборы для капиллярного электрофореза, ВЭЖХ, сиквенаторы, с системами детекции на основе флуоресценции

## **Молекулярные инструменты:**

### **Флуорогенные и хромогенные субстраты ферментов**

**Область применения – выявление, анализ экспрессии/активности и локализации различных клеточных ферментов;  
полуколичественный анализ рекомбинантных белков;  
использование в различных иммуноферментных тест-системах .**

**Главное свойство субстратов: избирательность взаимодействия**

**Флуорогенные субстраты: продукты реакции флуоресцируют**

**Хромогенные субстраты: продукты реакции поглощают свет (окрашены)**

**Продукты реакций: растворимые в воде  
нерастворимые в воде**

**Общее требование:**

**продукт реакции должен максимально отличаться по своим оптическим свойствам от субстрата -**

**более интенсивное или отличающееся по спектру поглощение (флуоресценция)**

**преимущество – детекция продукта в присутствии субстрата**

# Флуорогенные и хромогенные субстраты ферментов

Требования к субстратам для анализа в клеточных экстрактах

субстрат - растворимость в воде;

продукт реакции - интенсивное поглощение (флуоресценция) в видимой или (лучше) красной области спектра.

Приборы- планшетный или «кюветный» флуориметр (фотометр)

Требования к субстратам для анализа в живых клетках

субстрат – растворимость в воде, способность проникать в клетку.

продукт реакции -

1. длительное удержание в клетке

2. интенсивное поглощение (флуоресценция) в видимой или (лучше) красной области спектра.

3. растворимость в воде для анализа экспрессии/активности ферментов

4. выпадение в осадок или связывание в месте реакции – изучение локализации фермента

Приборы: флуоресцентный микроскоп; проточный цитометр

## Виды/классы ферментов:

$\beta$ -галактозидаза,

$\beta$ -глюкуронидаза,

секретируемые щелочные фосфатазы,

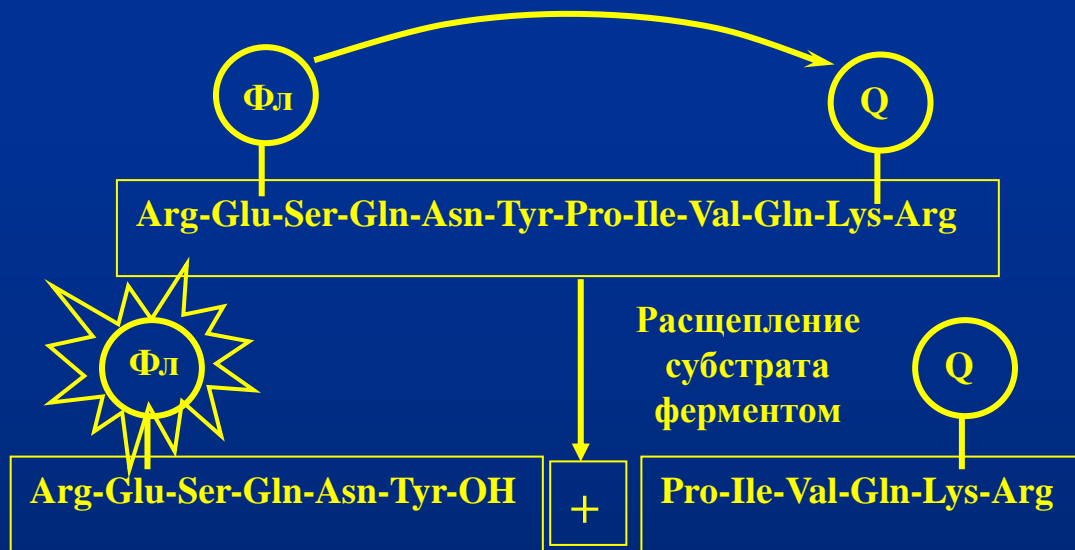
хлорамфеникол ацетилтрансфераза,

люцифераза,

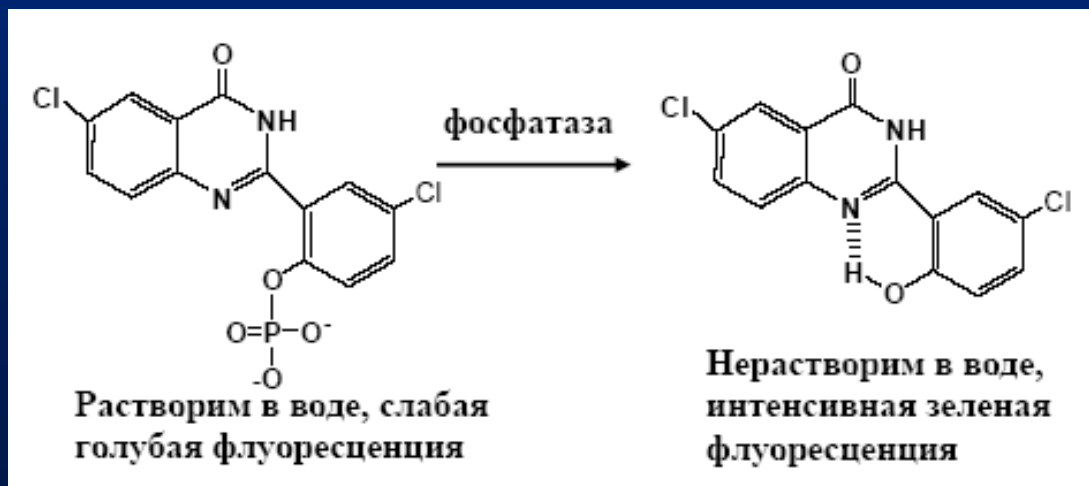
протеазы,

пероксидазы

# Принципы создания флуорогенных и хромогенных субстратов ферментов



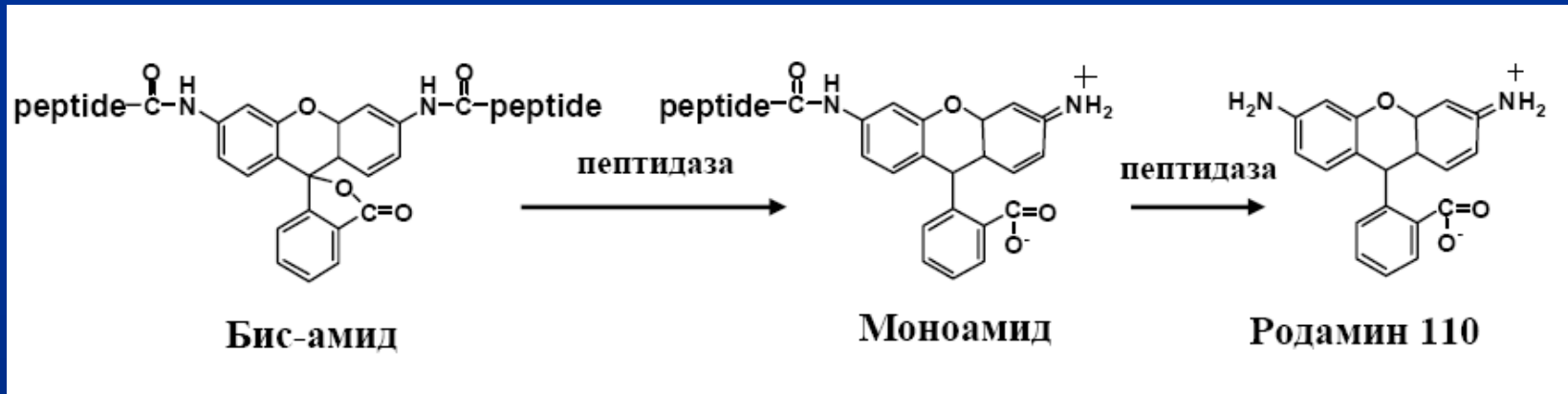
Субстраты на основе переноса энергии в возбужденном состоянии



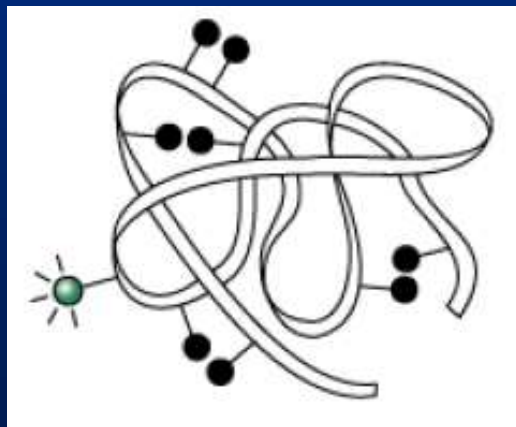
Принцип образования флуоресцирующего нерастворимого продукта в результате воздействия фосфатазы на водорастворимый субстрат



# Принципы создания флуорогенных и хромогенных субстратов ферментов

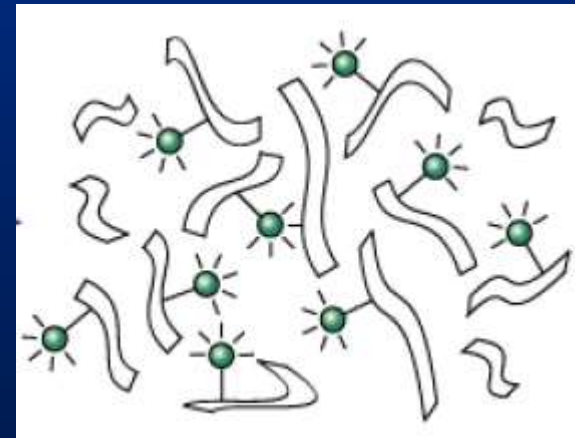


**Последовательное расщепление пептидазой субстрата на основе Родамина 110. Нефлуоресцирующий бис-амидный субстрат превращается во флуоресцирующий моноамид и затем в интенсивно флуоресцирующий Родамин 110.**



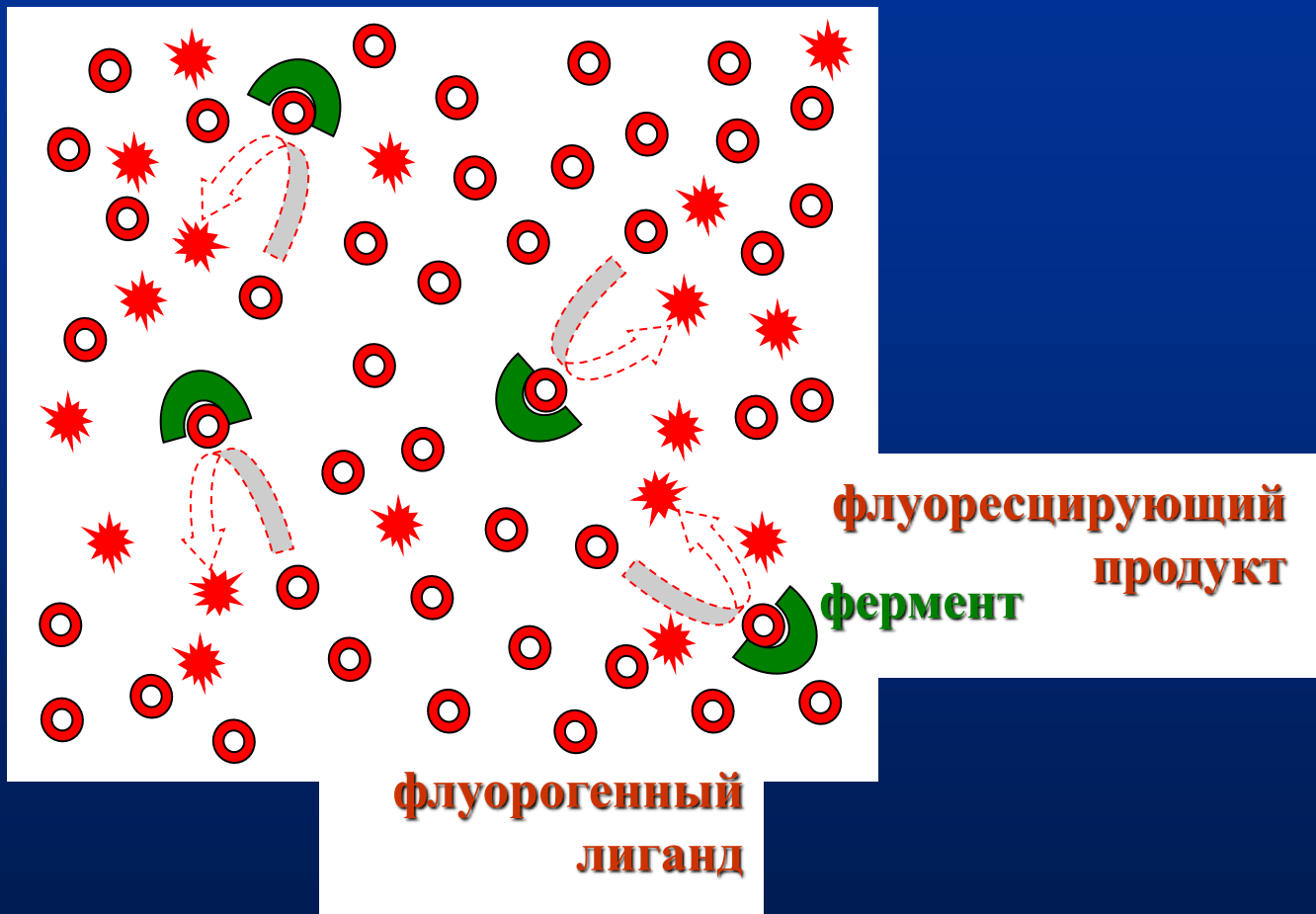
**Внутримолекулярно-затухенный субстрат**

пептидаза

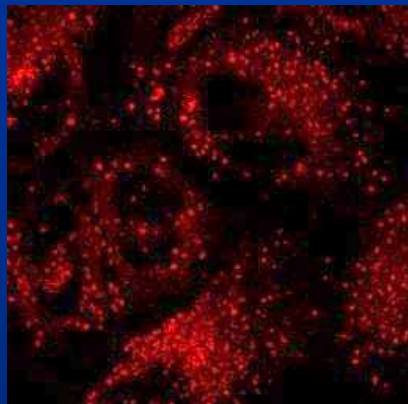


**Флуоресцирующие продукты расщепления**

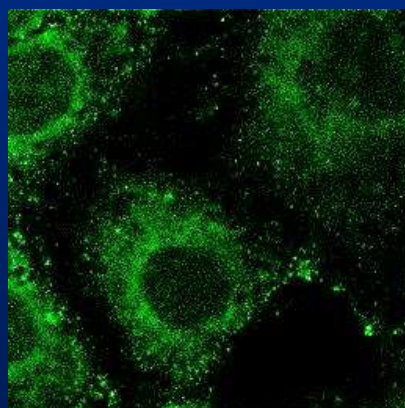
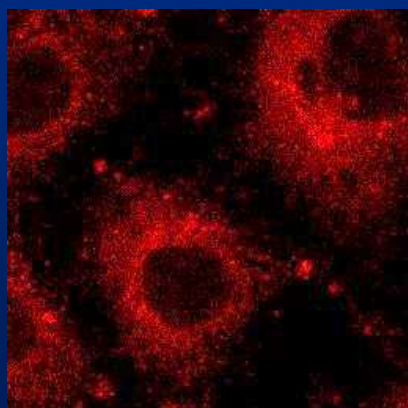
# Выявление ферментов и уровня их активности с помощью флуорогенных субстратов



**VZiPAR – флуорогенный субстрат ,  
выявляющий протеазную активность в живых  
клетках**  
**конъюгат**  
**VZiPAR**



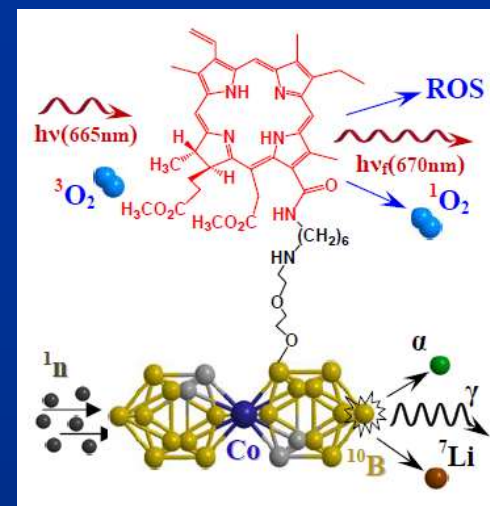
**VZiPAR + конъюгат**  
БЕЗ облучения светом



**VZiPAR + конъюгат**  
+ облучение светом

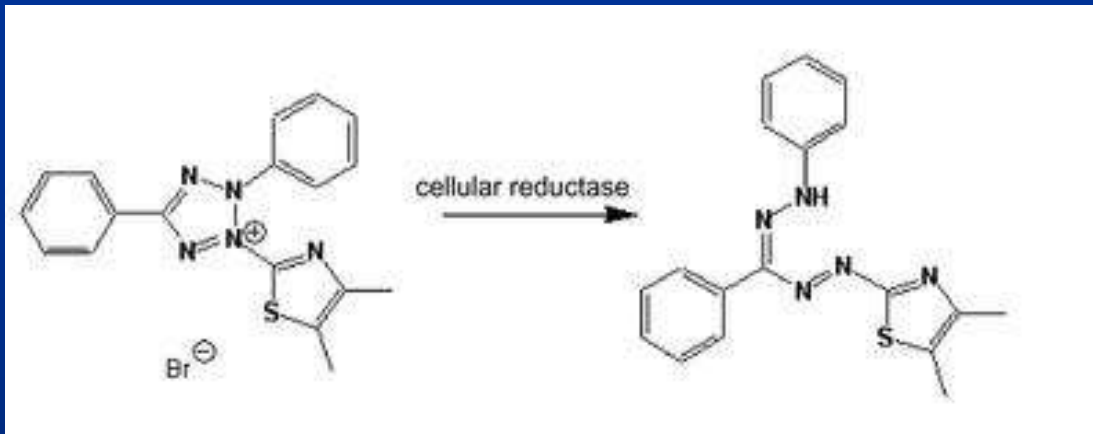
$\lambda_{ex} = 633 \text{ нм}$   
 $\lambda_{em} = 650-730 \text{ нм}$

$\lambda_{ex} = 488 \text{ нм}$   
 $\lambda_{em} = 500-530 \text{ нм}$



Облучение клеток, нагруженных конъюгатом, вызывает повреждение лизосом и вытекание наноконъюгата в цитозоль. Протеазная активность усиливается в цитоплазме после облучения.

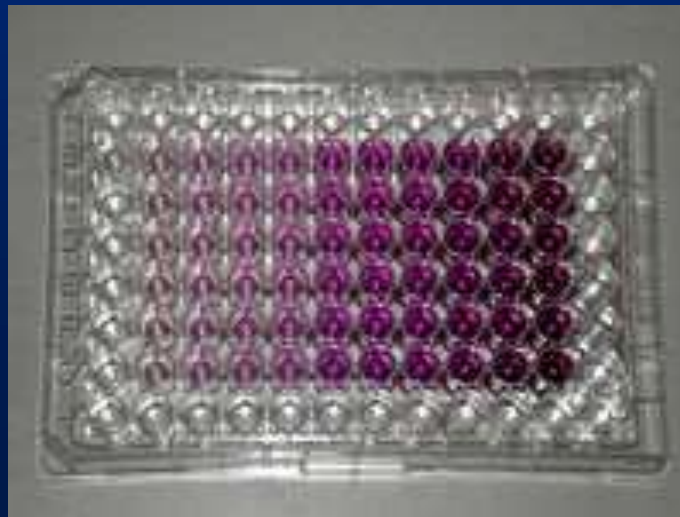
# Колориметрический МТТ- тест на выживание и пролиферацию клеток



МТТ - тетразолиевый краситель  
3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-  
дифенил-тетразолиум бромид

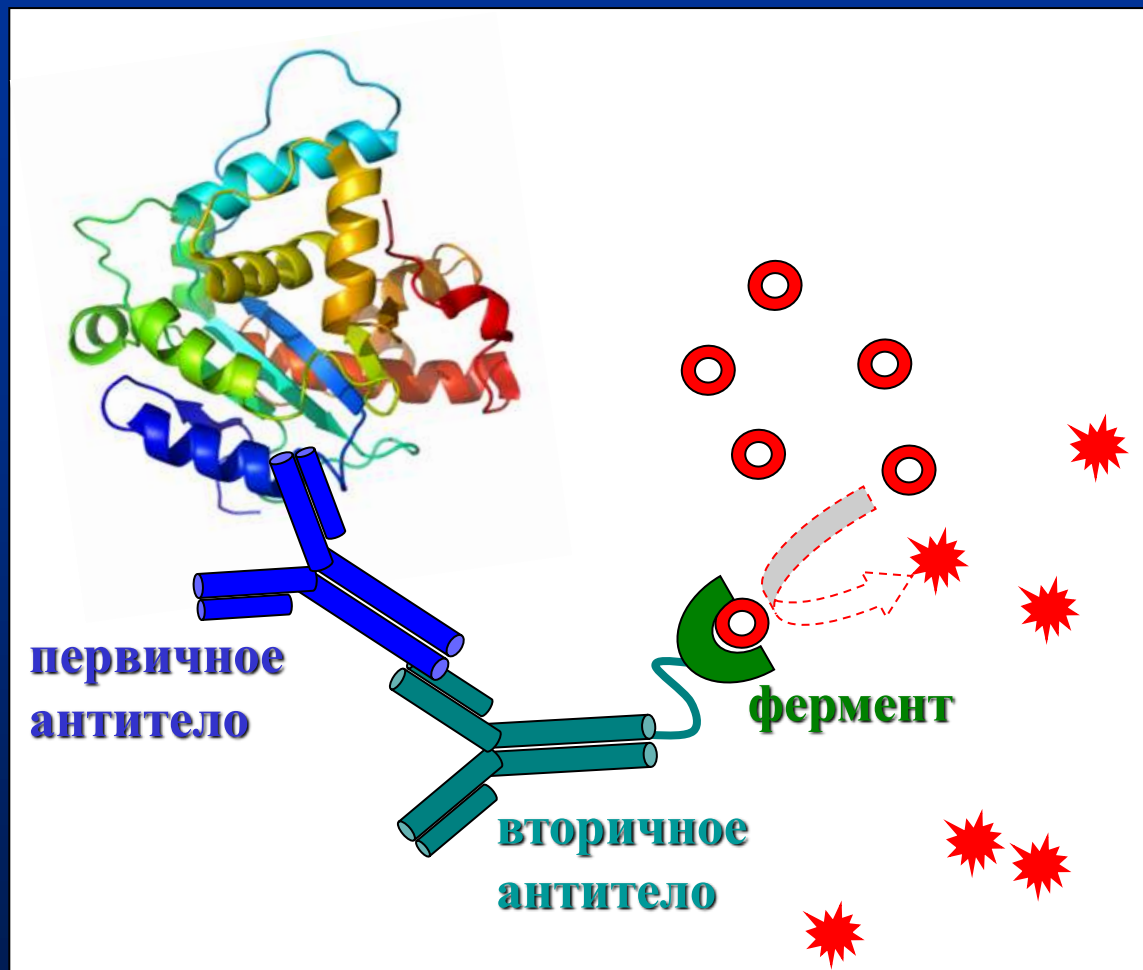
**Формаза**

**МТТ проникает  
в живые клетки,  
не окрашен**



**Формаза** выпадает в  
осадок,  
окрашен в пурпурный  
цвет

# Выявление заданных молекул и их количества с помощью антител, фермента и флуорогенных субстратов

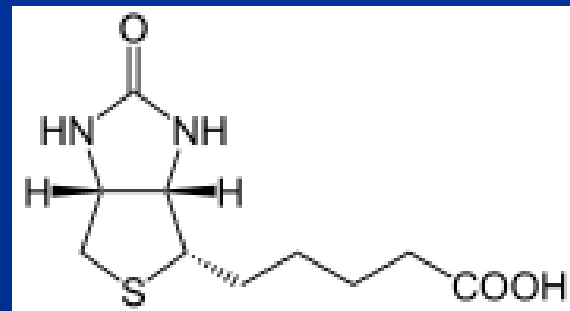


**Фермент: пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза**



# Авидин-биотиновые комплексы

**Биотин** - водорастворимый витамин группы В  
Входит в состав ферментов, регулирующих белковый и жировой обмен, обладает высокой активностью.



Участвует в синтезе глюкокиназы.

Является коферментом различных ферментов, в том числе и транскарбоксилаз.  
С участием биотина протекают реакции активирования и переноса  $\text{CO}_2$

**Авидин** — гликопротеид (66-69 кДа), гомотетрамер. Содержится в яичном белке птиц и рептилий.

**Стрептавидин** – тетрамерный белок (52,8 кДа) из бактерий *Streptomyces avidinii*. Эволюционно далек от авидина.

Каждая субъединица авидина (стрептавидина) связывает биотин.

$$K_d = 10^{-15} \text{ M}$$

Комплекс биологически неактивен.

Дегликозилирование авидина снижает неспецифическую адсорбцию белка: Экстравидин (Extravidin), Нейтравидин (NeutrAvidin)



# Авидин-биотиновые комплексы

**Рекомбинантные биоинженерные формы стрептавидина:**

**моновалентный стрептавидин – тетрамер с одним центром связывания ( $K_d=10^{-14}$  М). Позволяет избежать кросс-сшивки биотин-меченных молекул;**

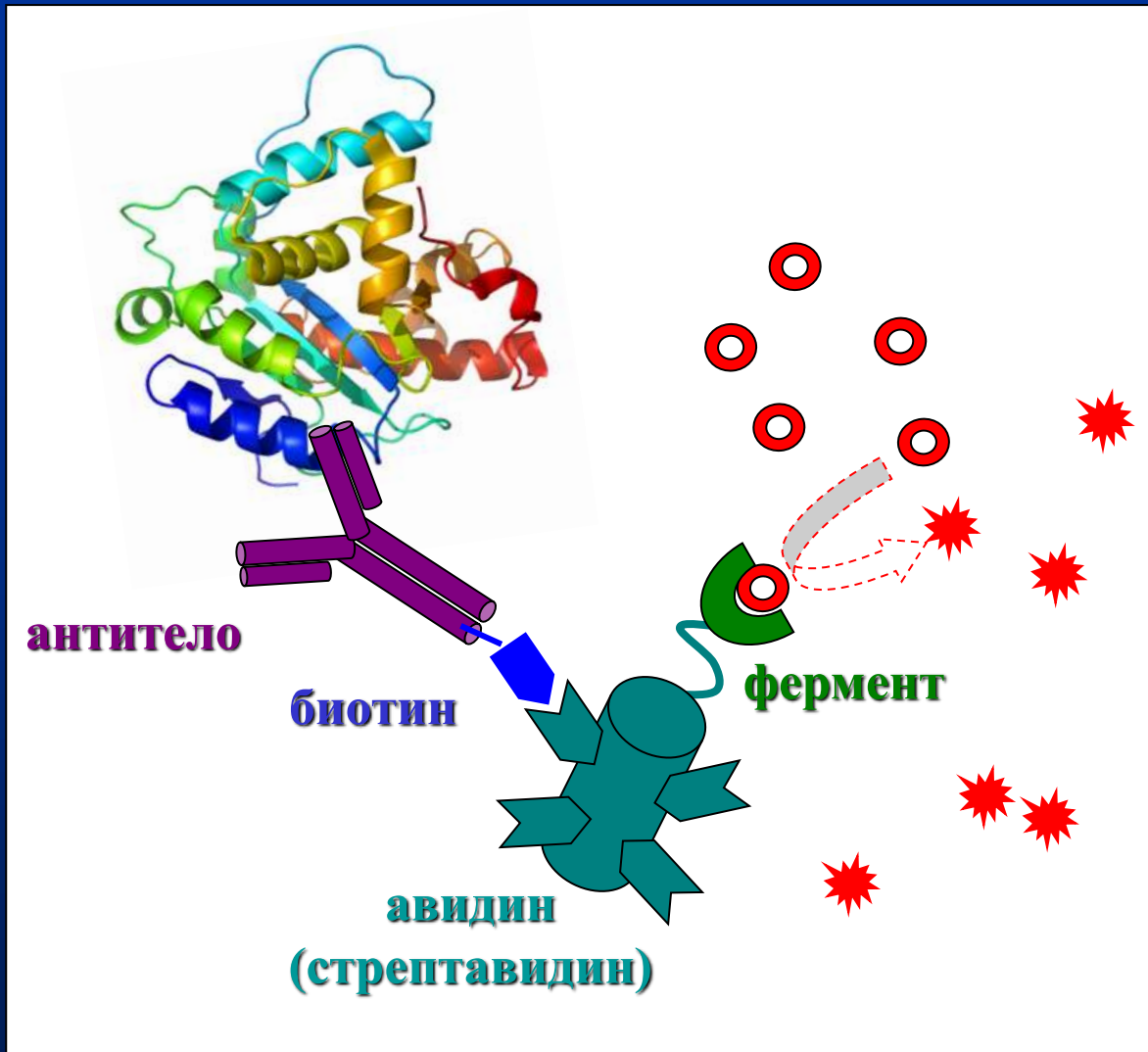
**мономерный стрептавидин ( $K_d=10^{-7}$  М). Удобен для выделения, когда важна обратимость образования комплексов.**

**Химически модифицированные формы авидина:**

**авидин с иодированным или нитрированным остатком Туг в активном центре. Связывает биотин при рН4. Высвобождает при рН>10;**

**мономерный авидин с  $K_d=10^{-7}$  М. Получают при обработке иммобилизованного авидина мочевиной или гуанидин-гидрохлоридом (6-8 М).**

**Используют в аффинной хроматографии.**



**Фермент: пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза**



# Универсальные метки/антигены (tag) для рекомбинантных белков

**Strep-tag, 8 а.к.: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys**

**Распознается Strep-Tactin, биоинженерным рекомбинантным белком, сконструированным и оптимизированным из стрептавидина.**

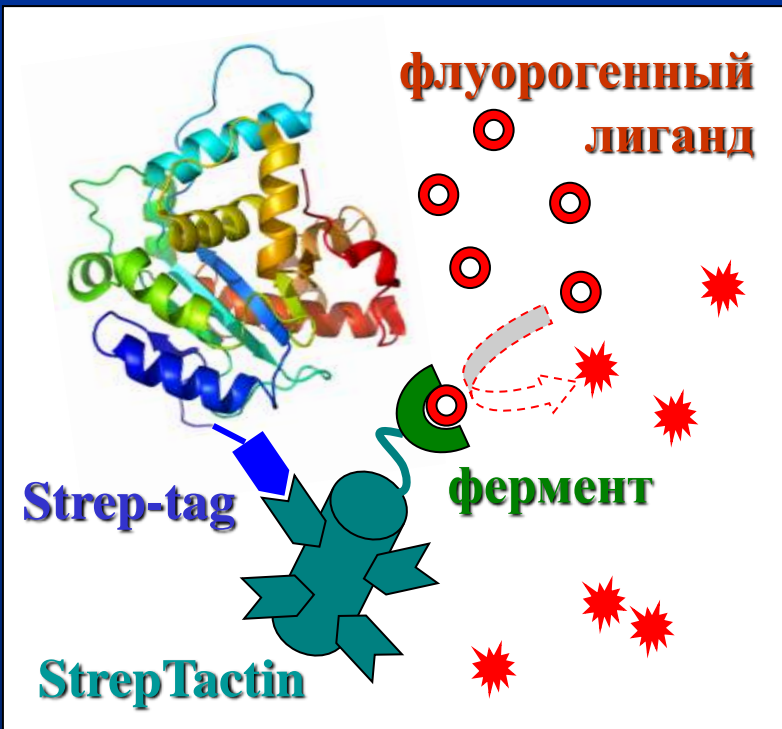
**His-tag, 6 или более His: His-His-His-His-His-His**

**Распознается антителами.**

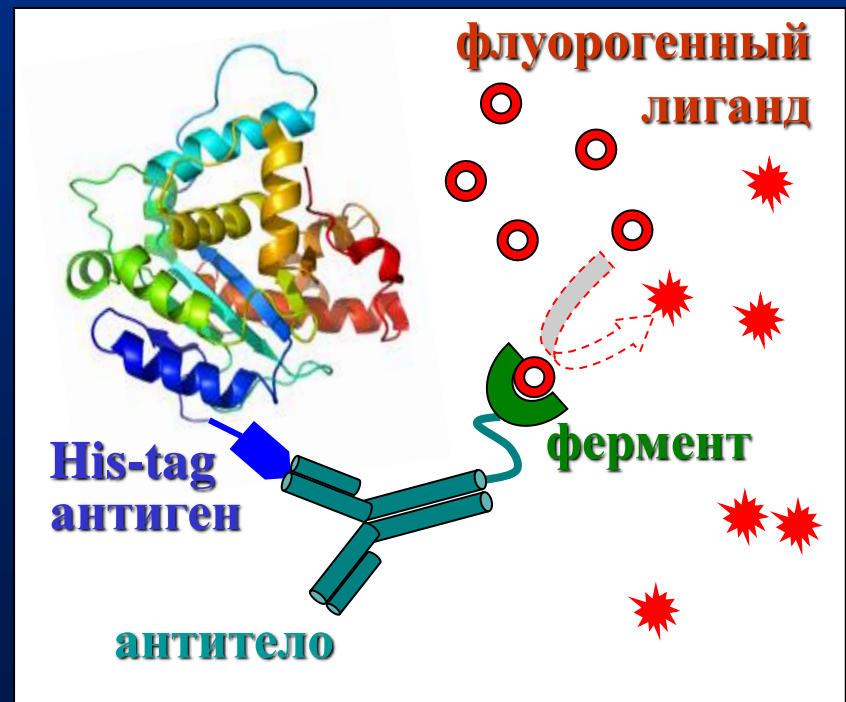
**FLAG-tag 8 а.к.: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys**

**Распознается антителами.**

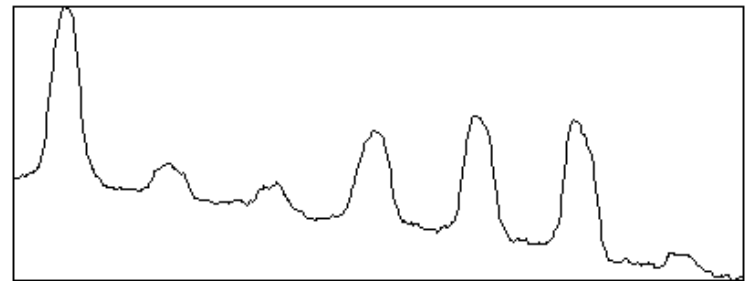
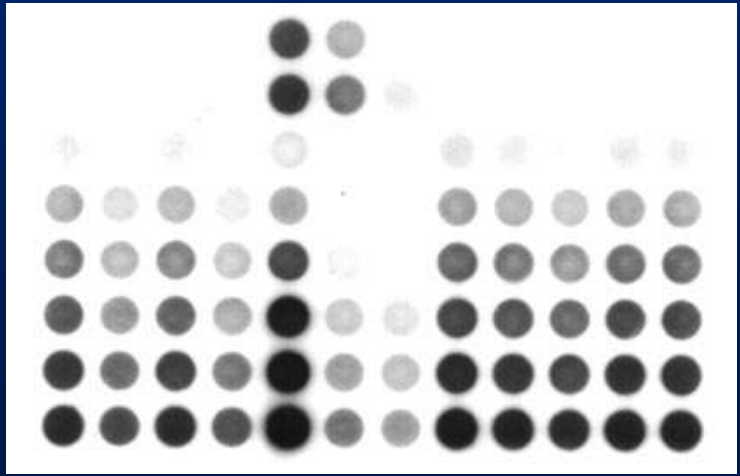
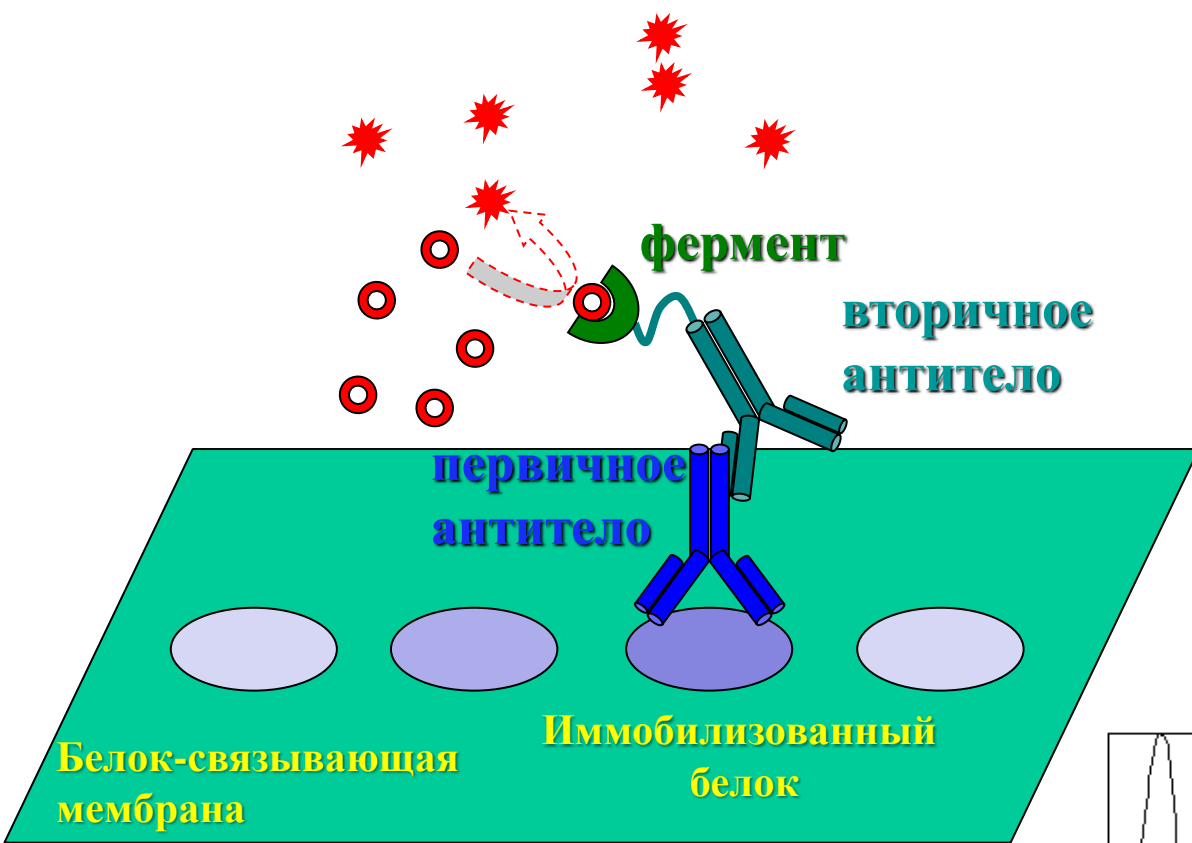
**Свойства меток: маленькие, инертные, возможно N- или C-концевое мечение.**



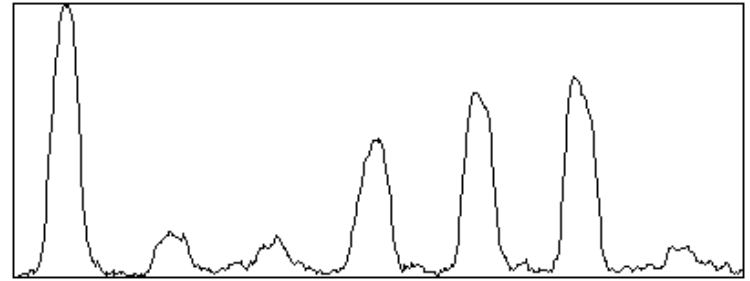
Фермент: пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза



# Дот-блот



Before background subtraction



After background subtraction

# ELISA - Enzyme-linked immuno sorbent assay

## Иммуноферментный анализ в планшете

