Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0053—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
О93

О93 **Оценка** воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—44 с.

ISBN 978—5—7508—1093—2

1. Разработаны Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Гаппаров, В. В. Бессонов, А. В. Васильев, Е. А. Арианова, О. Н. Тананова, А. А. Шумакова, Р. В. Распопов, В. А. Шипелин, О. И. Передеряев, Н. Э. Шаранова); Учреждением Российской академии наук «Институт биохимии им. А. Н. Баха» РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев); Федеральным бюджетным учреждением науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (И. А. Дятлов, В. П. Холоденко, В. В. Фирстова); Учреждением Российской академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН» (К. Г. Скрябин).

2. Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2011 годы».

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 29 декабря 2011 г.

4. Введены в действие 29 декабря 2011 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

© **Роспотребнадзор, 2012**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012**

Содержание

I. Область применения 4

II. Введение 5

III. Нормативные ссылки 8

IV. Общие положения 11

V. Методика изучения протеомного профиля и биосинтетических процессов в биосубстратах 15

5.1. Оборудование и материалы 15

5.2. Приготовление стандартных и рабочих растворов 24

5.3. Подготовка образцов для исследования (на примере микросомальной фракции гепатоцитов печени крыс и мышей) .. 28

5.3.1. Выделение микросомальной фракции 28

5.3.2. Определение общего белка в образце 29

5.4. Методика проведения двумерного электрофореза 30

5.4.1. Первое направление двумерного электрофореза 30

5.4.2. Второе направление двумерного электрофореза 33

5.4.3. Окраска гелей 37

5.4.4. Учет результатов 38

5.4.5. Обработка данных 39

5.4.6. Идентификация белковых пятен 40

5.4.7. Методика работы на масс-спектрометре MALDI 41

Приложение 1. Обозначения и сокращения 43

Приложение 2. Список рекомендуемой литературы 44

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 декабря 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0053—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют порядок и методы оценки безопасности искусственных наноматериалов по их влиянию на протеомный профиль биосубстратов и процессы биосинтеза белков в тестах на лабораторных животных.

1.2. Настоящие методические рекомендации могут применяться:

– при оценке безопасности разрабатываемых новых и уже используемых наночастиц и наноматериалов;

– в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с процессами производства и оборота наноматериалов.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства процедур подготовки образцов, проведения измерений и представления результатов в ходе оценки влияния искусственных наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы с использованием методов двумерного электрофореза и масс-спектрометрии.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями и учреждениями, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов и продукции наноиндустрии.

II. Введение

Быстрое развитие производства искусственных наноматериалов и их всё более широкое внедрение в различных областях человеческой деятельности приведет в ближайшее время к значительному увеличению нагрузки наночастицами и наноматериалами на население. Наноматериалы, обладающие ввиду своей высокой дисперсности комплексом уникальных физико-химических свойств и биологическим действием, должны рассматриваться как принципиально новые формы веществ, потенциальные риски от воздействия которых на организм должны быть во всех случаях детально охарактеризованы.

В рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии на 2008—2011 гг.» был разработан и утвержден в установленном порядке Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ряд методических документов, включающих порядок и методы оценки безопасности наночастиц и наноматериалов методами тестирования в биологических системах различного уровня организации (МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов»; МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза»; МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов»; МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных»; МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных»; МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных»; МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных»; МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека»; МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*»). Рассматриваемый комплекс методик позволяет проводить тестирование наночастиц и наноматериалов по их безопасности на иерархически организованной системе биологических объектов *in vitro* и *in vivo*, включая культуры микроорганизмов, клеточные культуры, гидробионты (беспозвоночные и рыбы), высшие растения, организмы лабораторных животных с использованием комплекса морфологических, биохимических, токсикологических, микробиологических, физиологических и иных методов. Вместе с тем, поиск дополнительных маркеров возможного неблагоприятного воздействия наночастиц и наноматериалов на организм продолжает сохранять актуальность, особенно в аспекте выявления от-

носительно слабых и отложенных во времени эффектов при хроническом воздействии. В этой связи представляется целесообразным использование при тестировании наноматериалов методов, позволяющих оценивать их влияние на протеомный профиль и биосинтетические процессы в организме, являющиеся вероятными индикаторами взаимодействия наноматериалов с генетическим и биосинтетическим аппаратом клетки.

Согласно имеющимся в настоящее время данным, наночастицы в силу своих малых размеров способны относительно беспрепятственно проникать через физиологические барьеры организма и далее через биологические мембраны в клетки, где возможно взаимодействие наночастиц с макромолекулами ДНК, РНК и другими биополимерами. Следствием этого может быть воздействие наночастиц и наноматериалов на экспрессию генов, кодирующих различные функционально значимые белки и, как следствие, длительные и стойкие изменения в протеоме организма. Методом, позволяющим оценивать эти изменения в условиях экспозиции биологических тест-систем наноматериалами, является двумерный электрофорез в сочетании с масс-спектрометрической идентификацией белков, получивший обобщенное название «протеомного картирования».

Метод двумерного гель-электрофореза заключается в объединении двух различных типов разделения (по электрическому заряду и молекулярной массе), позволяет разделять и идентифицировать отдельные белки в сложной смеси десятков и сотен белков, характерной для большого числа биосубстратов. Необходимым условием успешного разделения является отсутствие в смеси т. н. «доминантных» белков, составляющих по массе более 1—5 % общей суммы белков образца (примером такого белка являются альбумин, a,b и g-глобулины плазмы крови). В случае наличия таких белков они должны быть предварительно удалены из смеси с использованием специальной процедуры фракционирования (осаждение солями, органическим растворителями, ионообменная или иммуноаффинная хроматография).

Удобным объектом для протеомного исследования биосубстратов, не требующим предварительного фракционирования, является комплекс белков микросом (мембран эндоплазматического ретикулума) гепатоцитов печени.

При работе данным методом на первом этапе белки разделяют по их заряду. Для этого образец помещают в небольшой объем раствора, содержащего в качестве денатурирующих агентов неионогенное ПАВ и мочевину. В этом растворе происходит солюбилизация, денатурация и диссоциация всех без исключения полипептидных цепей (при этом изменения заряда цепей не происходит).

Диссоциированные полипептидные цепи разделяют методом изоэлектрического фокусирования, основанном на изменении заряда белковой молекулы при изменении pH окружающей среды. Каждый из белков может быть охарактеризован изоэлектрической точкой (ИЭТ) – значением pH, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен нулю, и, следовательно, белок не способен перемещаться под действием электрического поля. При pH ниже ИЭТ увеличивается положительный заряд, и молекула белка становится катионом. При pH выше ИЭТ увеличивается отрицательный заряд и белок становиться анионом. Для большинства тканевых белков ИЭТ находится в пределах 2,7—7,9.

При изоэлектрическом фокусировании белки подвергаются электрофорезу в узкой трубочке (или на стрипе), заполненной полиакриламидным гелем, в котором с помощью специальных буферов (т. н. «амфолинов», представляющих собой низкомолекулярные алифатические полимеры (полиаминокислоты) с различным соотношением аминных и карбоксильных групп) создается градиент pH. Под действием электрического поля каждый белок перемещается, в соответствии со своим зарядом, в ту зону градиента, которая соответствует его изоэлектрической точке и далее остается в ней.

На втором этапе трубочка геля или стрип, содержащие фракционированные по изоэлектрическим точкам белки, подвергается электрофорезу в направлении перпендикулярном тому, что имело место на первом этапе. Электрофорез ведут в щелочной области pH, в присутствии анионактивного ПАВ, сильного электролита додецилсульфата натрия (ДСН). В качестве носителя используют полиакриламидный гель (ПААГ). В этих условиях практически все разделяемые молекулы полипептидов несут максимально возможный отрицательный заряд, и их подвижность в электрическом поле определяется исключительно их размером (гидродинамическим диаметром). Меньшие молекулы будут встречать относительно меньшее сопротивление со стороны матрикса геля и, соответственно, двигаться быстрее. В результате проведения электрофореза большие молекулы будут находиться ближе к месту нанесения образца, чем меньшие. За один раз методом двумерного гель-электрофореза можно разделить до 2 000 отдельных полипептидных цепей, что достаточно, чтобы выявить большинство белков в образце биосубстрата. Разрешение метода настолько велико, что он позволяет разделить два практически идентичных белка, отличающихся одной заряженной аминокислотой.

Разделившиеся фракции (пятна) полипептидов во избежание их диффузии немедленно фиксируют и далее окрашивают в растворе красителя, прочно связывающегося с белком. Результаты

при этом получают в виде «двумерной» белковой карты образца. Подсчёт, каталогизация белковых пятен и их сравнение для различных образцов выполняют после сканирования гелей на денситометре высокого разрешения с использованием специализированного программного обеспечения.

Идентификацию белков в составе вариабельных пятен (появляющихся или, наоборот, исчезающих под воздействием наночастиц и наноматериалов) осуществляют методом масс-спектрометрии с использованием эффекта лазерной десорбции-ионизации на матрице (MALDI). Для этого выбранные для анализа пятна вырезают из геля, экстрагируют полипептиды с помощью подходящего растворителя, расщепляют их на относительно короткие олигопептидные фрагменты под действием протеаз и анализируют отношение массы к заряду для смеси олигопептидов на масс-спектрометре. Получаемая картина (спектр полипептидных фрагментов) является характеристической и высокоспецифической для белка данного вида и может быть идентифицирована при помощи существующих международных баз протеомной информации. После идентификации белков (компонентов протеома), являющихся мишенью воздействия наночастиц и наноматериалов, можно сделать вывод о биохимических механизмах возможного токсического действия наноматериалов на организм. В результате этого возможно установление доза-эффект, что является необходимым условием для гигиенического нормирования наноматериалов.

III. Нормативные ссылки

3.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3.2. Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

3.3. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

3.4. Федеральный закон от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

3.5. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

3.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

3.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в

области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».

3.8. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».

3.9. Постановление Правительства Российской Федерации от 2 февраля 2006 г. № 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга».

3.10. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

3.11. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

3.12. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

3.13. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 г. № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащих наноматериалы».

3.14. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

3.15. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

3.16. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

3.17. МУ 1.2. 2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

3.18. МУ 1.2. 2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.19. МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.20. МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.21. МУ 1.2. 2744 —10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах».

3.22. МУ 1.2. 2740 —10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в водных беспозвоночных».

3.23. МУ 1.2. 2742 —10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

3.24. МУ 1.2.2634 —10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

3.25. МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

3.26. МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.27. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

3.28. МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*».

3.29. МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами».

3.30. МР 1.2.0023—11 «Контроль наноматериалов в пищевой продукции».

3.31. МР 1.2.0024—11 «Контроль наноматериалов, применяемых в химической промышленности».

3.32. ГОСТ 24861—91 «Шприцы инъекционные однократного применения».

3.33. ГОСТ 21240—89 «Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

3.34. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

3.35. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

3.36. ГОСТ 4328—77 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия».

3.37. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия».

3.38. ГОСТ 27987—88 «Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия».

3.39. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования».

3.40. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

3.41. ГОСТ 3—88 «Перчатки хирургические резиновые. Технические условия».

3.42. ГОСТ 4568—95 «Калий хлористый. Технические условия».

3.43. ГОСТ 61—75 «Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия».

3.44. ГОСТ 83—79 «Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия».

3.45. ГОСТ 1277—75 «Реактивы. Серебро азотно-кислое. Технические условия».

3.46. ГОСТ 14261—77 «Кислота соляная особой чистоты. Технические условия».

3.47. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

3.48. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

IV. Общие положения

4.1. Целью оценки воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы является:

– установление возможного воздействия наночастиц и наноматериалов на генетический аппарат клетки, экспрессию генов, процессы транскрипции и трансляции, посттрансляционной модификации клеточных белков;

– установление зависимости доза-эффект, возможных эффектов кумуляции наночастиц в организмах животных;

– токсиколого-гигиеническая и медико-биологическая оценка безопасности наночастиц и наноматериалов;

– гигиеническое нормирование содержания наноматериалов в объектах окружающей среды и потребительской продукции;

– экспертиза наночастиц и наноматериалов, производимых на территории Российской Федерации или ввозимой на территорию Российской Федерации;

– оценка риска для здоровья населения при поступлении наноматериалов в организм с пищей, водой, атмосферным воздухом и иными путями;

– разработка мероприятий по охране окружающей среды от воздействия наночастиц и наноматериалов.

4.2. Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы проводится в биосубстратах

(цельных гомогенатах клеток, клеточных фракциях, отдельных органеллах, препаратах биологических мембран, экскретах и секретах, межклеточных жидкостях), полученных от биологических тест-систем различного уровня (культуры клеток микроорганизмов и высших многоклеточных организмов, растения, беспозвоночные, рыбы, млекопитающие), подвергнутых воздействию наночастиц и наноматериалов однократно или длительно (многократно) в контролируемых условиях эксперимента.

4.3. Выбор биологического объекта воздействия наночастиц и наноматериалов, принципы выбора действующих доз, пути, длительность и кратность введения наночастиц и наноматериалов, состав опытных и контрольных групп тестируемых организмов устанавливаются для отдельных тест-систем в соответствии с МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов», МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*», МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза», МУ 1.2. 2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов», МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.4. Отбор проб биологических объектов (органы и ткани животных и растений, подвергшихся воздействию наночастиц и наноматериалов) для проведения протеомного анализа осуществляется (для соответствующих групп организмов) в соответствии с МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных», МУ 1.2. 2744 —10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах», МУ 1.2. 2740—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в водных беспозвоночных», МУ 1.2. 2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных», МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

4.5. При выборе объекта исследования (биосубстрата) для оценки влияния наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы учитывается:

4.5.1) общее содержание белка в биосубстрате, которое должно быть достаточно высоким (не менее 10 % по массе сухих веществ) и воспроизводимым в условиях тестирования; отсутствие больших количеств веществ, препятствующих электрофоретиче-

скому разделению (минеральных солей, сильных электролитов, синтетических ПАВ);

4.5.2) фракционный состав белка, в том числе разнообразие белкового состава и отсутствие доминантных белковых фракций, составляющих более 10 % по массе общего белка биосубстрата; в случае присутствия таких белков должны иметься подходящие методы их удаления из образца с использованием фракционирования солями или органическими растворителями, хроматографии, иммуносорбции и другими;

4.5.3) наличие предварительных данных о токсических эффектах и (или) накоплении наночастиц исследуемого вида в организмах, органах и тканях, являющихся источниками получения биосубстратов для протеомного анализа.

Одним из объектов исследования, удовлетворяющих в полной мере вышеперечисленным критериям, является микросомальная фракция клеток печени лабораторных животных (крыс, мышей и др.), подвергнутых воздействию наночастиц и наноматериалов при различных путях их поступления (пероральном, ингаляционном, интратрахеальном, накожном, парентеральном).

4.6. Организация (лаборатория), проводящая исследования по изучению влияния наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должна быть аккредитована на проведение работ в соответствующей области. В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

4.7. В организации (лаборатории), проводящей исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должна быть разработана программа по обеспечению качества проводимых исследований. Все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП), осуществляемыми в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

4.8. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должны быть укомплектованы необходимым оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке. Эксплуатация оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки (калибровки) и те-

кущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание. Применяются средства измерений, имеющие сертификат и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

4.9. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварий, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных».

4.10. Организации (лаборатории) проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должны иметь специально оборудованные помещения для работы с биологическим материалом (препарирование, пробоподготовка), отдельные чистые помещения для проведения протеомного анализа (электрофорез, окрашивание гелей, экстракция белковых пятен, трипсинолиз). Для обработки материала, содержащего ультрамалые количества белков и пептидов, должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие горизонтальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

4.11. Организации (лаборатории), проводящие исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должны иметь оборудование, обеспечивающее безопасность работы с наноматериалами неорганического и биогенного происхождения: ламинарные вытяжные шкафы, перчаточные боксы, снабжённые системой вентиляции (HEPA-фильтры), препятствующие поступлению аэрозоля наноматериалов в воздух производственных помещений и в окружающую среду.

4.12. Документом, подтверждающим результаты проведённых исследований наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании. Отчет содержит следующие сведения:

– название исследования;

– адрес организации;

– даты начала и завершения исследований;

– цель и задачи исследования;

– характеристика тестируемого наноматериала;

– перечень исследованных биологических образцов и применяемых стандартных образцов;

– вид, линию, пол и возраст используемых лабораторных животных;

– состав применяемых рационов, условия содержания животных;

– метод введения наночастиц и наноматериалов, применяемые дозы, длительность и кратность введения;

– схема проведения исследования;

– для растений – вид, линию используемых растений, условия выращивания, методы введения наночастиц и наноматериалов, применяемые дозы, длительность введения; схема проведения исследования;

– для культур клеток – видовую принадлежность и номер (наименование) клеточной линии, состав культуральной среды, условия выращивания, действующие концентрации наноматериалов и препаратов, являющихся контрольными (положительный и отрицательный контроль);

– перечень использованных средств измерений и вспомогательного оборудования и режимы их работы;

– методы статистической обработки результатов;

– результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним;

– заключение, выводы, список использованных источников.

Оформление отчёта о результатах исследования должно соответствовать требованиям ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

Отчет о результатах проведенного исследования утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

4.13. Организация (лаборатория), проводящая исследования по влиянию наночастиц и наноматериалов на протеомный профиль биосубстратов и биосинтетические процессы, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

V. Методика изучения протеомного профиля и биосинтетических процессов в биосубстратах

5.1. Оборудование и материалы

5.1.1. Основное оборудование

Микроразмельчитель тканей
«POLYMIX PX-SR50E», производства

«Kinematica AG», Германия, или другой с аналогичными параметрами	
Ультрацентрифуга «Optima L-90K Ultracentrifuge», производства «Beckman Coulter», США, или другая с аналогичными параметрами	
Фотометр планшетный автоматический двухволновой «ЭФОС 9305», производства ОАО «МЗ «Сапфир», Россия, с интерференционными светофильтрами на длину волны 590—620 нм, или другой с аналогичными параметрами	
Масс-спектрометр Microflex MALDI TOF (производства BRUKER, США или другой с аналогичными параметрами)	
Анализатор потенциометрический со стеклянным электродом для измерения pH	ГОСТ 27987—88
Измеритель pH комбинированный SevenEasy (производитель «Mettler Toledo», Швейцария) или другой с аналогичными параметрами	
Центрифуга с охлаждением «3-18K», производства «Sigma», Германия, или другая с аналогичными параметрами	
Насос вакуумный «Rotavac valve tec», производства «Heidolph», Германия, или другой с аналогичными параметрами	
Ячейка «Protean II xi Cell», производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами	
Универсальный источник питания «PowerPactm HV Power Supply», производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	

Ячейка «Protean IEF Cell», производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами

Трей для фокусировки в ячейке Protean IEF Cell для стрипов 17см производства «Bio-Rad», США) или другой с аналогичными параметрами

Устройство перемешивающее «ПЭ-6410М», производства «Экрос», Россия, или другое с аналогичными параметрами

Камера «Protean II xi Multi-Gel Casting Chamber», производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами

Насос перистальтический, производства «Heidolph», Германия, или другой с аналогичными параметрами

Ячейка «Protean II xi Multi-Cell», производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами

Универсальный источник питания «PowerPactm Universal», производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами

Камера для окраски «Dodeca TM Stainer», производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами

Денситометр для анализа окрашенных гелей «Calibrated Imaging Densitometer model GS-800», производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами

Система для получения деионизованной воды «Milli-Q Advantage A10», производства «Millipore SAS», Франция, или другая с аналогичными параметрами

5.1.2. Вспомогательное оборудование

Дозаторы жидкости ручные или электронные автоматические с одноразовыми наконечниками емкостью 1—10 мм³, 10—100 мм³, 20—200 мм³ и 100—1 000 мм³, 500—5 000 мм³, 1 000—10 000 мм³, обеспечивающие суммарную погрешность дозирования на уровне ± 1,0 %, производства «Eppendorf Research», Германия, или другие с аналогичными параметрами	
Магнитная мешалка с подогревом «ES-6120», производства «Экохим», Россия, или другая с аналогичными параметрами	
Весы лабораторные электронные «GX-2000», производства «Эй энд Ди», Япония, или другие с аналогичными параметрами	
Весы лабораторные электронные «AL 104», производства «Mettler Toledo», Швейцария, или другие с аналогичными параметрами	
Водяная баня с электрическим подогревом «ГСП-2», производства «РЭМО», Украина, или другая с аналогичными параметрами	
Термостат 4610, производства «Экрос», Россия, или другой с аналогичными параметрами	
Вортекс персональный для пробирок объемом от 1,5 до 50,0 см³ (V-1 plus), производства «Biosan», Латвия, или другой с аналогичными параметрами	
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678—85
Морозильная камера бытовая, обеспечивающая температуру до –20 °С, производства «Bosch», Германия, или другая с аналогичными параметрами	

Дистиллятор электрический ДЭ-4-2, производства ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», Россия, или другой с аналогичными параметрами	

5.1.3. Лабораторная посуда и вспомогательные материалы

Стеклянные трубочки 1,5 mm ID Glass Tube, 7,5 OD, 180 mm length, 24 производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Заглушки «Grommets and Stoppers. For 6—7,5 mm OD tybes», производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Шприцы инъекционные однократного применения с иглой на 2 и 5 $см^3$	ГОСТ 24861—91
Шприц на 20 $см^3$ с навинчивающейся иглой, производства «Химмед», Россия, или другой с аналогичными параметрами	
Иглы для нанесения геля, производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Иглы для экстракции «Tube Gel Extrusion Needles, Protean II xi cell», производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Набор больших стекол «Protean II xi Outer Plates, 20 cm», производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	
Набор малых стекол «Protean II Beveled Inner Plates, 20 cm», производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	
Спейсеры «Protean II XL IPG Spacers, 1,0 mm, 4», производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	

Зажимы «Protean II XL Sandwich Clamps, 20 cm set», производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Пробирки полиэтиленовые одноразовые Эппендорф на 1,5 $см^3$, производства «Eppendorf», Германия, или другие с аналогичными параметрами	
Пробирки полиэтиленовые одноразовые Эппендорф на 2,0 $см^3$, производства «Eppendorf», Германия, или другие с аналогичными параметрами	
Пробирки полиэтиленовые или полипропиленовые одноразовые с крышкой на 5,0 $см^3$, производства «Axygen», США, или другие с аналогичными параметрами	
Полиалломерные тонкостенные центрифужные пробирки, 13 × 64 мм, 6,5 $см^3$, производства «Beckman Coulter», США», или другие с аналогичными параметрами	
Алюминиевые крышки к полиалломерным тонкостенным центрифужным пробиркам, 13 × 64 мм, 6,5 $см^3$, производства «Beckman Coulter», США», или другие с аналогичными параметрами	
Одноразовые полиэтиленовые наконечники для лабораторных дозаторов объемом 1—10 $мм^3$, 10—200 $мм^3$, 100—1 000 $мм^3$, 1 000—5 000 $мм^3$, 1 000—10 000 $мм^3$, производства «Eppendorf», Германия, или другие с аналогичными параметрами	
Цилиндры с носиком на 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Стаканы лабораторные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы мерные на 10, 100, 500 и 1 000 $см^3$ со шлифом и пробкой	ГОСТ 1770—74

Пинцет зубчато-лапчатый ПХ-200 × 18, производства «Ветмаркет», Россия, или другой с аналогичными параметрами	
Перчатки диагностические (смотровые) нестерильные или перчатки латексные	ГОСТ 3—88
Парафильм М, производства «Laboratory Film», или другой с аналогичными параметрами	
Стрипы с преформированным градиентом pH длиной 17 см, производства «Bio-Rad», США, или другие с аналогичными параметрами	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Пробирки для ПЦР объемом 500 мм^3, производства «Lab Tec», США, или другие с аналогичными параметрами	
Скальпель глазной брюшистый малый	ГОСТ 21240—89
Гребенка, производства «Bio-Rad», США, или другая с аналогичными параметрами	
Пробирки Falcon, 15 см^3, производства «Greiner», Германия, или другие с аналогичными параметрами	
Штатив для уравновешивающего буфера, производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	
Планшет для иммуноферментного анализа, полистирол со средней степенью связывания	

5.1.4. Реактивы

Трис-гидроксиметиламинометан основание (Трис) 98,0 % чистоты, производства «Bio-Rad», США, или другое с аналогичными параметрами	

Соляная кислота (HCl), осч	ГОСТ 14261—77
Хлорид калия (KCl), чда	ГОСТ 4568—95
Реагент Бредфорда, производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	
Бычий сывороточный альбумин (БСА), производства «Sigma-Aldrich», Германия, или другой с аналогичными параметрами	
Акриламид (АА), 99,9 %, производства «Sigma», Китай, или другой с аналогичными параметрами	
NN-бис-метилен-акриламид («бис АА») 99,0 %, производства «Bio-Rad», США, или другой с аналогичными параметрами	
Мочевина, производства «Bio-Rad», США, или аналогичная	
Амфолины pH 3—5, производства «Fluka», Германия, или аналогичные	
Амфолины pH 5—7, производства «Fluka», Германия, или аналогичные	
Амфолины pH 3—10, производства «Bio-Rad», США, или аналогичные	
CHAPS, производства «Bio-Rad», США, или аналогичный	
Октилфеноксиполиэтоксиэтанол (NONIDET P 40, NP40), производства «Helicon» США, или аналогичный	
Персульфат аммония (ПСА) 99,0 %-й, производства «Sigma-Aldrich», Мексика, или аналогичный	
N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин (TEMED), производства «Sigma», США, или аналогичный	
Тиомочевина 99,0 %-я, производства «Sigma», Германия, или аналогичная	

Дитиотрейтол (ДТТ), производства «Bio-Rad», США, или аналогичный	
Гидроксид натрия (NaOH)	ГОСТ 4328—77
фосфорная кислота (H_3PO_4), осч	ТУ 2612-014-00203677—97 или аналогичная
Минеральное масло, производства «Bio-Rad», США, или аналогичное	
Натрий додецилсульфат (ДСН), производства «Bio-Rad», США, или аналогичный	
Глицерин для электрофореза 99,0 %-й, производства «Sigma», Германия, или аналогичный	
Глицин 98,5 %-й, производства «Merck», Германия, или аналогичный	
Агароза, производства «Sigma», США, или аналогичная	
Бромфенол синий натриевая соль для электрофореза, производства «AppliChem», или аналогичный	
Стандартные образцы белков известных молекулярных масс, производства «Bio-Rad», США, или аналогичные	
Бета-меркаптоэтанол, производства «Merck», Германия, или аналогичный	
Спирт этиловый 96,0 %-й	ГОСТ Р 51652—2000
Ледяная уксусная кислота, хч	ГОСТ 61—75
Серебро азотно-кислое, хч	ГОСТ 1277—75
Тиосульфат натрия	ТУ 2642-001-49415344—99 или аналогичный
Натрий углекислый безводный, чда	ГОСТ 83—79
Реагент «Sensitizer concentrate SC», производства «Bio-Rad», США, или аналогичный	

Реагент «Background reducer concentrate BRC», производства «Bio-Rad», США, или аналогичный

Реагент «Silver reagent concentrate SRC», производства «Bio-Rad», США, или аналогичный

Реагент «Developer buffer concentrate DBC», производства «Bio-Rad», США, или аналогичный

Реагент «Image developer concentrate IDC» производства «Bio-Rad», США, или аналогичный

Ацетонитрил для хроматографии, производства «J.T.Baker», или аналогичный

Гидрокарбонат аммония, производства «Sigma», Мексика, или аналогичный

Лиофилизированный свиной трипсин, производства «Sigma», США, или аналогичный

Трифторуксусная кислота (ТФУ), производства «Sigma», Германия, или аналогичная

Вода для хроматографии, производства «LiChrosolv®, Merck», Германия, или аналогичная

2,5-дигидроксибензойная кислота

5.2. Приготовление стандартных и рабочих растворов

1) 6М HCl.

В мерную колбу на 100 см³ вносят 60—70 см³ деионизованной воды, отмеряют цилиндром 18,45 см³ концентрированной HCl. Раствор перемешивают, охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки.

2) 0,154М KCl в 0,05М Трис-HCl буфере pH 7,4.

Взвешивают навески Трис массой 6,0550 г и KCl массой 11,50 г на аналитических весах, переносят в мерный стакан на 1 000 см³, растворяют на магнитной мешалке в 900 см³ деионизованной воды. К раствору добавляют концентрированную HCl под контро-

лем pH-метра до достижения величины pH 7,4, количественно переносят в мерную колбу на 1 000 см³ и доводят деионизованной водой до метки.

3) 1,15 % раствор KCl.

Навеску KCl массой 11,50 г, переносят в мерную колбу на 1 000 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки.

4) 0,05М Трис-HCl буфер pH 7,4.

Навеску Трис массой 6,0550 г, переносят в мерный стакан на 1 000 см³, растворяют на магнитной мешалке в 900 см³ деионизованной воды. К раствору добавляют концентрированную HCl под контролем pH-метра до достижения величины pH 7,4, количественно переносят в мерную колбу на 1 000 см³ и доводят деионизованной водой до метки.

5) Стандартные растворы белка для определения содержания общего белка в образцах.

Стандартный раствор 4 (1,5 мг/см³): навеску БСА массой 0,0090 г переносят в пробирку на 15 см³, растворяют в 6 см³ 0,05М Трис/HCl буфера с pH 7,4.

Стандартный раствор 3 (1 мг/см³): в пробирку эппендорф вносят 600 мм³ стандартного раствора 4 (1,5 мг/см³), растворяют в 300 мм³ 0,05М Трис/HCl буфера с pH 7,4.

Стандартный раствор 2 (0,5 мг/см³): в пробирку эппендорф вносят 500 мм³ стандартного раствора 3 (1 мг/см³), растворяют в 500 мм³ 0,05М Трис/HCl буфере с pH 7,4.

Стандартный раствор 1 (0,25 мг/см³): в пробирку эппендорф вносят 500 мм³ стандартного раствора 2 (0,5 мг/см³), растворяют в 500 мм³ 0,05М Трис/HCl буфере с pH 7,4.

6) Буфер для образца.

Навеску мочевины массой 4,8 г, тиомочевины массой 1,52 г, ДТТ массой 0,12 г, CHAPS массой 0,5 г, NP40 объёмом 1 см³ переносят в мерную колбу на 10 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки. Хранить при температуре 4 °С.

7) Акриламид/Бисакриламид 30,0 %.

Навески акриламида массой 29,2 г и бисАА массой 0,8 г переносят в мерную колбу на 100 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки. Хранить при температуре 4 °С в темноте не более 30 дней.

8) 10,0 % ПСА.

Навеску 100 мг ПСА переносят в пробирку эппендорф на 1,5 см³, растворяют в 1 см³ деионизованной воды. Готовят перед работой. Не хранить!

9) 50 мМ NaOH.

Навеску NaOH массой 2 г переносят в мерную колбу на 1 000 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки.

10) 20 мМ H_3PO_4.

Аликвоту H_3PO_4 объёмом 2,76 см³ переносят в мерную колбу на 1 000 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки.

11) 0,5М Трис-HCl, pH 6,8.

Навеску Трис массой 6,0 г переносят в мерный стакан на 100 см³, растворяют на магнитной мешалке в 60 см³ деионизованной воды. К раствору добавляют 6Н HCl на деионизованной воде под контролем pH-метра до достижения величины pH 6,8, количественно переносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят деионизованной водой до метки. Хранить при 4 °С в темноте не более 30 дней.

12) CHAPS для приготовления геля для трубочек.

Взвешивают в пробирке «эппендорф» 45 мг CHAPS на аналитических весах, добавляют 135 мм³ воды для хроматографии и NP40 15 мм³. Оставляют до полного растворения NP40 (около 1 или 1,5 ч). *Готовят перед использованием!*

13) Уравновешивающий буфер.

Навески мочевины массой 90 г и ДСН массой 5 г переносят в мерную колбу на 250 см³, вносят 75 см³ глицерина и 31,25 см³ 0,5М Трис/HCl pH 6,8, растворяют и доводят деионизованной водой до метки. Хранить при 4 °С.

14) 2М Дитиотрейтол (ДТТ).

Навеску дитиотрейтола массой 3,0 г переносят в пробирку на 15,0 см³ и растворяют в 10,0 см³ деионизованной воды. Хранить в морозильной камере при –20 °С.

Непосредственно перед извлечением трубочек внести по 5 см³ уравновешивающего буфера в лунку штатива и добавить 50 м³ 2М ДТТ.

15) 1,5М Трис-HCl, pH 8,8.

Навеску Трис массой 36,3 г переносят в мерную колбу на 200,0 см³, растворяют на магнитной мешалке в 160 см³ деионизованной воды. К раствору добавляют 6Н HCl на деионизованной воде под контролем pH-метра до достижения величины pH 8,8, количественно переносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят деионизованной водой до метки. Хранить при 4 °С в темноте не более 30 дней.

16) 10 %-й ДСН.

Навеску 1,0 г ДСН переносят в пробирку на 15 см³ и растворяют в 10 см³ деионизованной воды. Хранить при комнатной температуре.

17) Агароза, 1 %-я.

Навеску агарозы массой 1,0 г переносят в мерную колбу на 100,0 см³, доводят деионизованной водой до метки, нагревают при

37 °С на водяной бане до полного растворения агарозы. Для окраски раствора (ярко-синий цвет) добавляют на кончике шпателя бромфенол синий. Хранить при 4 °С в темноте.

18) Буфер для стандартных образцов.

Стоковый буфер: в пробирку на 15 см³ вносят деионизованную воду в объеме 5,3, 1,2 см³ 0,5М Трис/HCl (pH 6,8), 1,0 см³ глицерина, 2,0 см³ 10 %-го ДСН. Общий объем 9,5 см³. Для окраски раствора (ярко-синий цвет) добавляют на кончике шпателя бромфеноловый синий. Хранить при комнатной температуре.

Непосредственно перед разведением стандартных образцов полученный стоковый буфер в объеме 95 мм³ смешивают с 5 мм³ бета-меркаптоэтанола.

19) Электродный буфер, pH 8,3 (10-кратный).

Навески Трис массой 15,15 г, ДСН массой 5 г, 72 г глицина переносят в мерную колбу на 500 см³, растворяют компоненты и доводят деионизованной водой до метки. Не корректируют pH ни кислотой, ни основанием. Хранить при 4 °С в темноте (30 дней). Если при хранении происходит осаждение ДСН, буфер достают из холодильника и нагревают до комнатной температуры. Хранить при 4 °С в темноте не более 30 дней.

20) Фиксирующий раствор.

В мерную колбу на 500 см³ вносят 100 см³ этанола, 50 см³ ледяной уксусной кислоты и доводят деионизованной водой до метки. Хранить под тягой.

21) Раствор для увеличения чувствительности (0,03 %-й р-р тиосульфата натрия). Навеску тиосульфата натрия массой 150 мг переносят в мерную колбу на 500 см³ и доводят деионизованной водой до метки.

22) Раствор для окраски. Навеску нитрата серебра массой 0,5 г переносят в мерную колбу на 500 см³, растворяют в 300—400 см³ деионизованной воды, вносят 0,5 см³ формалина (37 %) и доводят водой до метки.

23) Раствор для проявки. Навеску натрия углекислого массой 20 г переносят в мерную колбу на 500 см³ и растворяют в 300—400 см³ деионизованной воды, вносят 10 см³ 0,03 %-го раствора тиосульфата натрия, 0,5 см³ формалина (37 %) и доводят деионизованной водой до метки.

24) Раствор для остановки. В мерную колбу на 500 см³ вносят 25 см³ ледяной уксусной кислоты и доводят деионизованной водой до метки.

25) Раствор для сенсибилизации. В мерную колбу на 500 см³ вносят 50 см³ реагента SC, 5 см³ BRC, 150 см³ этанола и доводят деионизованной водой до метки. *Готовят перед применением!*

26) Раствор для окраски. В мерную колбу на 500 см³ вносят 10 см³ SRC, доводят деионизованной водой до метки. *Готовят перед применением!*

27) Раствор для проявки. В мерную колбу на 500 см³ вносят 50 см³ DBC, 100 мм³ IDC, 25 мм³ BRC доводят деионизованной водой до метки. *Готовят перед применением!*

28) 1мМ HCl. В мерную колбу на 100 см³ вносят 70—80 см³ деионизованной воды, отмеряют цилиндром 7,88 мм³ концентрированной HCl. Раствор перемешивают, охлаждают до комнатной температуры и доводят водой до метки.

29) 9 %-й ацетонитрил. В мерную колбу на 100 см³ вносят 9 см³ ацетонитрила, доводят деионизованной водой до метки.

30) 40мМ гидрокарбонат аммония в 9 %-м ацетонитриле. Навеску 31,6 мг NH_4HCO_3 переносят в мерную колбу на 10 см³, растворяют и доводят 9 %-м раствором ацетонитрила до метки.

31) 0,1 %-й раствор ТФУ. Навеску 0,1 г ТФУ, взятую на аналитических весах, переносят в мерную колбу на 100 см³, растворяют и доводят деионизованной водой до метки.

32) 20 %-й ацетонитрил. В мерную колбу на 100 см³ вносят 20 см³ ацетонитрила, доводят деионизованной водой до метки.

33) 2,5-дигидроксибензойная кислота (20 мг/см³), содержащая 20 %-й ацетонитрил и 0,1 %-ю ТФУ. Навеску 0,1 г ТФУ, взятую на аналитических весах, переносят в мерную колбу на 100 см³, растворяют и доводят 20 %-м ацетонитрилом до метки. К навеске 20 мг 2,5-дигидроксибензойной кислоты, взятой на аналитических весах, добавляют 1 см³ раствора 20 %-го ацетонитрила с 0,1 %-й ТФУ.

5.3. Подготовка образцов для исследования (на примере микросомальной фракции гепатоцитов печени крыс и мышей)

5.3.1. Выделение микросомальной фракции

За 12 ч до забоя у животных отбирают всю пищу. Умерщвление животных проводят одним из способов согласно МУ 1.2.2869—11 «Порядок оценки токсического действия наноматериалов на лабораторных животных». При эвтаназии животных исключается использование анестезирующих и наркотических препаратов, за исключением углекислого газа (CO_2). Для исследования отбирают печень. Печень немедленно промывают и перфузируют охлажденным до 0—2 °С 1,15 %-м раствором KCl. Все последующие процедуры проводят при температуре не выше 4 °С в холодной комнате. Печень просушивают фильтровальной бумагой, измельчают ножницами и продавливают сквозь перфорированную фильеру из нержавеющей стали с отверстиями диаметром ~ 0,8 мм. Масса полу-

ченной при этом навески составляет 2,0 г. Помещают образец и жидкую среду (8 см³ 0,154 М KCl на 0,05М Трис/HCl буфере pH 7,4) при соотношении 1 : 4 (масса : объем) в стеклянную ампулу микроразмельчителя тканей, снабженного тефлоновым пестиком, и ставят ампулу в контейнер. Гомогенизируют в течение 90 с при 1 200 об./мин. Жидкая среда в процессе размельчения тканей должна охлаждаться, поэтому пространство между стенками контейнера и ампулой гомогенизатора заполняют льдом. В центрифужные пробирки отбирают 5,5 см³ полученного гомогената. Пробирки уравновешивают на аналитических весах путем добавления по каплям 0,154М KCl в 0,05М Трис/HCl буфере pH 7,4.

Гомогенаты центрифугируют в течение 15 мин на ультрацентрифуге при 12 000 об./мин (10 000 g). Полученный супернатант отбирают и уравновешивают в новых пробирках с перфорированной крышкой, затем подвергают центрифугированию при 38 000 об./мин (105 000 g) в течение 60 мин. Отделяют надосадочную жидкость (цитозольная фракция), осадок (микросомальная фракция) ресуспендируют в 2,2 см³ 0,05М Трис/HCl буфере с pH 7,4 в размельчителе тканей в течение 60 с при 900 об./мин. Полученную микросомальную фракцию хранят до анализа в морозильной камере при температуре не выше –20 °С в течение не более недели или не выше –70 °С длительно (6 месяцев и более).

5.3.2. Определение общего белка в образце

Для того, чтобы точно определить количество образца микросом печени или другого биосубстрата, подвергаемого фракционированию методом двумерного электрофореза, в образце проводят количественное определение общего белка спектрофотометрическим методом с помощью реактива Бредфорда. Для этого готовят стандартные растворы белка для определения содержания общего белка в образцах БСА (бычий сывороточный альбумин) как указано в п. 5.2. Реагент Брэдфорда достают из холодильника за 1 ч до проведения анализа. Полученные образцы биосубстратов размораживают (15 мин) и центрифугируют в течение 5 мин при скорости 3 500 об./мин. В лунки полистирольной планшеты вносят по 5 мм³ образца. Отдельно вносят в лунки планшеты по 5 мм³ стандартных растворов и «слепой» образец (бланк) (0,05М Трис/HCl). Добавляют в каждую лунку по 250 мм³ реагента Бредфорда. Оставляют на 5—45 мин. Измеряют оптическую плотность при 590—620 нм на иммуноферментном планшетном фотометре. На основе построенного по БСА калибровочного графика оценивают содержание белка в образцах.

5.4. Методика проведения двумерного электрофореза

Работу проводят в чистом помещении. Поверхность лабораторных столов моют и протирают спиртом. Все манипуляции при проведении двумерного электрофореза осуществляют в халате, перчатках, шапочке, сменной обуви.

5.4.1. Первое направление двумерного электрофореза

Вариант 1. Изоэлектрическое фокусирование на трубочках

Подготовка трубочек: важно обеспечить чистоту внутренней поверхности стеклянных трубочек. Их тщательно споласкивают проточной водой, промывают деионизированной водой, хорошо просушивают. Внутри трубочек не должно оставаться капель, пятен и ворсинок.

Для заливки и полимеризации геля от края трубочек отмечают 3,5 см, а нижние торцы трубочек заклеивают парафильмом и устанавливают их строго вертикально в штатив, предварительно надев уплотнитель.

Согласно п. 5.2 готовят раствор CHAPS непосредственно перед применением. Взвешивают на аналитических весах в пробирке эппендорф 1,0 г мочевины, добавляют 700 мм³ воды для хроматографии и 260 мм³ стокового раствора АА/бисАА (30 %). Смесь подогревают до температуры 25—30 °С до растворения мочевины. Добавляют по 30 мм³ амфолинов pH 3—10 и pH 3—5, и 40 мм³ амфолина pH 5—8, и 120 мм³ приготовленного раствора CHAPS. Полученный раствор дегазируют с использованием вакуумного мембранного насоса. После дегазации к раствору последовательно добавляют 4 мм³ 10 % ПСА и 2 мм³ TEMED *(качать, не взбалтывать!)*.

Примечание. Наибольшую опасность для нормального протекания полимеризации акриламида представляет растворенный в воде кислород, молекула которого является бирадикалом и поэтому способна оборвать цепную реакцию свободнорадикальной полимеризации акриламида. Поэтому для удаления из смеси растворов растворенного кислорода необходима дегазация. Ее следует вести достаточно энергично и с перемешиванием так, чтобы жидкость при пониженном давлении закипела, но как только интенсивное выделение пузырей газа закончится, дегазацию следует прекратить, не допуская заметное испарение воды. Обычно эта процедура занимает несколько минут при комнатной температуре.

С помощью шприца с навинчивающейся иглой с тупым концом заполняют трубочки гелем. Иглу опускают в трубку и сначала интенсивно, потом плавно выдавливают раствор геля в трубочку так, чтобы верхний участок трубочки, предназначенный для внесения препарата, оставался сухим. Необходимо следить за тем, чтобы край иглы всегда находился ниже уровня геля. Штатив с заполненными трубочками следует несколько раз слегка ударить об

стол для удаления пузырьков воздуха. Оставить на 1 ч для полимеризации.

Примечание. Следует помнить о необходимости промывки иглы для внесения раствора геля сразу после окончания её использования, до того как в ней произойдет полимеризация акриламида).

Биологические образцы размораживают в течение 15 мин и центрифугируют при 3 500 об./мин в течение 10 мин, после чего определяют в них общее содержание белка, как указано в п. 5.3.2. После этого разводят очищенные образцы в «Буфере образца» (п. 5.2) до концентрации белка 1 мг/см^3.

Примечание. При проведении электрофореза надо быть уверенным в том, что исходный биологический образец свободен от взвешенных частиц (пыли или осадка), которые могут собираться на торце геля и нарушать однородность тока по его сечению, что повлечет за собой деформацию разделяющихся зон.

Разведенные образцы центрифугируют в течение 5 мин при скорости 3 500 об./мин.

После полимеризации геля в трубочках шприцем отбирают отслоившуюся воду с поверхности геля. Вносят 20 мм^3 образца, аккуратно наслаивают на гель. Следят за тем, чтобы не образовались пузырьки воздуха. При появлении пузырьков воздуха их необходимо удалить, используя иглу.

На внесенный образец наслаивают 50 мМ NaOH до полного заполнения трубочки. При этом не следует касаться иглой образца, щелочь должна наслаиваться на поверхность образца.

Перед установкой готовой трубочки с гелем в прибор, аккуратно снимают парафильм с нижнего конца трубочки и «подвешивают» на него каплю 20 мМ H_3PO_4 с помощью пипетки.

Собирают рамку. Для этого следует «утопить» трубочки в резиновые заглушки так, чтобы от края заглушки осталось не более 0,5 см. Если используются не все трубочки, то на их место ставят заглушки, не пропускающие воду. В верхний резервуар заливают буфер (50 мМ NaOH) и проверяют тем самым рамку на герметичность.

В нижний резервуар ячейки вносят 20 мМ H_3PO_4, собирают ячейку согласно инструкции к прибору. Пример общего вида ячейки, готовой к проведению изоэлектрического фокусирования, представлен на рис. 1. При сборке ячейки внимательно контролируют, чтобы нижние концы трубочек были погружены в буфер.

Изоэлектрическую фокусировку осуществляют с помощью универсального источника питания в следующем режиме:

- 100 В – 200 В – 300 В – 400 В – 500 В – 600 В – по 45 мин;
- 700 В – 10 ч;
- 900 В – 1—2 ч.

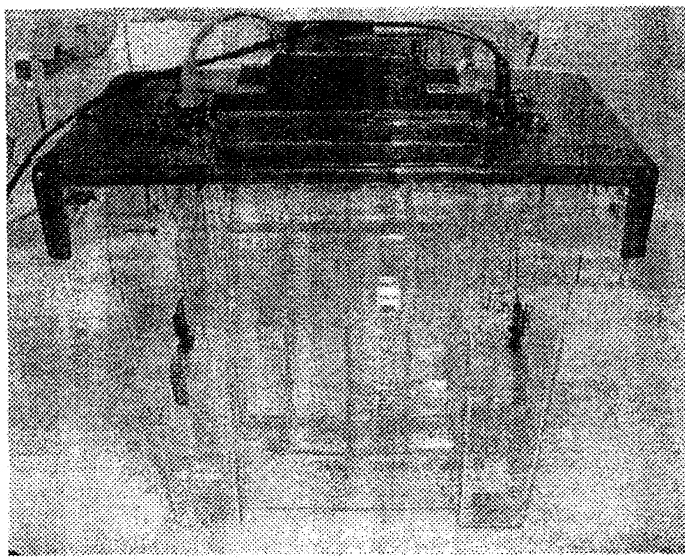

Рис. 1. Общий вид ячейки
для изоэлектрического фокусирования (Protean II xi 2-D) (пример)

По окончании электрофореза гель из трубочек извлекают в лунки пластикового штатива, в которые заранее вносят уравновешивающий буфер. В большинстве случаев извлечь гель из трубки легко с помощью длинной и затупленной иглы шприца, которую вводят с одного из концов трубки и круговыми движениями постепенно отслаивают гель от ее стенок. Если необходимо, такую операцию повторяют и с другого конца. Через иглу при этом поступает уравновешивающий буфер, который предварительно набирают в шприц.

Вариант 2. Изоэлектрическое фокусирование на стрипах

За 10 мин до нанесения образца, достают стрипы из морозильного отделения холодильника и размораживают. Разводят очищенные центрифугированием (см. выше) биологические образцы в «Буфере образца» до концентрации белка не более 1 мг/см^3. Конечный объем пробы должен быть не менее 300 мм^3 (для стрипов длиной 17 см).

Повторно центрифугируют разведенные образцы 5 мин при 3 500 об./мин.

Трей протирают спиртом. В лунки трея вносят образцы (до 12 образцов). Образцы вносят так, чтобы весь образец уместился между электродами в лунке (около 1 см от каждого края лунки). Образец переносят количественно.

С помощью пинцета берут размороженный стрип, снимают наклейку, кладут гелем вниз в трей на образец («+» к «+»). Очень важно проверить каждый образец на отсутствие пузырьков под стрипом (если имеются, аккуратно удаляют наконечником).

Поверх стрипа вносят минеральное масло так, чтобы оно покрыло полностью всю поверхность стрипа.

Закрывают трей крышкой, проверяют полярность крышки и электродов («+» к «+», «–» к «–»). Помещают в прибор для изоэлектрического фокусирования (используют PROTEAN IEF CELL или аналог) и запускают следующую программу:

«PROTEAN IEF CELL
Firmware Version: 1.40
Method «Name»
Voltage slop – LINEAR
Gel length – 17 cm
REGEDRATATION – active @ 50V
Rehyde time: 12 : 00
Run Temp: 20 °C
Without pause after rehydratation
S1 – 250 V 00 : 15
S2 – 10 000 V 2 : 30
S3 – 10 000 V – 40 000VHOURS
S4 – 500V/HOLD
LIMIT/Gel: 50μA»

Общее время изоэлектрического фокусирования составляет 17—19 ч.

После окончания изоэлектрофокусирования стрип достают пинцетом за «щелочной» конец из лунки трея. Держа пинцетом, аккуратно отмывают стрипы в цилиндре с деионизованной водой от минерального масла.

5.4.2. Второе направление двумерного электрофореза

При подготовке стекол для электрофореза весьма существенно обеспечить чистоту поверхности стеклянных форм для геля. Их тщательно моют лабораторными детергентами и обильно ополаскивают проточной водой, далее промывают стекла деионизированной водой. По хорошо промытой стеклянной поверхности вода должна стекать, не оставляя капель. Затем стекла протирают спиртом (стекла должны быть без пятен и ворсинок).

В камеру Protean II xi Multi-Gel Casting Chamber кладут специальную прокладку (поставляется с камерой), затем большое стекло, спейсер и малое стекло и снова прокладку. Обычно в камеру помещается 9—10 пар стекол. Накрывают крышкой, проверяют на отсутствие зазоров и плотно закручивают винтами.

Готовят 12,5 %-й раствор геля (для 6 гелей): в стеклянный стакан на 500 см³ вносят 96 см³ АА/бисАА 30 %, 60 см³ 1,5М Трис/HCl pH = 8,8, 80,4 см³ деионизованной воды, 3,6 см³ 10 %-го ДСН. Полученный раствор дегазируют в колбе Бунзена, присоединенной к вакуумному насосу. После дегазации к раствору добавляют 1,2 см³ 10 %-го ПСА и 120,0 мм³ TEMED, перемешивают и заливают в камеру Protean II xi Multi-Gel Casting Chamber с помощью перистальтического насоса. При правильном выборе концентраций персульфата и TEMED полимеризация занимает 40—60 мин. Ее следует вести вдали от яркого источника света. Для заливки 6 гелей достаточно 235 см³ гелевого раствора.

Кислород воздуха в контакте с раствором мономеров может помешать полимеризации, поэтому на поверхность раствора осторожно наслаивают по 1 см³ воды. Наслаивать следует по стенке формы с помощью шприца с иглой. Им же удобно отобрать воду после окончания полимеризации геля. Вначале граница между гелем и водой исчезает, но затем вновь появляется, что указывает на окончание процесса полимеризации.

Примечание. Следует помнить о необходимости промывки шлангов перистальтического насоса деионизованной водой сразу после окончания их использования, до того как в них произойдет полимеризация акриламида.

После полимеризации геля, гелевые сэндвичи вынимают из камеры и, придерживая руками, помещают в держатели. Проверяют, чтобы стекла плотно соединились с держателями (рис. 2).

Гелевые трубочки (или стрипы) после 1-го направления изоэлектрофокусирования выдерживают в уравновешивающем буфере в течение 30—40 мин в планшете при медленном покачивании на перемешивающем устройстве ПЭ-6410М. При этом стрипы должны лежать гелевой стороной вверх.

При использовании трубочек делают из парафильма лодочку. Аккуратно наконечником на 20 мм³ перекладывают на парафильм гелевую трубочку из уравновешивающего буфера. Разравнивают трубочку от «+» к «—» («—» — темный конец). Скальпелем отрезают по 1—3 мм с каждого конца геля. При использовании стрипов пинцетом достают стрип за «щелочной» конец из уравновешивающего буфера.

Шприцем отбирают воду из гелевого сэндвича. Укладывают сэндвич горизонтально на стол и переносят трубочку на большое

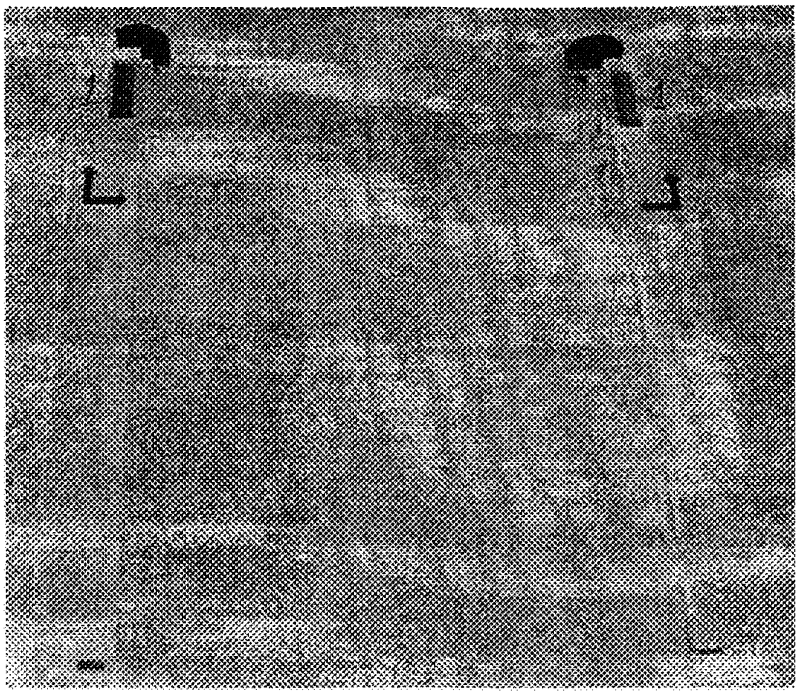

Рис. 2. Установление стекол с гелем
для 2-го направления электрофореза в держателе (пример)

стекло. Если используется стрип, то его укладывают гелем вверх на большое стекло. Прижимают щелочной конец трубочки (или стрипа) к гелю, наклонив сэндвич вправо. При необходимости добавляют сверху гелевой трубки (или стрипа) несколько капель уравновешивающего буфера для облегчения укладки на гель.

Аккуратно поглаживая гелевую трубочку (или стрип) и наклонив сэндвич влево, опускают трубочку на гель. Очень важно, чтобы не возникало пузырьков воздуха между трубочкой (стрипом) и гелевым сэндвичем. С левого конца трубочки (стрипа) между стеклами вставляют гребенку на 1 лунку для добавления стандартных образцов молекулярных масс.

Сверху сэндвич заливают 1 %-й агарозой, подкрашенной бромфеноловым синим. Наконечник пипетки не следует подносить вплотную к поверхности геля; препарат должен выливаться с высоты 2—3 мм над гелем и свободно растекаться по его поверхности.

Примечание. Краситель (бромфеноловый синий) вносят в 1 %-ю агарозу для наблюдения за ходом электрофореза. В условиях электрофореза данный краситель мигрирует в том же направлении, что и фракционируемые белки. Он не связывается

с белками, а скорость его продвижения по гелю заведомо больше, чем у наиболее быстро мигрирующего белка.

После застывания агарозы, гребенку вытаскивают и вносят в образовавшуюся на её месте лунку 2 мм³ смеси стандартных образцов белков известных молекулярных масс. Предварительно стандартные образцы разводят в буфере «для стандартных образцов»: к 76 мм³ буфера добавляют 4 мм³ раствора стандартов. Греют 5 мин при 95 °С на водяной бане.

Собирают форму из готовых сендвичей. Между стеклом и прокладкой заливают 3—5 см³ агарозы. Агароза в контакте с прокладками быстро застынет и заметного ее вытекания не произойдет. Для надежности можно сначала залить небольшой слой агарозы и дать ей застыть, а потом залить весь ее объем.

Десятикратный электродный буфер разводят деионизованной водой в соотношении 1 : 9 (для 6 гелей необходимо 5 дм³ разведенного электродного буфера). Верхнюю часть формы заливают разведенным буфером и проверяют на отсутствие течи.

В ячейку Protean II xi Multi-Cell (рис. 3) заливают 4 дм³ разведенного электродного буфера. После этого устанавливают вертикально собранные формы. Необходимо убедиться в том, что нижний конец геля опущен в электродный буфер и на границе гель–буфер отсутствуют пузырьки воздуха. Электрофорез проводят при водном охлаждении (10 °С). Для этого форму подсоединя-

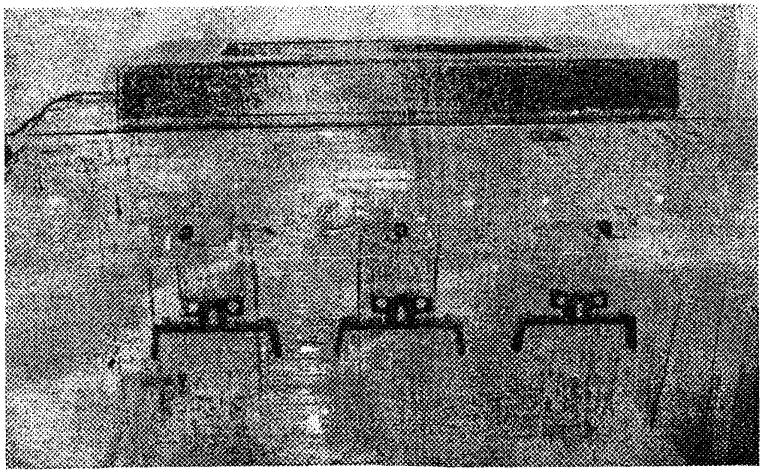

Рис. 3. Ячейка (Protean II xi Multi-Cell)
в сборе для второго направления ЭФ в ПААГ с ДСН (пример)

ют к шлангам, подключенным к водопроводу или к циркуляторному водяному термостату с охлаждением. При этом в каналах формы циркулирует холодная водопроводная вода.

Во избежание подсыхания геля прибор во время работы закрывают прозрачной крышкой, которую иногда называют антиконденсационной. Она предохраняет гель в случае существенного охлаждения от конденсации на его поверхности влаги из окружающего воздуха. Чтобы сама крышка изнутри не запотевала за счет испаряющейся влаги, особенно в случае их перегрева, по периметру крышки (у ее краев) с внутренней стороны проходит трубка с охлаждающей водой. Пары влаги конденсируются на трубке, оставляя крышку прозрачной.

С помощью универсального источника питания (PowerPac™ Universal или аналог) запускают программу в следующем режиме:

- по 20 мА на стекло – 15—20 мин;
- по 40 мА на стекло – до 5 ч.

Резервуар электрофоретической ячейки изготовлен из прозрачного пластика, что позволяет следить за продвижением фронта красителя в процессе электрофореза. После того, как фронт красителя бромфенолового синего достигает конца гелевого сэндвича, электрофорез останавливают. Вертикальное расположение стекол имеет то преимущество, что препарат, наносимый на гель сверху, при любом его объеме равномерно покрывает всю рабочую поверхность геля.

После электрофореза аккуратно достают и затем разбирают формы. Гели из сэндвичей извлекают с помощью пластиковых лопаток и помечают в правом нижнем углу пластиковым наконечником. Сразу после этого гели фиксируют в фиксирующем растворе и подвергают окрашиванию белковых пятен по одной из возможных методик.

5.4.3. Окраска гелей

Вариант 1. Окраска гелей серебром с тиосульфатом натрия.

Фиксацию гелей проводят в фиксирующем растворе в течение 1 ч или оставляют на ночь. По окончании фиксации раствор удаляют, а гели отмывают деионизованной водой 3 раза по 15 мин.

Далее гели обрабатывают раствором для увеличения чувствительности в течение 2 мин. Затем отмывают в деионизованной воде – 3 раза по 10 мин.

Окрашивание зон проводят путем вымачивания геля в растворе для окраски в течение 10—15 мин. После окраски излишки красителя удаляют: гели отмывают деионизованной водой – 2—3 раза по 30 с.

Проявку гелей проводят под визуальным контролем раствором для проявки до отчетливого появления мелких пятен белков (миноров). При этом не следует передерживать гель в растворе во избежание окрашивания промежутков геля между белковыми пятнами (фона).

Реакцию останавливают путем добавления раствора для остановки. Гели вымачивают в нем в течение 15 мин, после раствор удаляют и отмывают гели деионизованной водой в течение 15 мин.

Вариант 2. Окраска гелей с использованием стандартных растворов производства «Bio-Rad». Последовательность операций при данном способе приведена в табл. 1.

5.4.4. Учет результатов

Окрашенные гели сканируют на денситометре. Денситограммы гелей сохраняют в электронном виде на жестком диске компьютера в специальном формате программного обеспечения к прибору с последующим импортом в стандартный цифровой формат jpeg или tiff (8-битный).

Таблица 1

Окрашивание гелей с помощью стандартных реактивов производства «Bio-Rad»

Процесс	Время
Фиксация (раствор для фиксации)	Не менее 1 ч, лучше – в течение ночи
Сенсибилизация (раствор для сенсибилизации производства «Bio-Rad»)	30 мин
Отмывка водой	3 раза по 10 мин
Окраска (раствор для окраски производства «Bio-Rad»)	30 мин
Промывка водой	1 раз по 10 мин
Проявка (раствор для проявки производства «Bio-Rad»)	10—30 мин (при визуальном контроле до отчетливого появления мелких пятен белков (миноров), при этом следует не передержать гель в растворе для проявки, чтобы несильно окрасился фон)
Остановка (раствор для остановки)	10 мин
Отмывка водой	10 мин

5.4.5. Обработка данных

Обработку изображений гелей (денситограмм) проводят в программе PDQuest. Каждая точка на изображении геля соответствует отдельному белку с характерной для него молекулярной массой и изоэлектрической точкой. Все изображения гелей сравниваются между собой наложением денситограмм друг на друга.

По результатам наложения составляется общий мастер гель (рис. 4), на который наносят пятна различной интенсивности со всех анализируемых гелей, из которых 9 пятен – стандарты молекулярных масс белков (табл. 2). После обработки выявляют характерные пятна, которые появляются или исчезают при воздействии на изучаемый биологический объект наноматериала по сравнению с контролем.

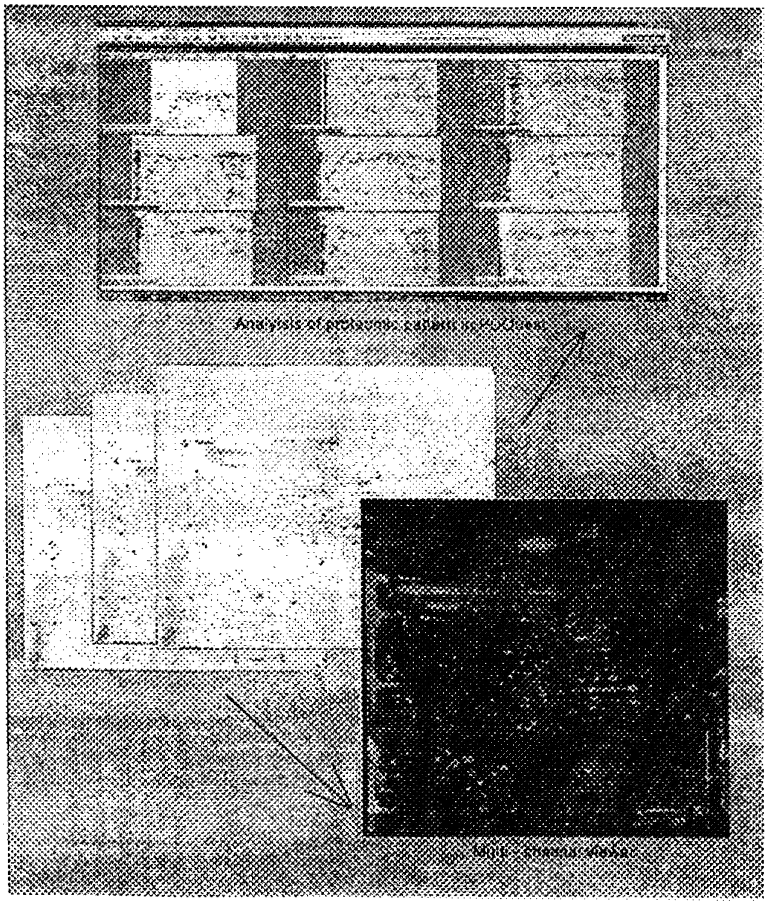

Рис. 4. Мастер гель (пример). Сканирование гелей на денситометре GS800 и наложение изображений в программе PDQuest

Таблица 2

Пример применяемого набора стандартных образцов молекулярных масс

Белок	Молекулярная масса, кД
1	2
Миозин	200,000
β-галактозидаза	116,250
Фосфорилаза-b	97,400
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	66,200
Овальбумин куриного яйца	45,000
Карбоангидраза	31,000
Ингибитор трипсина Кунитца из сои	21,500
Лизоцим куриного яйца	14,400
Апротинин	6,500

5.4.6. Идентификация белковых пятен

Идентификацию характерных пятен белков проводят с помощью масс-спектрометрии на время-пролетном масс-спектрометре. Предварительно выбранные пятна вырезают из геля и проводят трипсинолиз.

Используют несиликонизированные пробирки для ПЦР (200 мм³). Кусочки геля диаметром 1,5 мм вырезают в ламинарном шкафу (в перчатках, в шапочке, в маске, на протертом спиртом столе) наконечником, обрезанным бритвой. Предварительно набирают в наконечник деионизованную воду, чтобы можно было вытолкнуть гель. Инкубируют в воде 15 мин при комнатной температуре, чтобы удалить фиксирующий раствор. Супернатант сливают.

Добавляют в пробирки с гелем по 50—100 мм³ ацетонитрила. Инкубируют при комнатной температуре 20 мин. Ацетонитрил удаляют, следя, чтобы кусочки геля оставались на дне пробирки.

Пробирки с образцами с открытыми крышками ставят в термостат на 50 °С на 1 ч или в SpeedVac при комнатной температуре на 15 мин.

В пробирку с 1 мг лиофилизированного свиного трипсина на льду добавляют 1 см³ 1мМ HCl. Разделяют на аликвоты по 20 мм³

(хранить при –20 °С). К аликвоте добавляют 100 мм³ 1 мМ HCl. (Хранить при –20 °С в течение месяца). К 100 мм³ добавляют 900 мм³ 40 мМ гидрокарбоната аммония в 9 %-м ацетонитриле (хранится при –20 °С в течение месяца). Запасной раствор трипсина можно замораживать и размораживать 3 раза.

Переносят пробирки в ламинарный шкаф. К каждому кусочку геля добавляют 5—10 мм³ рабочего раствора трипсина в зависимости от размера кусочка. Пробирки сразу закрывают и помещают на лед.

Пробирки инкубируют на льду или при 4 °С от 45 мин до 1 ч для того, чтобы трипсин вошел в гель.

Для проведения реакции расщепления пробирки переносят в термостат и инкубируют в течение 30 мин при 50 °С или 16—18 ч при 37 °С.

Для экстракции пептидов в каждую пробирку добавляют по 20 мм³ свежеприготовленного 0,5 %-го (об/об) раствора ТФУ в воде. Инкубируют при комнатной температуре на устройстве перемешивающем ПЭ-6410М 30—40 мин, затем экстракт отбирают в чистые подписанные пробирки и направляют на исследование методом масс-спектрометрии.

5.4.7. Методика работы на масс-спектрометре MALDI

После трипсинолиза 0,2—1,0 мм³ раствора образца смешивают с таким же количеством раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/см³), содержащего 20 %-й ацетонитрил и 0,1 %-ю ТФУ, полученную смесь высушивают на воздухе, помещая на мишень AnchorChip™ (или аналогичную). (Примечание: AnchorChip – это мишени MALDI, содержащие гидрофильные пятна для образцов точно заданного диаметра (400 или 600 мкм) в строго определенных позициях, окруженные гидрофобным покрытием. Такое устройство мишеней позволяет готовить образцы на маленьких, точно определенных площадях из очень маленьких объемов.

MALDI-TOF PMF спектры получали в полностью автоматизированном режиме на масс-спектрометре.

Рекомендуемые технические характеристики масс-спектрометра (на примере Microflex MALDI TOF):

– лазер: азотный лазерный картридж MNL106, 337 нм;
– минимальное кол-во выстрелов: 6×10^7 выстрелов;
– лазерная частота повторсния: переменная от 1 до 60 Гц;
– лазерная энергия в импульсе: > 80 мкДж / имп;
– характеристики линейного TOF:
• ускорение ионов: до +20 / –20 кВ;
• эффективный курс полета: 105 см;
• разрешение пептидов: > 2 000 для бомбезина (m /z 1 619,8);

• разрешение белка: > 450 для белка с m /z 44613;

• разрешения в широком диапазоне масс, одновременно измеренные с техникой PAN ™:

› ≥ 400 для инсулина (m/z 5 734);

› ≥ 600 для миоглобина M2 + (m/z 8 476);

› ≥ 700 для цитохрома C (m/z 12 361);

› ≥ 800 для миоглобина (m/z 16 952);

• чувствительность: при 500 лазерных выстрелах 500 фмоль БСА (m/z 66 000) при соотношении сигнал/фон не менее 50 : 1;

• массовая точность (белковая смесь): не более 200 промилле с внешней калибровкой; не более 150 промилле с внутренней калибровкой;

• MALDI диапазон масс: до 300 000 m/z;

– характеристики отражательного TOF:

• эффективный курс полета: 196 см;

• разрешение: > 15 000 для соматостатина 28 (m/z 3 147,47) ;

• разрешения в широком диапазоне масс, одновременно измеренные с техникой PAN ™:

› ≥ 10 000 для соматостатина (m/z 3 147) ;

› ≥ 12 000 для АКТГ 18-39 (m/z 2 465) ;

› ≥ 10 000 для АКТГ 1-17 (m/z 2 093) ;

› ≥ 9 000 для бомбезин (m/z 1 619) ;

› ≥ 6 000 для ангиотензина II (m/z 1 046) ;

• чувствительность: 1 фмоль [Глу1]-фибринопептида B (m/z 1 570,7) при соотношении сигнал/фон не менее 10 : 1;

• массовая точность (пептидной смеси): < 75 частей на миллион с внешней калибровкой; < 15 частей на миллион с внутренней калибровкой;

– FAST / PSD-метод: ионный диапазон для выбора предшественника ионов имеет разрешение > 100;

– MS / MS: точность определения массы ионов фрагментов ангиотензина II составляет не более ± 0,4 Д;

– MS / MS чувствительность: 1 пмоль ангиотензина (m/z 1 046,54).

Идентификацию белков выполняют с помощью программного обеспечения MASCOT (gost.e-ecolog.ru). Полученные спектры анализируемых белков сравнивают с NCBI базой данных (gost.e-ecolog.ru). Критерием для идентификации является скор совпадения белкового масс-спектра не менее 80 %.

Приложение 1

Обозначения и сокращения

АА	акриламид
бисАА	NN-бис-метилен-акриламид
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	дитиотрейтол
ИЭТ	изоэлектрическая точка
об./мин	обороты в минуту
ПААГ	полиакриламидный гель
ПАВ	поверхностно-активное вещество
ПСА	персульфат аммония
Трис	трис-гидроксиметиламинометан
ТФУ	трифторуксусная кислота
BRC	концентрат раствора для подавления фона
CHAPS	3-[(3-холамидопропил)диметиламмонио]--1-пропансульфонат
DBC	концентрат обрабатывающего буфера
IDC	концентрат проявляющего реагента
MALDI	лазерная десорбция-ионизация на матрице
m/z	отношение массы к заряду
NP40	октилфеноксиполиэтоксиэтанол
SC	концентрат сенсибилизирующего раствора
SRC	концентрат серебряного реагента
TEMED	N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин
TOF	время-пролётный масс-анализатор

Приложение 2

Список рекомендуемой литературы

1. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.: ил. С. 3—29.

2. Кухта В.К., Морозкина Т.С., Олецкий Э.И., Таганович А.Д. Биологическая химия: Учебник /Под ред. А.Д. Тагановича. Минск: Асар, М.: Издательство БИНОМ, 2008. 688 с.: ил. С. 21—23.

3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. //Anal.Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.

4. Li L., Mu Q., Zhang B., Yan B. Analytical strategies for detecting nanoparticle-protein interactions //Analyst. 2010. Vol. 135. N 7. P. 1519—1530.

Оценка воздействия наноматериалов на протеомный профиль и биосинтетические процессы в тестах на лабораторных животных

Методические рекомендации
МР 1.2.0053—11

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 10.07.12

Формат 60×88/16 Печ. л. 2,75
Тираж 200 экз. Заказ 46

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер. д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru