

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 547.96; 577.11

№ госрегистрации 115011660024

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФАВ РАН,

член-корреспондент РАН,

 С.О.Бачурин

«25» июня 2015 г.



«МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЙ НА ПОЛИМЕРИЗАЦИЮ ТУБУЛИНА»

СТП-14.621.21.0008.01-2015

Ответственный исполнитель

Заведующий лабораторией,

к.б.н.



С.Г. Ключков

«25» июня 2015 г.

Черноголовка, Московская обл. 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1. Наименование методики измерений.....	3
2. Назначение методики измерений и область применения.....	3
3. Нормативные ссылки	3
4. Погрешность измерений	3
5. Требования к показателям точности измерений.	4
6. Условия измерений	4
7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для выделения микротубулярных белков из мозговой ткани грызунов (крыс и мышей).....	4
7.1.Реактивы	4
7.2. Материалы	4
7.3. Оборудование.....	4
8. Операции при выполнении методики выделения микротубулярных белков из мозговой ткани грызунов (крыс и мышей)	5
8.1. Получение цитозольной фракции мозга грызунов.....	5
8.2. Выделение тубулина и микротубулоассоциированных белков методом полимеризации-деполимеризации из цитозольной фракции мозга грызунов.....	6
9. Оценка влияния соединений на полимеризацию тубулина.....	7
9.1. Спектрофотометрическая регистрация кинетики процесса полимеризации тубулина.	7
9.2. Электронномикроскопический контроль структуры образующихся микротрубочек в результате процесса полимеризации тубулина.....	7
10. Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
11. Требования к квалификации операторов	8

1. Наименование методики измерений

Настоящий документ СТП-14.621.21.0008.02-2015 устанавливает методику «Методика оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина»

2. Назначение методики измерений и область применения

Настоящая методика описывает процедуру оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина.

Основными областями применения данной методики являются фармакологические науки - скрининговые исследования по влиянию потенциальных лекарственных препаратов на полимеризацию полученного препарата очищенных тубулина и микротубулоассоциированных белков позволяют выявить потенциальные лекарственные препараты для лечения заболеваний, связанных с нарушениями процессов сборки/разборки микротрубочек или для создания цитотоксичных противораковых препаратов.

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты и документы:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

СТП – 1.42.02 – 2002 Стандарты предприятия. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию, обозначению и порядку введения

ГОСТ 1.5—2001 Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Общие требования к построению, изложению, оформлению, содержанию и обозначению

ГОСТ Р ИСО 9000—2008 Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.

4. Погрешность измерений

Не устанавливаются.

5. Требования к показателям точности измерений.

Получение изображения формирующихся микротрубочек осуществляется на просвечивающем электронном микроскопе.

6. Условия измерений

Диапазон температуры окружающей среды для проведения измерений – 18-27°C.

Диапазон увеличения для получения электронных микрофотографий микротрубочек - от 4000 до 15000.

7. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, применяемым для выделения микротубулярных белков из мозговой ткани грызунов (крыс и мышей)

7.1. Реактивы

- Пентобарбитал натрия (Euthatal, США)
- Буфер выделения "А" (50мМ Tris-HCl, (pH=6,9), 2мМ EGTA.)
- Буфер полимеризации "Б" (50мМ Tris-HCl (pH=6,9), 0,2мМ GTP, 12мМ MgCl₂)
- Уранил ацетат дегидрат (Sigma, США)
- Глутаровый альдегид (Sigma, США)

7.2. Материалы

- Толстостенные центрифужные пробирки Special Beckman (BeckmanCoulter, США)
- Реагенты для определения белка - набор Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, США).
- планшет 96-луночный формата 1/2 площади
- медные сеточки для просвечивающей электронной микроскопии - шестигранная решетка 200.

7.3. Оборудование

- Гильотина для грызунов (OpenScience, Россия)



-Гомогенизатор Potter S (Sartorius AG, Германия)



- Центрифуга среднескоростная Avanti 25 (Beckman Coulter, США), ротор JA-14 с пробирками центрифужными и вкладышами к ним.

- Ультрацентрифуга Optima MAX XP (Beckman Coulter, США), ротор MLA-50 с пробирками центрифужными и вкладышами к ним.

- ТС-1/20 СПУ термостат суховоздушный СКТБ (Смоленск)

- планшетный ридер Victor или EnVision (Perkin Elmer, США)

8. Операции при выполнении методики выделения микротубулярных белков из мозговой ткани грызунов (крыс и мышей)

8.1. Получение цитозольной фракции мозга грызунов.

Для экспериментов могут быть использованы грызуны (крысы, мыши) различных линий, в том числе и генно-модифицированные животные . Животные при содержании должны иметь свободный доступ к корму и воде. Все манипуляции с животными должны быть проведены в строгом соответствии с решениями комиссии по Биоэтике ИФАВ РАН.

Декапитацию животных, наркотизированных пентобарбиталом натрия, проводят с помощью гильотины для грызунов (OpenScience, Россия).

Свежий мозг немедленно после получения помещают на лед и используют в экспериментах не более, чем через 20 минут после декапитации.. Мозг очищают от оболочек и кровеносных сосудов и промывают охлаждённым буфером “А”: 50мМ Tris-HCl, (pH=6,9), 2мМ EGTA. Выделенную мозговую ткань при охлаждении льдом гомогенизируют в том же буфере с использованием гомогенизатора Potter S (Sartorius). Полученный гомогенат центрифугируют при 10000g в течении 30 минут на центрифуге Avanti 25 (Beckman), ротор JA-14 для осаждения неразрушенных клеток. Полученный осадок отбрасывают, а супернатант центрифугируют снова при 100000g в течении 60 минут при 40С на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор MLA-50. Осадок опять отбрасывают, в супернатанте определяют концентрацию белка методом Бредфорда, используя набор фирмы Био-Рад (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

8.2. Выделение тубулина и микротубулоассоциированных белков методом полимеризации-деполимеризации из цитозольной фракции мозга грызунов.

Полученный супернатант, представляющий собой цитозольную фракцию, обогащенную микротубулярными белками, используют для дальнейшей очистки путём проведения цикла сборки-разборки микротрубочек. Для этого супернатант разбавляют буфером “А” до концентрации белка 30мг/мл и полученный белковый раствор разбавляют в 2 раза буфером “Б”: 50мМ Tris-HCl (pH=6,9), 0,2мМ GTP, 12мМ MgCl₂. Далее эта фракция помещается в водяную баню или термостат при 37⁰С на 6 часов для формирования микротрубочек. После окончания срока инкубации супернатант центрифугируют на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор MLA-50, 100000g, при 28⁰С в течении 1 часа для осаждения сформировавшихся микротрубочек. После откручивания супернатант отбрасывают, а осадок ресуспендируют в холодном буфере “А”, объём которого в 10 раз меньше, чем объём экстракта при инкубации в водяной бане. Полученную взвесь инкубируют при 2⁰С -4⁰С в течении 30-60 минут для деполимеризации полученных микротрубочек. Далее суспензия, содержащая не деполимеризовавшиеся микротрубочки и растворённые тубулин и микротубулоассоциированные белки центрифугируется на ультрацентрифуге Optima MAX XP (Beckman), ротор MLA-50, 100000g в течении 30 минут. В зависимости от задачи исследования и требованиям к чистоте полученного препарата тубулина с

микротубулоассоциированными белками операции сборки-разборки микротрубочек могут быть повторены ещё один-два раза, или нет. Осадок отбрасывают, в супернатанте измеряют концентрацию и состав растворённых тубулина и микротубулоассоциированных белков (определяют как общий белок, так и проводится электрофоретический анализ состава), и аликвоты замораживают при -80°C .

9. Оценка влияния соединений на полимеризацию тубулина.

9.1. Спектрофотометрическая регистрация кинетики процесса полимеризации тубулина.

Все измерения проводятся в трёх повторах. Полное время измерений зависит от концентрации исходного препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков и находится в диапазоне 1,5 - 6 часов.

При проведении эксперимента крайне важен контроль температуры - все реагенты и планшеты необходимо заранее в течении 30 минут прогреть до 37°C .

Установить необходимые параметры протокола измерения на планшетном ридере: температура 37°C , медленная кинетика, 30-99 циклов с интервалом 1-3 минуты, фильтр 355нм, перемешивание только при первом измерении 5 секунд орбитальное среднее.

Развести все исследуемые вещества в буфере Б, прогретом до температуры 37°C до концентрации, в 10 раз превышающих конечные концентрации скрининга. Добавить в ячейки предварительно прогретую планшета по 10мкл веществ.

Разморозить аликвоту раствора тубулина и микротубулоассоциированных белков, развести до концентрации белка 0.4 мг/мл в буфере Б с температурой 4°C . Максимально быстро разлить многоканальной пипеткой по 100 мкл в пробы с веществами и в контрольные пробы. Немедленно поместить планшет в ридер и начать запись кинетической кривой.

По окончании записи обработать результаты с помощью программы WorkOut 2.5 (DazDug, Бельгия) к планшетному ридеру, установив следующие формы обработки результатов - определение максимальной скорости изменения кривой, определение интегральной площади под кривой, определение стандартного отклонения для этих параметров.

9.2. Электронномикроскопический контроль структуры образующихся микротрубочек в результате процесса полимеризации тубулина.

После проведения полимеризации тубулина и микротубулоассоциированных белков 10мкл суспензии микротрубочек фиксируют в течении 30 секунд в 10мкл 0,5%

глутарового альдегида. Затем фиксированные микротрубочки наносятся на медную сетку, покрытую формваровой пленкой. Через 10-15 секунд капля суспензии с формваровой пленки осторожно убирается фильтровальной бумагой и на пленку наносится капля насыщенного раствора уранил ацетата. Через 30 секунд она убирается так же фильтровальной бумагой. Сеточка с образцом высушивается, на сеточку напыляется углерод и далее она используется для электронно-микроскопического контроля.

10. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации к приборам.

11. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений могут быть допущены штатные сотрудники, имеющие соответствующую профессиональную подготовку, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе тренировки.

Валидация методики оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина.

Валидация методики оценки влияния соединений на полимеризацию тубулина проводилась в экспериментах по изучению влияния на процессы сборки микротрубочек - полимеризации выделенного по описанной методике препарата из мозга белых беспородных крыс, с оценкой их структуры электронномикроскопически методом негативного контрастирования ионов алюминия, которые известны как возможный патофизиологический фактор нарушения функций микротрубочек и патогенетический фактор болезни Альцгеймера.

Процесс полимеризации тубулина и микротубулоассоциированных белков регистрировали методом светорассеяния при $\lambda=355\text{nm}$ на планшетном ридере Victor (Perkin Elmer, США). Полученные в процессе полимеризации микротубулярные структуры анализировали электронномикроскопически методом негативного контрастирования при $X=20.000$ на электронном микроскопе Philips-EM 420.

На рис.1 приведены результаты экспериментов изменения светорассеяния в минуту при полимеризации препарата тубулина с микротубулоассоциированными белками при концентрации Al^{3+} 50, 100, 250 и 500мкМ.

Установлено, что ионы Al^{3+} вызывают увеличение изменения светорассеяния в минуту при всех исследованных концентрациях по дозозависимому механизму ($P<0,001$). При концентрации 500мкМ на 80 минуте полимеризация прекращалась, поскольку происходило агрегирование препарата тубулина с микротубулоассоциированными белками и образование белого хлопьевидного осадка.

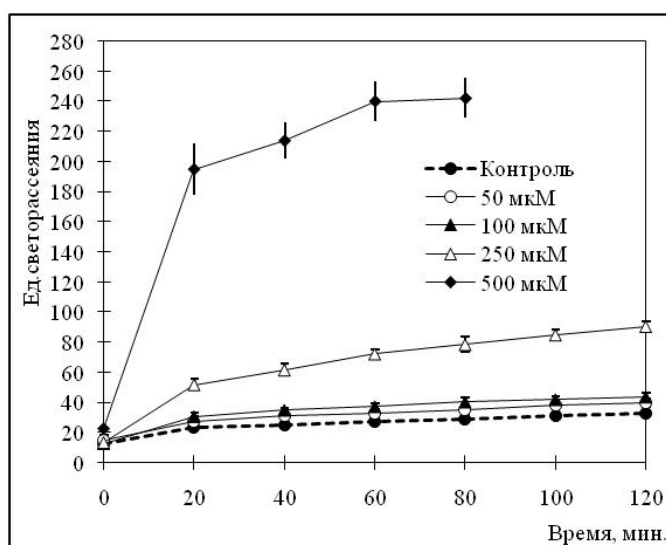


Рис.1. Влияние Al^{3+} на изменение светорассеяния при полимеризации препарата чистого тубулина и микротубулоассоциированных белков мозга крыс.

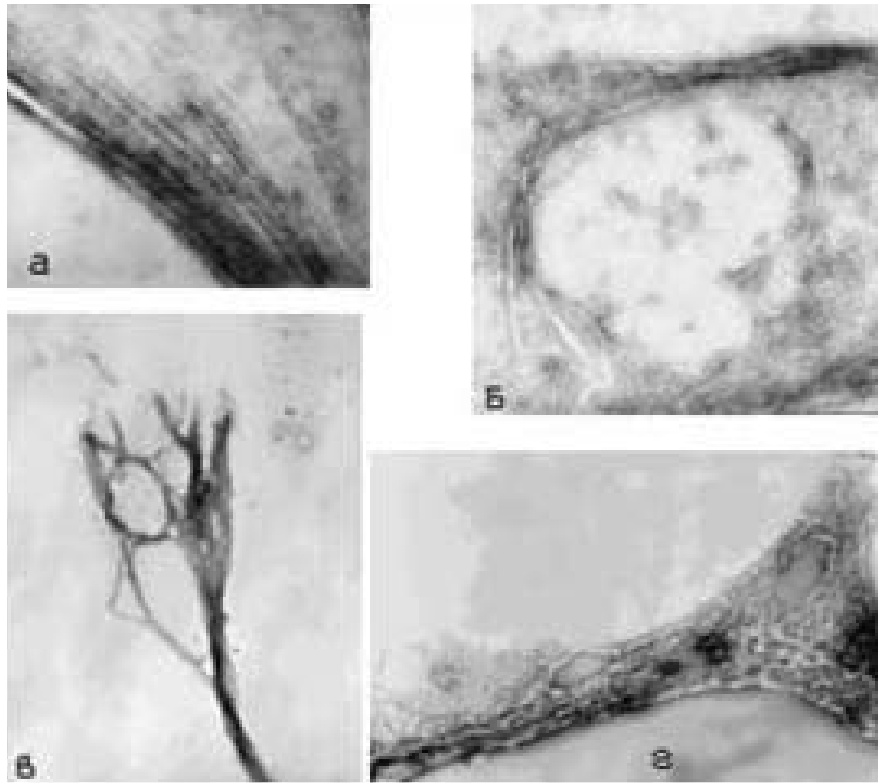


Рис.2 (x20000). Электронномикроскопический контроль структуры микротрубочек, полученных после полимеризации тубулина и микротубулоассоциированных белков, выделенных из мозга крыс:

- а - контроль, без добавок;
- б - в присутствии 10 мкМ Al^{3+} ;
- в - в присутствии 100 мкМ Al^{3+} ;
- г - в присутствии 250 мкМ Al^{3+} .

При проведении полимеризации препарата тубулина с микротубулоассоциированными белками в присутствии Al^{3+} были установлены нарушения структуры микротрубочек, начиная с минимальной исследованной концентрации Al^{3+} - 10 мкМ. Наряду с параллельными микротрубочками нормальной структуры (как в контрольных пробах) в большом количестве выявляются микротубулярные пучки, расщеплённые на отдельные деформированные, кольцеобразно закрученные микротрубочки, кроме этого отмечается появление бесформенных агрегатов (рис. 2б). При 100 мкМ Al^{3+} отмечается прогрессирование процесса кольцеобразования микротрубочек (рис. 2в). Концентрация 250 мкМ приводит к полному нарушению

структуры микротрубочек - теряется характерная для микротрубочек параллельность расположения в пучках. Вместо этого обнаруживается рыхлая, аморфная, сетеподобная масса с едва угадываемыми элементами микротубулярной структуры в некоторых её местах (рис.2г). При концентрации 500мкМ Al^{3+} идёт выпадение хлопьевидного осадка, сформированные микротрубочки полностью отсутствуют (данные не представлены).

Данные эксперимента по валидации полученного по описанной методике препарата тубулина и микротубулоассоциированных белков подтверждают функциональную значимость препарата - способность формировать микротрубочки нормальной структуры в контрольных пробах и реагировать на токсические стимулы (в данном случае, повышенное содержания алюминия в пробах) формированием аномальных микротубулярных структур.