

Тема 5.3.10. Методи за анализ на растителни белтъци. Протеомен анализ

Хорариум 30 часа (всяка тема по 2 часа)

лектор доц. д-р Л. Симова, ИФРГ

тел. 02 9799 2677

e-mail: lsimova@mail.bg

Анотация:

Курсът е предназначен за широк кръг слушатели - студенти, дипломанти, докторанти и специалисти, работещи в областта на растителните науки (биолози, биохимици, биотехнолози, агрономи), и дава добра методическа основа за практическата им работа с растителни белтъци. Представят се както класически биохимични методи за анализ на отделни белтъци, така и съвременни системни подходи като протеомен анализ.

Курсът се състои от две части. В първата критически са разгледани основни методи за извличане, фракциониране, количествено определяне, белязване, електрофоретично разделяне на белтъци, имунохимични техники за идентифициране и количествен анализ на белтъци, като се акцентира върху особеностите при работа с растителен материал. Във втората част се дават основни познания за протеомиката, като се проследява целия ход на анализа от подготовката на растителните проби, техниките на разделяне (двумерна електрофореза/течна хроматография), анализ и обработка на данните, мас-спектрометрична идентификация на белтъци (PMF, MS/MS, de novo секвениране), анализ на пост-транслационни модификации (фосфорилиране, гликозилиране), количествен анализ, стандартите, приети в протеомиката, приложения на протеомния анализ в растителните науки.

Независимо от своята насоченост към растенията (основно към докторанти от специалности Биохимия и Физиология на растенията), курсът разглежда принципни положения в анализите на белтъци и би бил от полза и за други специалисти, проявяващи интерес към протеомиката.

Програма:

Част първа

1. Особенности на белтъците като обект на изследване. Извличане на белтъци от различни видове растителни тъкани. Фракциониране на пробите и обогатяване на специфични белтъци. Фактори, от които зависи запазването на определена ензимна активност.
2. Критична оценка на методите за количествено определяне на белтъци.
3. Електрофоретично разделяне на белтъци в неденатуриращи и денатуриращи условия. Проявяване на ензимни активности след разделяне в гел.

4. Имуноблотинг и други имунохимични техники за идентификация и количествен анализ на белтъци. Маркиране на белтъци и използване на лигандни взаимодействия.
5. Основни техники за пречистване и концентриране на белтъци. Хетероложна експресия.

Част втора

6. Протеомен анализ – основни понятия, необходимо оборудване, ход на изследванията. Гел-базирани и течна хроматография-базирани анализи (първо и второ поколение протеомика).
7. Подготовка на растителните проби за протеомен анализ. Отстраняване на пречещи примеси и намаляване дела на доминиращи белтъци.
8. Гел-базирани методи на разделяне на белтъците. Изоелектрофокусиране. Двумерна SDS-електрофореза и DIGE като вариант. Разделяне на пептиди.
9. Анализ и обработка на изображенията. Мултивариантна статистика.
10. Мас-спектрометрия за протеомика. Видове мас-спектрометри. Идентификация на белтъци посредством PMF и MS/MS.
11. Интерпретация на мас спектрите. Секвениране de novo и търсене в бази данни.
12. Пост-транслационни модификации - биологично значение, типове, MS анализ, неутрална загуба и диагностични йони.
13. Фосфорилиране и гликозилиране като най-разпространени PTMs.
14. Количествен анализ в протеомиката – техники със и без белязване.
15. Стандартизация, MIAPE, протеомни репозитории и бази данни, protein arrays. Приложения на протеомиката в растителните науки.

Препоръчителна литература:

1. Protein Purification: Principles and Practice. R. K. Scopes. Springer NY 1994. 3rd ed.
2. Plant biochemistry. Hans Walter Heldt. Elsevier Acad. Press 2005.
3. Proteomics in practice. R. Westermeier, T. Naven. 2002 Wiley –VCH Verlag GmbH
4. Plant Proteomics - Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 1072, 2014. Eds Jorin-Novo, J.V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S. Humana Press.