

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОСТРОЕНИЮ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ФБУН «Федеральный научный центр
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью
населения»

Зав. отделом биохимических и
цитогенетических методов диагностики
д.м.н., доцент Землянова Марина Александровна,
[*zem@fcrisk.ru*](mailto:zem@fcrisk.ru)

5-6 октября, 2011 г. Пермь

Санитарно-эпидемиологическая экспертиза

Статья 42 (Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ, в ред. от 22.08.2004, 30.12.2008)

Ц Е Л Ь

**Установление и
предотвращение вредного
воздействия факторов среды
обитания на здоровье
человека**

**Расширение доказательной
базы причинно-
следственных связей в
системе «среда-здоровье»**

**Современные направления
фундаментальных научных
исследований**

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Разработка и внедрение новых аналитических подходов к системному анализу молекулярных механизмов возникновения и развития ответных реакций организма на внешнесредовое воздействие на самых ранних стадиях их развития

Целевые молекулярные маркеры эффекта

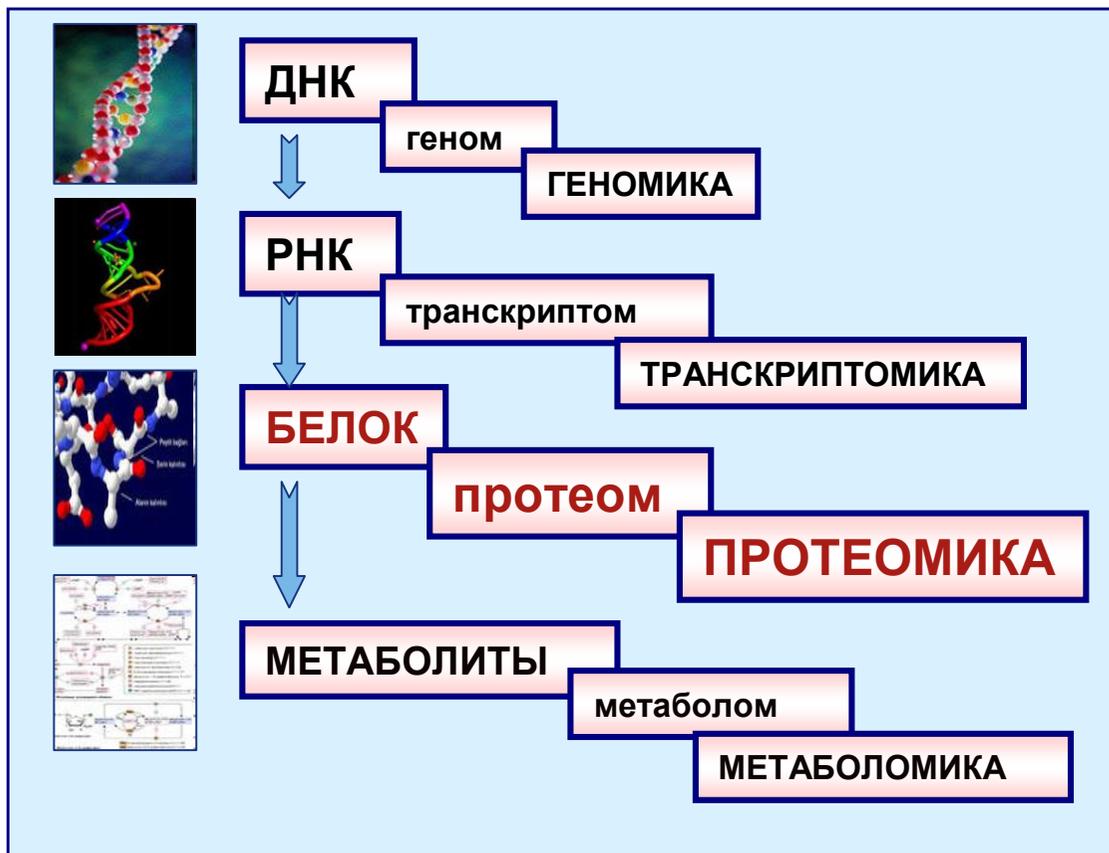
Система молекулярных мишеней воздействия

Новые технологии раннего выявления и прогноза развития заболеваний

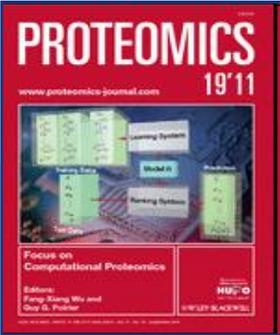
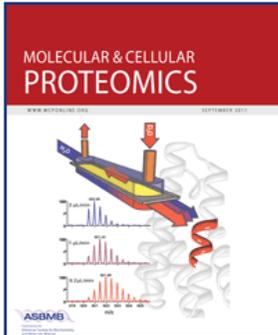
Эффективные программы профилактики

Повышение эффективности системы биомониторинга

ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА

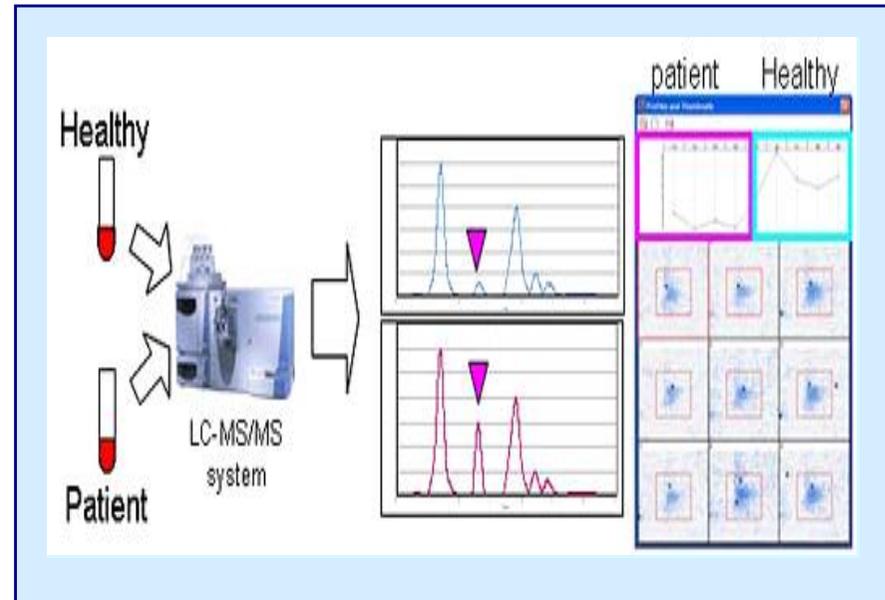
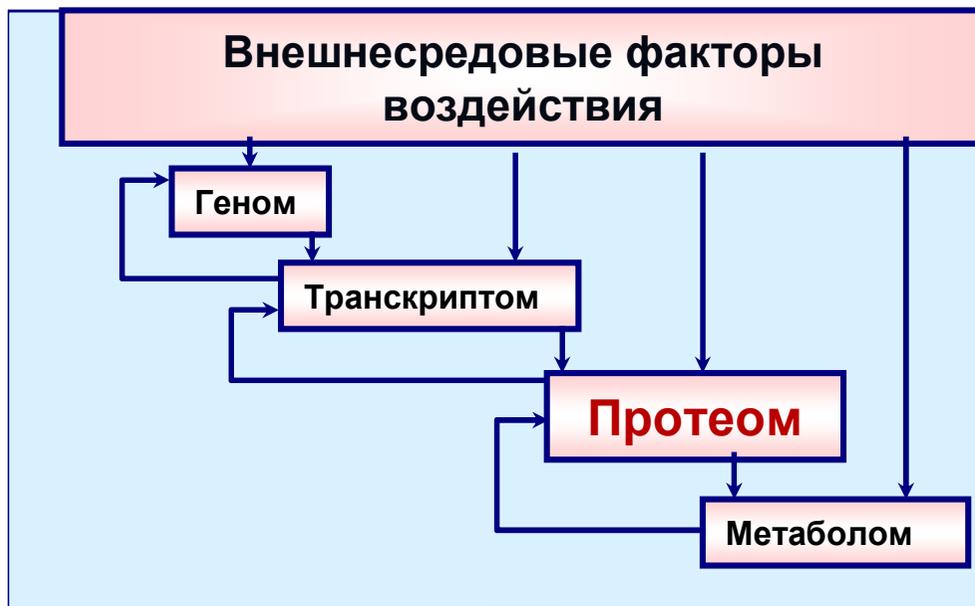


Международный научный проект
«Протеом человека» (2008 г.)
направлен на идентификацию
совокупности белков человека



В России: Программа РАМН и РАН
«Протеомика в медицине и
биотехнологии» (2001-2011 гг.)

ПРОТЕОМ КАК ОПЕРАТИВНЫЙ ИНДИКАТОР СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА



Построение и сравнительный анализ протеомных карт нормальных, пред- и патологических состояний на уровне индивидуум – группа – популяция

Обоснование белковых маркеров ответных реакций организма

Формирование доказательной базы нарушений состояния здоровья в условиях воздействия внешнесредовых и производственных факторов риска

ПРИБОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Комбинация высокотехнологичных методов tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения и высокоэффективной жидкостной хроматографии – наиболее адекватный подход к изучению протеомного профиля

- Эффективно и качественно проводить разделение белков и пептидов
- Идентифицировать белки и пептиды с ультранизкой концентрацией (от 10^{-9} до 10^{-15} М)



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ПРОТЕОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



Инициативы Международной организации «Протеом человека»

- Проект Протеом человека (HPP)
- Проект Протеом Плазмы человека (HPPP)
- Проект Протеом Печени человека (HLPP)
- Проект Протеом Мозга человека (HBPP)
- Инициатива Антитела человека (HAI)
- Инициатива Протеомных Стандартов (PSI)
- Инициатива Протеом/Гликом человека (HGPI)
- Проект Протеом Почек и Мочи человека (HKUPP)
- Модели Заболеваний человека на мышах
- Инициатива Сердечно-сосудистая система человека (HCVI)
- Инициатива Протеом Биологии стволовых клеток
- Инициатива Биомаркеры заболеваний
- Инициатива по Моделированию Протеома организма (iMOP)

Наиболее адекватная биологическая матрица для поиска белковых маркеров эффекта

Плазма крови

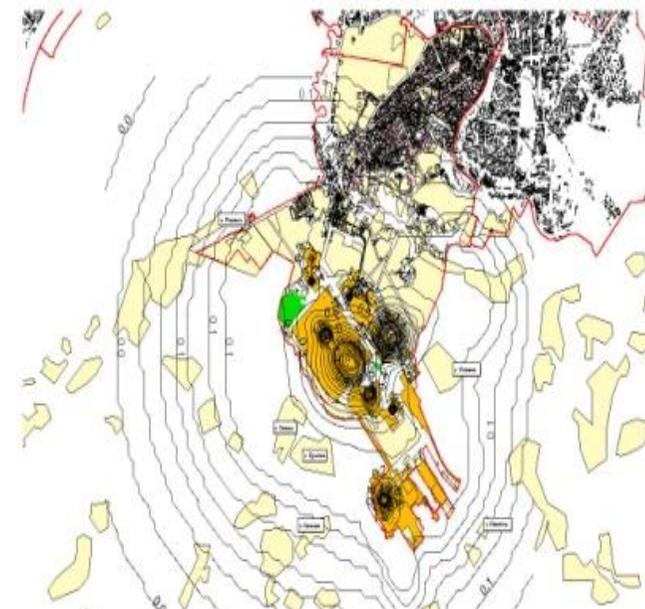
Преимущества

- содержит в своем составе большинство белков,
- имеет достаточно простой способ отбора,
- не требует предварительного лизиса клеток при пробоподготовке

ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработка методических подходов к исследованию белкового профиля плазмы крови человека

В качестве биологической матрицы используется плазма крови детей 3-7 лет, проживающих на территориях с хроническим внешнесредовым воздействием тяжёлых металлов (ванадий, никель, хром) и сравнительно на территориях с отсутствием воздействия тяжёлых металлов



Аналитическая система хромато-масс-спектрометрии:

- ВЭЖХ система UltiMate-3000 (Dionex, США)
- тандемный масс-спектрометр 4000 QTrap LC/MS/MS на базе тройного квадруполя с источником ионов типа NanoSpray (AB Sciex, США, Канада)

ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработка стадий анализа:

• пробоподготовка

• хроматографирование

• масс-спектрометрическое
детектирование

• анализ и интерпретация
полученных данных



ПРОБОПОДГОТОВКА

Этап пробоподготовки

Методы пробоподготовки

§ Удаление интенсивных белков плазмы крови (альбумина, глобулинов и др.)

§ Иммуноаффинное связывание интенсивных белков с антителами, иммобилизованными на сорбенте, с последующей фильтрацией

Albumin	Transferrin	α_1 -Acid Glycoprotein	Complement C1q
IgG	Fibrinogen	Ceruloplasmin	Complement C3
IgA	α_2 -Macroglobulin	Apolipoprotein A-I	Complement C4
IgM	α_1 -Antitrypsin	Apolipoprotein A-II	Plasminogen
IgD	Haptoglobin	Apolipoprotein B	Prealbumin

Удаление до 20 интенсивных белков, мешающих анализу

ПРОБОПОДГОТОВКА



Этап пробоподготовки

§ Увеличение концентрации низкокопийных белков до регистрируемой

§ Деструкция белков до пептидов

Методы пробоподготовки:

§ Концентрирование на центрифужных фильтрах

§ Восстановление, алкилирование и трипсинолиз

Повышение чувствительности и эффективности анализа плазмы крови

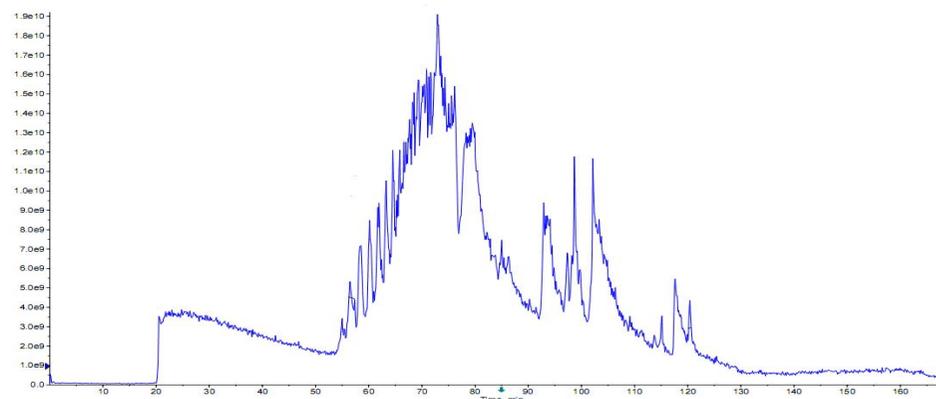
ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЕ

Этап хроматографирования

§ Подбор таких условий (форма градиента, время элюирования, температура колонки), при которых обеспечивается полное элюирование образца с колонки за наименьшее время с наилучшим разрешением

Условия хроматографирования образца плазмы крови ребёнка
(хроматографическая колонка RepMap 100, C18, 3 мкм, 100 Å, 75 мкм в.д. x 15 см)

Подвижная фаза	Градиент	Скорость потока	Объём пробы	Т°С колонки	Т°С сэмплера
А) вода, 0,05% FA	•5-80 % В - 140 мин	200 нл/мин	20 мкл	25,0	5,0
В) MeCN, 0,04 % FA	•100 % В - 15 мин				
	•уравновешивание - 15 мин				



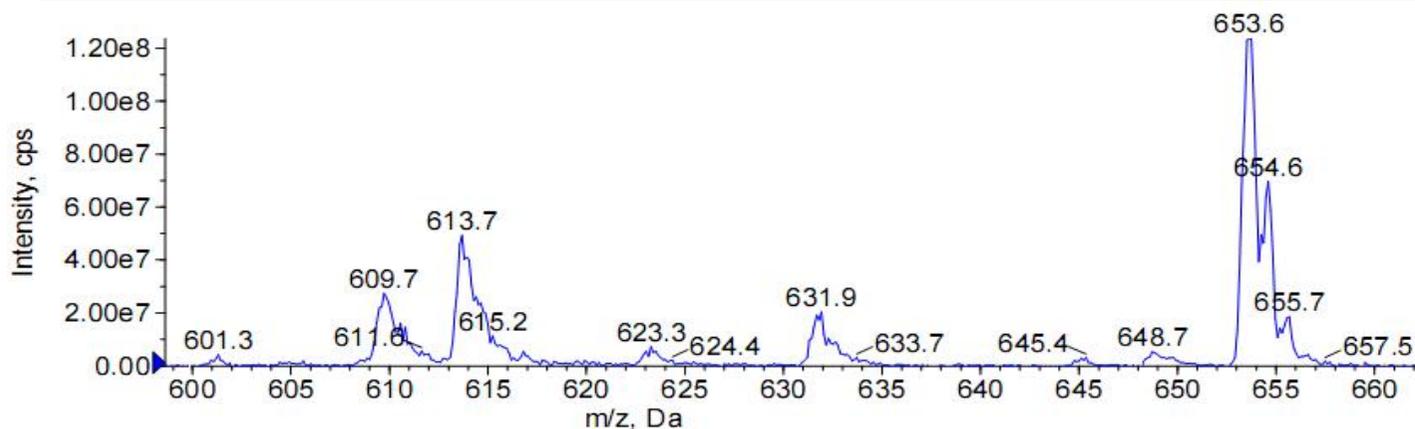
Хроматограмма образца плазмы крови ребёнка

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Этап регистрации масс-спектров

Информационно-зависимый эксперимент, включающий 2 режима:

§ режим расширенного масс-спектра – обзорный масс-спектр пептидов образца плазмы крови



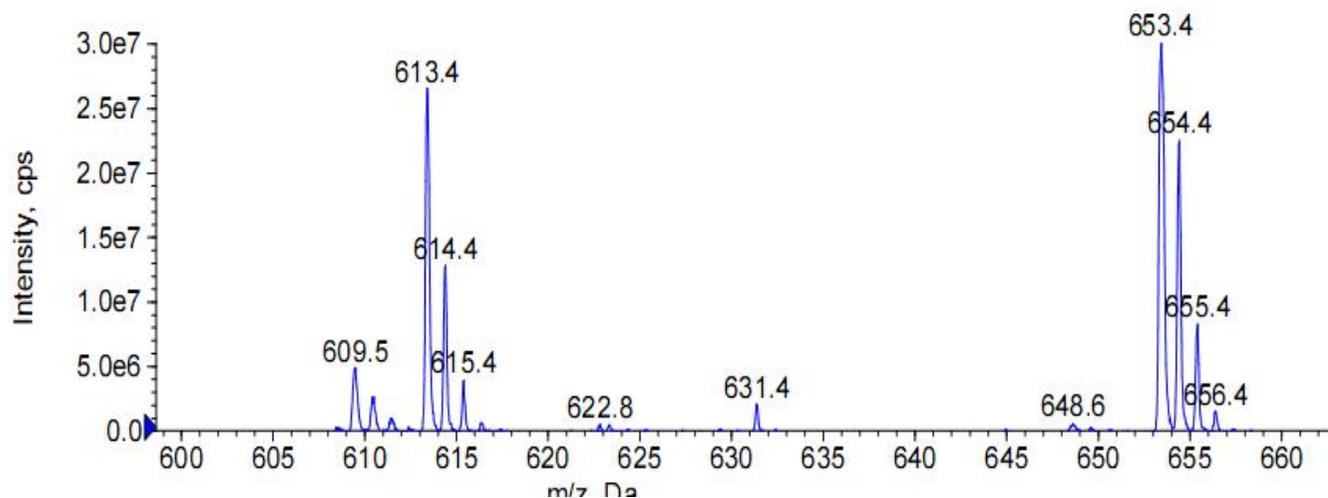
Расширенный масс-спектр пептидов образца плазмы крови ребенка в области 58,1-58,7 мин

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Этап регистрации масс-спектров

Информационно-зависимый эксперимент, включающий 2 режима:

§ режим высокого разрешения – **масс-спектр пептидов высокого разрешения образца плазмы крови**



Масс-спектр высокого разрешения образца плазмы крови ребенка в области 58,1-58,7 мин

ПРОТЕОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ полученных данных

Получен набор данных по исследуемым образцам плазмы крови, содержащих информацию о количественном содержании и качественном составе пептидов и состоящих из них белков

- Статистические методы
- Базы данных (Mascot)

Результат

Идентификация и сравнительная оценка изменений белкового профиля плазмы крови детей в зависимости от уровня тяжелых металлов в крови

Белковые маркеры эффекта

Благодарю за внимание !