**Гороховатский, Андрей Юрьевич.**

## Исследование резонансного переноса энергии биолюминесценции в гибридных белках и их комплексах : диссертация ... кандидата химических наук : 02.00.10. - Пущино, 2005. - 133 с. : ил.

## Оглавление диссертациикандидат химических наук Гороховатский, Андрей Юрьевич

Содержание.

Список сокращений.

I. ВВЕДЕНИЕ.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: РЕЗОНАНСНЫЙ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ.

II. 1. Резонансный перенос энергии флуоресценции.

II.1.1. Основные понятия и термины.

II. 1.2. Ограничения FRET.

11.2. Методы детектирования резонансного переноса энергии.

11.2.1. Равновесная спектроскопия.

11.2.2. Измерения времени жизни возбужденного состояния.

И.2.2.1. Импульсный метод.

II.2.2.2. Фазово-модуляционный метод.

11.2.3. FRET-микроскопия.

11.2.4. Измерения на уровне одиночных донор-акцепторных пар.

11.3. Синтетические хромофоры, используемые в приложениях резонансного переноса энергии.

11.3.1. Органические флуоресцентные метки.

11.3.2. Люминесцентные хелаты лантаноидов.

11.3.3. Полупроводниковые нанокристаллы.

11.4. Зеленый флуоресцентный белок - генетически-кодируемый флуорофор в приложениях FRET.

11.4.1. Спектральные свойства GFP.

11.4.2. Варианты зеленого флуоресцентного белка.

11.4.3. GFP-подобные флуоресцентные белки из других организмов.

11.4.4. Использование FRET между вариантами GFP.

II.4.4.1. Внутримолекулярные FRET-индикаторы.

И.4.4.2. Межмолекулярные FRET-индикаторы.

11.5. Резонансный перенос энергии биолюминесценции.

11.5.1. Люциферазы Renilla reniformis и Aequorea victoria.

11.5.2. Механизм переноса энергии.

11.5.3. Использование BRET.

III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

III. 1. Материалы и реактивы.

111.2. Генетические конструкции.

111.3. Экспрессия генетических конструкций в клетках Е. coli и очистка рекомбинантных белков.

111.3.1. Акворин, обелин и гибриды GFP/EGFP-Aeq/Ob.

111.3.2. GFP и EGFP.

111.3.3. Гибрид EGFP-RLuc.

111.3.4. Гибрид BCCP-EGFP.

111.3.5. Гибрид SAV-Aeq.

111.3.6. Активация апо-белков целентеразином.

111.3.7. Определение концентрации белков.

111.4. Спектральные методы.

111.4.1. Спектры поглощения и кругового дихроизма.

111.4.2. Спектры флуоресценции.

111.4.3. Спектры биолюминесценции.

111.4.4. Биолюминесцентная активность Са2+-активируемых фотобелков и их гибридов.

111.4.5. Расчет интеграла спектрального перекрывания и Ro.

111.4.6. Определение эффективности BRET.

111.4.6.1. Анализ спектров.

111.4.6.2. Измерение сигнала BRET в двулучевом люминометре.

111.4.7. Кинетические измерения методом остановленного потока.

111.5. Электрофоретические методы.

111.5.1. ДСН-ПААГ электрофорез.

111.5.2. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану.

111.6. Иммунологические методы.

111.6.1. Выделение IgG кролика.

111.6.2. Получение поликлональных антител к GFP.

111.6.3. Получение поликлональных антител к акворину.

111.6.4. Обработка нитроцеллюлозных мембран.

III.7. Другие методы.

111.7.1. Трипсинолиз гибридного белка GFP-19-Aeq.

111.7.2. Определение активности каспазы-3 in vitro.

111.7.3. Калибровка сигнала BRET.

111.7.4. Определение Kcat/KM.

111.7.5. Определение активности каспазы-3 в клеточных лизатах.

111.7.6. Биотинилирование EGFP и IgG кролика.

111.7.7. Анализ биотина.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

IV. 1. Экспрессия генетических конструкций и очистка гибридных белков.

IV.2. Спектральные характеристики гибридных белков и эффективность внутримолекулярного BRET.

IV.3. Исследование механизмов внутримолекулярного BRET в акворинсодержащих гибридных белках.

IV.4. Характеристика биолюминесцентных субстратов для определения активности каспазы-3 методом внутримолекулярного BRET.

IV.5. Тестирование белок-белковых взаимодействий методом межмолекулярного BRET.

V. ВЫВОДЫ.

VI. БЛАГОДАРНОСТИ.