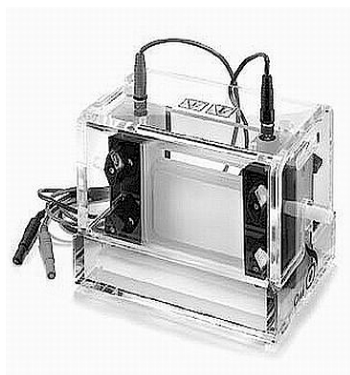




Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева

Методы анализа живых систем



Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова

Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева

Методы анализа живых систем

Учебное пособие

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов, обучающихся по направлению
Прикладная информатика в химии*

Ярославль
ЯрГУ
2013

УДК 543.21(075.8)

ББК Е072я73

У69

Рекомендовано

*Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2013 года*

Рецензенты:

Щапов А. Н., кандидат химических наук,
доцент кафедры химии фармацевтического факультета
Ярославской государственной медицинской академии;
кафедра органической и неорганической химии
Ярославского государственного педагогического университета
им. К. Д. Ушинского

Урванцева, Г. А. Методы анализа живых систем :

У69 учебное пособие / Г. А. Урванцева, Е. Л. Грачева ; Яросл. гос.
ун-т им. П. Г. Демидова. – Ярославль : ЯрГУ, 2013. – 104 с.

ISBN 978-5-8397-0942-3

Учебное пособие написано в соответствии с содержанием Государственных образовательных стандартов, программой практикума (раздел «Биохимические методы анализа»); программой дисциплины «Химические основы и методы анализа живых систем»; программой дисциплины «Биотехнология и организация аналитического контроля»; программой «Физико-химические и биологические методы анализа». Изложены методы центрифугирования, электрофореза, хроматографии, ПЦР и других методов анализа живых систем. Рассмотрены их теоретические основы, достоинства и недостатки, перспективы развития и другие особенности и характеристики.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению 230700.62 Прикладная информатика в химии (дисциплина «Химические основы и методы анализа живых систем», цикл Б2), очной формы обучения.

УДК 543.21(075.8)

ББК Е072я73

ISBN 978-5-8397-0942-3

© ЯрГУ, 2013

Основные обозначения

A – абсорбция вещества (оптическая плотность)

ПААГ – полиакриламидный гель

ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность

ВЭКХ – высокоэффективная колоночная хроматография

ПАУ – полиароматические углеводороды

ТСХ – тонкослойная хроматография

АМХП – автоматизированное многократное хроматографическое проявление

R_f – коэффициент скорости движения

K_d – коэффициент распределения

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Введение

Настоящее учебное пособие посвящено описанию современных методов анализа и исследования живых систем. Живые системы имеют ряд существенных особенностей:

1. Во-первых, как правило, исходный материал – биомасса, из которой предстоит выделить интересующее исследователя вещество, – состоит из многих сотен или даже тысяч различных соединений. Многие компоненты этих смесей, выполняя разнообразные биологические функции, построены довольно однотипно;

2. Во-вторых, работа с биологическими объектами заключается в необходимости манипулировать с очень маленькими количествами вещества. Поэтому используемые для их детекции методы должны быть высокочувствительными. Основными методами детекции компонентов живых систем являются спектрофотометрические методы, основанные на измерении поглощения видимого или ультрафиолетового света, а также люминесцентные методы, основанные на измерении флуоресценции, био- и хемилюминесценции;

3. В-третьих, многие компоненты живых систем обладают низкой устойчивостью и при умеренных температурах и незначительных изменениях pH способны к денатурации. Кроме того, в клетках часто находятся ферменты, способные разрушать те или иные вещества.

Все эти особенности следует учитывать при выборе метода исследования компонентов живых систем, тем более что в настоящее время с этой целью по-прежнему широко используются и традиционные физико-химические методы анализа, например абсорбционная спектроскопия. Биохимическими методами анализа живых систем многие исследователи считают центрифугирование, электрофорез и хроматографические методы анализа, о которых подробно пойдет речь в настоящем пособии. Однако в последние годы широкое развитие получили новые молекулярные методы анализа, такие как ПЦР. На этот метод также будет обращено внимание студентов в данном пособии. Кроме того, в настоящее время распространено совместное использование двух или более методов анализа, например хромато-масс-

спектрометрия. Общей тенденцией развития современных методов анализа живых систем является математизация анализа, создание сети банков аналитических данных, разработка систем машинной идентификации природных соединений, выпуск аналитической аппаратуры со встроенной ЭВМ. Важно уметь выбрать метод, наиболее подходящий в данных обстоятельствах, дающий наибольшую информацию.

Перед началом выполнения лабораторной работы необходимо ознакомиться с соответствующей теоретической частью, приведенной в данном пособии в каждом разделе, а также в рекомендуемой литературе. При подготовке к сдаче выполненной работы следует ответить на контрольные вопросы, представить полученные результаты и сформулировать выводы.

1. Центрифугирование

1.1. Общие принципы центрифугирования

Центрифугирование – разделение веществ в поле центробежной силы.

Центрифугирование применяется для разделения мелкодисперсных многокомпонентных смесей, а также для фракционирования клеточных органелл и определения молекулярного веса высокомолекулярных органических соединений, например белков, нуклеиновых кислот (седиментационный анализ).

Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на том, что в центробежном поле частицы, имеющие различные размеры, форму и плотность, осаждаются (седиментируют) с разной скоростью.

Величина центробежной силы определяется скоростью вращения ротора и расстоянием от оси вращения. Для сравнения условий центрифугирования на разных центрифугах принято указывать относительное центробежное ускорение (фактор разделения), выраженное в g ($g = 9,8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$). Для примерных расчетов фактора разделения обычно пользуются номограммами или таблицами, которые прилагаются к каждому ротору.

В зависимости от задач, стоящих перед исследователем, центрифугирование можно условно разделить на препаративное и аналитическое (седиментационный анализ). Препаративное центрифугирование заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований.

С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое количество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности. Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов. Аналитическое центрифугирование применяется главным образом для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц, например, рибосом. В данном случае используется небольшое количество материала, а седиментация исследуемых частиц непрерывно регистрируется с помощью специальных оптических систем.

Метод позволяет получать данные о чистоте, молекулярном весе и структуре материала. В практикумах для студентов препаративное центрифугирование применяется гораздо чаще, чем аналитическое, поэтому мы остановимся на нем более подробно, хотя в основе обоих методов лежат общие принципы (см. рис. 1.1).

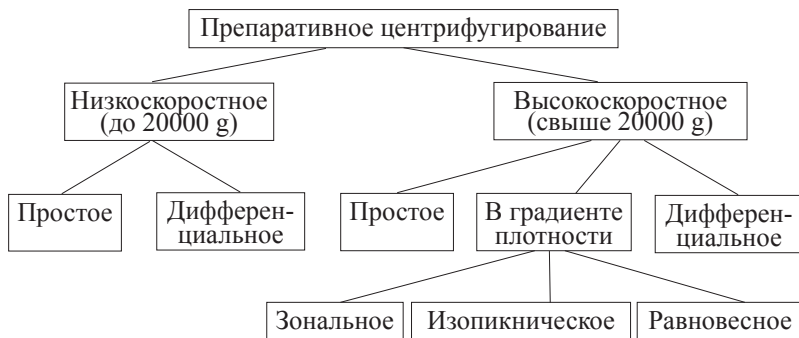


Рис. 1.1. Классификация методов препаративного центрифугирования

1.2. Разделение клеточных органелл дифференциальным центрифугированием

Для дифференциального центрифугирования используются различные типы роторов, в зависимости от объемов и требуемого фактора разделения. Описанными методами можно выделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрии, лизосомы (или другие микротельца), микросомы (фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети) и, наконец, рибосомы.

Центрифугирование. Исследуемую взвесь или коллоидный раствор наливают в пробирку, которую после уравнивания с точностью до 1 мг и удаления пузырьков воздуха (при использовании герметичных роторов углового типа) помещают в установленный на валу привода центрифуги ротор и центрифугируют при первом выбранном факторе разделения, что необходимо для осаждения самых тяжелых частиц.

Получить чистый препарат за одно центрифугирование практически невозможно. Первый образовавшийся осадок содержит, кроме самых тяжелых частиц, некоторое количество других компонентов разделяемой смеси. После седиментации его ресуспендируют в среде, состав которой определен задачами работы, и снова центрифугируют при тех же условиях.

Эту процедуру проводят для получения чистых осадков несколько раз. Полученные супернатанты (надосадочные жидкости) объединяют для дальнейшего разделения. Объединенный супернатант центрифугируют при втором факторе разделения для осаждения более мелких частиц. Далее, также ступенчато повышают фактор разделения до тех пор, пока не получают осадок последнего компонента изучаемой смеси. После этого супернатант, проверенный на полноту осаждения, можно отбросить, в случае необходимости, исследовать, исходя из задач эксперимента. Ступени относительного центробежного ускорения в большинстве случаев подбирают экспериментально применительно к среде гомогенизации и объекту исследования. Большая дискретность ступеней фактора разделения обеспечивает получение более чистых препаратов. Однако достигнуть высокой чистоты практически не удастся из-за относительно близких размеров частиц. Для улучшения очистки используют центрифугирование в градиентах плотности сахарозы, декстрана и других веществ.

Таблица 1.1

***Применение дифференциального центрифугирования
для разделения клеточных органелл***

<i>Компонент</i>	<i>Условия центрифугирования</i>	
	<i>Фактор разделения, g</i>	<i>Время, мин.</i>
Клеточные стенки	500-750	10
Ядра	500-1000	10-20
Митохондрии	9000-18000	10-20
Общие микросомы	80000-100000	30-90

1.3. Разделение фракций в градиентах плотности

Существуют два вида градиентов плотности веществ: непрерывный и ступенчатый. Градиент должен охватывать диапазон плотностей изучаемого материала и несколько перекрывать его. Ступенчатые градиенты можно разделить на простые (2–3 слоя растворов разной плотности) и сложные (более 3 слоев). Чем больше слоев, тем ближе ступенчатый градиент приближается к непрерывному. Широкое распространение ступенчатые градиенты получили из-за простоты их приготовления, а также возможности получения больших количеств исследуемой фракции. Наносят их пипеткой или шприцем, наслаивая раствор с меньшей плотностью на раствор с большей плотностью.

Формирование непрерывных градиентов осуществляется автоматически с помощью специальных установок.

1.4. Способы центрифугирования в градиентах плотности

Скоростное зональное центрифугирование (s-зональное) применяют для разделения частиц по размеру. Его проводят с использованием линейного градиента плотности. Изучаемую смесь наносят на поверхность градиента и центрифугируют при максимально возможном для данного типа ротора факторе разделения 20–30 мин до получения дискретных зон или полос исследуемых фракций. Наличие градиента препятствует конвекционному смешиванию этих зон. Если разделение не достигнуто, то увеличивают время центрифугирования или фактор разделения (применяя другой ротор). Если все частицы осели на дно, то увеличивают плотность градиента или уменьшают фактор разделения.

Изопикническое центрифугирование, в основе которого лежит разделение частиц в зависимости от их плавучей плотности. Плавучая плотность вещества определяется соотношением формы, размеров и удельной плотности разделяемых веществ, а также плотностью жидкого компонента, т. е. можно подобрать среду центрифугирования и фактор разделения так, что центробежная сила будет уравновешена силой диффузии на выделяемый компонент смеси не будет осаждаться на дно пробирки.