

ЛЕКЦИЯ 2

Методы исследования

Являясь в своей основе химической наукой, биохимия широко использует химические и физико-химические методы исследований: колориметрический и спектроскопический анализ, различные виды хроматографии, избирательную адсорбцию, ультрацентрифугирование, электрофорез и изоэлектрофокусировку, рентгеноструктурный анализ, электронную микроскопию, ядерный магнитный резонанс, применение радиоактивных и стабильных изотопов и др. Вместе с тем у биохимии выработались и свои специфические методы исследований. Главные особенности этих методов - применение щадящих способов выделения веществ, лиофильное высушивание биологического материала и использование защитных добавок с целью сохранения нативных свойств изучаемых веществ [4].

Биохимические методы исследования

1. Методы, используемые для изучения функций органелл

Для глубокого изучения функций любой из органелл необходимо прежде всего получить эти органеллы в относительно чистом виде, так, чтобы их препарат был как можно меньше загрязнен другими органеллами. Процесс, с помощью которого этого обычно удается достичь, называется субклеточным фракционированием и состоит из трех этапов: экстракции, гомогенизации и центрифугирования.

Экстракция

Первым шагом при выделении специфических органелл (или молекул) является их экстрагирование из клеток, в которых они находятся. Большинство органелл и многие биомолекулы весьма лабильны (неустойчивы) и легко утрачивают биологическую активность. Поэтому их нужно экстрагировать в мягких условиях (в водных растворах, избегая экстремальных значений рН, осмотического давления, а также высоких температур). Большая часть операций по выделению органелл производится при 0 - 4 °С. При комнатной температуре может наблюдаться значительное снижение активности, частично вследствие действия различных гидролитических ферментов (протеаз, нуклеаз), высвобождающихся при разрушении клеток. Обычно для экстракции органелл используют 0,25М раствор сахарозы (изотонический раствор), содержащий ионы K^+ и Mg^{2+} в концентрации, близкой к физиологической; рН раствора доводится до 7,4 солянокислым трис-буфером (трис [гидроксиметил]-аминометангидрохлорид) в концентрации 0,05М (Этот раствор часто называют СТКМ). Этот раствор обеспечивает мягкие условия экстракции.

Гомогенизация

Для выделения органелл (биомолекул) из клеток необходимо прежде всего разрушить клетки в мягких условиях. Удобным методом разрушения органов (печени, мозга, почки) и составляющих их клеток является гомогенизация. Для этого измельченные фрагменты соответствующего органа помещают в стеклянный стаканчик подходящего размера, заполненный раствором для гомогенизации (например, СТКМ), а затем пестиком приводят смесь во вращение. Вращение пестика с контролируемой скоростью создает силы вязкого трения, под действием которых клетки разрушаются. Полученную

суспензию, содержащую многие интактные (неповрежденные) органеллы, называют гомогенатом.

Центрифугирование. Субфракционирование гомогената путем дифференциального центрифугирования – это один из наиболее важных методов биохимии. В классическом случае используется три стадии центрифугирования при возрастающих скоростях. В ходе каждой из них образуется осадок и надосадочная жидкость (супернатант). Супернатант, полученный на каждой из стадий, подвергается центрифугированию на следующей стадии. В результате этой процедуры образуются три типа осадков, которые называют ядерной, митохондриальной и микросомной фракциями. Ни одна из этих фракций не представляет собой абсолютно чистые органеллы.

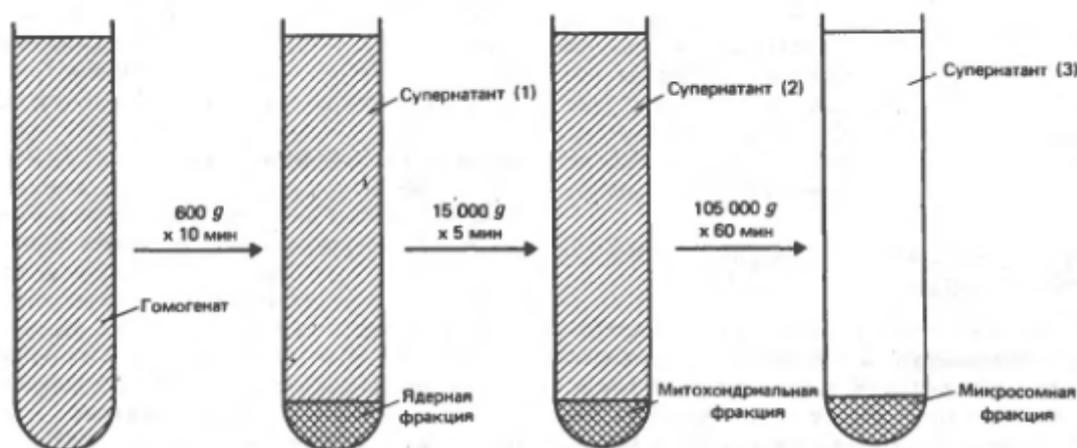


Рисунок 1 – Схема разделения субклеточных фракций с помощью дифференциального центрифугирования.

С помощью электронного микроскопа, а также путем идентификации соответствующих «маркерных» ферментов и химических компонентов было установлено, что главными компонентами этих трех фракций являются ядра, митохондрии и микросомы соответственно. «Маркерный» фермент или химическое соединение – это тот компонент, который присутствует практически только в составе данного типа органелл. Микросомная фракция представляет собой смесь фрагментов гладкого эндоплазматического ретикулума, шероховатого эндоплазматического ретикулума и свободных рибосом. Содержимое супернатанта, полученного на конечной стадии, приблизительно соответствует составу цитозоля.

Значение субклеточного фракционирования невозможно переоценить. Оно составляет одно из главных звеньев общего экспериментального подхода, с помощью которого удалось выяснить функции органелл, перечисленные в Таблице 1.

Таблица 1 Основные клеточные органеллы и их функции. Перечислены только главные функции каждого типа органелл.

Органелла или фракция	Маркер	Основные функции
Ядро	ДНК	Область локализации хромосом Область ДНК-зависимого синтеза РНК (транскрипция)
Митохондрия	Глутаматдегидрогеназа	Цикл лимонной кислоты, синтез АТФ
Рибосома	Высокое содержание РНК	Синтез белка (трансляция м-РНК)
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза	Связанные с мембранами рибосомы являются главным местом синтеза белка Синтез различных липидов Окисление многих ксенобиотиков(цитохром Р-450)
Лизосома	Кислая фосфатаза	Место действия многих гидролаз (ферментов, катализирующих реакции гидролитического расщепления)
Плазматическая мембрана	Na/K+-АТРаза 5'-нуклеотидаза	Транспорт молекул в клетку и из клетки, межклеточная адгезия и межклеточные коммуникации
Аппарат Гольджи	Галактозилтрансфераза	Внутриклеточная «сортировка» белков Реакции гликозилирования Реакции сульфатирования
Цитозоль	Лактат-дегидрогеназа	Процесс глиеолиза, синтез жирных кислот

2. Общий экспериментальный подход

Этот подход состоит из трех основных частей:

- 1) Выделение биомолекул и органелл, находящихся в клетке (субклеточное фракционирование);
- 2) Определение структуры биомолекул;
- 3) Использование различных препаратов для анализа функций биомолекул и их метаболизма.

Выделение биомолекул. Как и в случае органелл, для выяснения функций любой биомолекулы необходимо прежде всего получить ее в чистом виде. В таблице 2 перечислены основные методы, используемые для разделения и очистки биомолекул.

Таблица 2. Основные методы разделения и очистки биомолекул

Фракционирование солями	
Хроматография	Бумажная Ионообменная (анион- и катионообменная) Аффинная Тонкослойная Газо-жидкостная Жидкостная под высоким давлением
Гель-фильтрация	
Электрофорез	На бумаге Высоковольтный В агарозе В ацетатцеллюлозе В крахмальном геле В полиакриламиде В полиакриламиде в присутствии додецилсульфата натрия (применение додецилсульфата натрия приводит к солюбилизации ряда белков, которые ранее не удавалось перевести в растворимое состояние)
Ультрацентрифугирование	

Очистить биомолекулы до состояния гомогенности (отсутствия загрязнения любыми другими биомолекулами) удастся лишь при последовательном применении нескольких таких методов.

Определение структуры биомолекул

После очистки биомолекул можно определить их структуру. Это необходимое условие успешного детального изучения корреляции между структурой и функцией. Основные методы, используемые для анализа структуры биомолекул:

- 1) Элементарный анализ;
- 2) Спектроскопия в УФ-, видимой и инфракрасной областях, ЯМР-спектроскопия;
- 3) Использование кислотного или щелочного гидролиза для расщепления изучаемых молекул на составляющие их компоненты;
- 4) Использование набора ферментов с известной специфичностью для расщепления изучаемых молекул (протеаз, нуклеаз, гликозидаз);
- 5) Масс-спектрометрия;
- 6) Специфические методы секвенирования (белков или нуклеиновых кислот) Секвенирование (sequencing) – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК;
- 7) Рентгеновская кристаллография.

Изучение функций и метаболизма биомолекул с использованием различных препаратов

Первые биохимические исследования человека и животных проводились на уровне целого организма. Вскоре стало ясно, что целый организм слишком сложен, чтобы можно

было получить четкие ответы на различные вопросы. Многие проблемы, возникающие при работе на целом организме, были устранены после приготовления более простых препаратов и изучения их *in vitro*. В таблице 3 приведены различные типы препаратов, которые используются для изучения биохимических процессов [2].

Таблица 3. Препараты, используемые для изучения биохимических процессов

Метод	Комментарии
Исследование на уровне целого организма	Могут включать: 1) Удаление органа (гепатэктомия) 2) Изменение диеты (голодание – усиленное питание) 3) Прием лекарств (например, фенобарбитала) 4) Введение токсических веществ (четырёххлористый углерод) 5) Наблюдение за животными со специфическими заболеваниями 6) Использование сложных методов, т.к. ЯМР-спектроскопия и позитронно-эмиссионная томография
Исследование изолированного перфузируемого ¹ органа	Наиболее пригодны сердце, печень, почки
Использование тканевых срезов	Срезы печени
Использование целых клеток	1. Особенно это относится к клеткам крови, которые относительно легко поддаются выделению 2. Клетки в культурах тканей являются незаменимым объектом во многих областях биологии
Использование гомогената	1. Позволяет работать с бесклеточными препаратами 2. Можно добавлять или удалять (путем диализа) различные соединения и наблюдать за последствиями 3. Путем центрифугирования можно провести дальнейшее субфракционирование, что позволяет получить индивидуальные клеточные органеллы
Исследование изолированных клеточных органелл	Широко используется для изучения функций митохондрий, эндоплазматического ретикулула, рибосом
Субфракционирование органелл	Широко используется при изучении функций митохондрий
Выделение и характеристика метаболитов	Важнейшая часть анализа любой химической реакции или метаболического пути
Клонирование генов, кодирующих ферменты и другие белки	Выделение клонированного гена необходимо для изучения деталей его структуры и регуляции. Позволяет установить аминокислотную последовательность белка, который им кодируется

¹ Перфузия (лат. *perfusio* обливание, вливание)— метод питания биологических тканей или подведения биологически активных веществ путем пропускания физиологических растворов, крови, кровезамещающих или других жидкостей через кровеносные сосуды какого-либо органа, части тела или всего организма; кровоснабжение органов тела в естественных условиях (напр., почек, головного мозга и др.).

Рисунок 2 – Качественная реакция на наличие фенольной или енольной группы с раствором хлорида железа (III)

Наличие в соединении функциональных групп определяют также путем получения производных, которые легче идентифицируются при сравнении их с известными соединениями. Например, для характеристики альдегидов и кетонов используют образование 2,4-динитрофенилгидразонов.

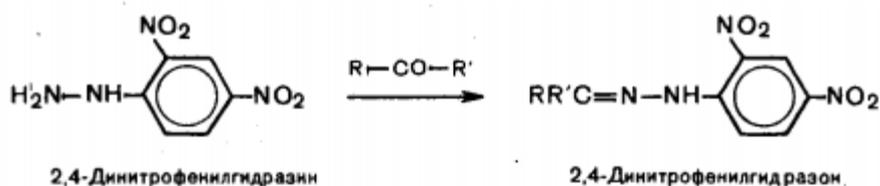


Рисунок 3 - Образование 2,4-динитрофенилгидразонов

В основе определения строения углеродного скелета соединения лежит расщепление углерод-углеродных связей с образованием в качестве осколков более легко идентифицируемых соединений. Чаще всего расщепление проводят путем окисления перманганатом, трикислородом (озоном), хромовой, азотной, йодной кислотами, пероксидом водорода. Однако использование химических методов связано с большой затратой времени и вещества [6].

Физико-химические методы

1. Хроматографические методы

Хроматография – зональный метод разделения и идентификации веществ. Хроматографический метод основан на различном распределении вещества между подвижной (поток жидкости или газа) и неподвижной (твердой или жидкой) фазами. В зависимости от характера фаз, с помощью которых производится разделение, различают газовую, распределительную, ионообменную (иониты), гель-хроматографию. Хроматографический процесс может осуществляться в колонках, тонком слое и на бумаге.

Адсорбционная хроматография основана на различии в относительном сродстве компонентов разделяемой смеси к твердым адсорбентам (неподвижная фаза), в качестве которых используются порошкообразные вещества – оксид алюминия, силикагель, крахмал, цеолиты, активированный уголь и т.п. наиболее распространены колоночный и тонкослойный варианты адсорбционной хроматографии. В случае колоночной хроматографии колонка обычно представляет собой стеклянную трубку, заполненную сорбентом, в которую вносят раствор смеси веществ. При прохождении раствора через колонку осуществляется разделение компонентов смеси. С помощью подаваемого в колонку элюента-растворителя адсорбированные вещества в виде зон перемещаются с различными скоростями. В результате из колонки выходят фракции разделенных веществ.

Хроматография в тонком слое заключается в том, что на тонкий слой сорбента на подложке (стеклянная, алюминиевая пластинка) в виде нескольких зон наносят раствор

разделяемых веществ. В хроматографической камере при подъеме подвижной фазы по пластинке снизу вверх происходит разделение веществ. Вещества обнаруживают, обрабатывая пластинку различными реагентами.

Распределительная хроматография основана на разделении веществ за счет различия в коэффициентах распределения между двумя или более несмешивающимися жидкостями, или неподвижной жидкой фазой и газовой фазой. Неподвижной фазой служит носитель пропитанный специальной жидкостью, подвижной – растворитель или газ. Распределительная хроматография обычно осуществляется на бумаге или колонках. В бумажной хроматографии носителем служит специальная хроматографическая бумага. Подвижная фаза перемещается по бумаге вниз (нисходящая) или вверх (восходящая хроматография). Высокоэффективное разделение веществ достигается при использовании газовой подвижной фазы.

Ионообменная хроматография включает обратимый обмен ионов, содержащихся в растворе разделяемой смеси, на ионы полимерных смол, называемых ионитами и используемых в качестве неподвижной фазы. Катиониты – иониты кислотного характера, содержащие карбоксильные и сульфогруппы, протоны которых обмениваются на катионы. Аниониты – иониты основного характера, содержащие аминогруппы разной степени замещения. Ионообменная хроматография основана на химическом взаимодействии активных групп неподвижной фазы с ионами разделяемых соединений.

Гель-хроматография – метод разделения, очистки и анализа веществ, основанный на различии в размерах и массе молекул. В качестве стационарной фазы используются различные гели с трехмерной сетчатой структурой: декстраны, полиакриламиды, силикагели, цеолиты. При разделении смеси небольшие молекулы диффундируют через поры набухшего в растворителе геля. При промывании геля растворителем в первую очередь перемещаются крупные молекулы, находящиеся в пространстве между частицами геля, а затем уже мелкие. Гель действует как молекулярное сито.

Аффинная хроматография основана на использовании аффинных сорбентов. Явление аффинности основано на том, что многие биополимеры имеют специфическое сродство к тем или иным веществам, обладающим комплементарными участками. Специфические лиганды ковалентно присоединяются к соответствующему носителю, и выделяемое вещество либо адсорбируется таким сорбентом, либо отделяется от остальных компонентов.

Оптимальным носителем для аффинной хроматографии является сорбент с реакционноспособными группами. Наиболее популярным является бромцианосефароза. Цианид брома реагирует с гидроксильной группой сефарозы, превращая ее в остаток цианата. Такое производное активно по отношению к полимерам, содержащим аминогруппу. Присоединение лигандов к носителю называется иммобилизацией.

2. Электрофоретические методы

Электрофорез – метод разделения смеси веществ под действием электрического тока. При этом в электрическом поле перемещаются заряженные молекулы, а растворитель остается неподвижным.

Скорость перемещения вещества определяется уравнением:

$$Ze\varepsilon = fv,$$

где Z – заряд частицы, e – заряд электрона, ε – направленность приложенного электрического поля, f – коэффициент вязкого течения частиц.

Для сферической частицы:

$$f_0 = 6\pi\eta r,$$

где η – вязкость среды, r – радиус частицы.

Основное практическое применение имеет гель-электрофорез. При использовании гелей резко уменьшается коэффициент диффузии, что снижает размывание зон. В качестве гелей используют полиакриламиды и агарозы.

3. Ультрацентрифугирование

Ультрацентрифугирование основано на седиментации биополимеров в центробежном поле. величиной, характеризующей подвижность частиц в центробежном поле, является константа седиментации (S), представляющая собой отношение скорости перемещения седиментирующей частицы к величине центробежного ускорения $\omega^2 r$, где ω – угловая скорость вращения ротора центрифуги, r – расстояние частицы до оси ротора.

$$S = m \cdot [1 - (\rho_0 / \rho)] / f, \text{ где}$$

m – масса частицы, ρ_0 – плотность растворителя, ρ – плавучая плотность частицы, f – коэффициент вязкого трения.

$$\rho = \frac{1}{v_{уд}}$$

$v_{уд}$ – удельный парциальный объем.

Если разделяемую смесь нанести в виде зоны поверх растворителя в центрифужной пробирке, то в ходе центрифугирования вещества, различающиеся по константе седиментации, будут формировать отдельные зоны.

4. Спектральные методы детекции биополимеров

Спектральные методы связаны с воздействием на вещество электромагнитного излучения. Механизм этого взаимодействия основан на поглощении молекулой определенного количества энергии. При этом молекула переходит из одного энергетического состояния в другое.

Электронная спектроскопия – спектроскопия в УФ и видимой области. УФ-область (200-400 нм), видимая область (400-800 нм). Спектр поглощения записывается в виде зависимости интенсивности поглощения от длины волны. При поглощении света молекула

переходит из основного в возбужденное состояние. Поглощение света осуществляется избирательно: поглощаются те кванты света, энергия которых равна разности энергий между орбиталями основного и возбужденного состояний. Различные полосы поглощений соотносятся с отдельными фрагментами молекулы, называемыми хромофорами. К ним относятся функциональные группы, в которых атом с неподеленной парой связан с соседним атомом кратной связью.

Области электромагнитного спектра

Мягкое рентгеновское излучение	$\lambda = 10^{-3} - 10$ нм	Переходы внутренних e в атомах
УФ-область	$\lambda = 10 - 400$ нм	Переходы валентных e
Видимая область	$\lambda = 400 - 800$ нм	Переходы валентных e
ИК-область	$\lambda = 800 - 40000$ нм	Колебательные переходы молекул
Микроволновая область	$\lambda = 40$ мкм – 300 мм	Вращательные переходы молекул
Короткие радиоволны	$\lambda = 300$ мм – 200 м	Спиновые переходы ядер и электронов

В электронной спектроскопии основными объектами являются соединения с сопряженными хромофорами – каротиноиды, ароматические соединения бензольного и гетероциклического ряда.

Инфракрасная спектроскопия – спектроскопия в ИК-области (800 – 40000 нм). Связанные атомы претерпевают колебания:

- валентные – вдоль оси связи;
- деформационные – атомы отклоняются от оси связи с изменением валентных углов.

Связь поглощает ИК-излучение той же частоты, с какой колеблется сама. Поглощение излучения оценивается как ослабление интенсивности прошедшего через образец света по отношению к исходной интенсивности.

ИК –спектр можно условно разделить на 4 области:

3700 – 2900 см⁻¹ – валентные колебания связей О-Н, N-H, S-H, C-H;

2500 – 1900 см⁻¹ – колебания тройных связей C≡C, C≡N;

1900 – 1300 см⁻¹ – колебания двойных связей C=C (алкенов), C=C (аренов), C=O, C=N;

<1300 см⁻¹ – колебания углеродного скелета молекулы.

ЯМР спектроскопия основана на способности ядер некоторых атомов, имеющих магнитный момент, поглощать электромагнитное излучение, когда они находятся во внешнем магнитном поле. В настоящее время применяется ЯМР на ядрах ¹H, ¹⁹F, ¹³C, ³¹P.

ЭПР-спектроскопия применяется для исследования парамагнитных молекул – свободные радикалы, ион-радикалы. Спектр ЭПР дает информацию о наличии и количестве парамагнитных частиц.

5. Дифракционные методы

Рентгенография основана на явлении дифракции рентгеновских лучей, имеющих длины волн, соизмеряемые с межатомными расстояниями в исследуемом соединении. Используется для исследования пространственного расположения атомов в соединениях, находящихся в кристаллическом состоянии.

Рентгенограмма представляет собой совокупность пятен с различной степенью потемнения на фотопленке, образованных отклоненными рентгеновскими лучами.

Электроннография основана на явлении дифракции электронов на ядрах атомов. Метод используется для исследования веществ в газообразном состоянии. Электроннограмма состоит из центрального пятна и колец различной интенсивности.