Аналитическая биохимия / 2012

Лекция 1

Суть и принципы аналитической биохимии

Валерий Зайцев, *к.б.н.*
ВолгГМУ, кафедра биохимии

Распространение и использование на условиях
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported
http://wiki.creativecommons.org/images/3/3a/Attribution_3.0_CC_BY-NC-SA_rus.pdf

Аналитическая биохимия

Ученый уже в ранней молодости должен примириться с мыслью о том, что об окружающем его мире ему суждено знать очень немногое.

Анатоль Франс

БИОХИМИЯ

Наука о химическом составе живой материи и о химических процессах, происходящих в живых организмах и лежащих в основе их жизнедеятельности. Одним из разделов является статическая биохимия, задачей которой является анализ химического состава живых организмов.

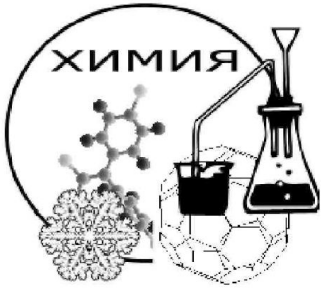
таким образом:

Аналитическая биохимия - научная дисциплина, которая рассматривает теоретические основы и практическое применение методов изучения химического состава биологических объектов и их составных частей и принципы идентификации химических соединений, обнаруживающихся в живых организмах.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Рассматривает принципы и методы определения химического состава вещества. Включает качественный анализ и количественный анализ. Задача первого из них - обнаружение компонентов анализируемого вещества и идентификация соединений, второго - определение массы или концентрации анализируемого компонента.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



CC BY-NC-SA 3.0

Предмет аналитической биохимии

Всякий раз мы смотрим на вещи не только с другой стороны, но и другими глазами – поэтому и считаем, что они переменились.

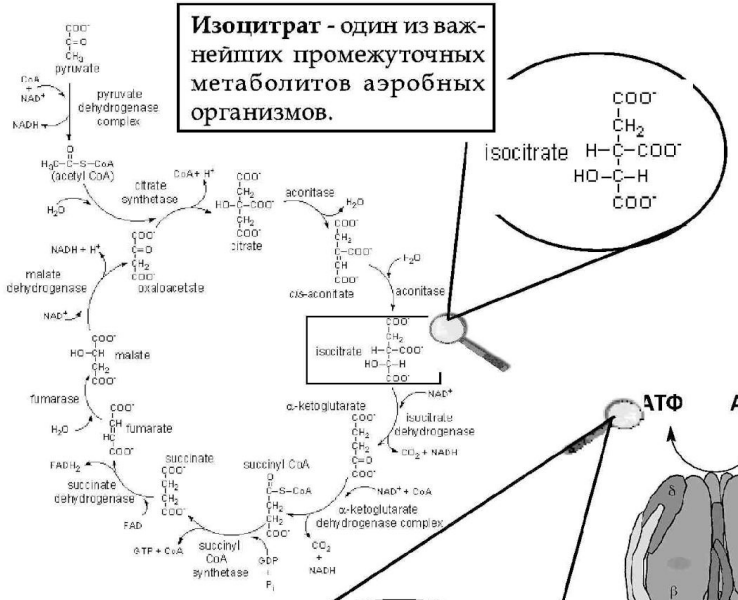
Блез Паскаль

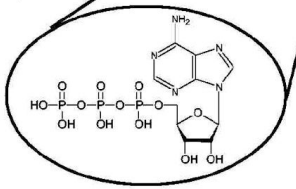
Предметом изучения аналитической биохимии **являются** принципы и методы надежного обнаружения, идентификации и количественного определения химических соединений, которые могут присутствовать в биологических объектах.

Такая формулировка подчеркивает, что объектом биохимического анализа могут быть не только естественные компоненты живых организмов, но и различные соединения, поступающие извне, например, загрязнители окружающей среды, компоненты продуктов питания или лекарственные препараты.

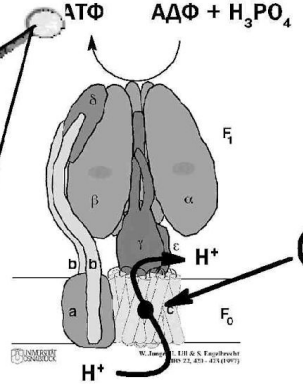
Это уточнение очень важно, поскольку в принципе любое поступающее извне вещество, не являясь компонентом нормальных метаболических процессов, может оказаться способным влиять на те или иные биохимические реакции, а значит, и на обмен веществ в организме в целом.

Изоцитрат - один из важнейших промежуточных метаболитов аэробных организмов.





АТФ - соединение, обеспечивающее запасание энергии внутри клеток.



Олигомицин - специфический ингибитор АТФ-синтазы, подавляющий трансмембранный перенос протонов и, как следствие, синтез АТФ в клетках.

CC BY-NC-SA 3.0

Обнаружение, идентификация, определение

Качественный анализ

Что присутствует в образце?

Определение химической подлинности (тождественности) компонентов пробы (аналитов) тому или иному химическому соединению (веществу)

Количественный анализ

Сколько чего именно присутствует в образце?

- **Определение количества (содержания, концентрации) компонента пробы (аналита) в определенных числовых величинах. Для разработки протокола количественного анализа обычно сначала требуется провести более или менее полный качественный анализ образца (или типа образца). Также требуется знать с большей или меньшей полнотой свойства аналита, что позволяет разработать максимально чувствительные и специфичные (селективные) аналитические подходы.**

Инструментальный анализ

CC BY-NC-SA 3.0

Необходимость аналитической биохимии

Если у общества появляется техническая потребность, то она продвигает науку вперед больше, чем десяток университетов.

Фридрих Энгельс

Прошедший век превратил биологию из преимущественно описательной дисциплины в точную науку, позволяющую дать адекватные количественные оценки изучаемых явлений. Это позволило совершить многие блистательные открытия в ходе фундаментальных исследований жизни, в первую очередь на молекулярном уровне. Более того, многие уже называют **XXI век - веком биологии**. В то же время сам бурный прогресс фундаментальной и прикладной биохимии и физико-химической биологии в целом было бы абсолютно невозможно без опережающего развития методов биохимического анализа.

Биохимический анализ , по сути,- приложение методов аналитической химии к идентификации и исследованию содержания и химического строения компонентов биологических проб (образцов).

Зачем же выделять отдельную дисциплину - АНАЛИТИЧЕСКУЮ БИОХИМИЮ?

!

В своих применениях биохимический анализ имеет ряд характерных особенностей (перечисленных ниже), которые накладывают достаточно строгие ограничения на применимость и условия применимости методов аналитической химии в биохимическом анализе. Особенно важен тот факт, что задачи, которые ставит анализ биологических проб, могут быть решены только на основе комплексного применения совершенно различных по своим принципам аналитических методов.

Особенности биохимического анализа

- Малый объем анализируемой пробы
- Композиционная сложность биологических проб
- Высокая молекулярная масса определяемых компонентов
- Малые или следовые содержания анализируемого вещества в пробе
- Низкая стабильность многих компонентов биопроб вне организма
- Большое отношение концентрации балластных веществ к концентрации определяемого компонента

CC BY-NC-SA 3.0

Проблемы анализа биологических проб. 1

Малый объём (масса) анализируемой пробы

Обычно биологический материал сложно получить для анализа в значительных количествах

	ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ *			
	мышь	**крыса**	**кролик**	**человек**
кровь	1-2 мл (тотально)	5-7 мл (тотально)	до 10 мл (прижизненно) 50-80 мл (тотально)	венозная -- до 10 мл капиллярная -- до 1 мл
моча	0,2-0,5 мл/сут	15-35 мл/сут	150-300 мл/сут	500-1000 мл/сут
эякулят	?	?	0,5-0,8 мл	3-4 мл
печень	1-2 г (тотально)	10-15 г (тотально)	до 250 г (тотально)	биоптаты различных тканей: несколько миллиграмм
сердце	сотни мг (тотально)	до 7 г (тотально)	до 100 г (тотально)	

* Часть данных о лабораторных животных взята с сайта Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (http://www.adelaide.edu.au/ANZCCART/)

CC BY-NC-SA 3.0

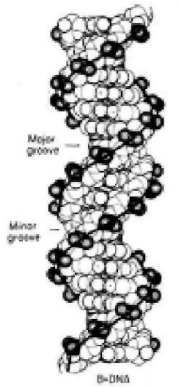
Проблемы анализа биологических проб. 2

Высокая молекулярная масса определяемых компонентов

Многие из биологически значимых молекул имеют молекулярную массу от десятков до тысяч килодальтон

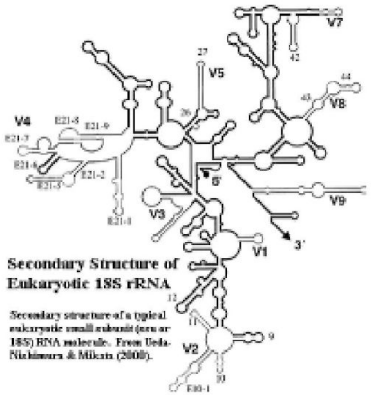
Один килодальтон (1 кДа) - величина молекулярной массы, эквивалентная 1000 атомных единиц массы (а.е.м.)

ДНК



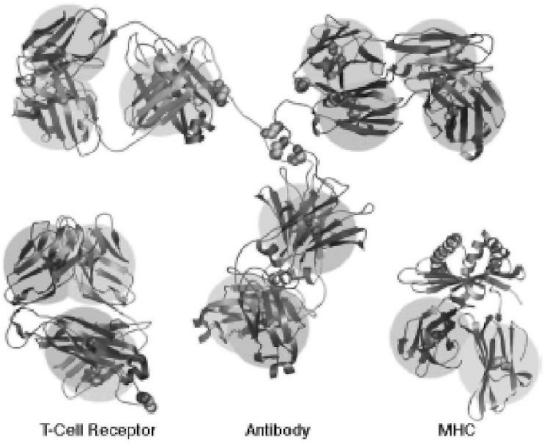
1000-100000 кДа

Рибосомальная РНК



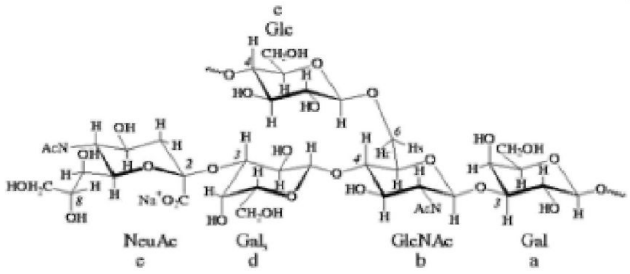
300-1500 кДа

Белки



10-1500 кДа

Полисахариды



15-1000 кДа

* Источники структурных изображений:

ДНК - Brutlag D. DNA Structure (lecture).- http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Handouts/dnastructure.html

рРНК - Ueda-Nishimura K., Mikata K. Two distinct 18S rRNA secondary structures in *Dipodascus* (Hemiascomycetes). Microbiology, 2000; 146: 1045-1051.- http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/full/146/5/1045

Белки - из базы данных PDB - Protein Data Bank.- http://www.rcsb.org/pdb/

Полисахариды - Brisson J.R. e.a. NMR and molecular dynamics studies of the conformational epitope of the type III group B Streptococcus capsular polysaccharide and derivatives. Biochemistry, 1997;36 (11)::3278-3292.- http://ibs-isb.nrc-cnrc.gc.ca/ibs/facilities/molecularmodelling_e.html

CC BY-NC-SA 3.0

Проблемы анализа биологических проб. 3

Низкая стабильность многих компонентов биологических проб вне организма

Стабильность некоторых клинически значимых компонентов биологических жидкостей человека *

Аланинаминотрансфераза	сыворотка	исследование должно быть проведено в день взяти пробы
Алкогольдегидрогеназа	сыворотка	24 часа при 4°C
Андростендион	сыворотка	хранить до разделения не более 1 часа на льду
Антиген раковый CA-125	сыворотка	24 часа при 2-8°C
Витамин B_{12}	сыворотка	в течение ночи при 8°C
Волчаночный антикоагулянт	плазма	1 час при 4°C
Гастрин	сыворотка	хранится только при -70°C или ниже
Гемоглобин H	кровь	анализировать немедленно
бета-Гидроксимасляная кислота	плазма	12 часов при 4°C
Гомоцистеин	моча	очень нестабилен, почти сразу окисляется на воздухе
Жирные кислоты, свободные	плазма	нестабильны, анализировать немедленно
Катепсин D	биоптаты тканей	стабилен при -70°C, заморозить немедленно после взятия
Кининоген высокомолекулярный	плазма	2 часа при 4°C
Креатинин	плазма	24 часа при 4°C
Лактатдегидрогеназа	плазма, спинномозг.жидк.	анализировать немедленно
Метгемоглобин	кровь	1 ч при комнатной температуре
Пируваткиназа	сыворотка	6 часов при 4°C
Фактор фон Виллебрандта	плазма	несколько часов
Фибрина D-димеры	плазма	8 часов при комнатной температуре

* Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. Н.У.Тица. М.:Лабинформ, 1997. 960 с.

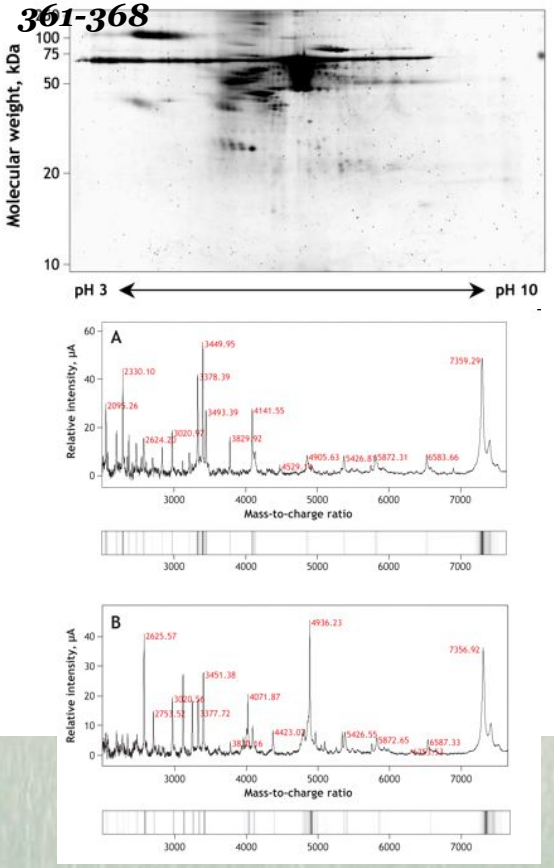
CC BY-NC-SA 3.0

Композиционная сложность биологических проб

Примеры биологических образцов сложного состава

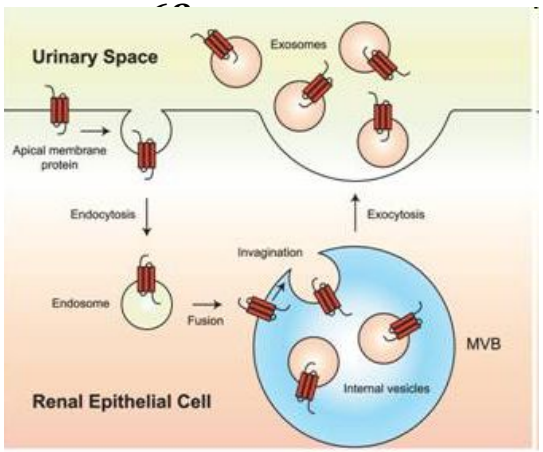
Белки в моче

Barrat e.a. CMAJ 2007; 177(4): 361-368



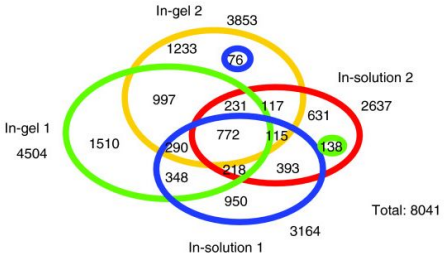
2004 г. – 295 экзосомальных белков

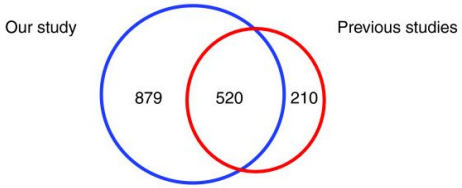
Pisitkun e.a. PNAS 2004; 101(36):



2006 г. – более 1500 белков мочи

Adachi e.a. Genome Biology 2006; 7: R80





Urinary Exosome Protein Database

http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lkem/exosome/

304 белка на начало 2010 года
1160 белков на настоящий момент

CC BY-NC-SA 3.0

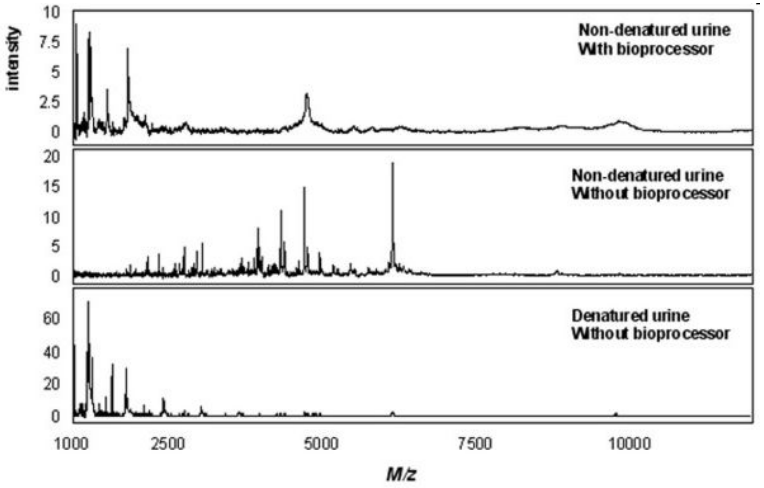
Проблемы анализа биологических проб. 4

Композиционная сложность биологических проб

Эффект пробоподготовки и высокая биологическая вариабельность состава

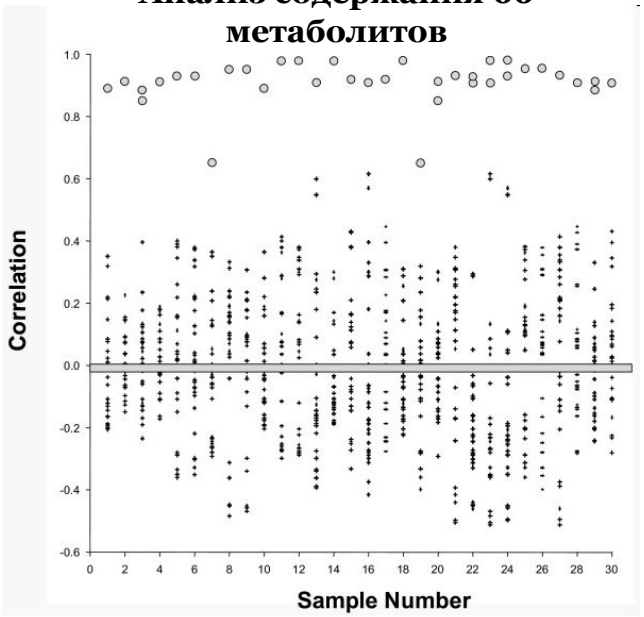
Белки в моче

Roelofsen e.a. Proteome Sci. 2007; 5: 2



Биологическая вариабельность содержания метаболитов в плазме крови человека

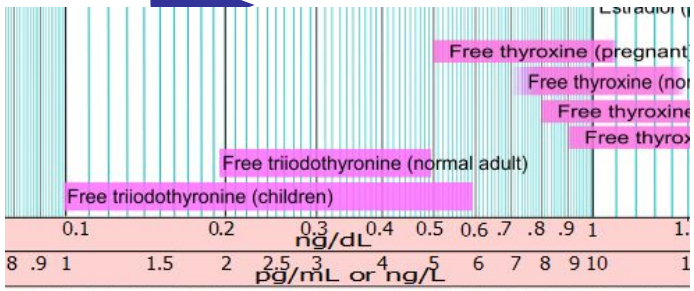
Shurubor e.a. BMC Clin. Pathol. 2007; 7: 9

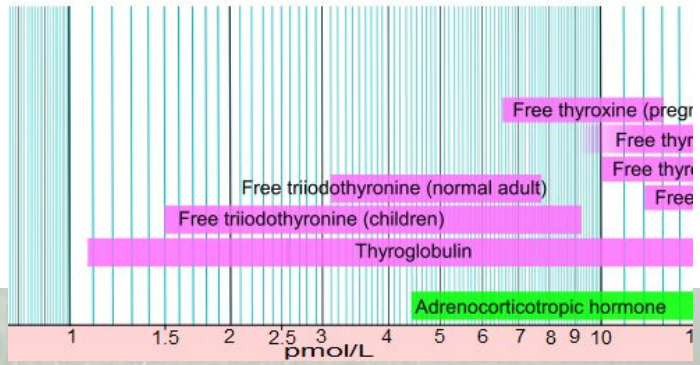


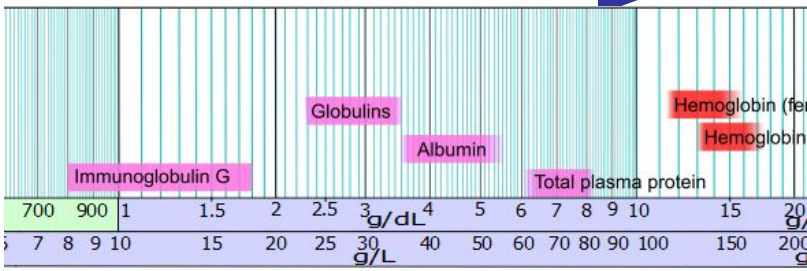
CC BY-NC-SA 3.0

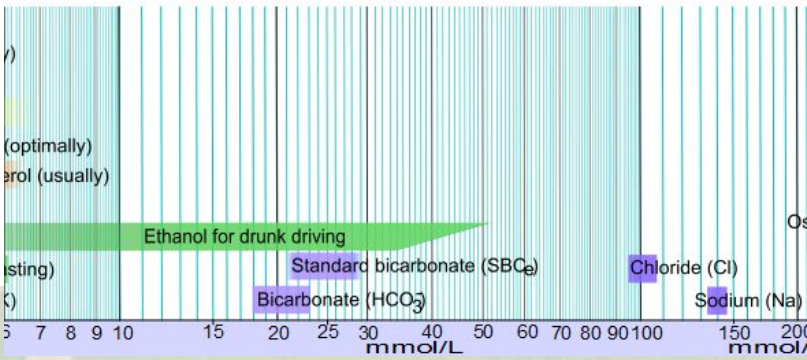
Малое или следовое содержание анализируемого вещества

Референтные диапазоны содержания компонентов в крови









CC BY-NC-SA 3.0

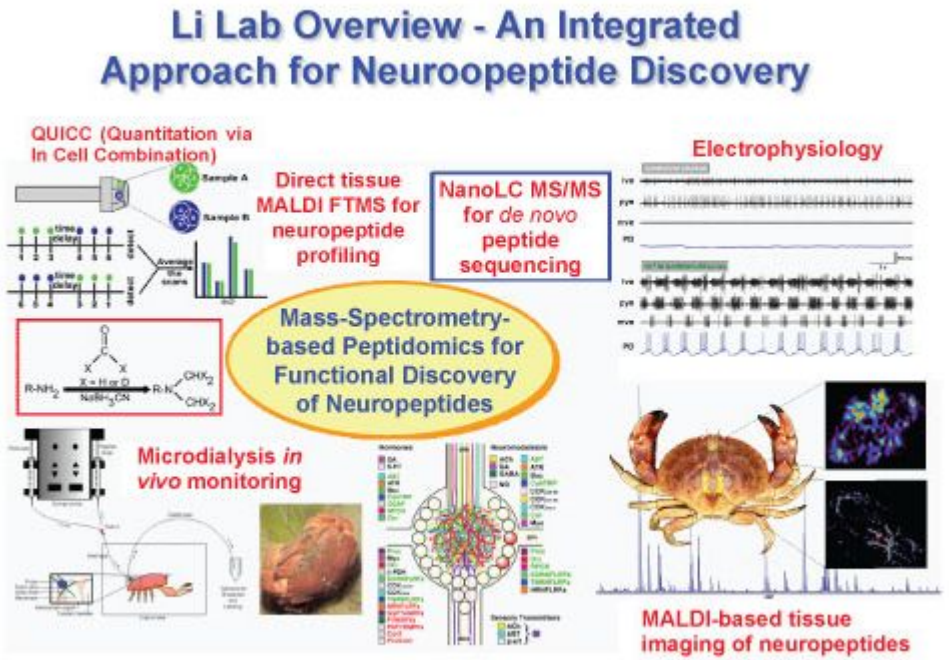
Аналитические процедуры в биохимическом эксперименте

Последовательность этапов биохимического аналитического эксперимента

1. Выбор цели эксперимента.
2. Анализ знаний по проблеме.
3. Выбор объекта анализа и постановка аналитической задачи.
4. Выбор адекватного аналитического метода.
5. Выбор способа отбора (приготовления) и подготовки пробы.
6. Планирование хода эксперимента.
7. Подготовка к экспериментальным операциям.
8. Выполнение аналитического эксперимента.
9. Анализ экспериментальных данных.
10. Формирование выводов и оценка успешности эксперимента.

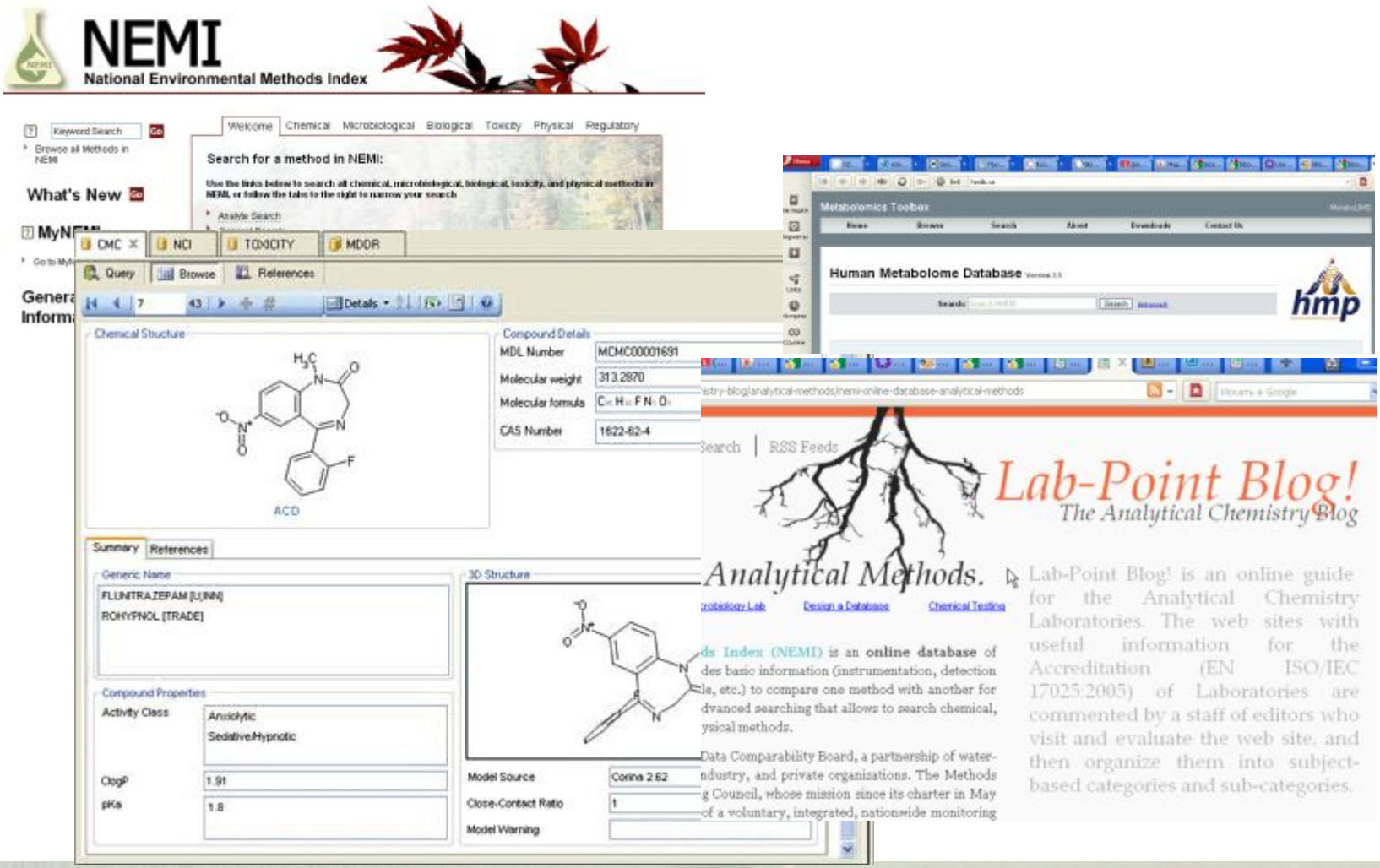
CC BY-NC-SA 3.0

1. Выбор цели эксперимента



CC BY-NC-SA 3.0

2. Анализ знаний по проблеме



CC BY-NC-SA 3.0

3. Выбор объекта и аналитической задачи

Home Articles About Us Support Groups Contact RSS

The Bartter Site

Information and Support for Bartter and Gitelman Syndromes

Lab Diagnosis of Magnesium Deficiency

by Herbert C. Mansmann, Jr. M.D.

The definition of magnesium deficiency (MgD) is "a reduction in the total body Mg content" (Welt 1965) (Elin 1988). This includes any test for Mg content that is decrease below the lowest normal reference level in any of the laboratory methods of measuring Mg

Topics

- Antenatal Bartter Syndrome
- Articles by Dr Mansmann
- Bartter Syndrome
- Gitelman Syndrome
- Magnesium

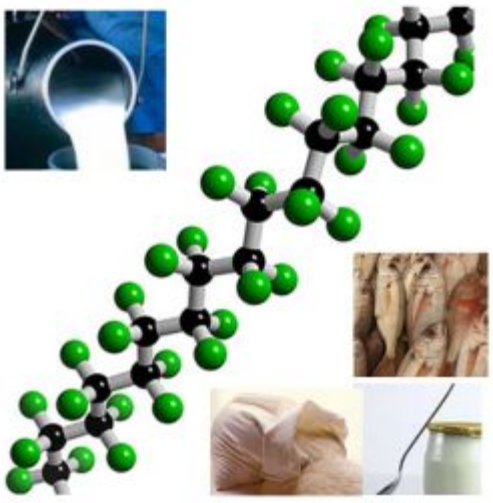
REFERENCE VALUES FOR LABORATORY TESTS FOR MAGNESIUM

COMPARISON OF THREE DIFFERENT REPORTING VALUE METHODS

	mmol/L	mEq/L	mg/dL	Total
sMg	0.7-1.1	1.3-2.1	1.7-2.5	NA[1]
rbc Mg	2.4-2.57	3.37-5.77	4.04-6.9	NA
24hr uMg	3.o-4.37	6.0-8.5		120-150mg

1. NA=Non-applicable

(Elin 1988)



CC BY-NC-SA 3.0

2011, В.Зайцев

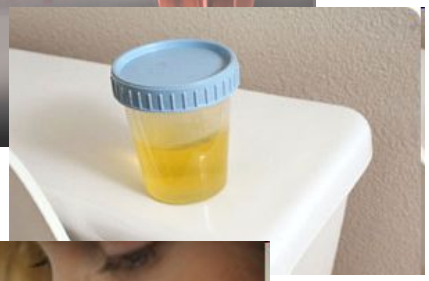
Принципы выбора

- **Чувствительность**
- **Точность**
- **Повторяемость (сходимость) и воспроизводимость**
- **Специфичность и селективность**
- **Длительность и трудоемкость выполнения**
- **Стоимость проведения анализа (включая исходные и операционные затраты)**
- **Применимость для серийных анализов**
- **Применимость для образцов сложного состава**

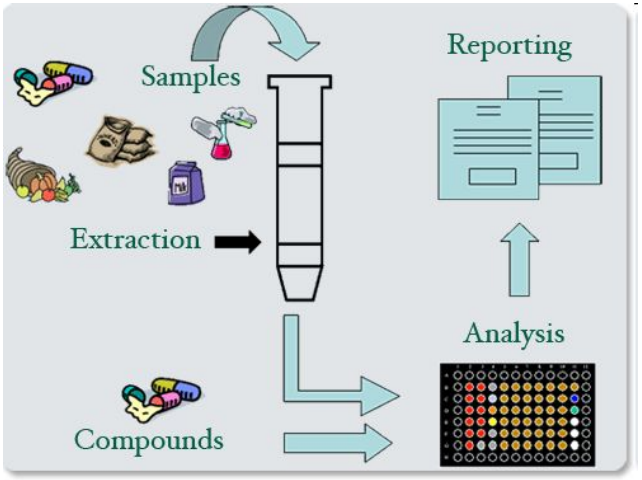
CC BY-NC-SA 3.0

5. Выбор способа отбора и подготовки пробы

Какой образец



Нужна пробоподготовка?



Способ сбора образца?

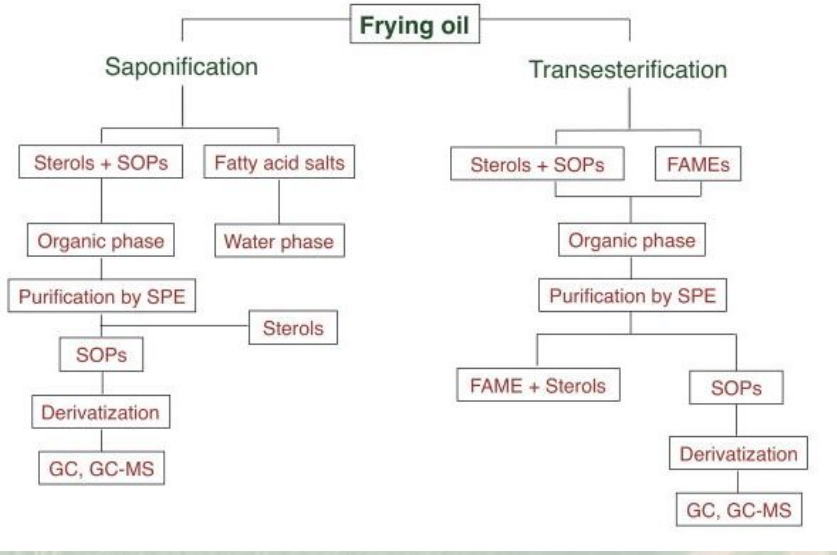
Можно ли хранить?

CC BY-NC-SA 3.0

6. Планирование хода эксперимента

Что необходимо ?

- Адаптация выбранного метода анализа к условиям лаборатории
- Закупка недостающего оборудования, реактивов, расходных материалов
- Разработка рабочего протокола
- Раскладка потребности времени на проведение эксперимента
- Разработка способов оценки успешности аналитического эксперимента



Интерференция ?

Проблема правильного выбора холостой пробы (образца сравнения).

Рабочий протокол

Должен включать подробно описанную последовательность всех операций и манипуляций в ходе подготовки к аналитическому эксперименту, его проведения и анализа полученных данных.

НЕ ДОЛЖЕН ИЗМЕНЯТЬСЯ В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПРОИЗВОЛЬНЫМ ОБРАЗОМ !!!

CC BY-NC-SA 3.0

7. Подготовка к экспериментальным операциям

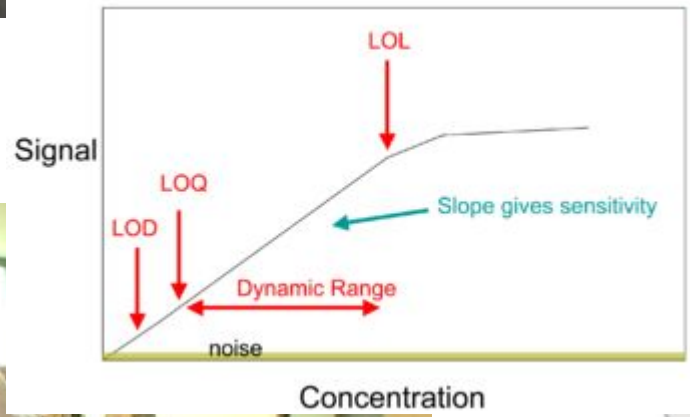
Зависит от эксперимента, например

Приготовление необходимых растворов, реагентов, стандартов и т.д.

Оценка качества исходных образцов

Предварительная (многоточесная) калибровка

Контроль правильности/точности работы оборудования



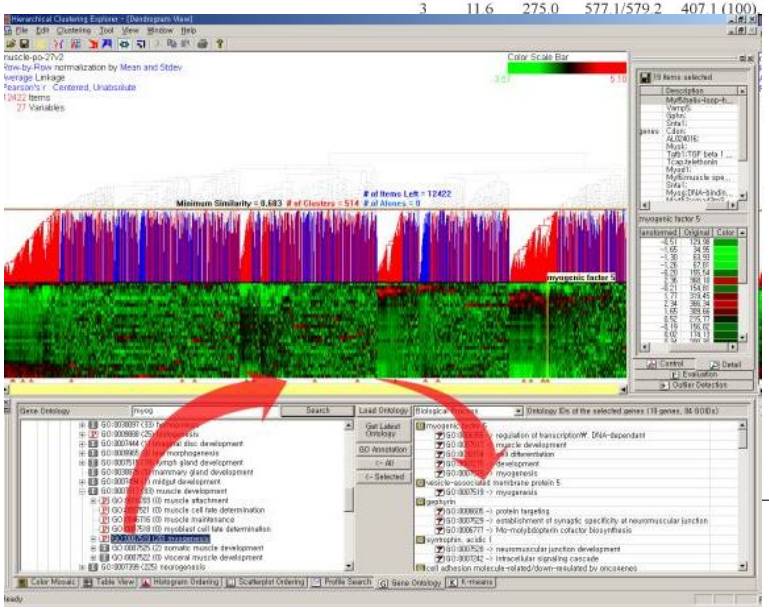
8. Выполнение аналитического эксперимента

CC BY-NC-SA 3.0

9. Анализ экспериментальных данных

Table 1. LC/MS data, deprotonated and protonated molecular ions (m/z) for peaks, including the retention times (Rt), MS/MS experiments and maximal absorption wavelength (λ_{max}) of the constituents found in hydroethanolic extract of *H. lupulus*.

Cmpd	Rt (min)	UV/vis Abs λ_{max} (nm)	(M-H)-/(M+H)+ (m/z)	MS/MS m/z (ESI-) (%)	Proposed structure
1	5.6	260.0	635.0/637.0	534.9 (40), 503.2 (100), 293.1 (30)	Unknown compound
2	6.4	ND	191.0/--	173.0 (10), 111.1 (100)	Quinic acid
3	11.6	275.0	577.1/579.2	407.1 (100)	Procyanidin dimer
					Rutin (quercetin-3-O-rutinoside)
					Oxidized cohumulinone derivative
					Kaempferol-3-*O*-rutinoside
					Oxidized humulinone derivative
					Cohulupone
					Hulupinic acid



Необходимые расчеты

Не являясь собственно экспериментальными данными, конечные результаты обучно получаются после более или менее сложных математических расчетов.

Статистический анализ

Необходим как для ослабления воздействия случайных погрешностей на результаты анализа, так и для выявления систематических ошибок и для оценки достоверности результатов.

Оценка достоверности результатов !

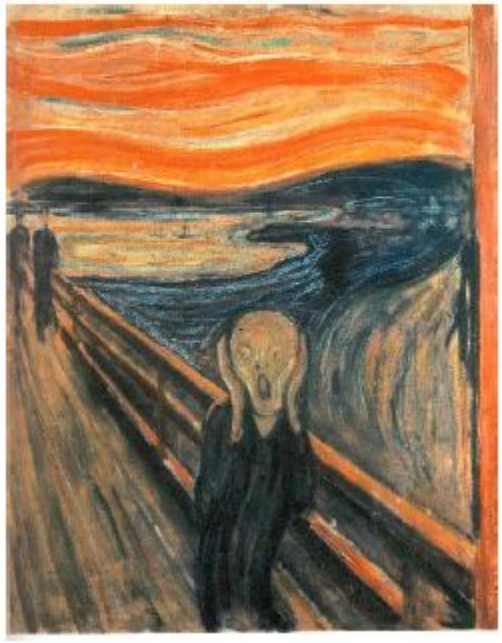
Аналитические результаты без оценки их достоверности не могут быть признаны обоснованными и потому не имеют никакого смысла.

CC BY-NC-SA 3.0

Hugo Kubinyi, www.kubinyi.de

Some Problems in Statistical Analyses

- inappropriate biological data
- wrong scaling of biological data
- data from different labs
- different binding modes
- mixed data (e.g. oral absorption and bioavailability)
- different mechanism of action (e.g. toxicity data)
- too few data points
- too many single points
- lack of chemical variation
- clustered data
- small variance of y values
- systematic error/s in y
- too large errors in y values
- outliers / wrong values
- wrong model selection



Why Models Fail

Hugo Kubinyi

Germany

kubinyi@t-online.de

www.kubinyi.de

CC BY-NC-SA 3.0