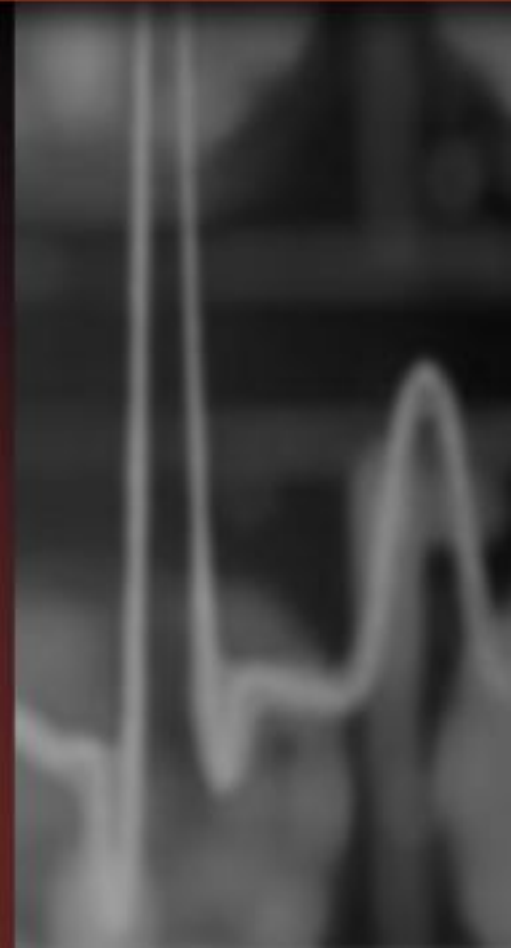


Современные методы исследования БАС

Методы выделения и анализа.

Лекция 2



Буферные растворы

- Буферные растворы - это растворы, концентрация ионов водорода (pH) которых не изменяется от прибавления ограниченных количеств сильной кислоты или щелочи.
- Основные типы:
 - Слабая кислота и ее анион A- /HA
 - Слабое основание и его катион B/BN+
 - Анионы кислой и средней соли или двух кислых солей
 - Ионы и молекулы амфолитов

pH – водородный показатель

pH (произносится «пэ аш», английское произношение англ. *pH* — pi:'eɪf «Пи эйч») - мера активности (в очень разбавленных растворах она эквивалентна концентрации) ионов водорода в растворе, и количественно выражающая его кислотность, вычисляется как отрицательный (взятый с обратным знаком) десятичный логарифм активности водородных ионов, выраженной в молях на литр:

$$pH = - \lg[H^+]$$

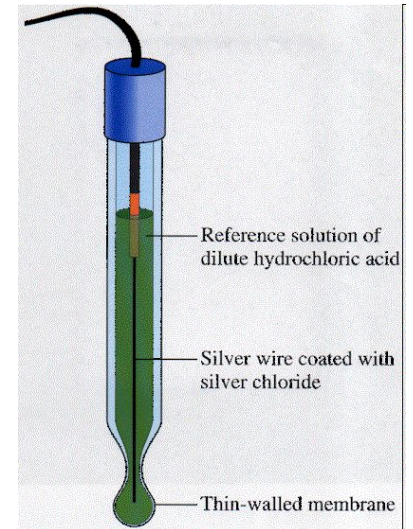
В чистой воде при 22 °С концентрации ионов водорода ($[H^+]$) и гидроксид-ионов ($[OH^-]$) одинаковы и составляют 10^{-7} моль/л, это напрямую следует из определения ионного произведения воды, которое равно $[H^+] \cdot [OH^-]$ и составляет 10^{-14} моль²/л² (при 22 °С).

Вопреки распространённому мнению, pH может изменяться не только в интервале от 0 до 14, а может и выходить за эти пределы.

Например, при концентрации ионов водорода $[H^+] = 10^{-15}$ моль /л, $pH = 15$, при концентрации ионов гидроксида 10 моль /л $pOH = -1$.

Измерение pH

- Индикаторы
- pH - метры



Уравнение Хендерсона - Хассельбаха

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \longrightarrow [H^+] = K' \frac{[HA]}{[A^-]} \longrightarrow -\lg [H^+] = -\lg K' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

$$pH = pK' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]} \longrightarrow \boxed{pH = pK' + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad pH = pK' + \lg \frac{[\text{Акцептор протонов}]}{[\text{Донор протонов}]}}$$

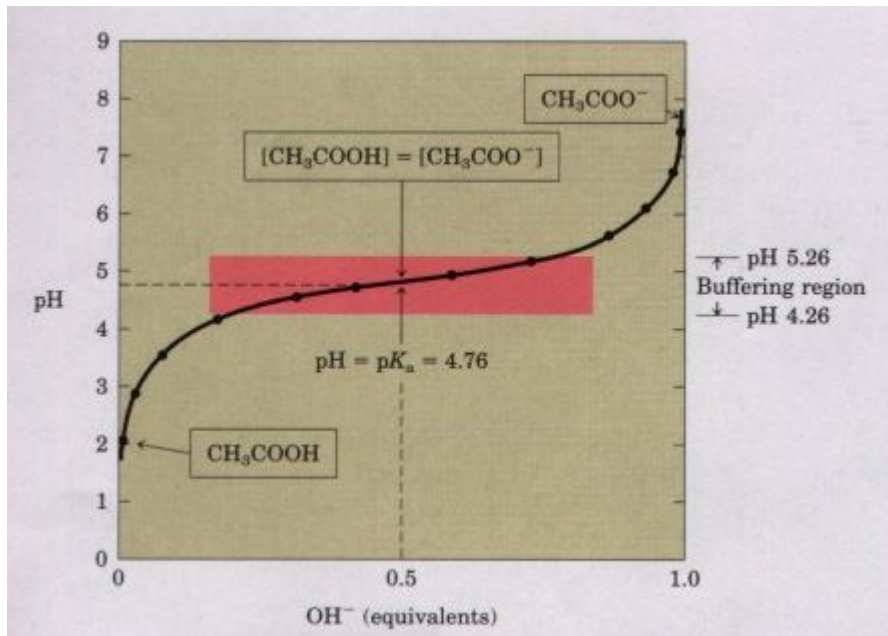
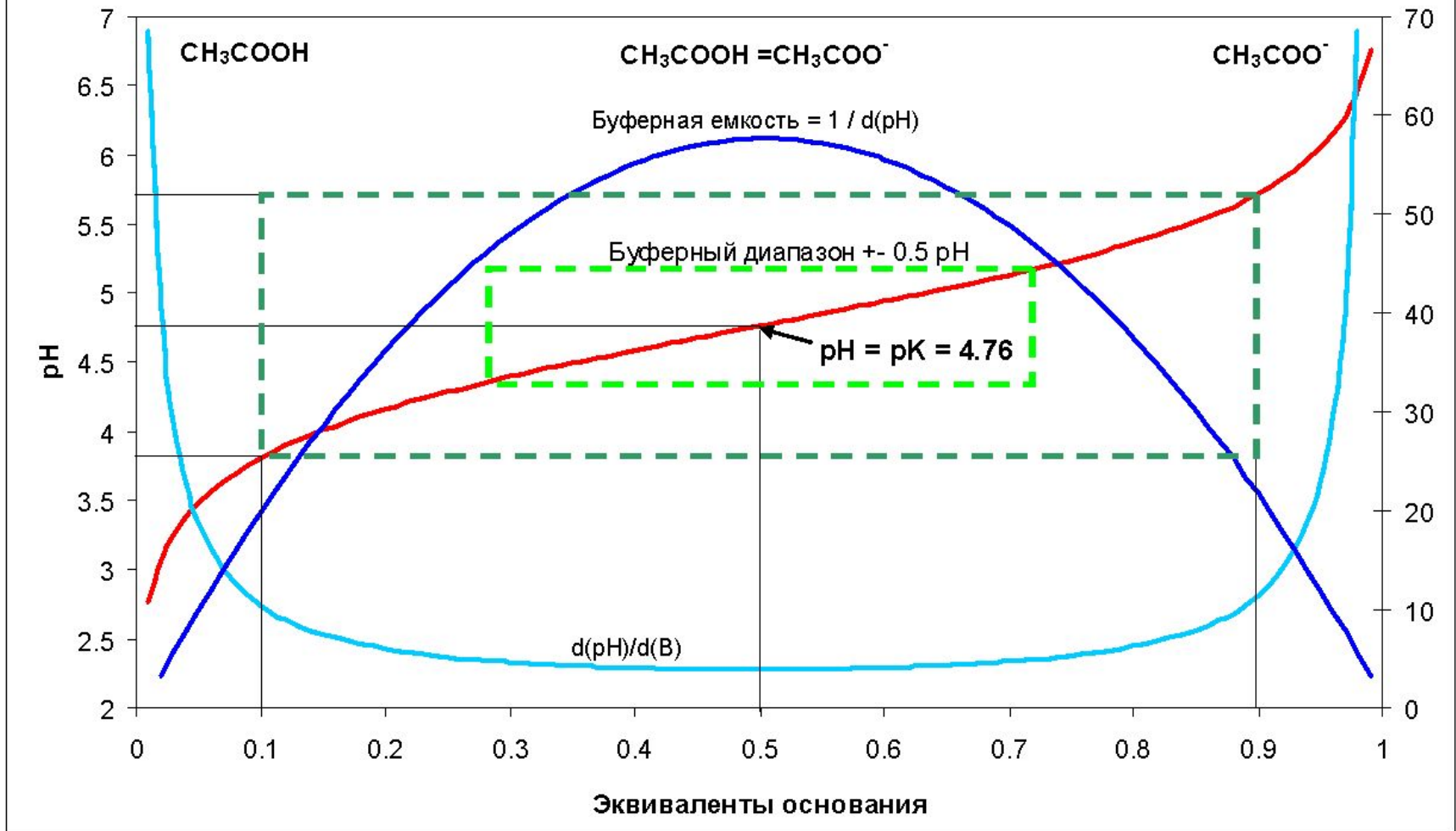


Table 4-7 Dissociation constant and pK_a of some common weak acids (proton donors) at 25 °C

Acid	K _a (M)	pK _a
HCOOH (formic acid)	1.78 × 10 ⁻⁴	3.75
CH ₃ COOH (acetic acid)	1.74 × 10 ⁻⁵	4.76
CH ₃ CH ₂ COOH (propionic acid)	1.35 × 10 ⁻⁵	4.87
CH ₃ CH(OH)COOH (lactic acid)	1.38 × 10 ⁻⁴	3.86
H ₃ PO ₄ (phosphoric acid)	7.25 × 10 ⁻³	2.14
H ₂ PO ₄ ⁻ (dihydrogen phosphate)	1.38 × 10 ⁻⁷	6.86
HPO ₄ ²⁻ (monohydrogen phosphate)	3.98 × 10 ⁻¹³	12.4
H ₂ CO ₃ (carbonic acid)	1.70 × 10 ⁻⁴	3.77
HCO ₃ ⁻ (bicarbonate)	6.31 × 10 ⁻¹¹	10.2
NH ₄ ⁺ (ammonium)	5.62 × 10 ⁻¹⁰	9.25

Кривая титрования CH_3COOH сильным основанием - ацетатный буфер



Буферная емкость определяется количеством эквивалентов сильной кислоты или основания, которые необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы изменить его pH на единицу.

Буферная емкость

- Буферная емкость максимальна при соотношении кислоты и соли 1:1 $\Rightarrow \text{pH} = \text{pK}$.
- Хорошая – при $[\text{pK}+0.5, \text{pK}-0.5]$
- Достаточная – при $[\text{pK}+1, \text{pK}-1]$

Что происходит с pH при разбавлении буфера?

Что происходит с буферной емкостью при разбавлении буфера?

Буферная емкость

- Буферная емкость максимальна при соотношении кислоты и соли 1:1 $\Rightarrow \text{pH} = \text{pK}$.
- Хорошая – при $[\text{pK}+0.5, \text{pK}-0.5]$
- Достаточная – при $[\text{pK}+1, \text{pK}-1]$
- Чем выше концентрация раствора, тем больше его буферная емкость.
Концентрация кислоты и соли в буферных растворах обычно бывает порядка 0,05—0,20 М.

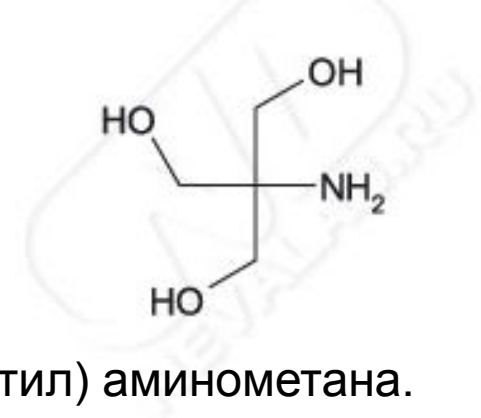
Требования к буферным растворам

1. Обладать достаточной буферной емкостью в требуемом диапазоне значений pH.
2. Обладать высокой степенью чистоты.
3. Хорошо растворяться в воде и не проникать через биологические мембраны.
4. Обладать устойчивостью к действию ферментов и гидролизу.
5. pH буферных растворов должен как можно меньше зависеть от их концентрации, температуры и ионного или солевого состава среды.
6. Не оказывать токсического или ингибирующего действия.
7. Комплексы буфера с катионами должны быть растворимыми.
8. Не поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра.

Буферные растворы

- Ацетатный, цитратный, боратный
- Аммиачный, ТРИС
- Фосфатный, гидрокарбонатный

ТРИС



Трис (tris) — сокращённое название трис (гидроксиметил) аминометана.

Является главным компонентом буферных растворов, широко применяющихся в биохимии и молекулярной биологии.

Наиболее распространённые буферы на основе триса — ТАС (трис — ацетат — ЭДТА) и ТБЕ (трис — борат — ЭДТА).

Трис биологически инертен и не вступает в реакции, катализируемые большинством ферментов.

$pK_a = 8,6$, что позволяет готовить на его основе буферы в диапазоне pH от 7,0 до 9,2. Физиологические значения pH (7,35—7,45) попадают в этот диапазон.

Использование комбинированных рН электродов.

- Между измерениями рабочая часть электрода должна находиться в буфере для заполнения электрода (обычно: {насыщенный KCl}, {4М KCl насыщенный AgCl}, {1М KCl насыщенный AgCl} и т. п.). Ни в коем случае - **не "сухой"** и **не "в дистилляте"**!
- Электрод портится не только из-за измерения в грязных/белковых растворах. Проблемы может вызвать и его **высушивание**.
- О проблемах с электродом может свидетельствовать медленная установка рН (достижение 95% величины измерения более, чем за 45сек.)

Центрифугирование

- Центрифугирование (от центр и лат. fuga — бегство, бег), разделение неоднородных систем под действием центробежных сил.
- Мы имеем дело с жидкостными системами – суспензиями и эмульсиями.

Термины и определения

- **Диспёрсная система́** — это образования из двух или более числа фаз (тел), которые совершенно или практически не смешиваются и не реагируют друг с другом химически. Первое из веществ (*дисперсная фаза*) мелко распределено во втором (*дисперсионная среда*). Если фаз несколько, их можно отделить друг от друга физическим способом (центрифугировать, сепарировать и т. д.).
- **Эмульсия́** (новолат. *emulsio*, от лат. *emulgeo* — дою, выдаиваю) — дисперсная система с жидкой дисперсионной средой и жидкой дисперсной фазой. Эмульсии состоят из несмешиваемых жидкостей.
- **Суспензия́**, или **взвесь** (лат. *suspensio*, буквально — подвешивание, от лат. *suspendo* — подвешиваю) — смесь веществ, где твёрдое вещество распределено в виде мельчайших частичек в жидком веществе во взвешенном (неосевшем) состоянии. Обычно размер частиц > 10 мкм

Термины и определения

- **Коллоидные системы (коллоиды, др.-греч. κόλλα — клей и εἶδος — вид; «клеевидные»)** — дисперсные системы, промежуточные между истинными растворами и грубодисперсными системами — взвесьями.
 - Коллоидные частицы не препятствуют прохождению света.
 - В прозрачных коллоидах наблюдается рассеивание светового луча (эффект Тиндаля).
 - Дисперсные частицы не выпадают в осадок за счёт броуновского движения.
- **Золи** (нем. *sole* от лат. *solutio* — раствор) = коллоидные растворы
- **Гели** (от лат. *gelo* — «застываю») — структурированные дисперсные системы, состоящие из высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ. Наличие трёхмерного полимерного каркаса (сетки) сообщает гелям механические свойства твёрдых тел - отсутствие текучести, способность сохранять форму, прочность и способность к деформации (пластичность и упругость).
 - «гель» — химия, химическая технология, косметические и бытовые средства;
 - «желе» — в кулинарии сладкие фруктовые или ягодные студенистые блюда;
 - «студень» — в кулинарии мясное или рыбное блюдо из охлажденного мясного (или рыбного) бульона с кусочками мяса (или рыбы)

Центрифугирование.

- Скорость осаждения, или седиментации, зависит от центробежного ускорения (G), прямо пропорционального угловой скорости ротора (ω , в рад/с) и расстоянию между частицей и осью вращения (R , в см): $G = \omega^2 * R$.
- Угловая скорость ротора в оборотах в минуту N (об./мин)
 $\omega = 2\pi N/60 = \pi N/30$
- Центробежное ускорение: $G = \pi^2 * N^2 * R / 900$ (об./мин)
- *Центробежное ускорение* обычно выражается в единицах g и называется *относительным центробежным, ускорением*
- $ОЦУ = G / 980 = 1,11 * 10^{-5} * N^2 * R$

Что такое g ? Чему равно?

Закон Стокса, видоизмененный Сведбергом и Никольсом

$$t = \frac{1}{K} \cdot \frac{\eta \ln x_2/x_1}{\omega^2 r^2 (d_p - d_m)},$$

где t — время в секундах, за которое частица с удельным весом d_p пройдет расстояние от точки с радиусом вращения x_1 до точки с радиусом вращения x_2 (рис. 190) в жидкости с удельным весом d_m ; r — радиус частицы в сантиметрах; ω — угловая скорость в *радиан/сек*; η — вязкость жидкости в пуазах (изменяется в зависимости от температуры); K — константа, характерная для частицы данной формы. Для частиц шарообразной формы K равна $2/9$, или 0,222; для природных фосфатов с частицами неправильной формы $K = 0,154$.

время, необходимое для осаждения гомогенных сферических частиц, обратно пропорционально квадрату их радиусов и разности плотностей частиц и среды и прямо пропорционально вязкости среды!

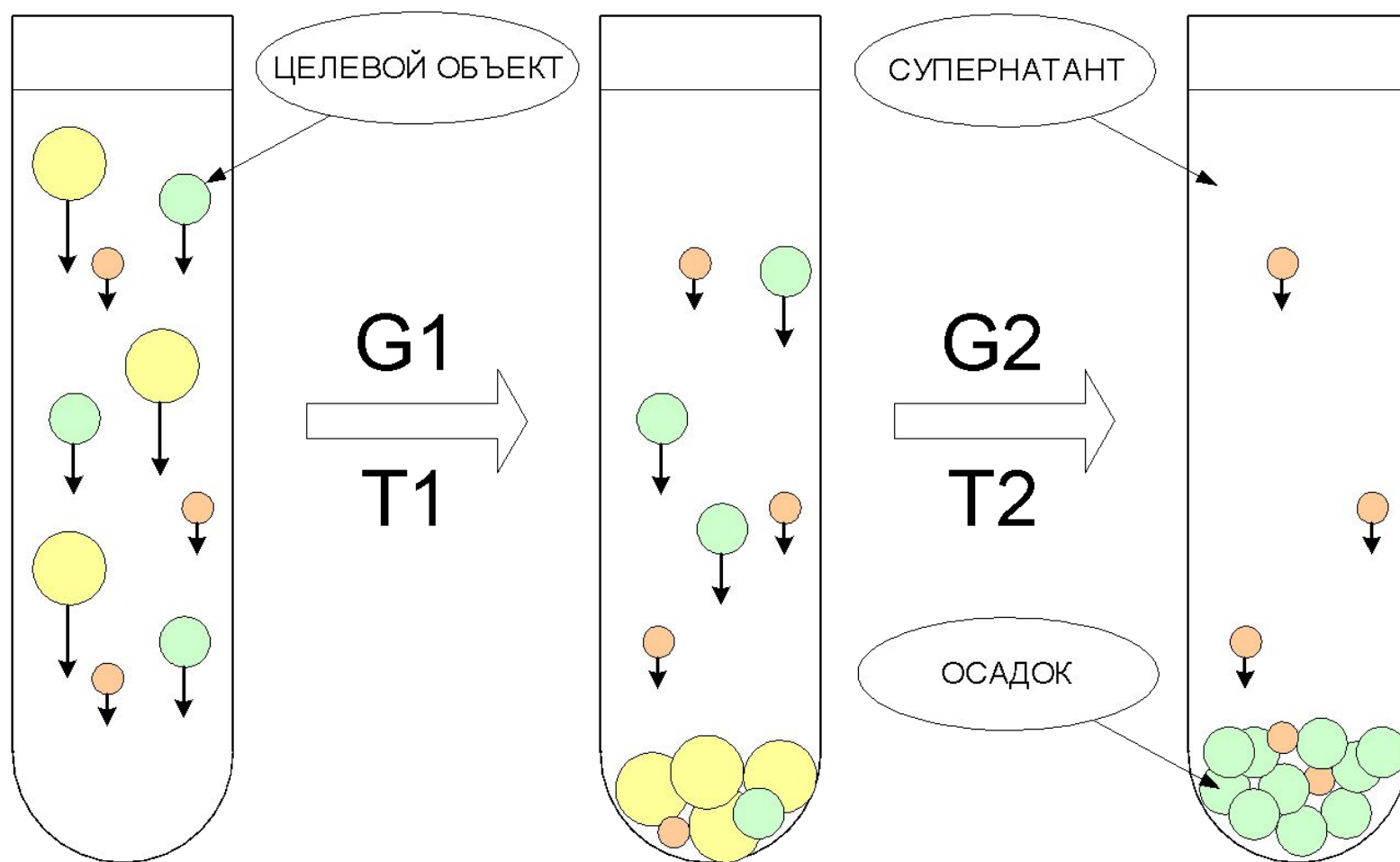
Центрифугирование

- Препаративное
 - Аналог фильтрования
 - Разделение объектов
- Аналитическое
 - Молекулярные веса
 - Изучение конформаций макромолекул

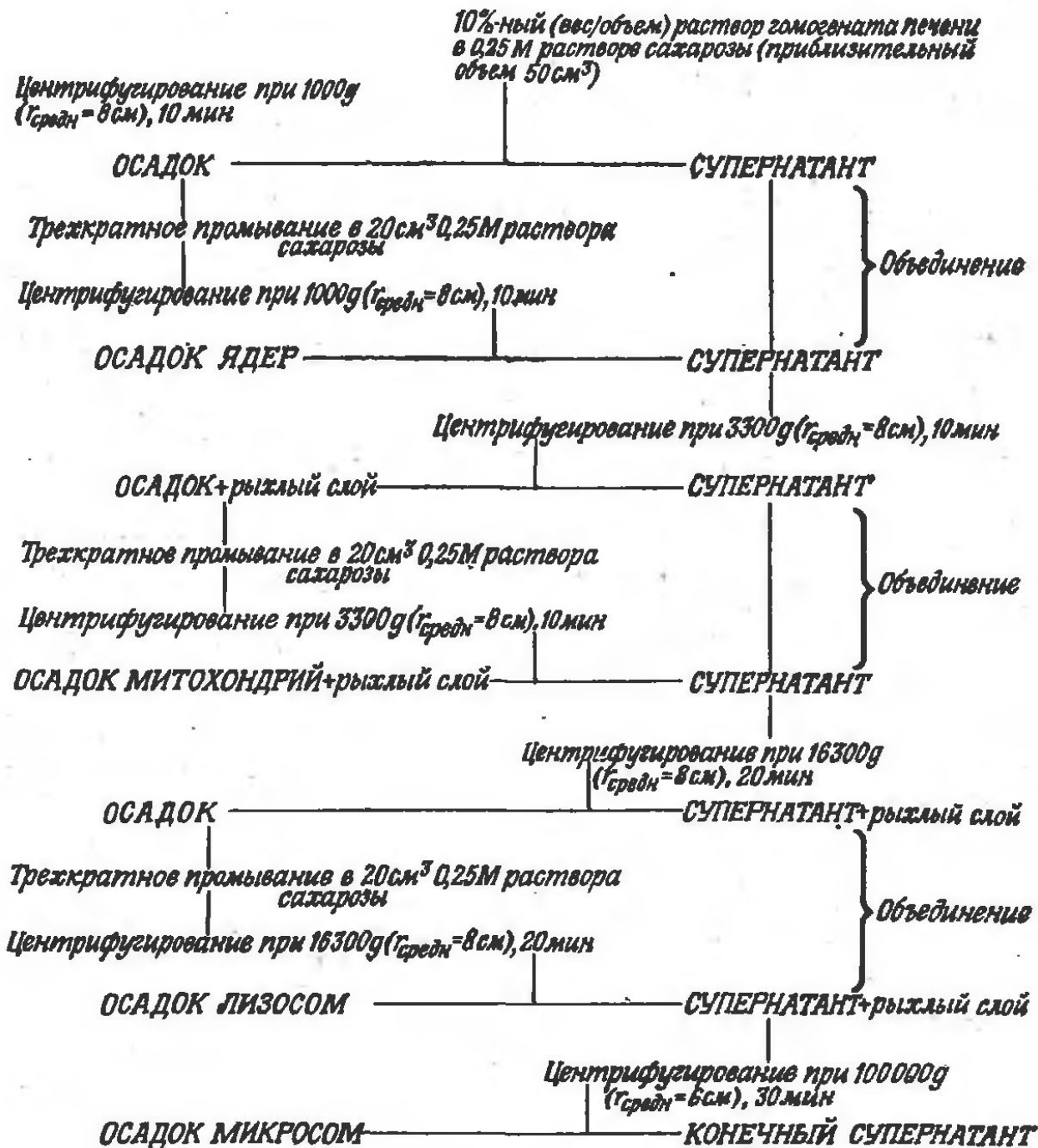
Методы центрифугирования

- Дифференциальное
- Зонально-скоростное
- Изопикническое

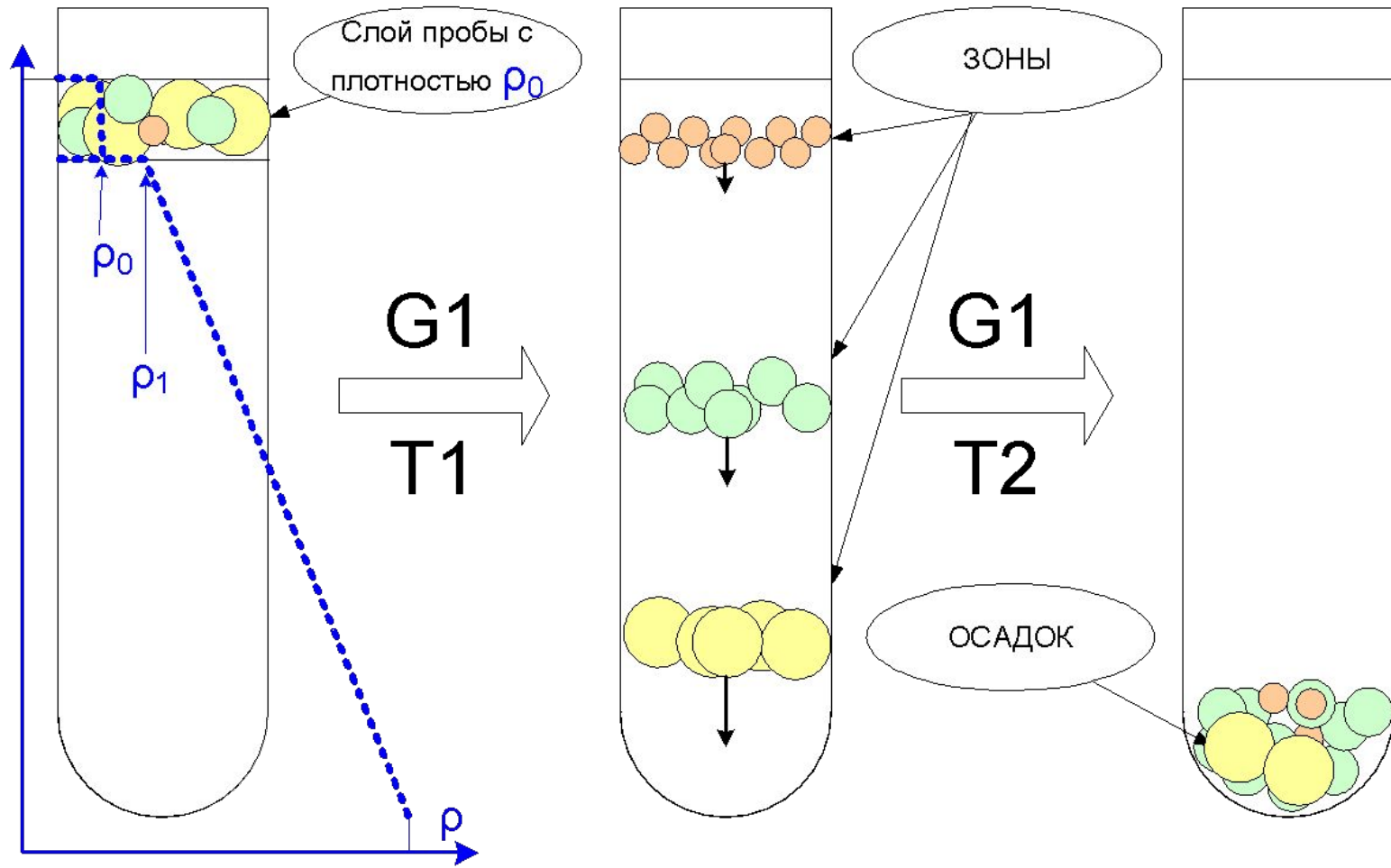
Дифференциальное центрифугирование



Можно ли получить чистую фракцию?



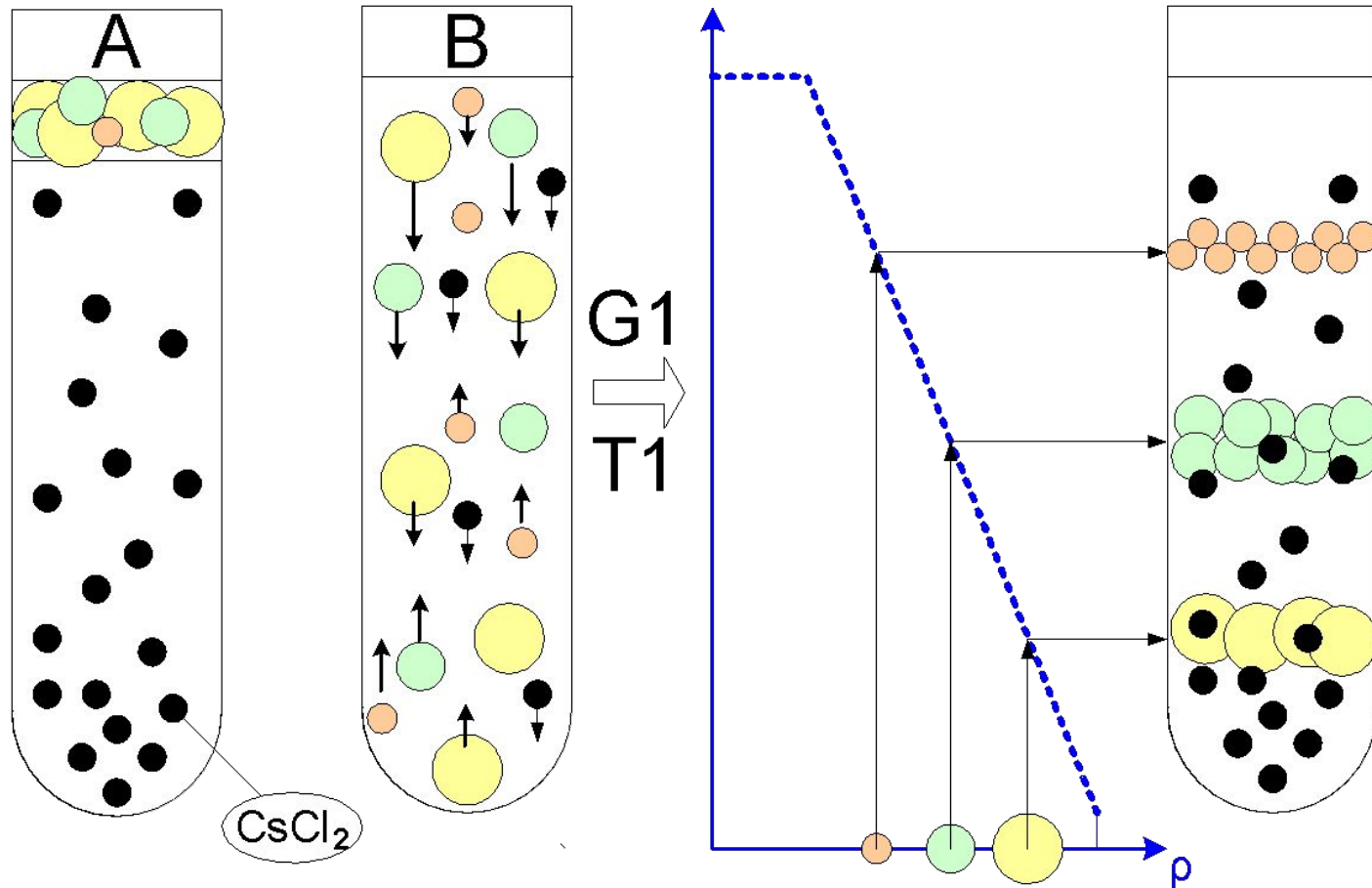
Зонально-скоростное центрифугирование



В пробирке заранее создается градиент плотности ρ (например раствором сахарозы)

Плотность увеличивается ко дну пробирки. $\rho_0 < \rho_1$

Изопикническое центрифугирование

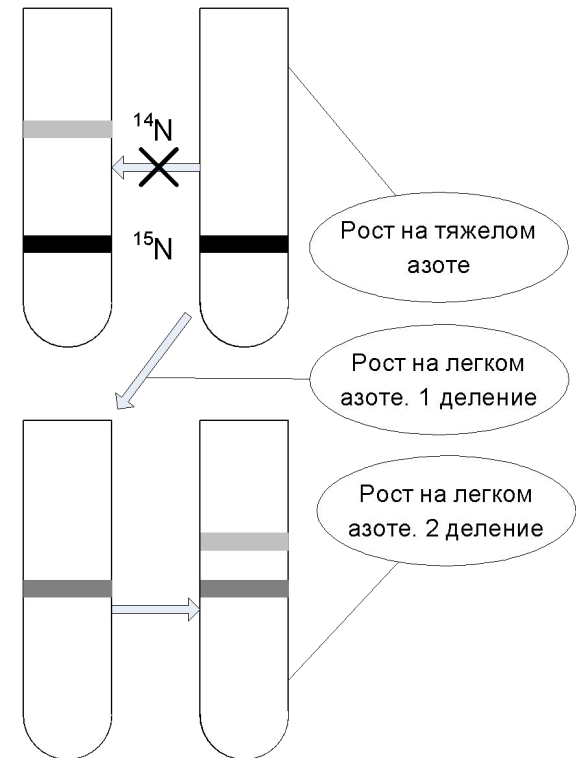
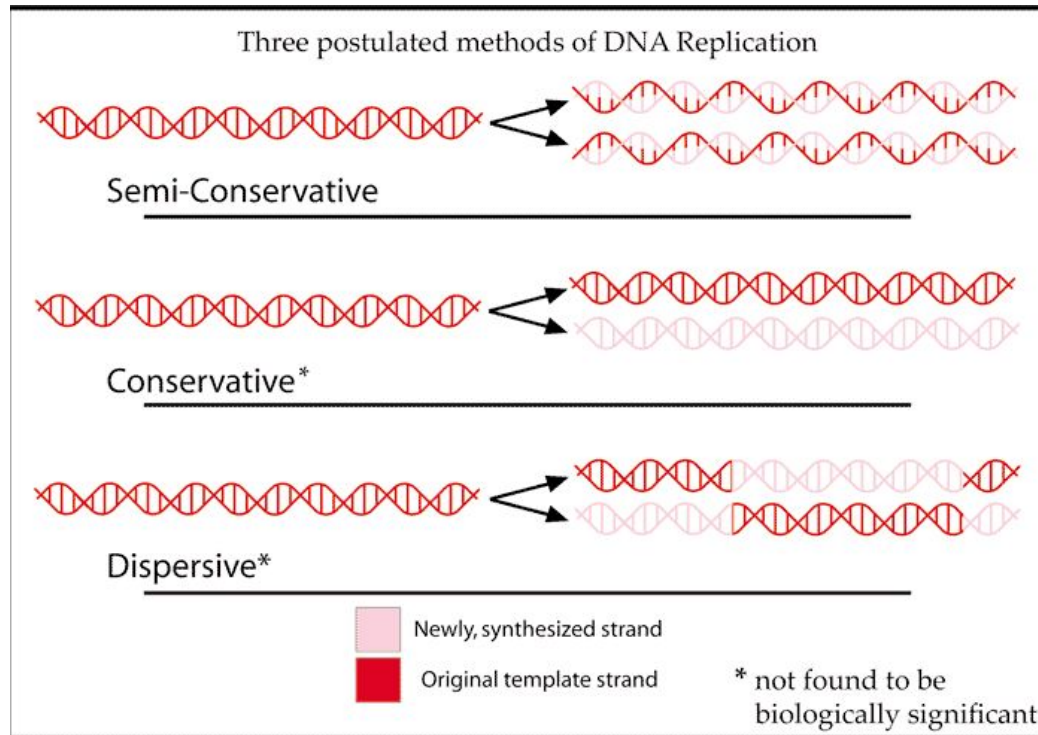


A. В пробирке заранее создается градиент плотности ρ (CsCl_2), проба наслаивается

B. Градиент плотности формируется в процессе центрифугирования, проба в растворе

Почему формируется градиент плотности?

Эксперимент Мезельсона и Сталя



1. *E. coli* в среде, богатой ^{15}N . Затем их ДНК была выделена и центрифугирована в градиенте плотности CsCl .
2. Эти бактерии затем были помещены обратно в ^{14}N среду, где им было позволено разделить только один раз. Затем из клеток были извлечены ДНК, их вес оказался больше веса ДНК бактерий, выращенных в среде, богатой ^{14}N , но меньше веса ДНК бактерий, выращенных в ^{15}N среде
3. Было выращено второе поколение бактерий, и их ДНК также было взвешено. Выяснилось, что клетки содержат как полностью «лёгкие» ДНК, так и «гибридные». Этот факт позволил исключить гипотезу дисперсного механизма репликации.

Препаративные центрифуги

- *Центрифуги общего назначения*
 - 8000 об./мин
 - ОЦУ до 6000 г.
- *Скоростные центрифуги*
 - 25 000 об./мин
 - ОЦУ до 89 000 г
- *Препаративные ультрацентрифуги*
 - 75 000 об./мин
 - ОЦУ до 510 000 г

Центрифуги общего назначения

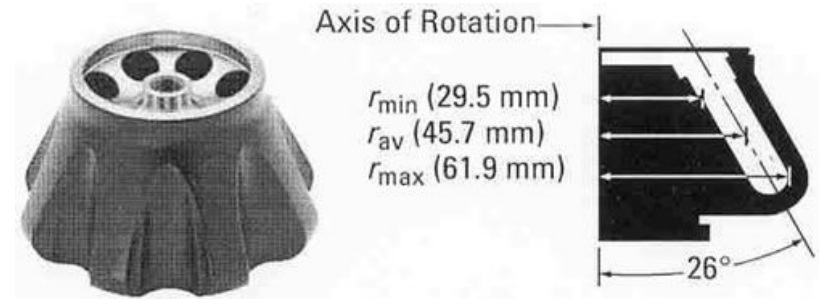


Рис. 1

Горизонтальный ротор (бакет-ротор) на 12 пробирок диаметром до 18 мм. (центрифуга LMC-3000, BioSan)



Рис. 2

Горизонтальный ротор (бакет-ротор) на 12 пробирок диаметром до 15 мм (центрифуга LMC-3000, BioSan)

Угловые роторы и роторы с подвесными стаканами

УРАВНОВЕШИВАНИЕ И СИММЕТРИЯ!

Скоростные центрифуги



- Роторы обоих типов, но!
- Обязательно охлаждение
- Броня
- Гибкая подвеска ротора
- Автоматика

Ультрацентрифуги

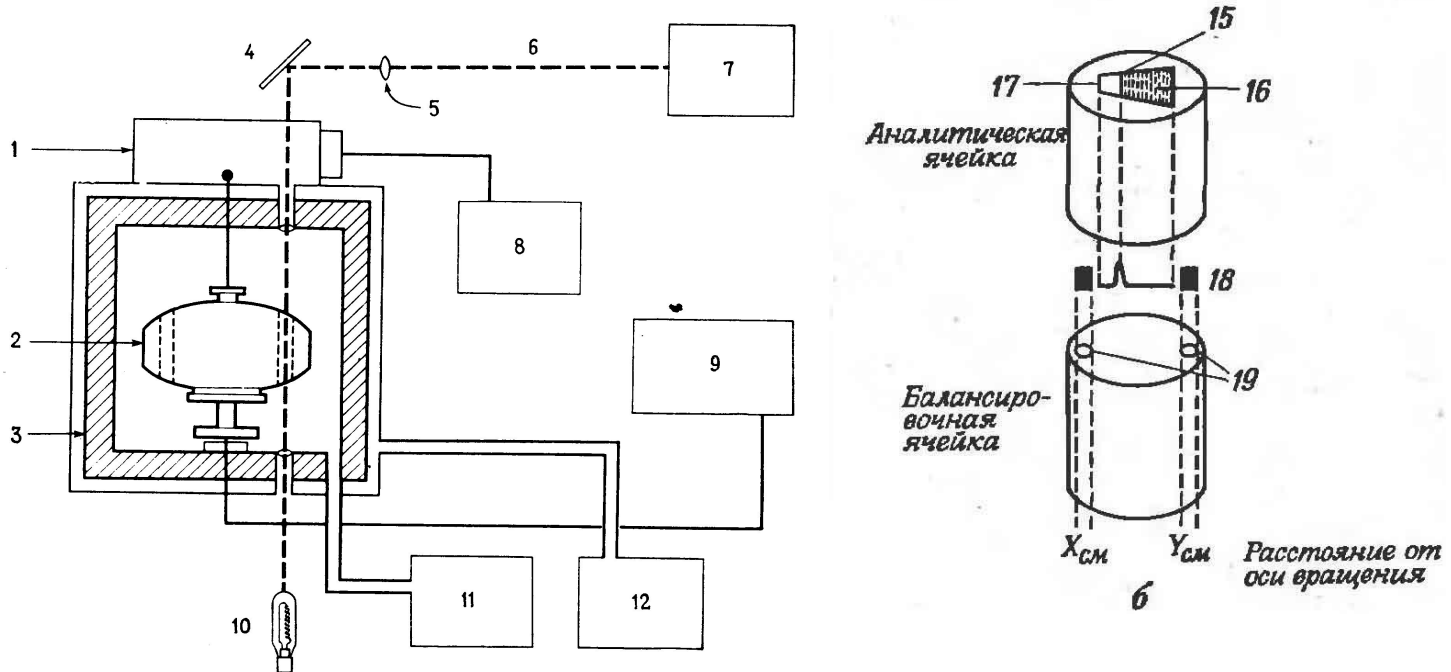


- Угловые роторы
- Обязательно охлаждение
- Вакуум
- Броня
- Гибкая или струнная подвеска ротора
- Автоматика

Аналитические ультрацентрифуги

- Идея ультрацентрифугирования была предложена А.В. Думанским в 1913, однако разработка современной теории седиментационного анализа стала возможной только после того, как [Т. Сведберг](#) в 1926 сконструировал высокоскоростную ультрацентрифугу.

41000 об/мин, ускорения — до 10^5 g



Подвеска на струне, газовая турбина, вакуум, холод, броня, оптическая система

УРАВНОВЕШИВАНИЕ И СИММЕТРИЯ!

Определение молекулярных весов

- По скорости седиментации
- Метод седиментационного равновесия
- Метод приближения к седиментационному равновесию

По скорости седиментации

- Константа седиментации это скорость, отнесенная к единице ускорения, имеет размерность времени (ее выражают в секундах).
- Величина константы седиментации, равная $1 \cdot 10^{-13}$ с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S).
- Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.
- Молекулярный вес молекул определяют по уравнению Сведберга

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

- M — молекулярный вес молекулы, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, s — коэффициент седиментации молекулы, D — коэффициент диффузии молекулы, \bar{v} — парциальный удельный объем, который можно рассматривать как объем, занимаемый одним граммом растворенного вещества, ρ — плотность растворителя.

Метод седиментационного равновесия

- Ультрацентрифугирование проводят вплоть до достижения частицами равновесия, устанавливающегося под действием центробежных сил, с одной стороны, и диффузионных — с другой, т. е. до тех пор, пока частицы не перестанут перемещаться. Затем по образовавшемуся градиенту концентрации рассчитывают молекулярный вес вещества 'согласно формуле

$$M = \frac{2RT \ln (c_2/c_1)}{\omega^2 (1 - \bar{v}\rho) (r_2^2 - r_1^2)}$$

- R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, ω — угловая скорость, ρ — плотность растворителя, \bar{v} — парциальный удельный объем, c_1 и c_2 — концентрация растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 от оси вращения
- Недостатком данного метода является то, что для достижения седиментационного равновесия необходимо длительное время — от нескольких дней до нескольких недель при непрерывной работе центрифуги.

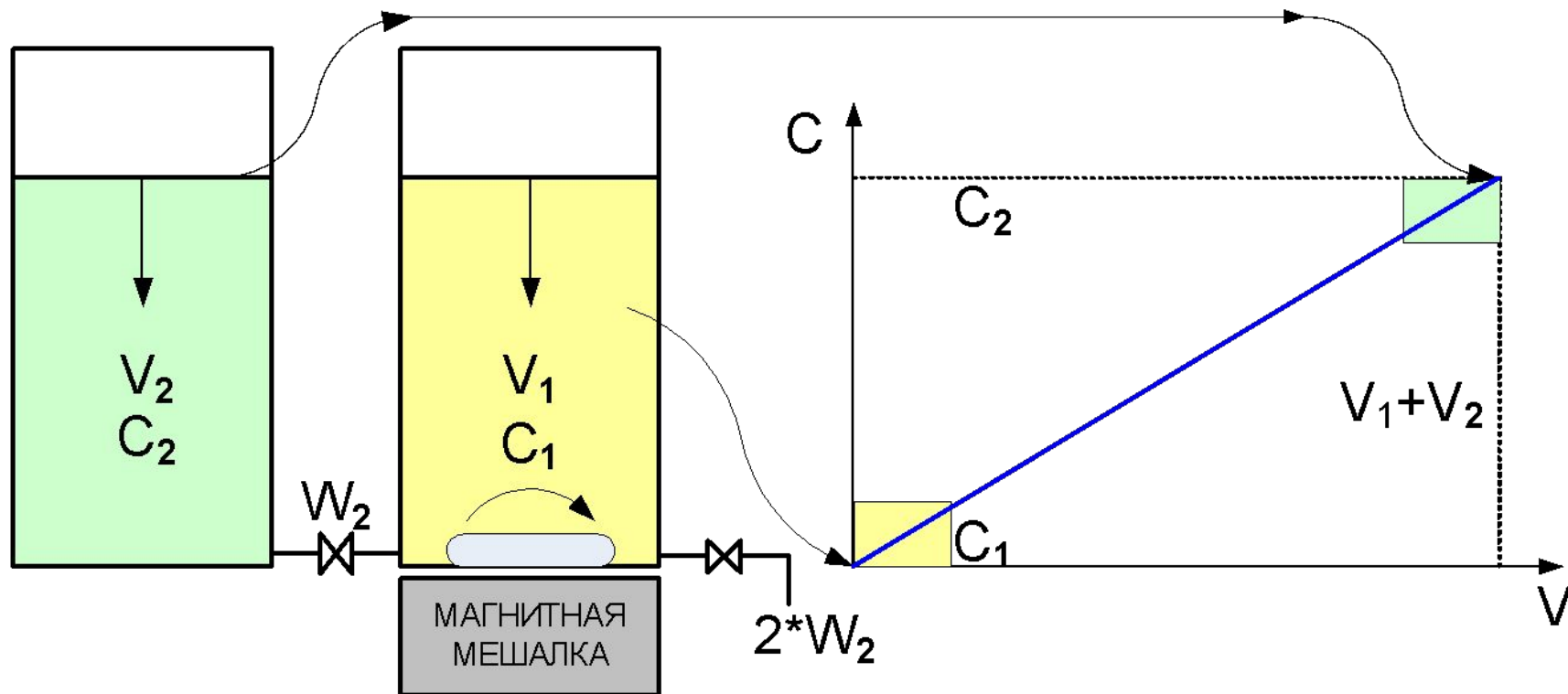
Метод приближения к седиментационному равновесию

- Этот метод был разработан для того, чтобы избавиться от недостатков предыдущего метода, связанных с большими затратами времени, необходимого для установления равновесия.
- С помощью него можно определять молекулярные веса, когда центрифугируемый раствор находится в состоянии приближения к равновесию.
- Вначале макромолекулы распределяются по всему объему аналитической ячейки равномерно; затем по мере центрифугирования молекулы оседают, и плотность раствора в области мениска постепенно уменьшается.
- Изменение плотности тщательно регистрируют, а затем путем сложных расчетов, включающих большое число переменных, определяют молекулярный вес данного соединения по формулам.

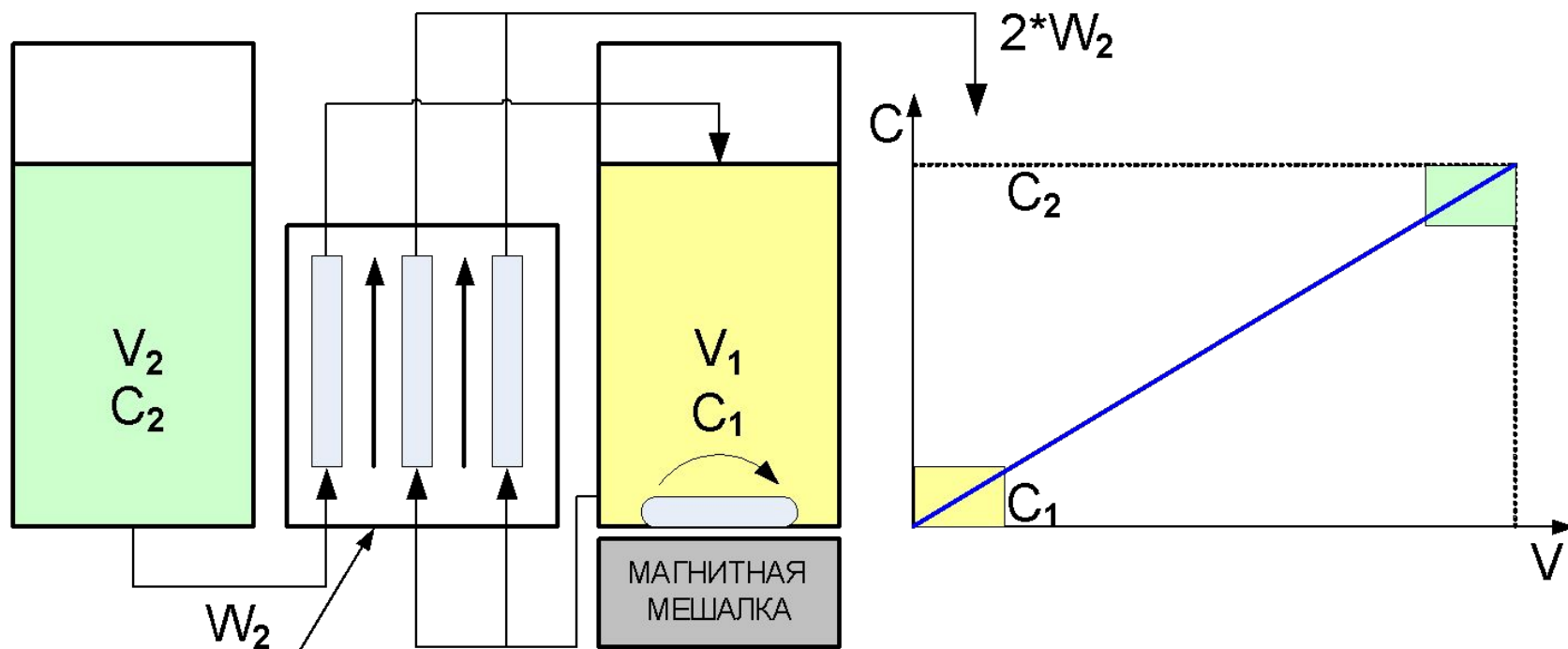
Методы формирования градиента

- Ступенчатый градиент
- Сообщающиеся сосуды
- Перистальтический насос
- Системы формирования градиента

Градиент с помощью сообщающихся сосудов



Градиент с помощью перистальтического насоса



Перистальтический насос позволяет перекачивать жидкости несколькими синхронными и равными потоками. Объединяя две трубки можно получить двойную объемную скорость.

Перистальтический насос

- Насос для перекачки жидкостей, текущих по гибким трубкам.
- Принцип действия основан на том, что ролики передавливают трубку с жидкостью, и двигаясь вдоль трубки, проталкивают жидкость вперёд.
- Обычно состоит из гибкой трубки, нескольких роликов, и поверхности (трека), к которой ролики прижимают трубку

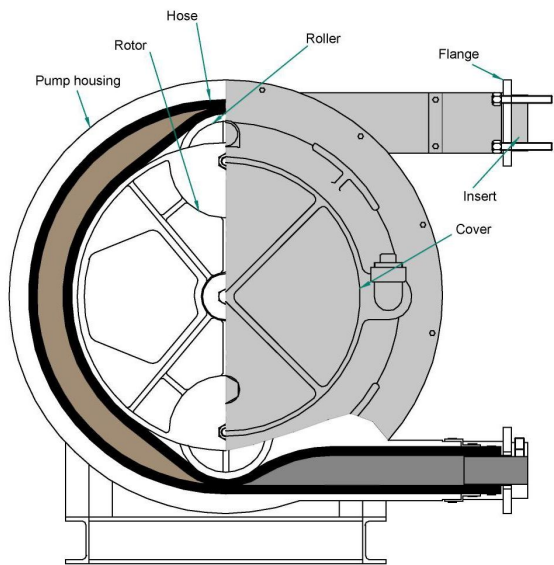
Перистальтические насосы - достоинства

- Среда и насос не взаимодействуют
 - Агрессивная среда
 - Чувствительные объекты
- Точность и неизменность дозирования $\pm 0,5 \%$
- Отсутствие пульсаций
- Широкий диапазон скоростей – зависит от трубки
- Параллельная перекачка
- Простота конструкции

Перистальтические насосы - недостатки

- Низкое рабочее давление
- Иногда трудно подобрать материал трубок

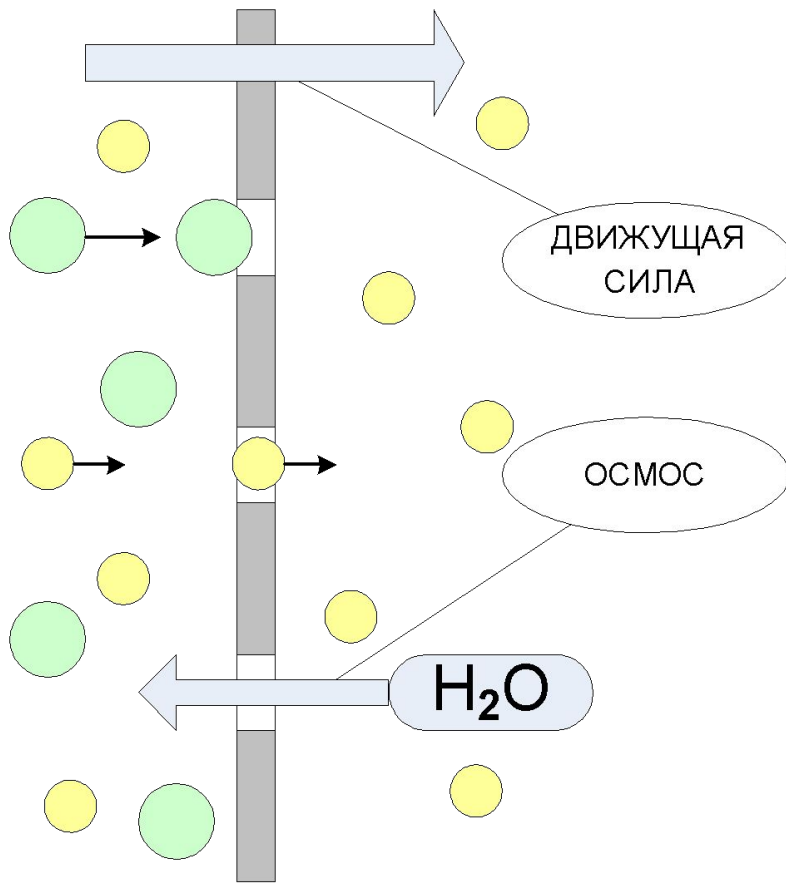
Перистальтические насосы



Как извлечь продукты разделения?

- Центрифужную пробирку прокалывают у основания и в нижнюю ее часть медленно вводят очень плотную среду, например 60—70%-ный раствор сахарозы (весовые %). Находящийся сверху раствор вытесняется, и фракции отбирают при помощи шприца, пипетки или специального приспособления, соединенного через трубочку с коллектором фракций.
- Если пробирки изготовлены из целлулоида или нитроцеллюлозы, фракции извлекают, надрезав пробирку специальным лезвием. Для этого центрифужную пробирку, закрепленную в штативе, надрезают непосредственно под нужной зоной и отсасывают фракцию шприцом или пипеткой.
- Сбор фракций осуществляют также, проколов основание пробирки тонкой полую иглой. Капли, вытекающие из пробирки через иглу, собирают в коллектор фракций для дальнейшего анализа.

Мембранные технологии

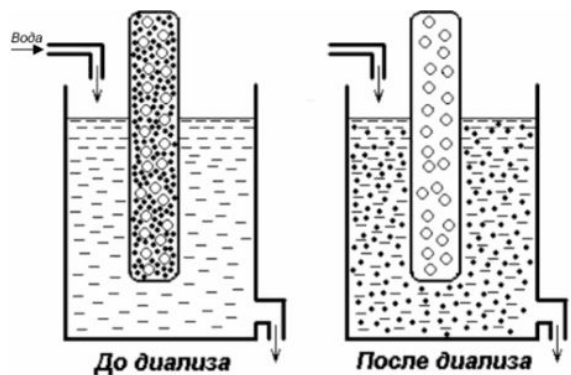


- Мембранные технологии основаны на разделении смесей жидкостей или газов, а также присутствующих в них частиц на составляющие компоненты с использованием частично проницаемых мембран.
- Мембрана позволяет определённым молекулам или ионам проходить через неё благодаря диффузии.
- Скорость прохождения зависит от давления, концентрации и температуры молекулы или растворённых веществ с обеих сторон, а также проницаемости мембраны для каждого раствора.
- Методы мембранных разделений различаются в зависимости от движущей силы, которая обеспечивает протекание процесса.

Мембранные технологии

- Градиент химических потенциалов => ДИАЛИЗ
- Электрическое поле => ЭЛЕКТРОДИАЛИЗ
- Градиент давлений => УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ
- Градиент давлений => ОБРАТНЫЙ ОСМОС

Диализ



1.4 Manipulation of Protein Solutions

19

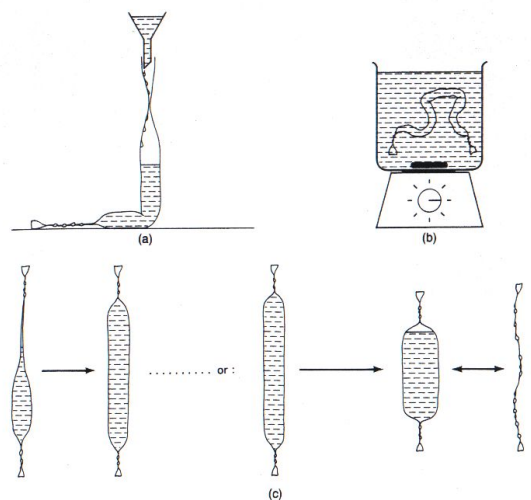
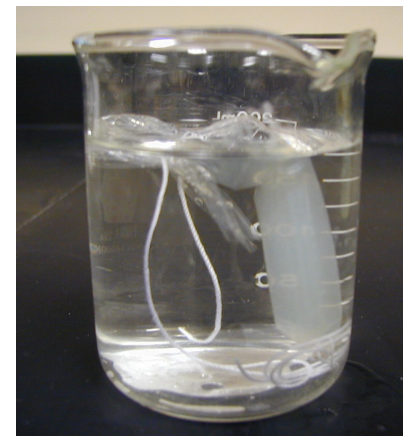
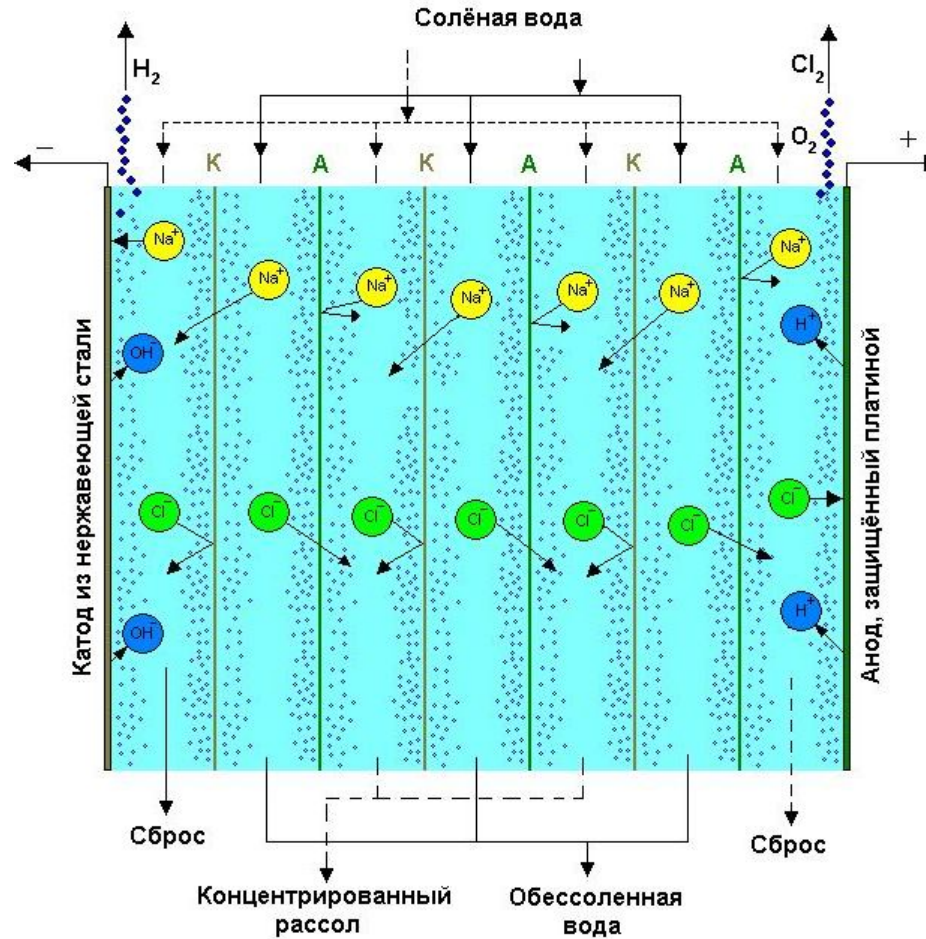


Figure 1.13. Use of the dialysis bag. (a) Filling with sample. (b) Agitation during dialysis. (c) Results of swelling due to osmotic forces.



Диализ применяют для очистки растворов высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных (например обессоливание) или для замены одних низкомолекулярных веществ на другие (перебуферивание).

Электродиализ



Электродиализ применяют для обессоливания. Например, для опреснения морской воды.

Ультрафильтрация

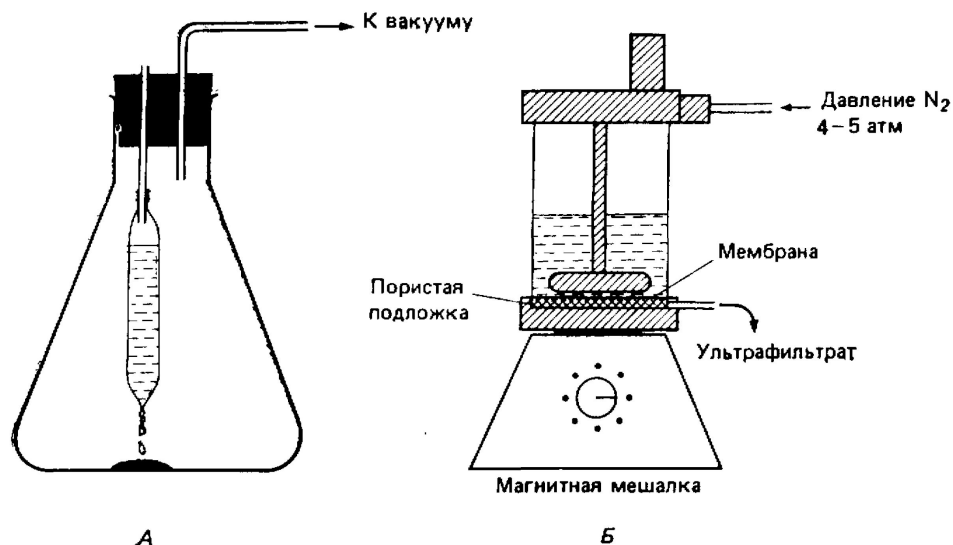


Рис. 1.13. Ультрафильтрация белковых растворов. А. Подвешенный диализный мешок сообщается с внешней атмосферой, а в колбе создается вакуум, так что максимальная разность давлений составляет менее 1 атм. Б. Ячейка для ультрафильтрации может работать при давлении до 5 атм. Фильтрат продавливается сквозь мембрану.

Ультрафильтрация применяется для концентрирования растворов ВМ веществ.