

Практическое применение аналитической химии и физико-химических методов анализа в биоинженерии.



Подготовил: студент группы ТБ-91
Петров Георгий Алексеевич.

Приняла: профессор и доктор
химических наук Кучменко Татьяна
Анатольевна.

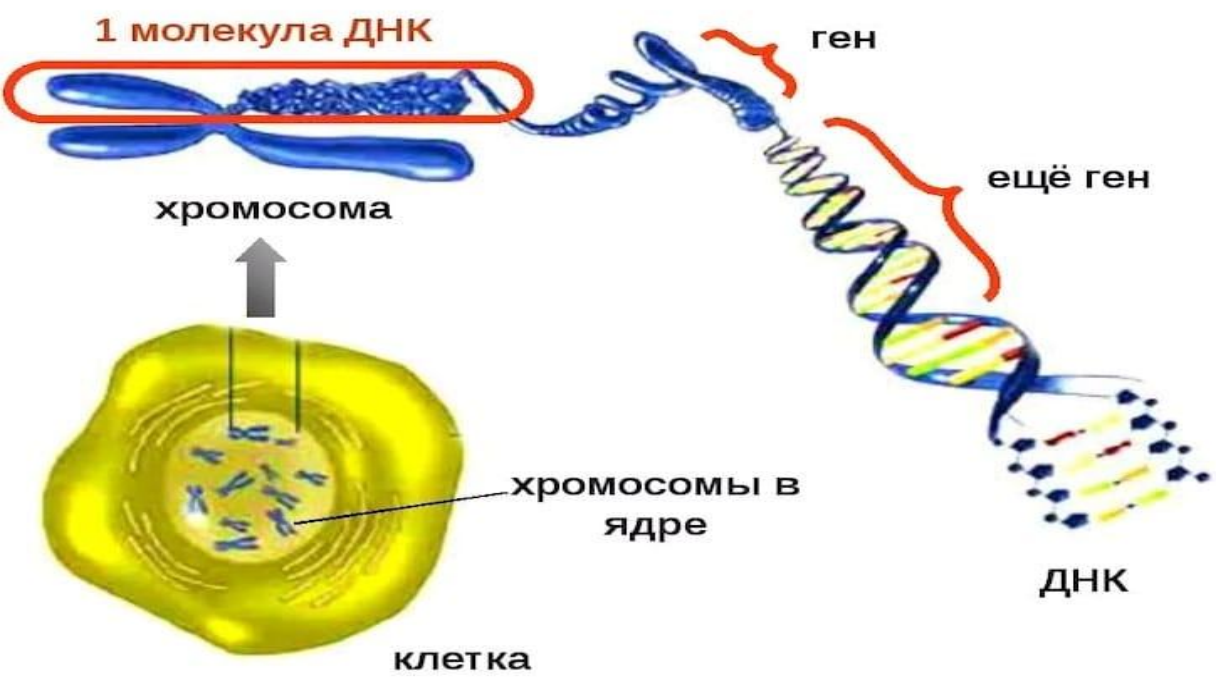
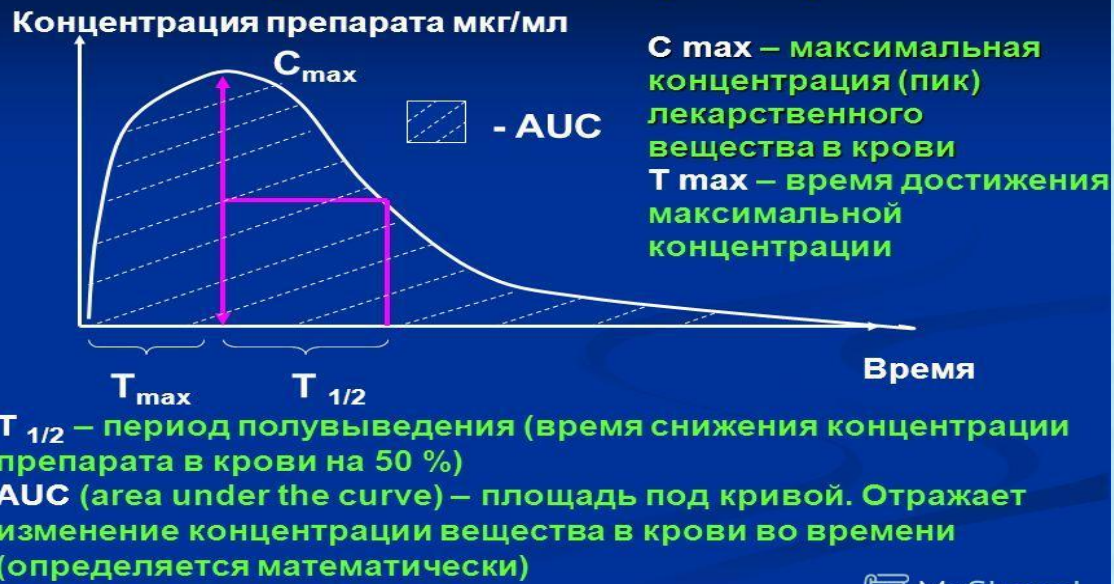
Что такое аналитическая химия?



Аналитическая химия — наука, развивающая теоретические основы химического анализа веществ и материалов и разрабатывающая методы идентификации, обнаружения, разделения и определения химических элементов и их соединений, а также методы установления химического состава веществ.



Элементы фармакокинетики лекарственных препаратов

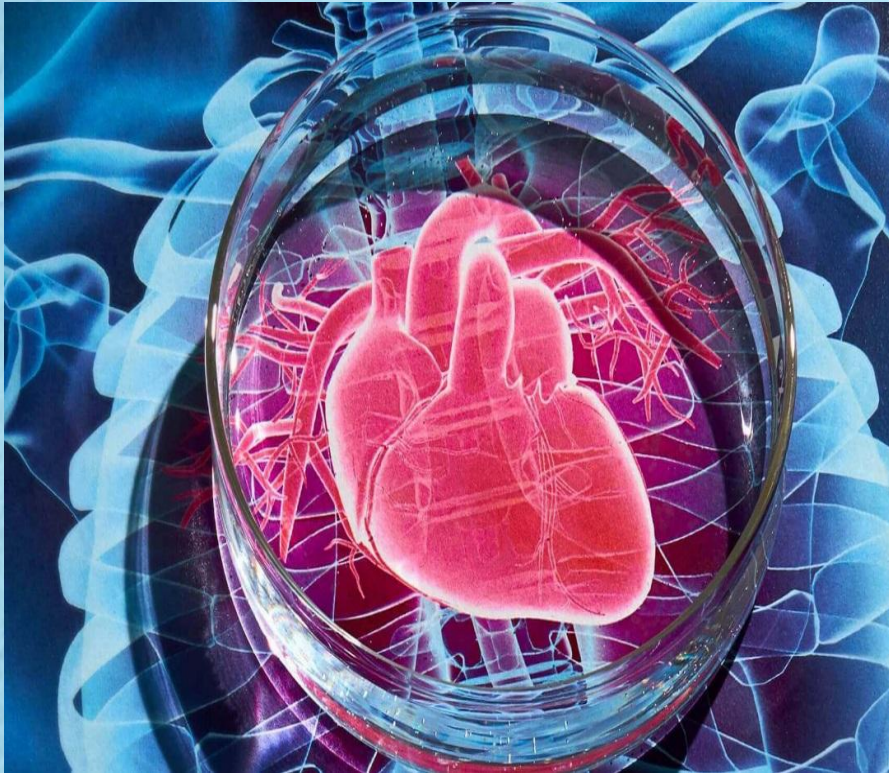


К менее распространенным медицинским исследованиям можно отнести поиск и определение новых маркеров заболеваний, фармакокинетику (изучение миграции и изменений лекарственных веществ в организме), допинг-контроль спортсменов, ДНК-анализы и др. Целью является обобщение имеющихся данных об анализе биологических тканей и жидкостей, применяемом в медицине, а также выявление основных направлений развития этой области аналитической химии.

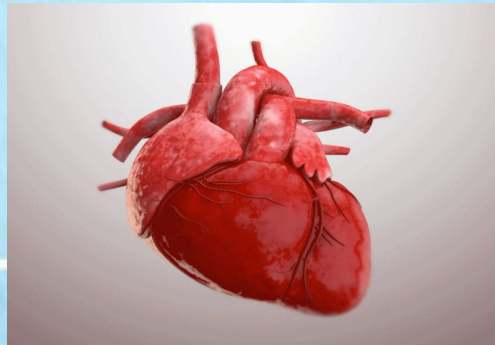
Аналитическая химия довольно длительное время не уделяла внимания медицинским и биологическим объектам. Методический уровень медико-биологических исследований, которыми занимались врачи или биологи, с точки зрения профессионала-аналитика был (а иногда и остается) довольно низким. В конце XX века в исследования медицинского назначения включается все больше и больше аналитических лабораторий. Этот процесс особенно характерен для США, где на биомедицинские исследования выделяются огромные средства. За это время были разработаны новые методы, прежде всего, метод иммуноанализа. В журналах по аналитической химии постоянно растет число публикаций, посвященных исследованию медицинских объектов.



Что такое БИОИНЖЕНЕРИЯ?



Биоинженерия (включая инженерию биологических систем) -- это применение понятий и методов биологии (и, во вторую очередь, физики, химии, математики и информатики) для решения актуальных проблем связанных с науками о живых организмах и/или их приложениями, с использованием аналитических и синтетических методологий инженерного дела, а также его традиционной чувствительности к стоимости и практичности найденных решений.



Сфера деятельности биоинженерии



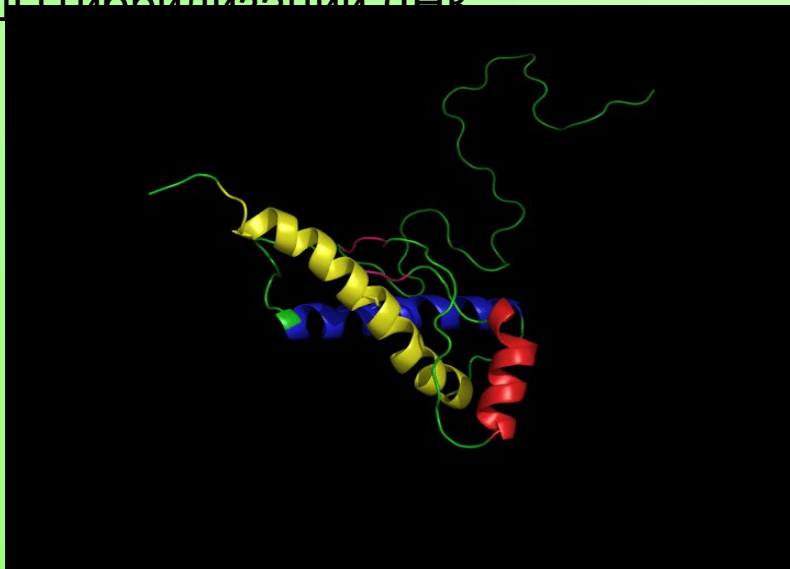
Биоинженерия простирается от создания искусственных органов с помощью технических средств или поиска способов выращивания органов и тканей методами регенеративной медицины для компенсации пониженных либо утраченных физиологических функций (биомедицинская инженерия) и до разработки генетически модифицированных организмов, например, сельскохозяйственных растений и животных (генетическая инженерия), а также молекулярного конструирования соединений с заданными свойствами (белковая инженерия, инженерная энзимология). В немедицинских аспектах биоинженерия тесно соприкасается с биотехнологией.

Методы аналитической химии позволяют ответить на многие вопросы, возникающие при осаждении нуклеиновых кислот в водном растворе (находит частое применение в биоинженерии), что необходимо для определения чистого ДНК, а потом и РНК. Рассмотрим методики полностью.



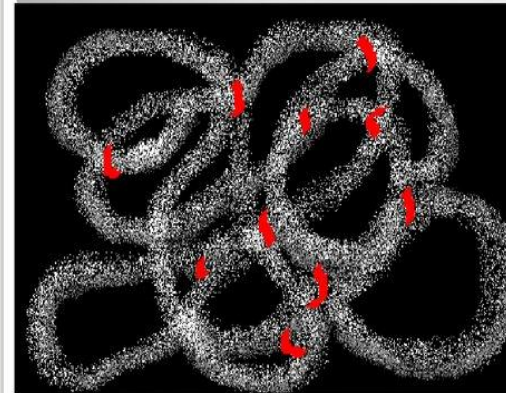
Методы исследования первичной и вторичной структуры нуклеиновых кислот.

1. Выделение ДНК и РНК
2. Физикохимические свойства ДНК;
3. Методы анализа первичной структуры ДНК;
4. Методы анализа вторичной структуры ДНК;
5. Методы гибридизации ДНК

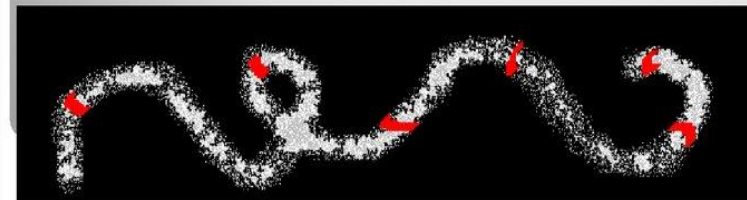
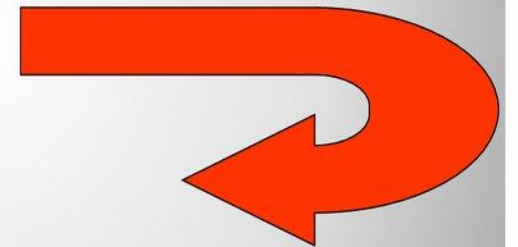


0.2 ns

Денатурация белка

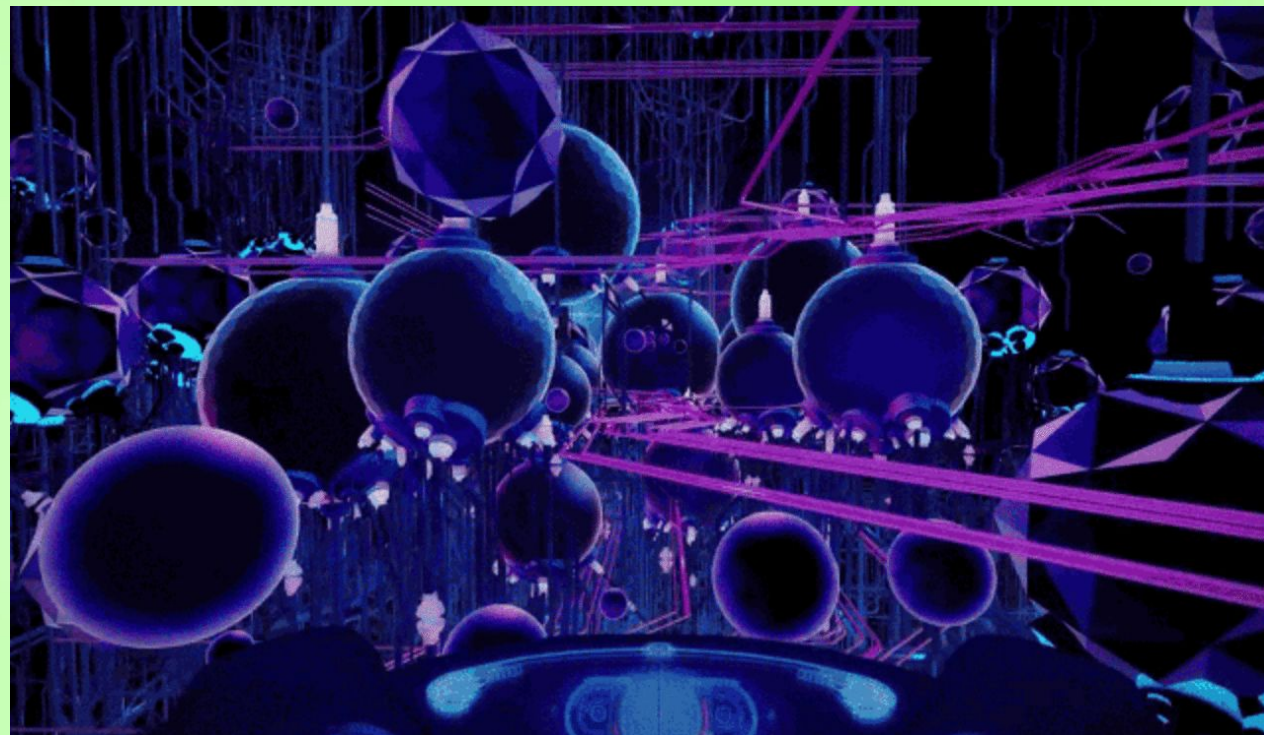


Высокие температуры,
кислоты, яды, радиация



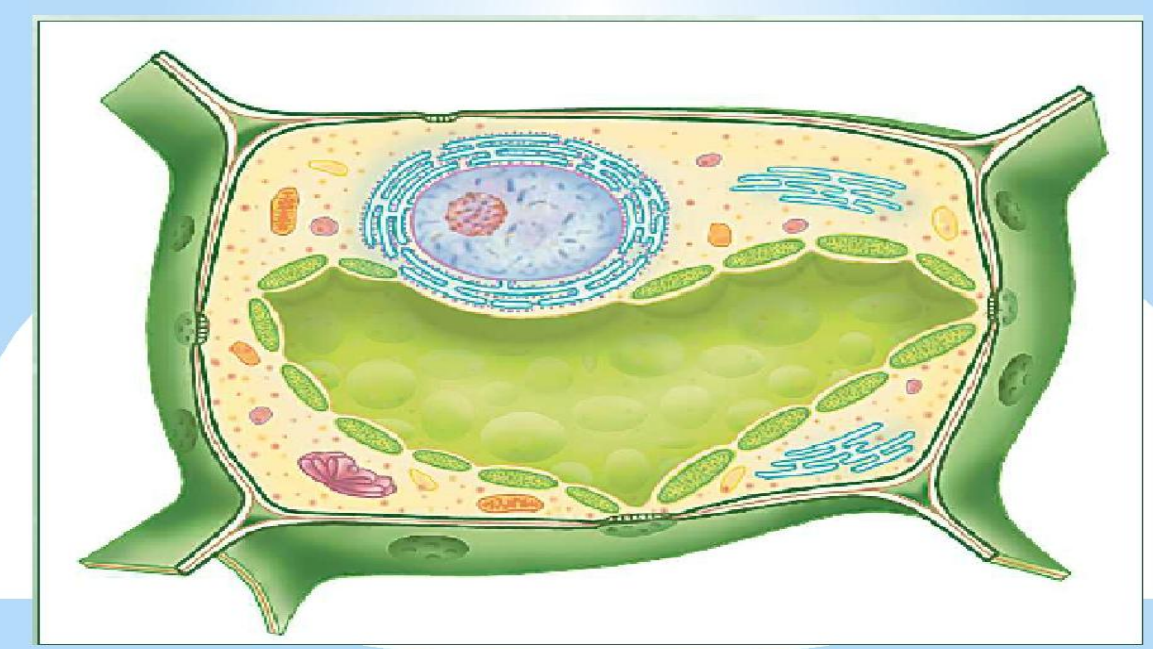
1. Этапы выделения ДНК и РНК

1. Разрушение клеток.
2. Отделение нуклеиновых кислот от белков, полисахаридов и др. соединений.
3. Осаждение нуклеиновых кислот.
4. Анализ чистоты препарата.



В зависимости от того, из какого организма выделяют ДНК используют различные методы разрушения клеток:

1. Для разрушения клеток бактерий используют химические вещества, разрушающие клеточную стенку бактерий – ЭДТА, лизоцим, ультразвук, гомогенизация и др. Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия или гуанидинизотиоцианат.
2. Разрушение клеток животных и человека не вызывает сложностей: используют гомогенизацию, обработку SDS, либо клетки обрабатывают протеиназами.
3. Для разрушения клеточных стенок растений – ферменты, разрушающие целлюлозу, замораживание в жидком азоте и последующее механическое разрушение клеток и др. Часто используют обработку детергентами, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующими агентами, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов.



2. Отделение нуклеиновых кислот от белков осуществляют :

- депротеинизацию клеточного лизата чаще всего осуществляют с помощью фенола и хлороформа (белки переходят в фазу растворителя).

Молекулярщики часто подразумевают смесь водонасыщенного фенола с хлороформом 1:1, а не кристаллическое вещество. В смеси с хлороформом фенол работает эффективнее, а изоамиловый спирт гасит пенообразование.

-

Концентрацию полученной нуклеиновой кислоты, а также наличие примесей (белки) обычно определяют спектрофотометрически по поглощению на A_{260} нм.

Максимум поглощения белка приходится на 280 нм. Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации ДНК в 50 мкг/мл. Для расчёта можно воспользоваться калькулятором на интернет-ресурсе MOLBIOL.RU (<http://www.molbiol.ru>) или других подобных порталах.

Для оценки чистоты препарата ДНК, свободного от РНК, проводят измерения оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения растворов ДНК, белков и полисахаридов, соответственно.

Значение отношения $A_{260/280}$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8.

Значение $A_{260/235}$ должно быть больше, чем 2,2.

Нуклеиновые кислоты

Состав нуклеотидов

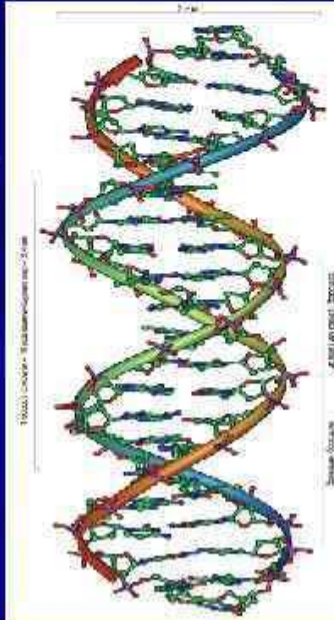
PO_4^{3-}
фосфат

C_5 -моносахарид,
рибоза – РНК,
дезоксирибоза – ДНК

Азотистое
снование:
тимин (Т)
цитозин (Ц)
гуанин (Г)
аденин (А)

Двойная спираль

ДНК



РНК → контроль биосинтеза белков

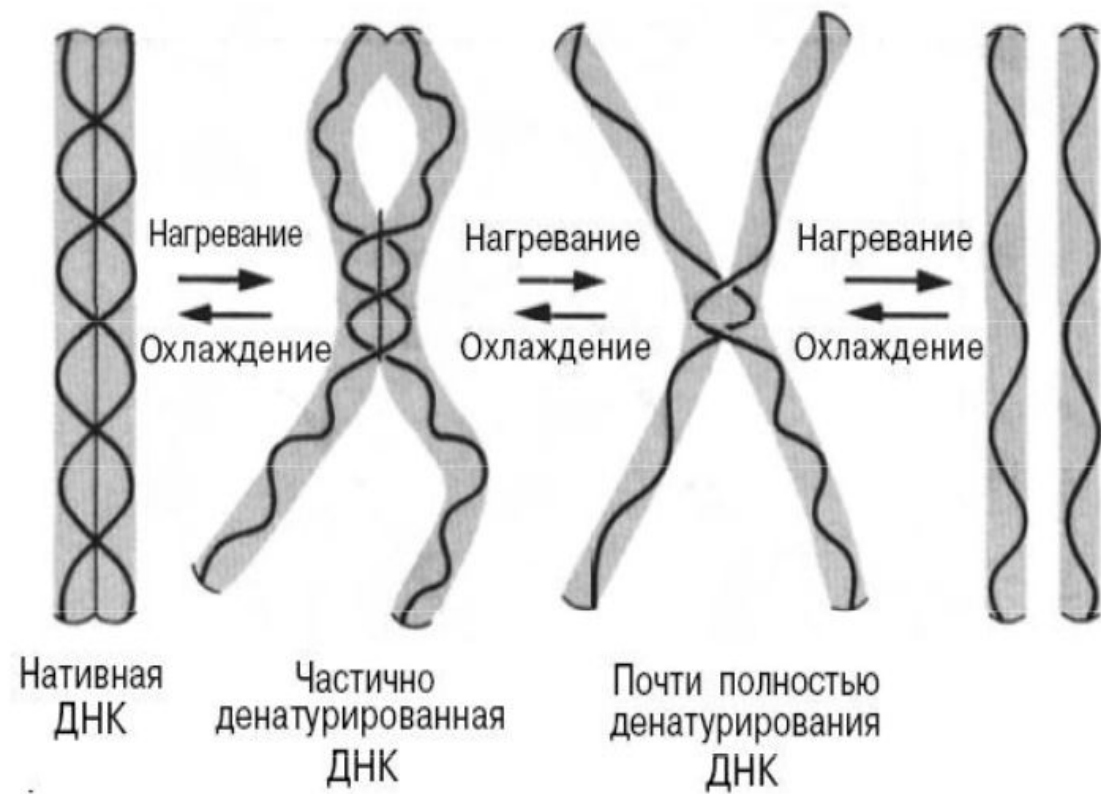
ДНК → 1) размножение
2) хранение и передача наследственной информации

Принцип комплементарности

	ДНК	ДНК	РНК
	I цепь	II цепь	
Г		Ц	Г
А		Т	У
Т		А	А
Ц		Г	Г

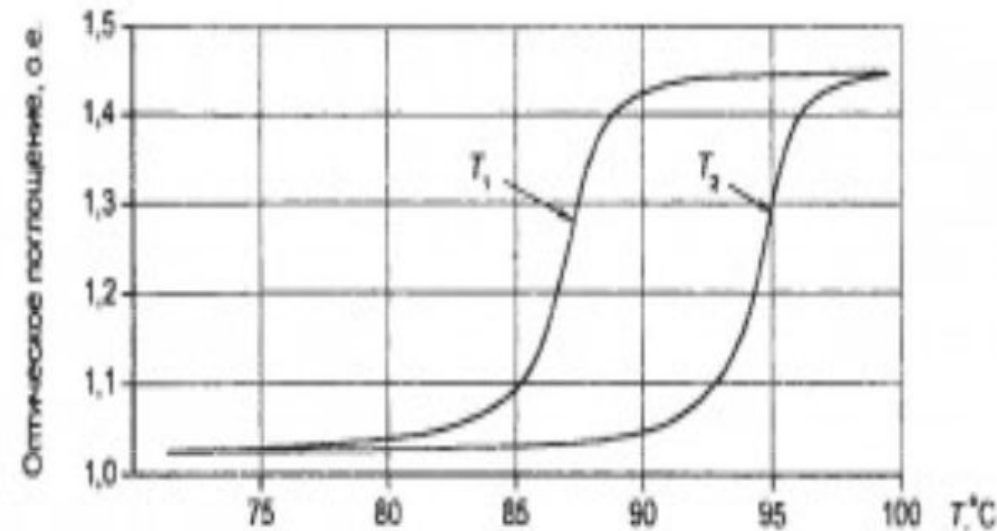
Физические свойства молекулы ДНК. При повышении температуры или добавлении щелочей происходит разрыв водородных связей между комплементарными основаниями. При этом происходит денатурация (плавление) и нативная двухцепочечная ДНК переходит в одноцепочечную форму. При охлаждении или понижении pH среды происходит ренатурация (отжиг), т.е. восстановление двойной спирали ДНК.

Температура плавления (T_m) – это температура, при которой денатурируется 50% всей ДНК. T_m зависит от содержания Г=Ц пар в молекуле ДНК. У млекопитающих, в том числе и у человека, T_m ДНК составляет 87°C . Способность ДНК денатурировать и восстанавливать двойную структуру используют для гибридизации при образовании дуплексов ДНК-РНК или ДНК-ДНК.

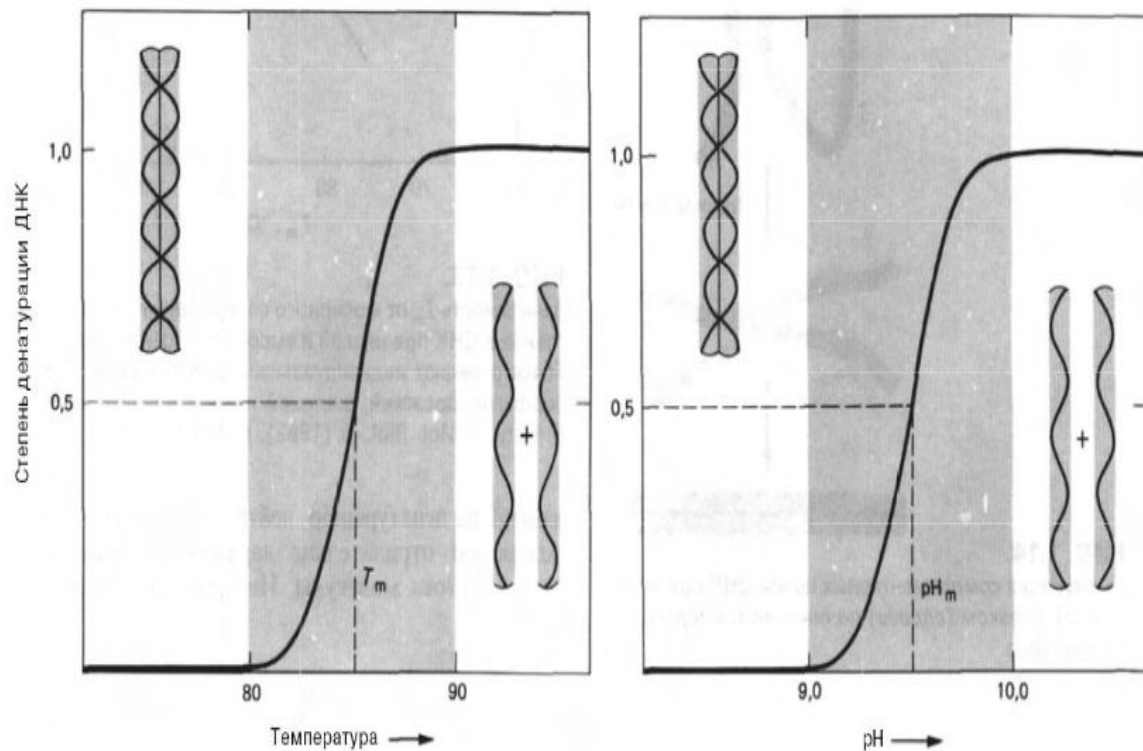


Денатурация происходит также при увеличении pH раствора до уровня, при котором разрушаются водородные связи между основаниями.

При денатурации изменяются некоторые физические свойства ДНК, например ее оптическая плотность. Азотистые основания поглощают свет в ультрафиолетовой области (с максимумом, близким к 260 нм). ДНК поглощает свет почти на 40 % меньше, чем смесь свободных нуклеотидов того же состава. Это явление называют гипохромным эффектом, а обусловлено оно взаимодействием оснований при их расположении в двойной спирали.



Денатурация ДНК при нагревании, наблюдаемая по изменению ее оптической плотности. Показаны кривые денатурации ДНК, содержащей в своей последовательности 40 % (T_1) и 60 % (T_2) пар G-C



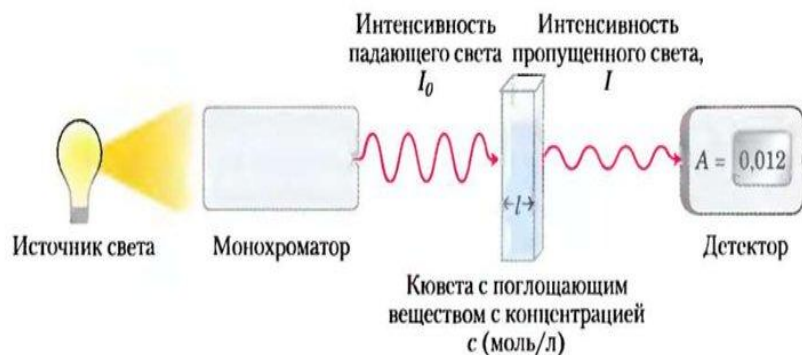
Как мы видим, методы аналитической химии помогают при отделении нуклеиновых кислот. Мы оцениваем обстановку с помощью **спектрофотометрии.**

Спектрофотометрия. Сущность метода.

Спектрофотометрический метод определения концентрации белков

Закон Бугера-Ламберта-Бера

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$



Это метод фотометрического анализа, в котором определение содержания вещества производят по поглощению им монохроматического света в видимой, УФ- и ИК-областях спектра. В спектрофотометрии, в отличие от фотометрии, монохроматизация обеспечивается не светофильтрами, а монохроматорами, позволяющими непрерывно изменять длину волны. В качестве монохроматоров используют призмы или дифракционные решетки, которые обеспечивают значительно более высокую монохроматичность света, чем светофильтры, поэтому точность спектрофотометрических определений выше.

Задачи спектрофотометрии

Спектрофотометрические методы, по сравнению с фотоколориметрическими, позволяют решать более широкий круг задач:

- проводить количественное определение веществ в широком интервал длин волн (185-1100 нм);**
- осуществлять количественный анализ многокомпонентных систем (одновременное определение нескольких веществ);**
- определять состав и константы устойчивости светопоглощающих комплексных соединений;**
- определять фотометрические характеристики светопоглощающих соединений.**

Фотометрическим методом можно определять также компоненты смеси двух и более веществ.



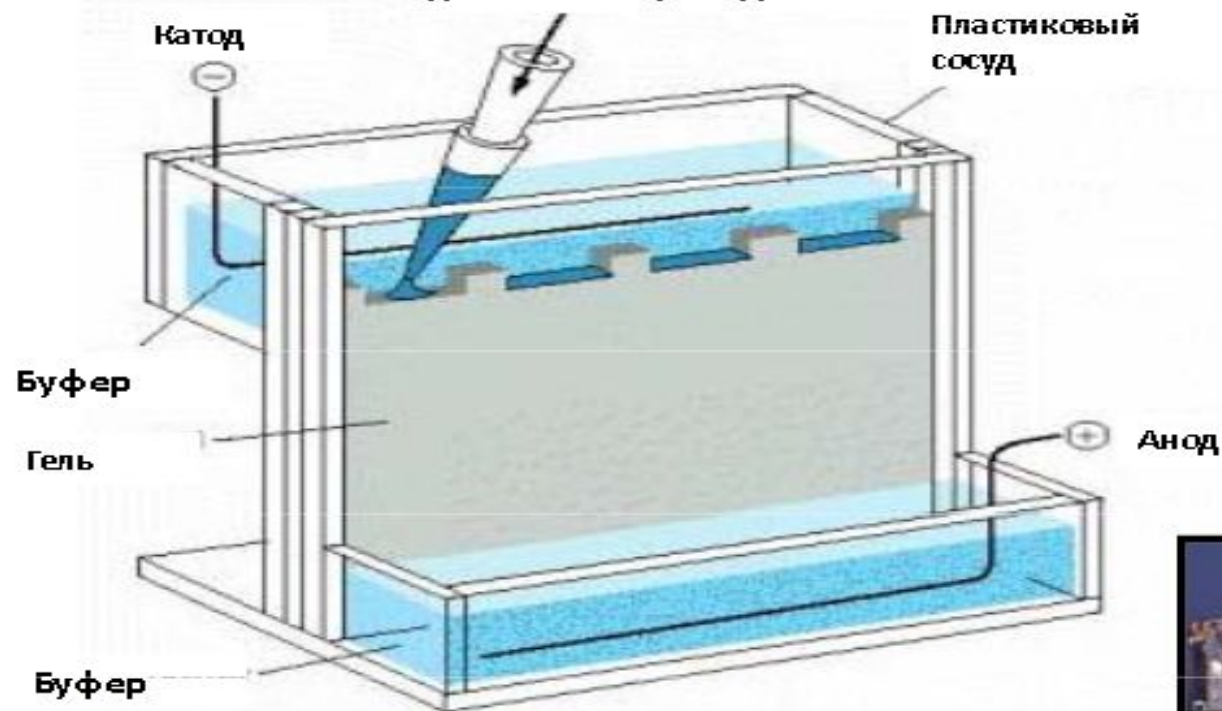
UNICO[®]

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки интактных молекул ДНК и их фрагментов (высокомолекулярная хромосомная ДНК всегда фрагментируется при изоляции из клетки). Агароза – фракция природного полисахарида агар-агара.

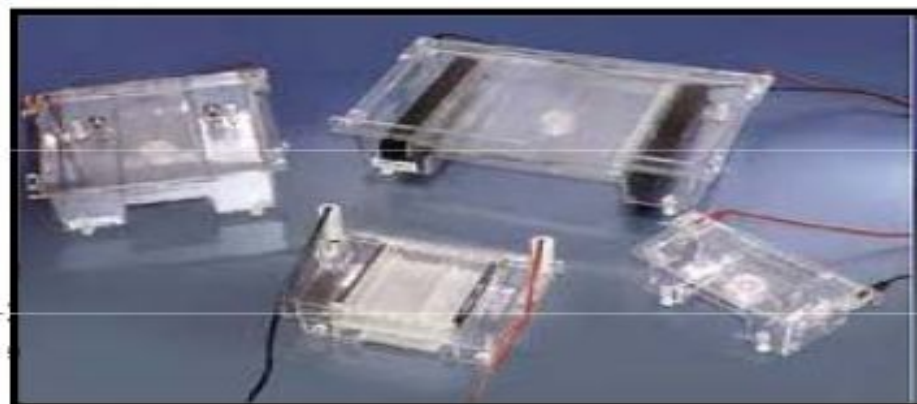
- Гель предотвращает свободную диффузию образца (в воде то же самое не получится);**
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, значит, в растворе она диссоциирует на отрицательно заряженные ионы кислоты и H^+ (протоны). Если у вас есть смесь фрагментов ДНК длин 10 и 20, то соответствующие анионы кислоты будут иметь заряд, пропорциональный длине фрагмента (и, соответственно, пропорциональный массе).**

Гель-электрофорез

В каждую лунку агарозного геля микропипеткой добавляется проба ДНК



Аппарат для электрофореза



Гель-электрофорез

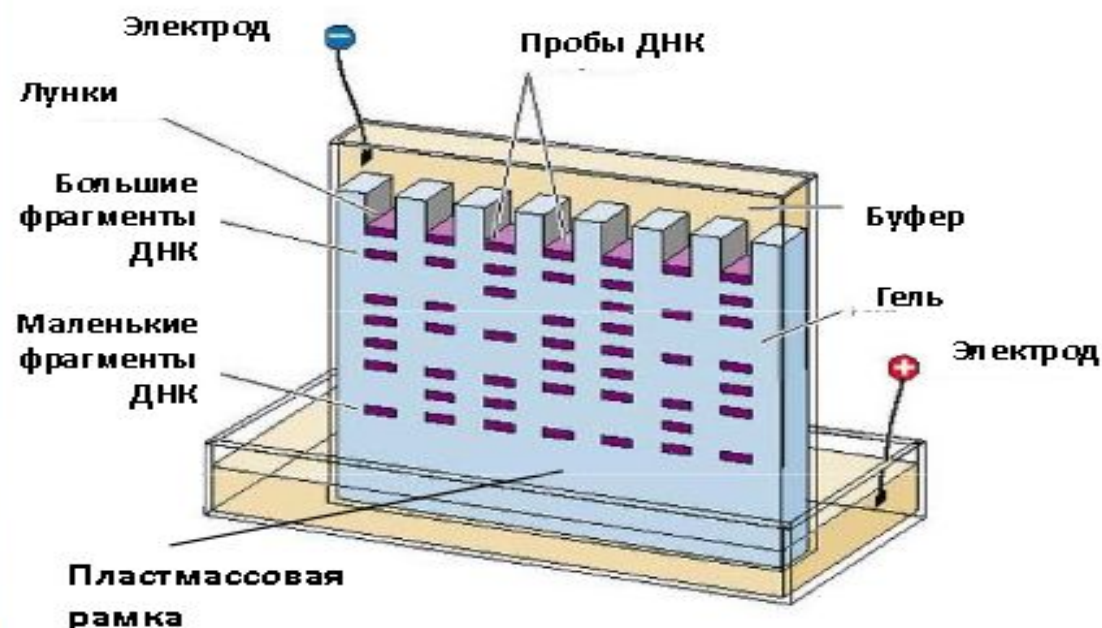
Пусть у вас есть смесь фрагментов ДНК разной длины и массы. Как разделить эту смесь и выделить индивидуальные компоненты?

ДНК – это слабая кислота, поэтому она движется к аноду («+») за счёт отрицательно заряженных фосфатных групп.

За движением ДНК (РНК) в пластине геля можно следить, так как полосы окрашенной флуоресцентными красителями ДНК, формируемые молекулами одного размера при продвижении через поры геля, видны в УФ свете.

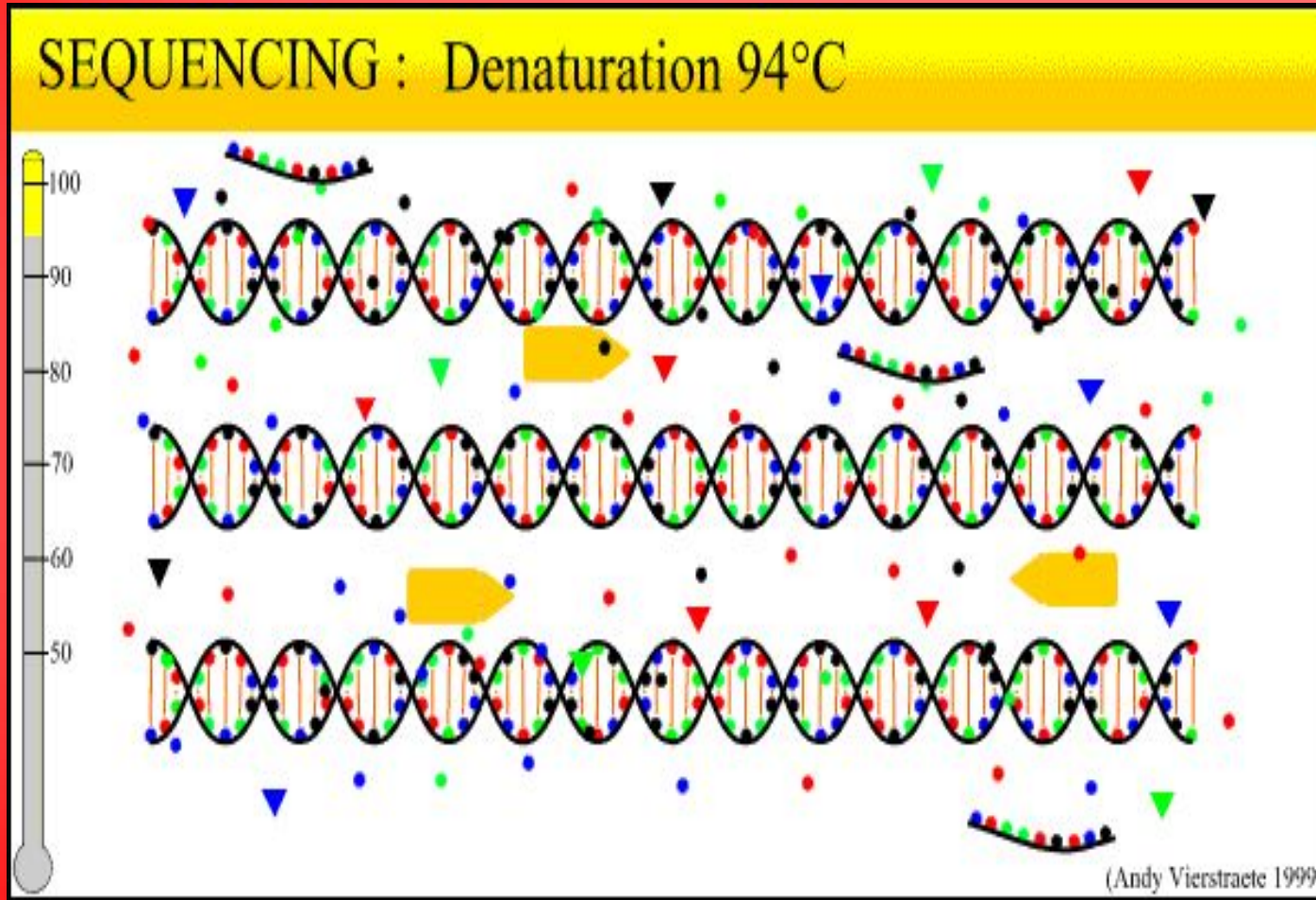
Для окрашивания ДНК применяют краситель этидий бромид ($\lambda_{max} = 590 \text{ нм}$). Молекулы этидий бромида интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов.

Интенсивность флуоресценции связанного этидиум бромида в 20 раз выше, чем свободного.

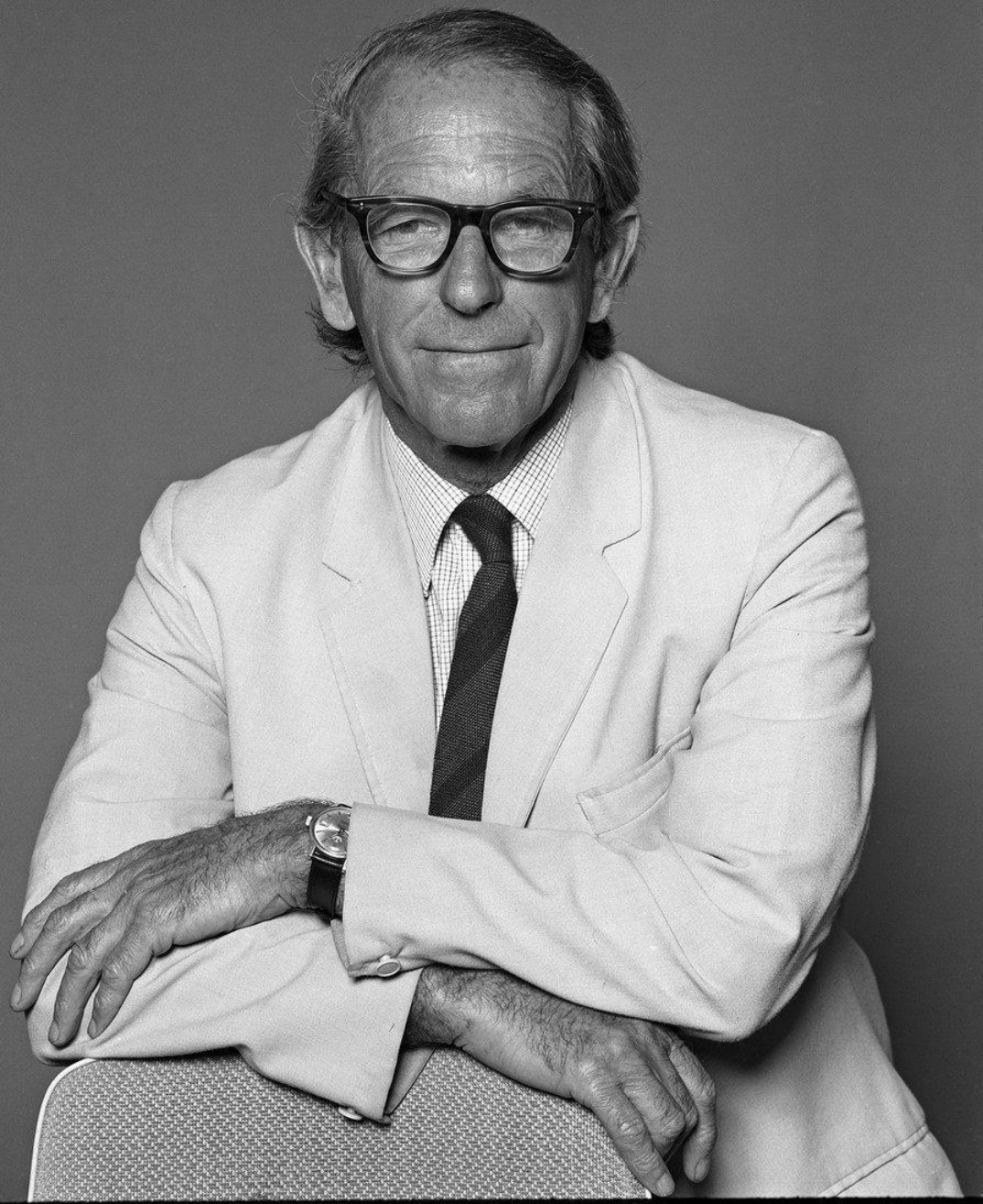


Такая окраска ДНК обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полоски оранжевого цвета.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ



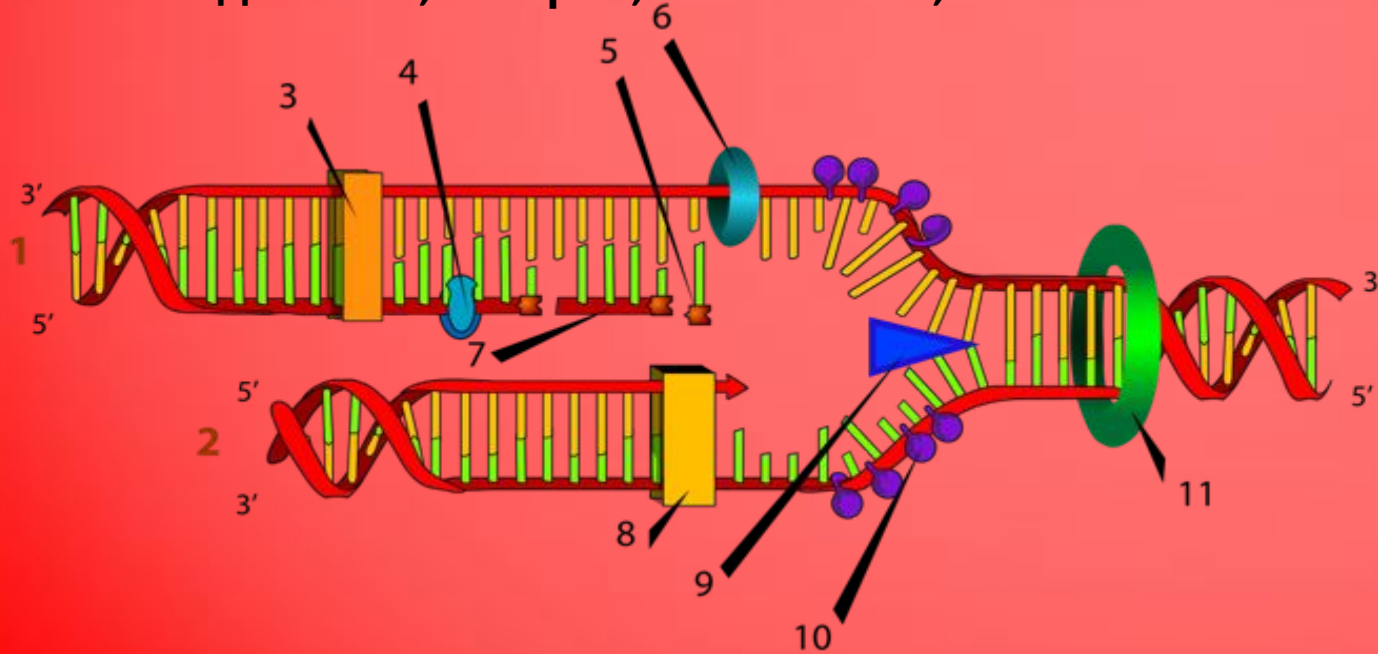
Секвенирование — это метод определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Тестирование используется для определения генетических повреждений (мутаций) в ДНК, которые являются причиной наследственных болезней, наследственных предрасположенностей или особенностей организма. Существует несколько разновидностей секвенирования, которые позволяют выявлять возможные генетические отклонения и редкие генетические варианты, тонко влияющие на появление определенных патологий в человеческом организме.



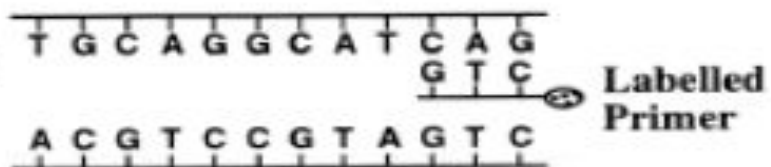
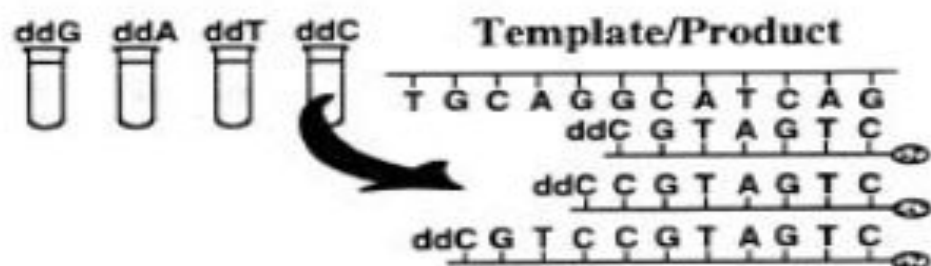
Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918–2013) — единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 годах). Первую премию присудили за установление структур белков, особенно инсулина, а вторую награду ему вручили в том числе и за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот. Методику секвенирования ДНК с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов и ДНК-полимеразы (или фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I) предложили Сэнгер и его коллеги в 1977 году, причем с течением времени этот метод прошел несколько модификаций и к настоящему моменту считается золотым стандартом современного секвенирования

Секвенирование ДНК – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком; все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (клонировается молекула ДНК многократно и «разрезается» её в случайных местах), а потом читается каждый участок по отдельности.

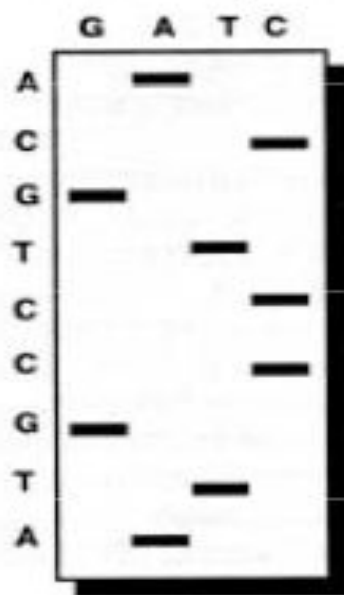
Клонирование происходит либо просто выращиванием клеток в чашке Петри, либо (в случаях, когда это было бы слишком медленно или по каким-то причинам не получилось бы) при помощи так называемой полимеразной цепной реакции. В кратком и неточном изложении работает она примерно так: сначала ДНК денатурируют, т.е. разрушают водородные связи, получая отдельные нити. Затем к ДНК присоединяют так называемые праймеры; это короткие участки ДНК, к которым может присоединиться ДНК-полимераза – соединение, которое, собственно, и занимается копированием (репликацией) нити ДНК.



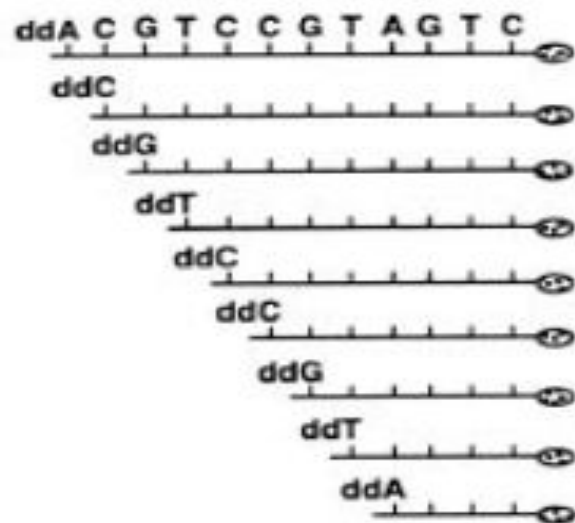
Схематическое изображение процесса репликации ДНК: (1) Отстающая цепь (запаздывающая нить), (2) Ведущая цепь (лидирующая нить), (3) ДНК-полимераза α ($Pol\alpha$), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) Праймаза, (7) Фрагмент Оказакиса, (8) ДНК-полимераза δ ($Pol\delta$), (9) Хеликаза, (10) Однонитевые ДНК-связывающие белки, (11) Топоизомераза.

a.Denatured
TemplateAdd dNTPs and
Polymerase

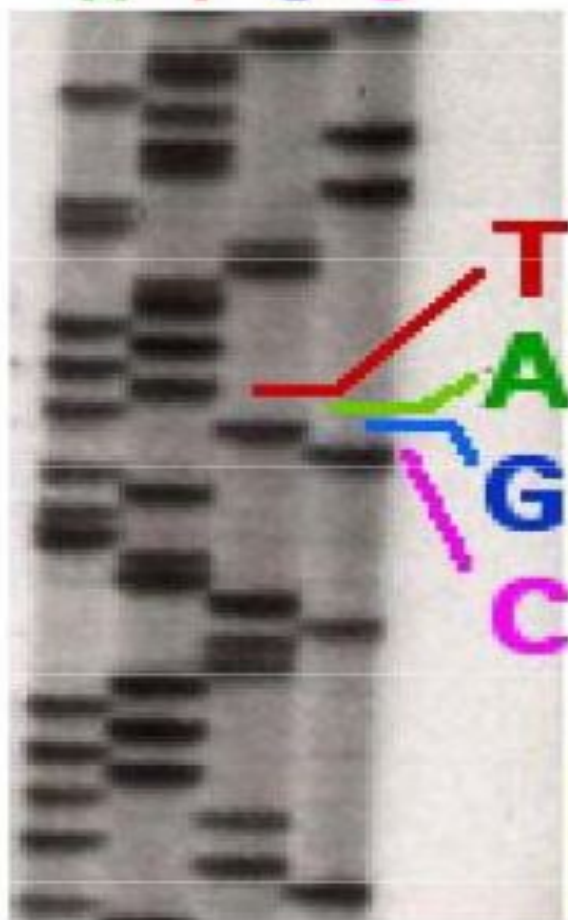
Denaturing Gel

**b.**

Labelled Strands



A T G C



Капиллярный электрофорез

Капиллярный электрофорез

- В качестве камеры используется тонкостенный кварцевый капилляр (внутренний диаметр <100 мкм)
- Высокое напряжение электрического поля
- Продолжительность разделения – 5-30 мин



Капиллярный электрофорез (КЭ) - интенсивно развивающийся метод разделения сложных смесей, позволяющий анализировать ионные и нейтральные компоненты различной природы с высокой экспрессностью и уникальной эффективностью. В основе капиллярного электрофореза лежат электрокинетические явления — электромиграция заряженных частиц и электроосмос. Эти явления возникают в растворах при помещении их в электрическое поле, преимущественно, высокого напряжения. Если раствор находится в тонком капилляре, например, в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости, в результате чего проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции специфичны для каждого сорта заряженных частиц. В то же время, такие возмущающие факторы, как диффузионные, сорбционные, конвекционные, гравитационные и т. п., в капилляре существенно ослаблены, благодаря чему достигаются рекордные эффективности разделений.

- Разделение пробы достигается приложением напряжения к буферным сосудам. Возникающее в капилляре электрическое поле вызывает миграцию зоны пробы. На электрофоретическое перемещение всегда накладывается более или менее интенсивный электроосмотический поток (ЭОП), который способствует пассивному транспорту зоны пробы, а не ее разделению. Этот ЭОП сильно зависит от значений **pH буфера** и от свойств поверхности капилляра. Он может быть настолько большим, что будут двигаться не только нейтральные молекулы, но даже отрицательно заряженные ионы могут перемещаться к детектору, несмотря на их электрофоретическую миграцию.
- Измерение pH буферного раствора выполняют с помощью **двух потенциометров** разных типов.

ПОТЕНЦИОМЕТРИЯ

Потенциометрический метод анализа основан на зависимости равновесного электродного потенциала (E) от активности (a) или концентрации (C) вещества в растворе.

Для измерений необходимо составить гальванический элемент из подходящего индикаторного электрода и электрода сравнения, а также иметь прибор для измерения потенциала индикаторного электрода. В качестве таких приборов используют:

потенциометр (для особо точных измерений);
электронные вольтметры, рН-метры.
Иономеры - современные потенциометры заводского типа с электронными усилителями тока. Выпускаются серийно.
Шкалы калиброваны: мВ, ед. рН, ед. рХ.

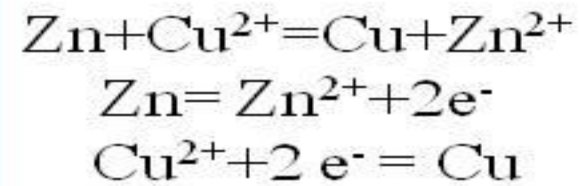
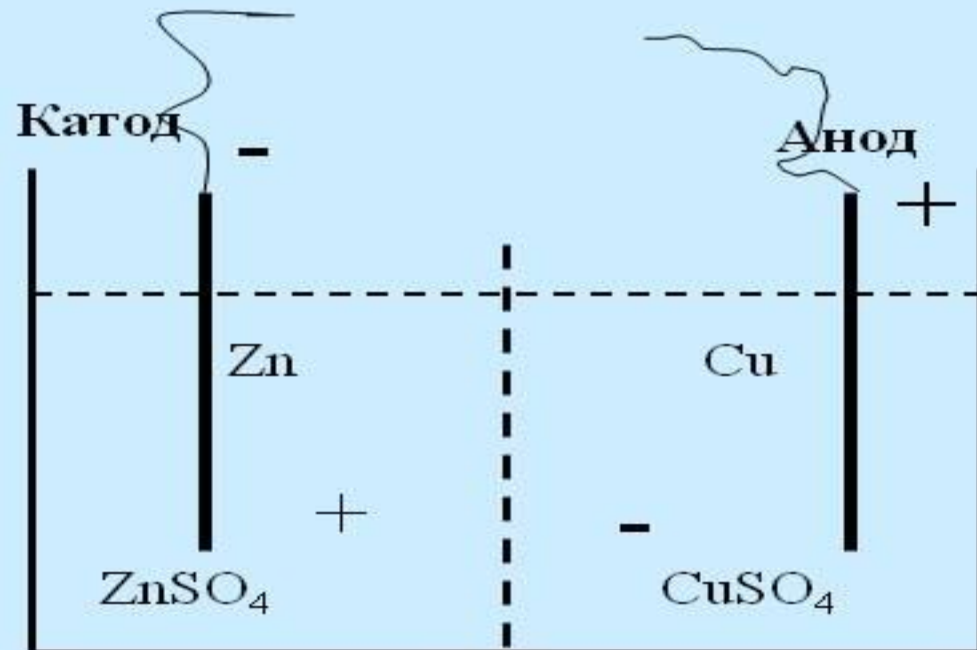
Приборы в потенциометрии



Гальванические элементы

Гальванический элемент — химический источник электрического тока, названный в честь Луиджи Гальвани. Принцип действия гальванического элемента основан на взаимодействии двух металлов через электролит, приводящем к возникновению в замкнутой цепи электрического тока. ЭДС гальванического элемента зависит от материала электродов и состава электролита.

Если в гальваническом элементе протекают обратимые химические реакции, то он называется **аккумулятором**.

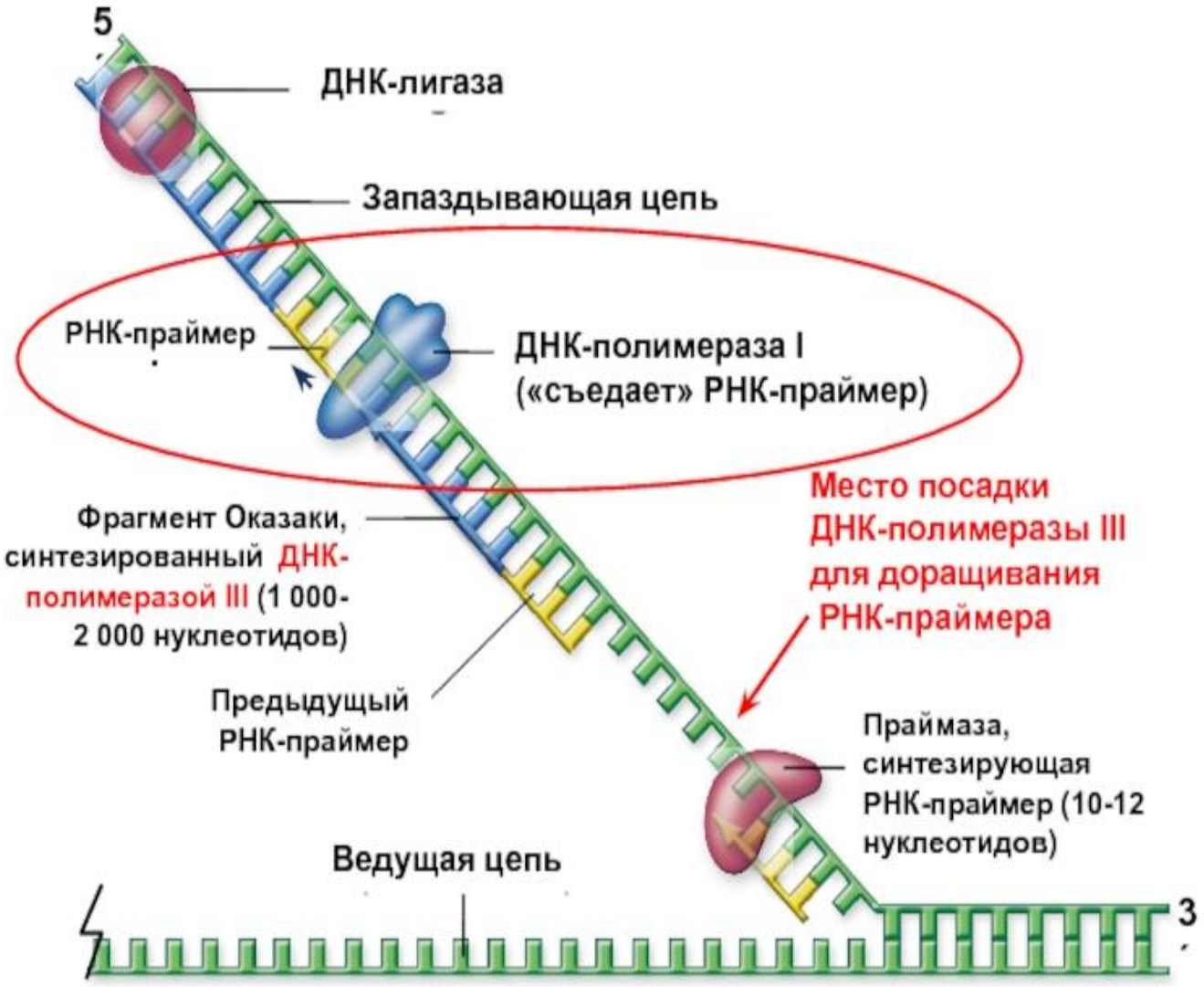


Если пространственно разделить окислитель и восстановитель, то электроны будут переходить от восстановителя к окислителю по проводу, т.е. возникнет электрический ток

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – высокоточный метод молекулярно-генетической диагностики, который позволяет выявить у человека различные инфекционные и наследственные заболевания, как в острой и хронической стадии, так и задолго до того, как заболевание может себя проявить.

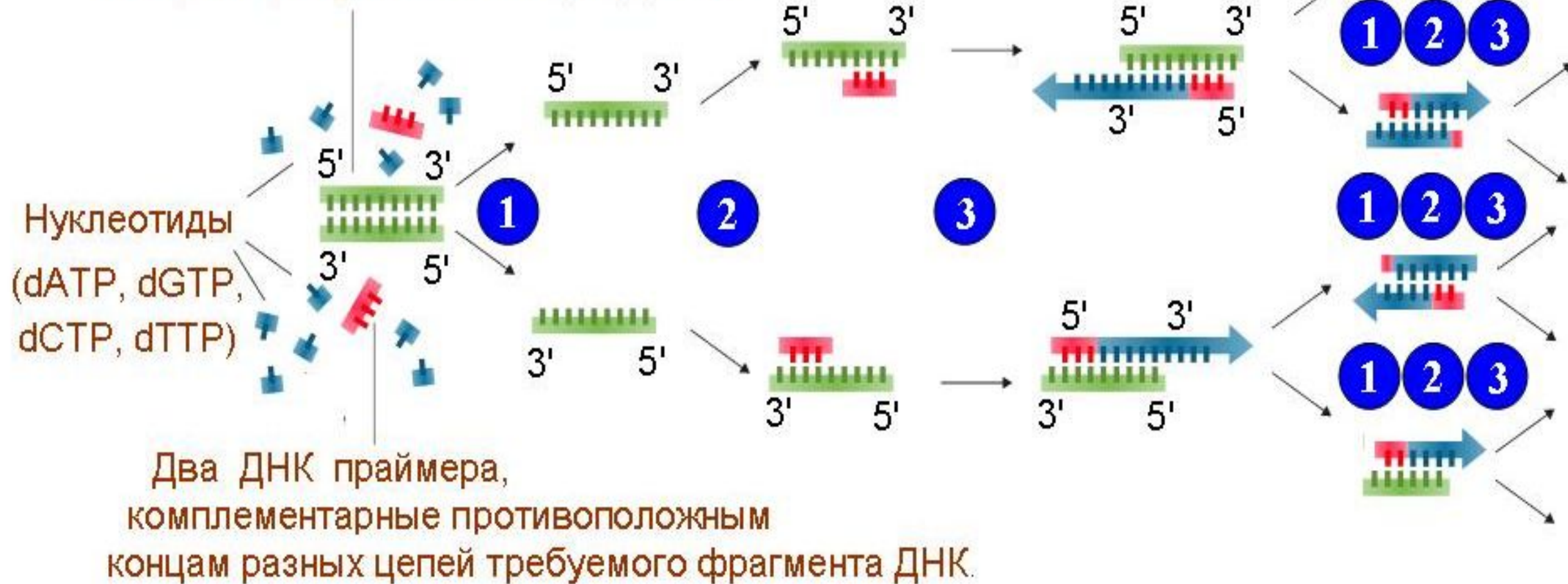




Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими **праймерами** (короткими фрагментами «затравочной» ДНК) в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «узнавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной **комплементарности**.

Полимеразная цепная реакция - ПЦР

ДНК-матрица, с участком ДНК, который требуется амплифицировать



1 Денатурация при 94 - 96°C

2 Отжиг при ~ 68°C

3 Элонгация при 72°C

- **Типичная реакционная смесь**
- **Анализируемая ДНК.** Это может быть как отдельный кусочек молекулы, так и плаزمид, хромосома или геном клетки полностью. Для грубой оценки сойдет даже суспензия клеток. ДНК служит матрицей для многократного копирования нужного участка.
- **Праймеры.** Праймер — это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов (15–30 штук), комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи. У праймеров, как и у любого олиго- или полинуклеотида, есть 3′- и 5′-концы.
- **Нуклеотиды.** А точнее, дезоксинуклеотидтрифосфаты — четыре вида «кирпичиков» для строительства цепей ДНК: дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ.
- **ДНК-полимераза.** Фермент, строящий комплементарную матричной цепь ДНК. Он может начинать синтез только от 3′-конца праймера. Обычно используют термостабильные полимеразы, изначально выделенные из термофильных бактерий и архей: *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-полимераза) и *Pyrococcus woesei* (*Pwo*-полимераза). Первая — самая производительная, а две другие — более точные.
- **Буфер.** Раствор, содержащий различные ионы для поддержания нужного рН, соли магния, необходимые для работы полимеразы, и неионный детергент Tween-20 в сочетании с BSA (бычьим сывороточным альбумином) для предотвращения налипания компонентов реакции на стенки пробирки. В случае ГЦ-богатых матриц в смесь часто добавляют энхансер — ДМСО (диметилсульфоксид), предотвращающий нежелательные взаимодействия между комплементарными участками матрицы.



Этапы ПЦР

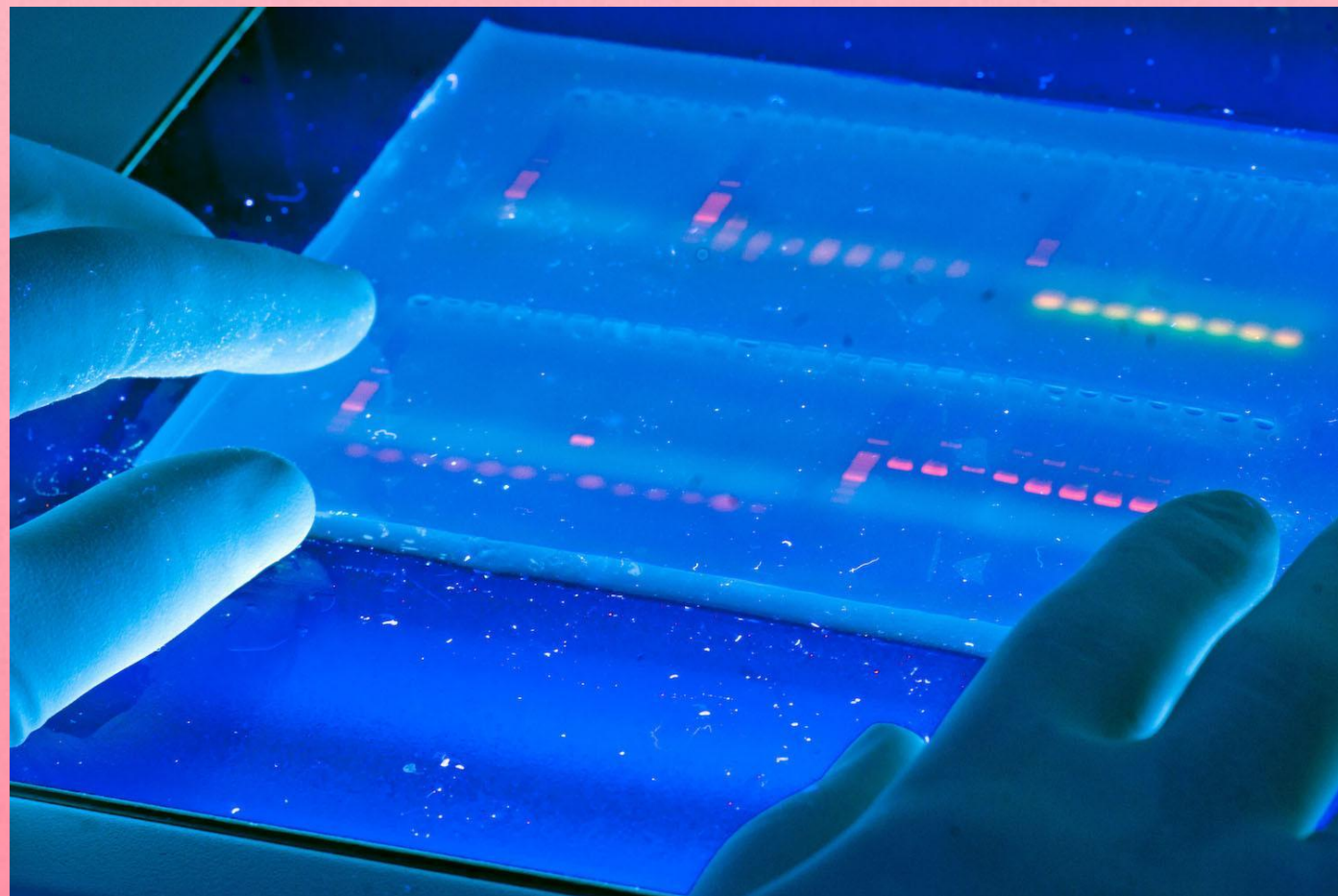
Что происходит	Температура	Длительность
Этап 1: Денатурация (плавление)		
Водородные связи разрываются, двуцепочечные молекулы ДНК распадаются на одноцепочечные	90-95°C	15 секунд
Этап 2: Отжиг (гибридизация) праймеров		
Водородные связи образуются между комплементарными фрагментами ДНК. Одноцепочечные праймеры гибридизуются с участками ДНК в начале и конце нужного фрагмента	55-65°C	30 секунд
Этап 3: Элонгация		
Тақ-полимераза удлиняет праймеры в направлении 5'-3', синтезируя дочерние цепи	72°C	60 секунд на тысячу пар оснований

Аппаратура для ПЦР



Визуализация продуктов ПЦР

Для того, чтобы проверить качество и количество продуктов ПЦР, как правило, используют метод агарозного гель-электрофореза. Для этого достаточно взять около 10 микролитров продуктов ПЦР, внести в лунку агарозного геля и посмотреть на результат разделения в ходе электрофореза.



Только в одном длительном процессе (секвенирование) мы установили два метода аналитической химии и физико-химических методов анализа:

- 1) **Спектрофотометрия;**
- 2) **Потенциометрия.**

Вследствие вышеуказанного мы можем сделать вывод о значимости методов аналитической химии, ведь , в данном процессе (секвенирование) , необходимо постоянно контролировать процесс, чтобы не ошибиться и не переделывать все заново.





**Спасибо
за внимание!**