

# 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?



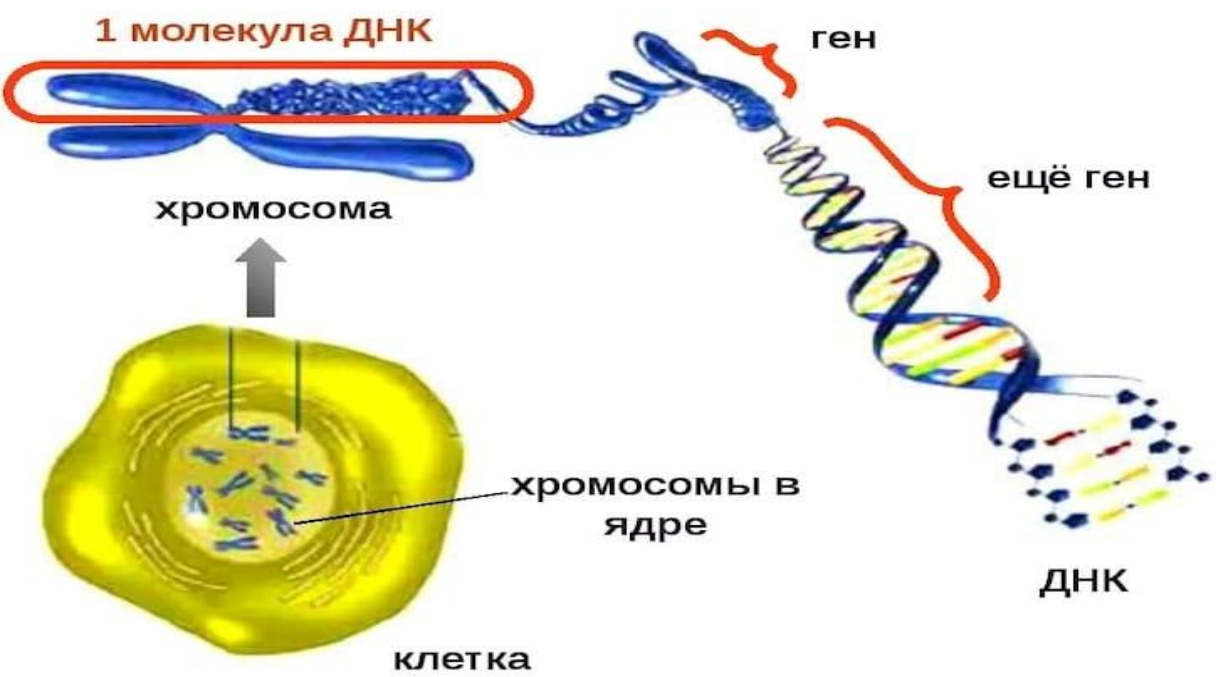
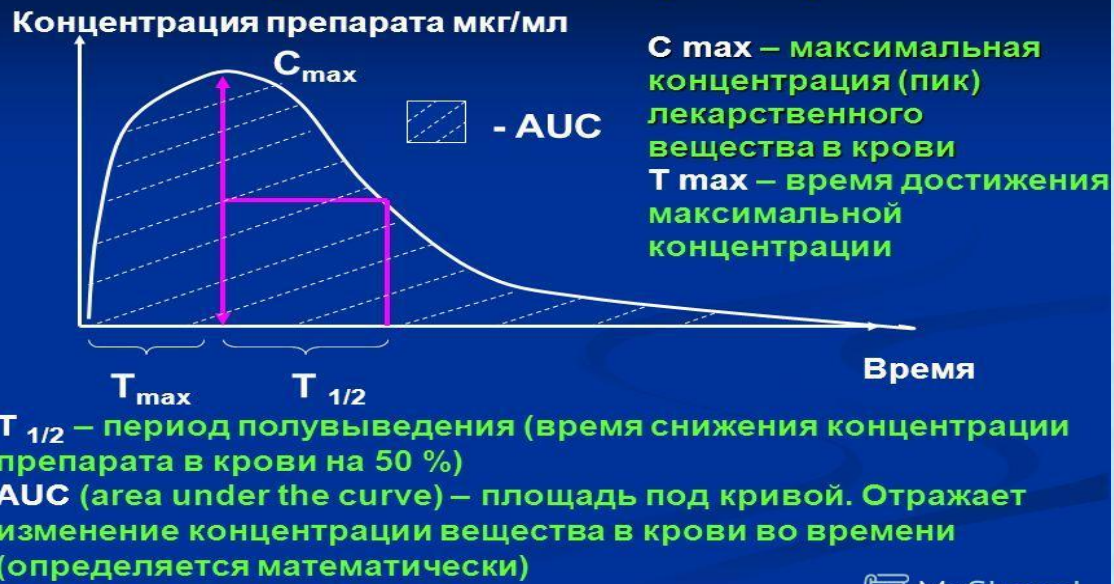
**Аналитическая химия** — наука, развивающая теоретические основы химического анализа веществ и материалов и разрабатывающая методы идентификации, обнаружения, разделения и определения химических элементов и их соединений, а также методы установления химического состава веществ.



Аналитическая химия имеет огромное научное и практическое значение, представляя совокупность методов исследования веществ и их превращений. Важную роль она играет также и в смежных с химией областях науки – минералогии, геологии, физиологии, микробиологии, а также в медицинских, агрономических и технических науках. Проведение многих научных исследований тесно связано с использованием методов в аналитической химии.



# Элементы фармакокинетики лекарственных препаратов

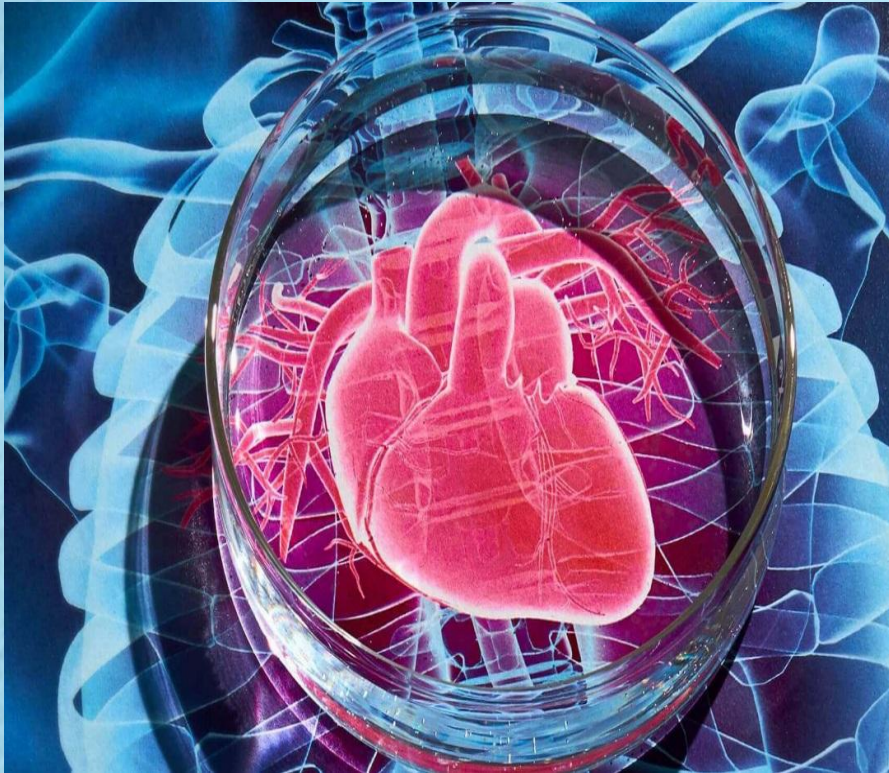


К менее распространенным медицинским исследованиям можно отнести поиск и определение новых маркеров заболеваний, фармакокинетику (изучение миграции и изменений лекарственных веществ в организме), допинг-контроль спортсменов, ДНК-анализы и др. Целью является обобщение имеющихся данных об анализе биологических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

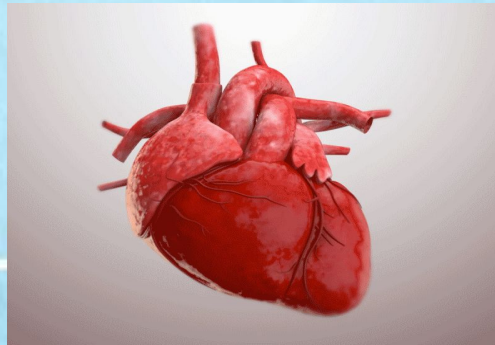
Аналитическая химия довольно длительное время не уделяла внимания медицинским и биологическим объектам. Методический уровень медико-биологических исследований, которыми занимались врачи или биологи, с точки зрения профессионала-аналитика был (а иногда и остается) довольно низким. В конце XX века в исследования 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.**





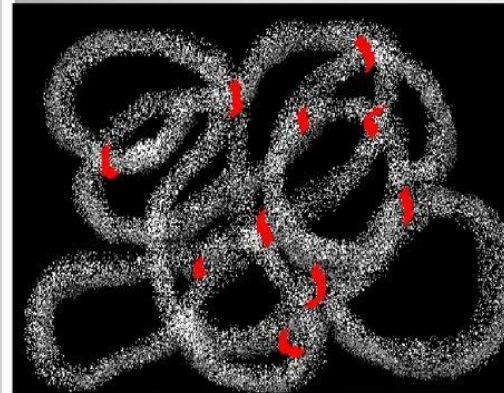
# Методы исследования первичной и вторичной структуры нуклеиновых кислот.

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

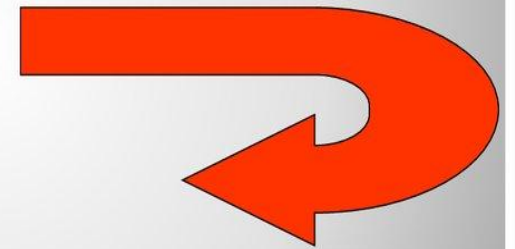


0.2 ns

## Денатурация белка

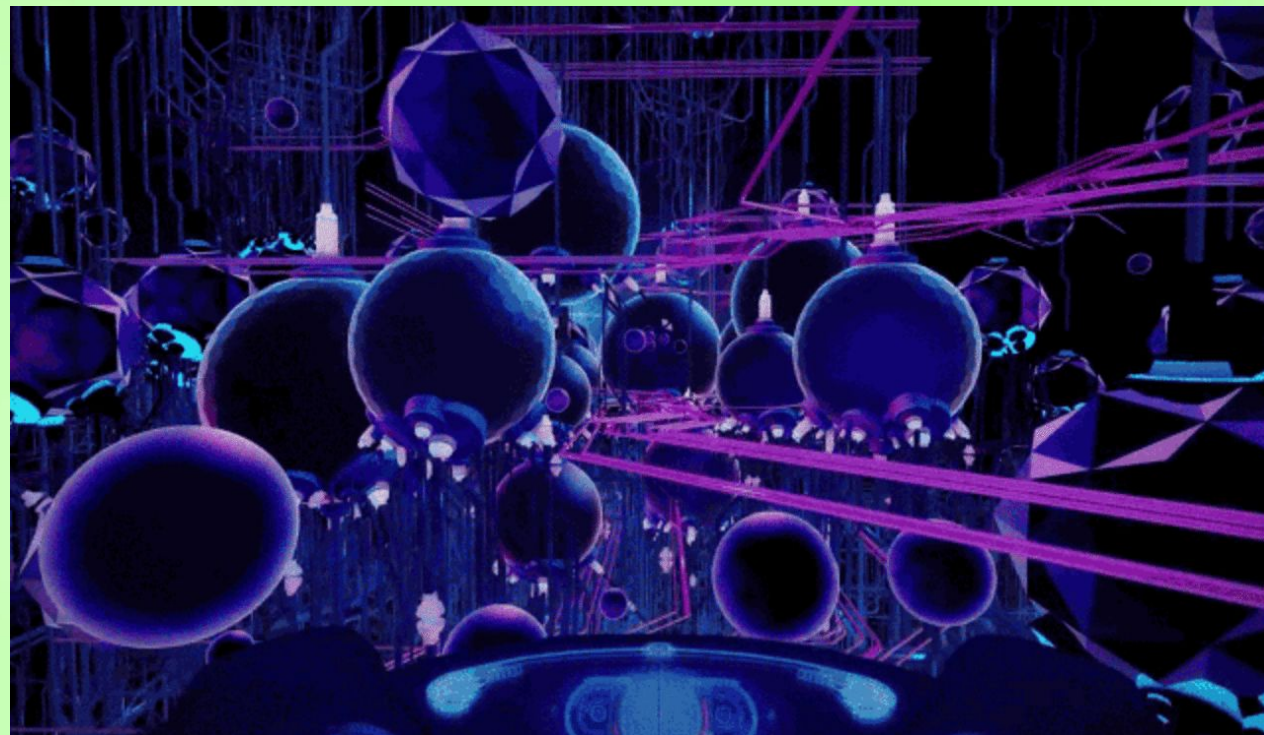


Высокие температуры,  
кислоты, яды, радиация



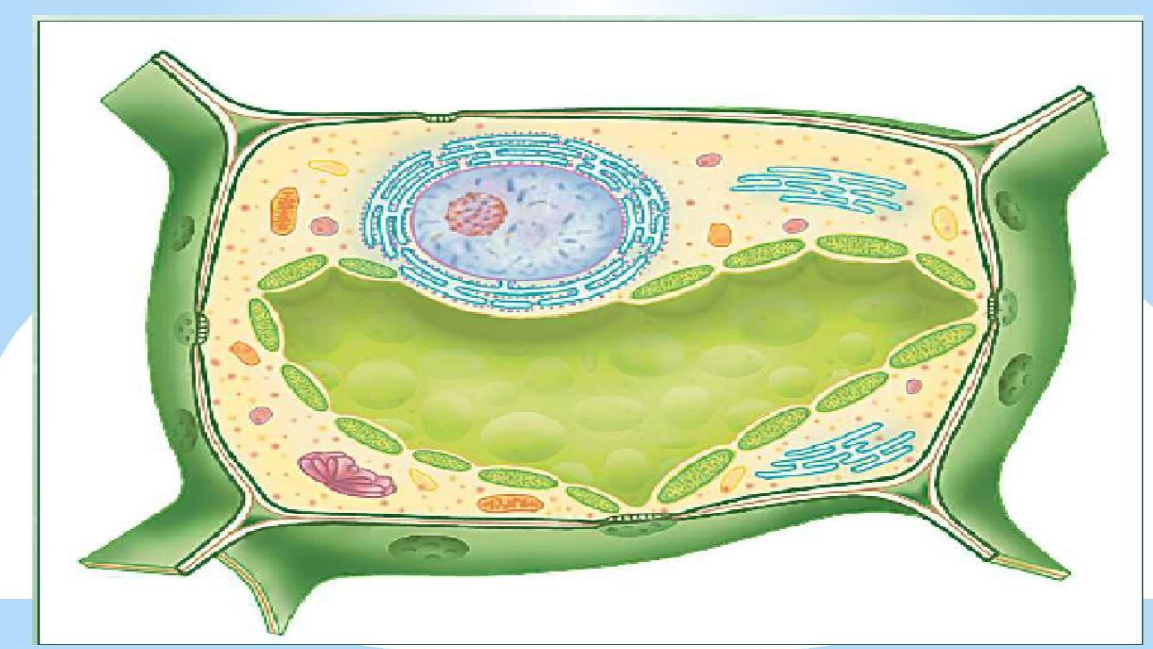
# 1. Этапы выделения ДНК и РНК

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 :

- депротенинизацию 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<sub>4</sub><sup>3-</sup> фосфат**

**C<sub>5</sub>-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	Ц
А	Т	А	У
Т	А	Т	А
Ц	Г	Ц	Г

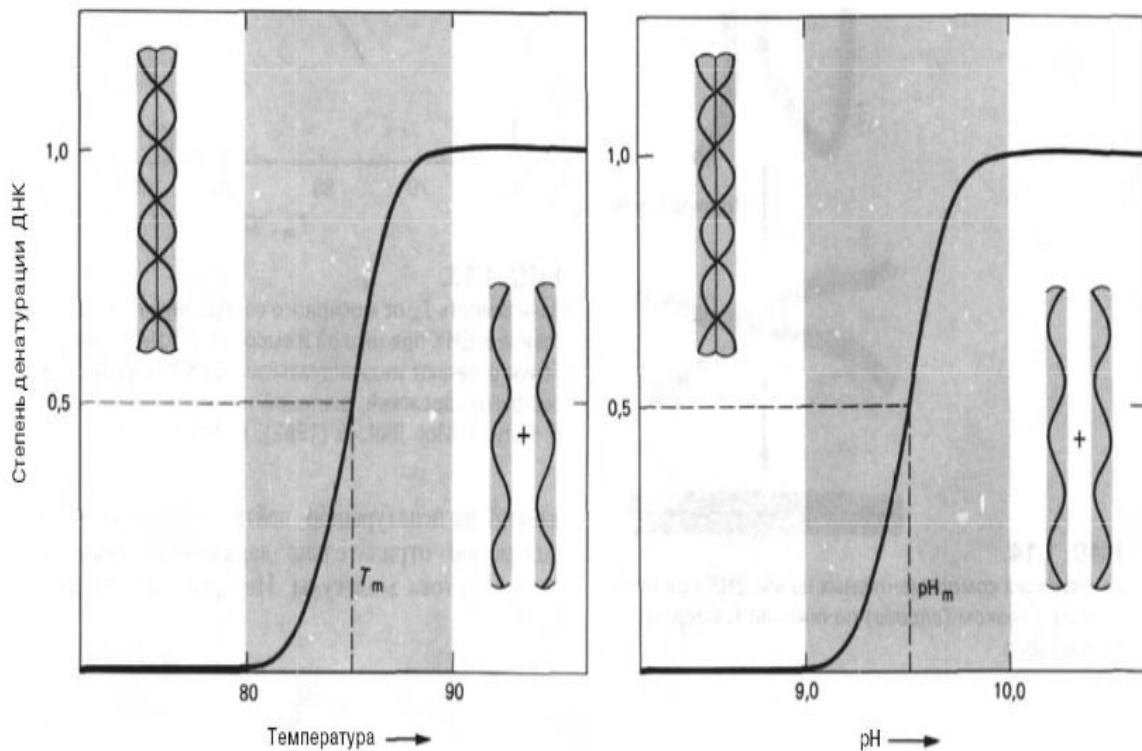
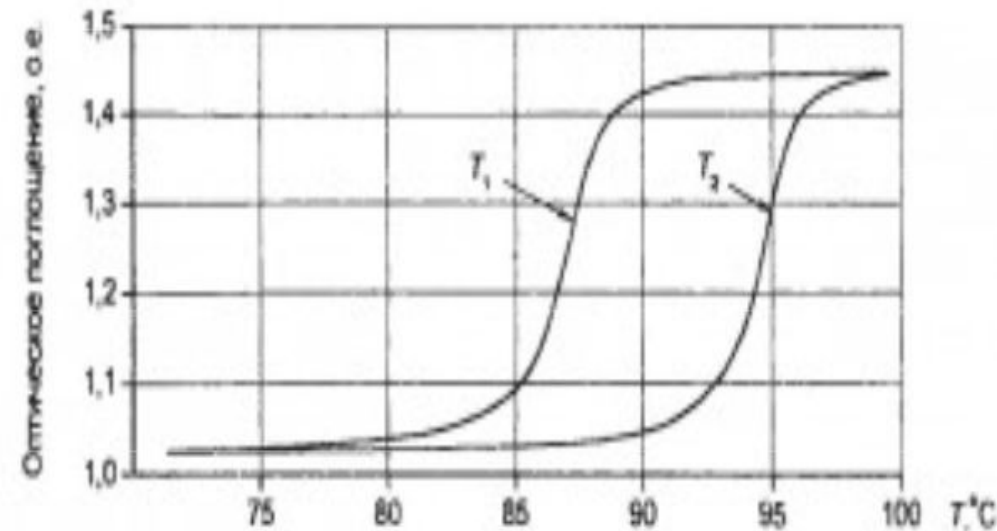
**Физические свойства молекулы ДНК.** При повышении температуры или добавлении щелочей происходит разрыв водородных связей между комплементарными основаниями. При этом происходит денатурация (плавление) и нативная двухцепочечная ДНК переходит в одноцепочечную форму. При охлаждении или понижении pH среды 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  $87^{\circ}\text{C}$ . 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<sub>1</sub>) и 60 % (T<sub>2</sub>) пар G-C

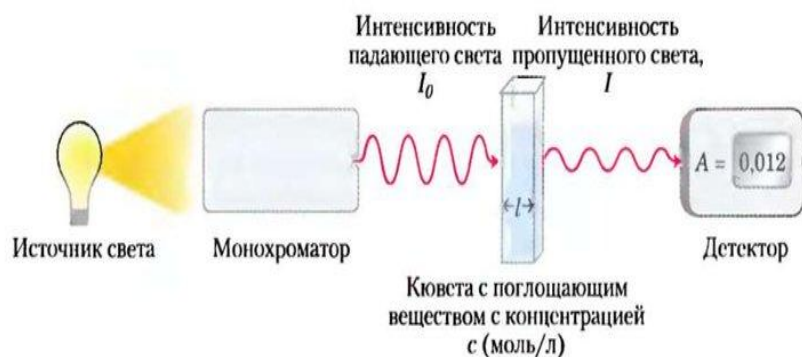
Как мы видим, методы аналитической химии помогают при отделении нуклеиновых кислот. Мы оцениваем обстановку с помощью **спектрофотометрии.**

# 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.**



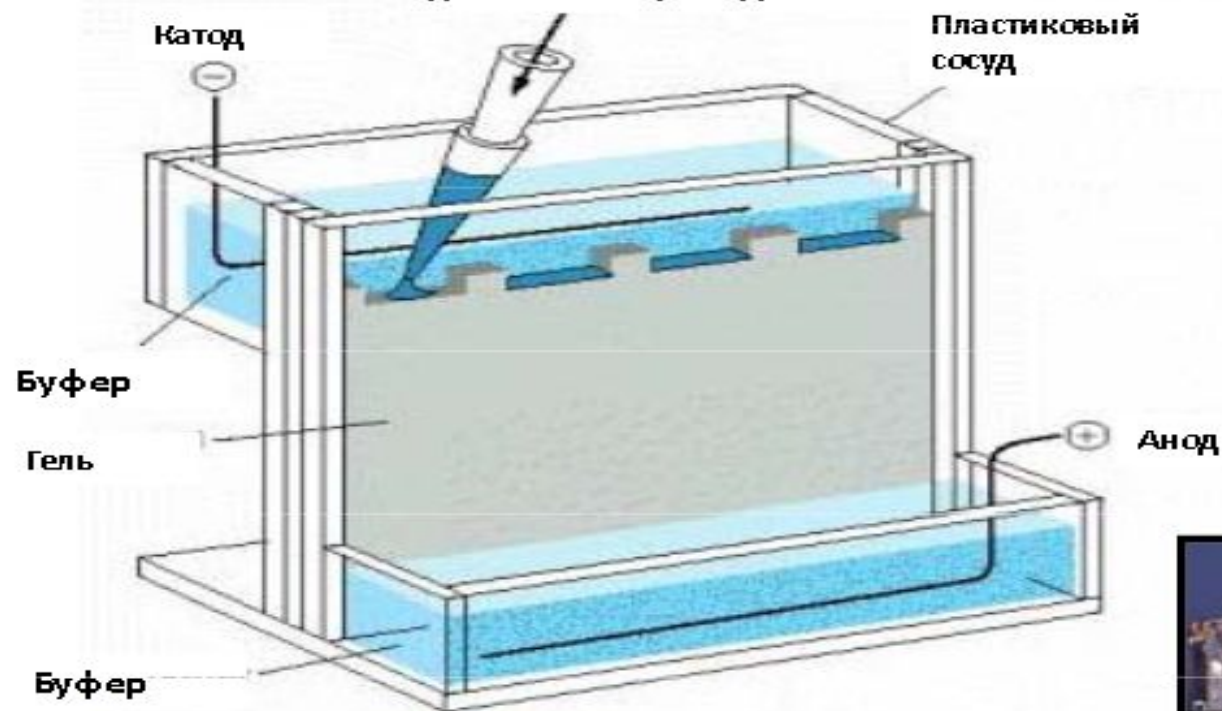
**UNICO**<sup>®</sup>

**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.**

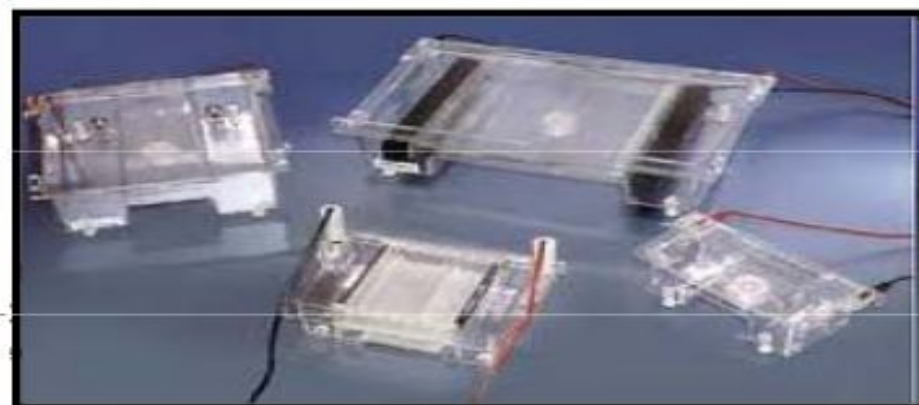
- Гель предотвращает свободную диффузию образца (в воде то же самое не получится);**
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, значит, в растворе она диссоциирует на отрицательно заряженные ионы кислоты и  $H^+$  (протоны). Если у вас есть смесь фрагментов ДНК длин 10 и 20, то соответствующие анионы кислоты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

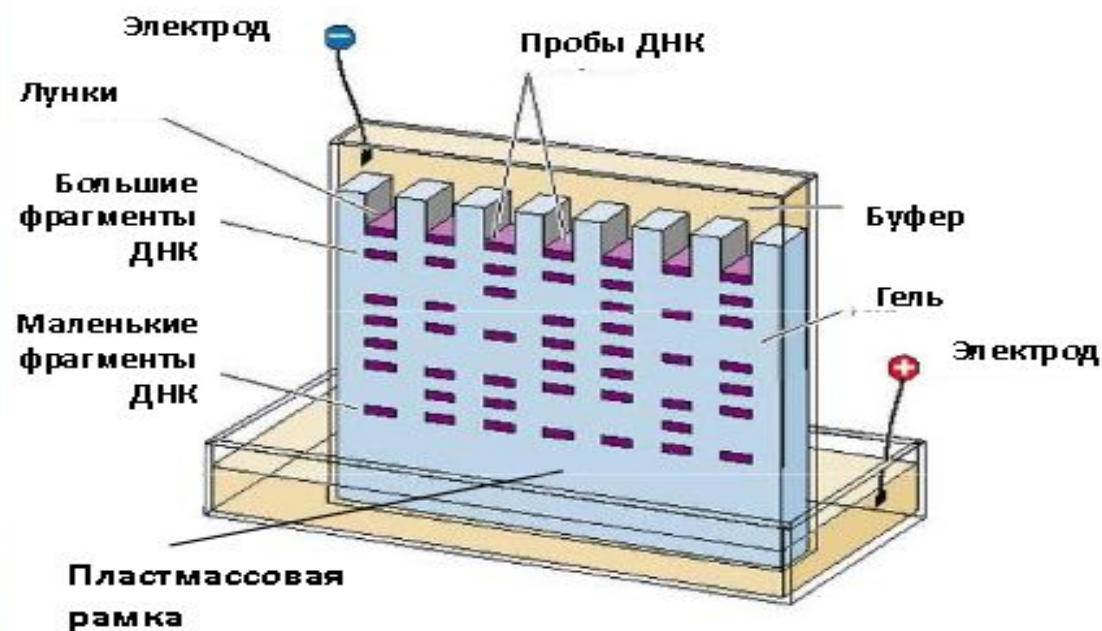
Пусть у вас есть смесь фрагментов ДНК разной длины и массы. Как разделить эту смесь и выделить индивидуальные компоненты?

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 ( $\lambda_{max} = 590$  нм). Молекулы этидий бромида интеркалируют в молекулы ДНК, т.е. встраиваются между соседними парами нуклеотидов.*

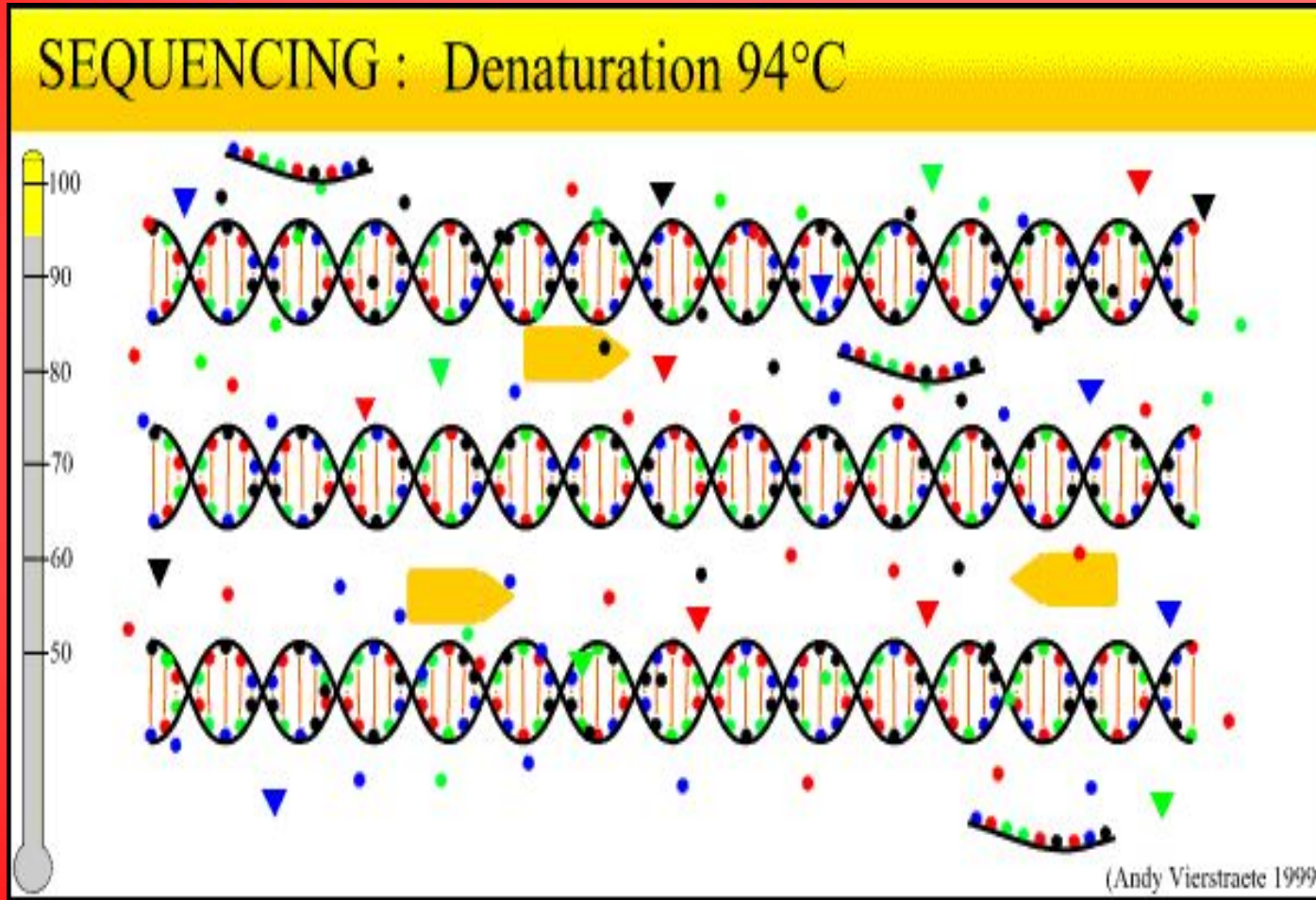
Интенсивность флуоресценции связанного этидиум бромида в 20 раз выше, чем свободного.



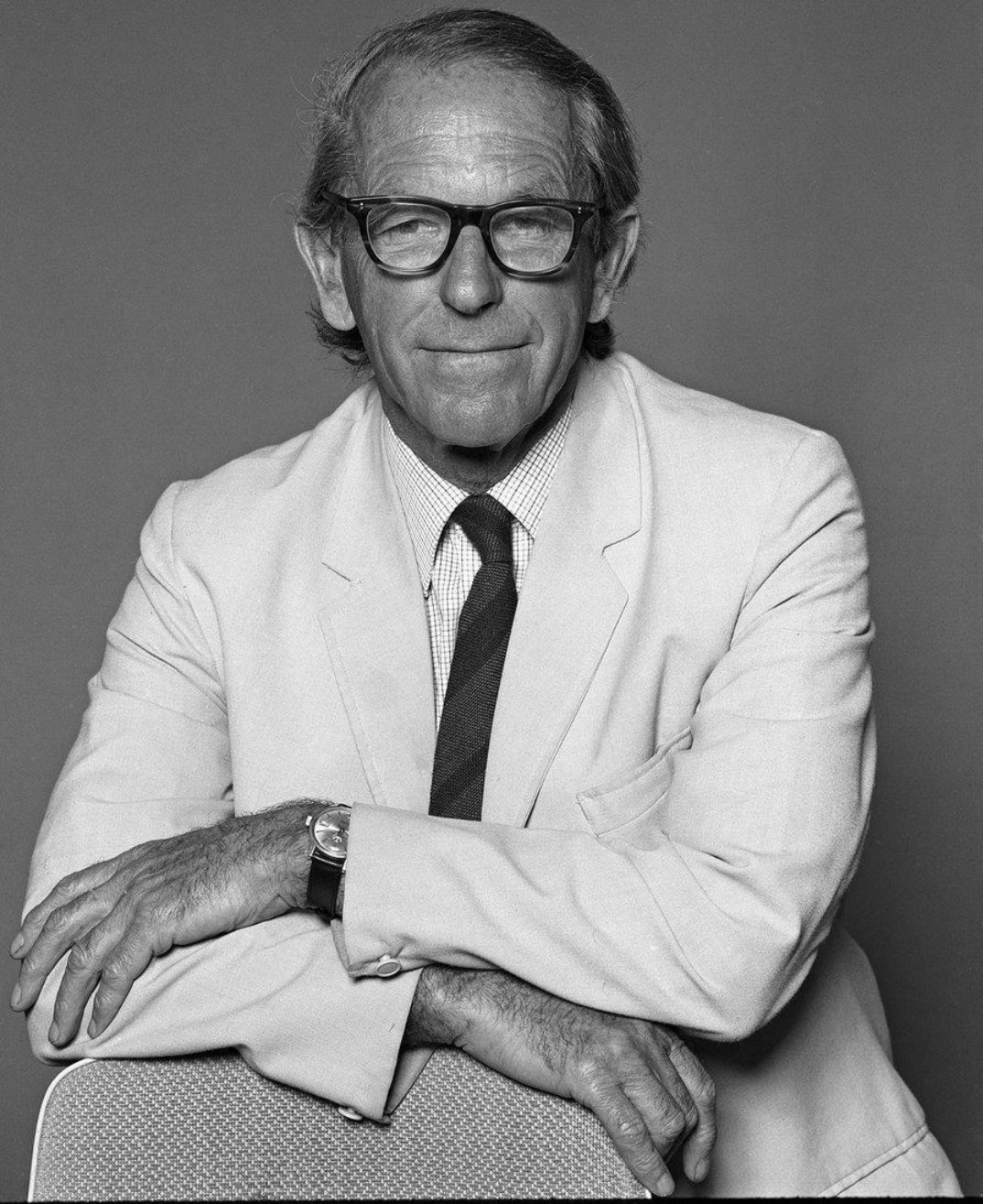
Такая окраска ДНК обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК можно увидеть в виде полоски оранжевого цвета.



# 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.

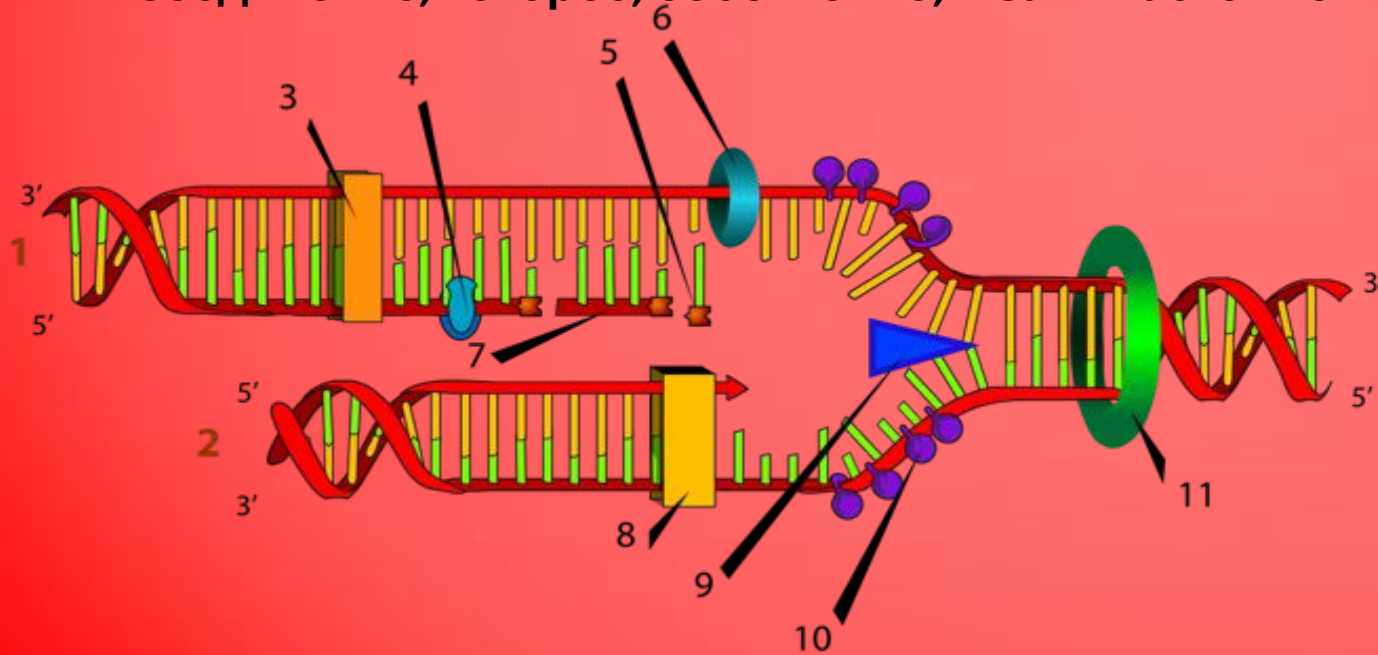


Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918–2013) — единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 годах). Первую премию присудили за установление структур белков, 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

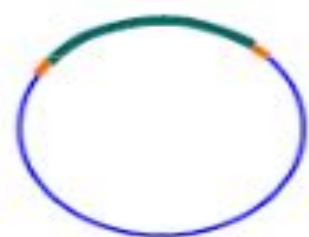


**Секвенирование ДНК – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком; все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (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  $\alpha$  ( $Pol\alpha$ ), (4) ДНК-лигаза, (5) РНК-праймер, (6) Праймаза, (7) Фрагмент Оказаки, (8) ДНК-полимераза  $\delta$  ( $Pol\delta$ ), (9) Хеликаза, (10) Однонитевые ДНК-связывающие белки, (11) Топоизомераза.

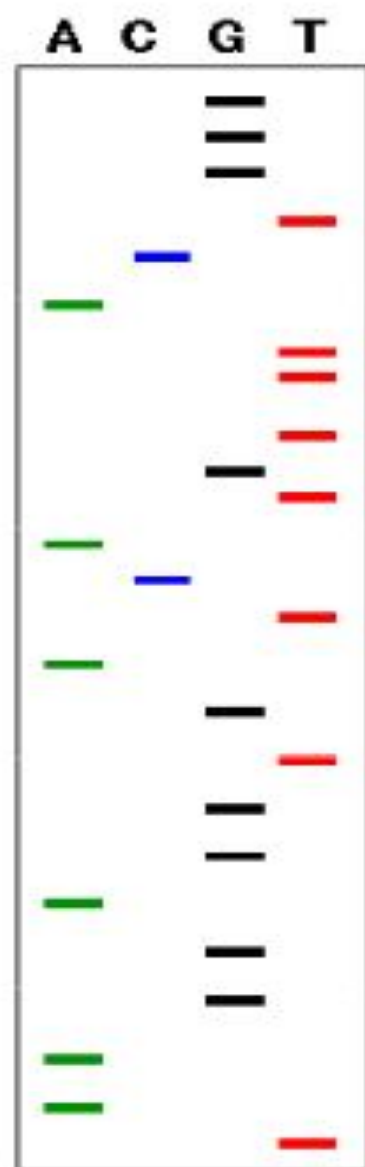


Присоединение прайера

Репликация цепи

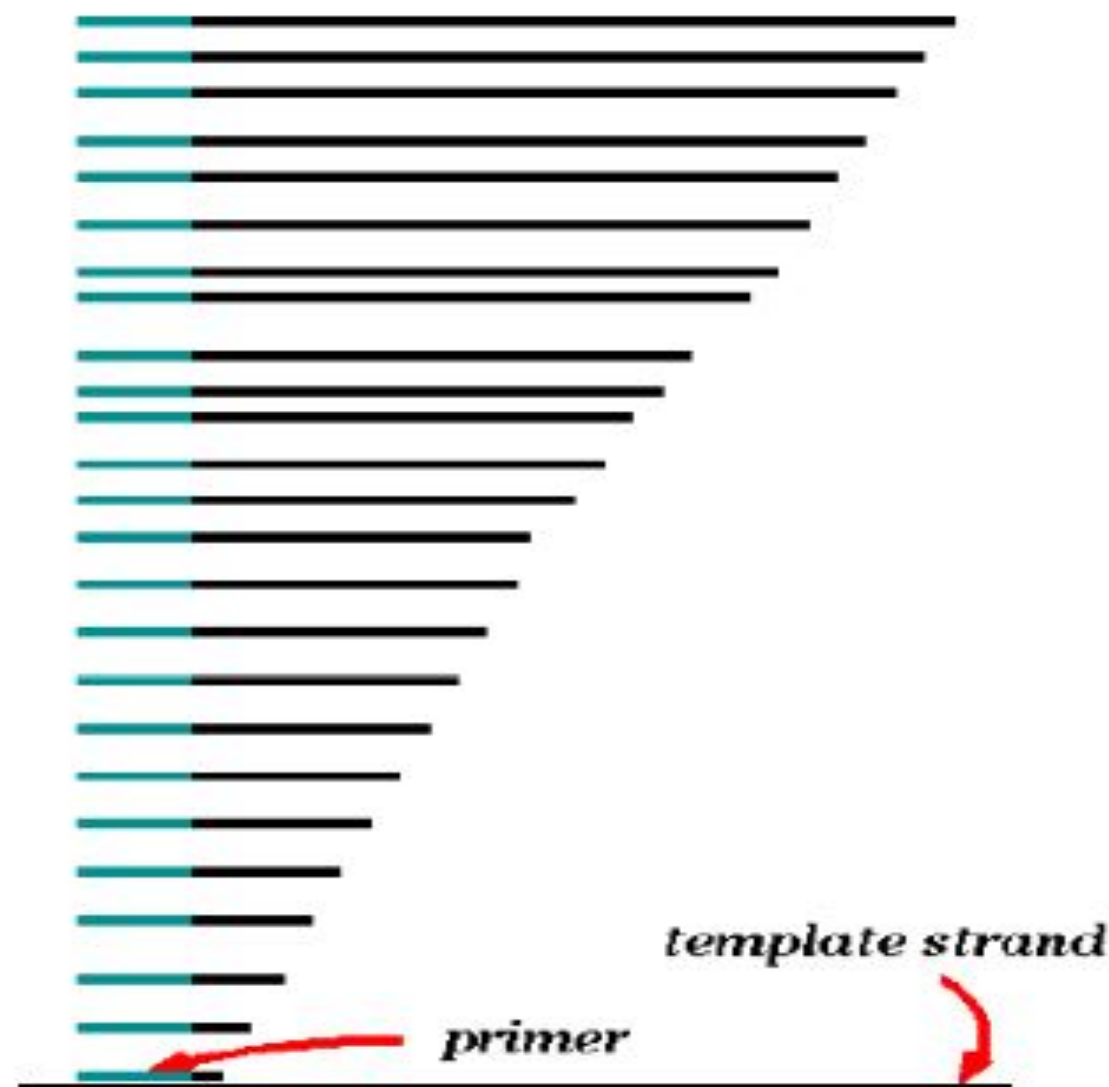
Включение ди-дезокси-НТФ

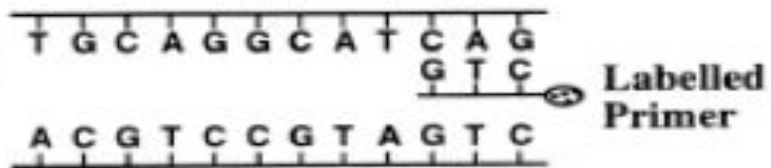
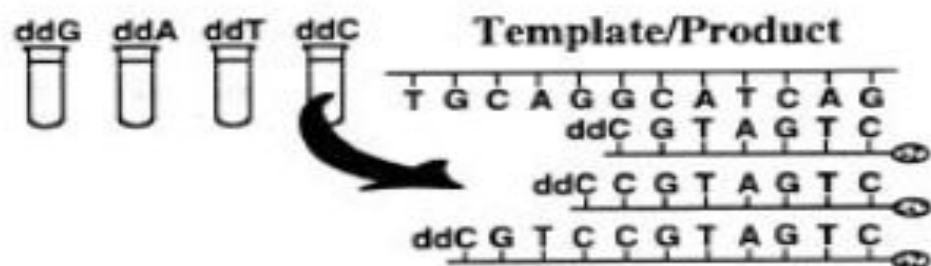
Остановка синтеза ДНК



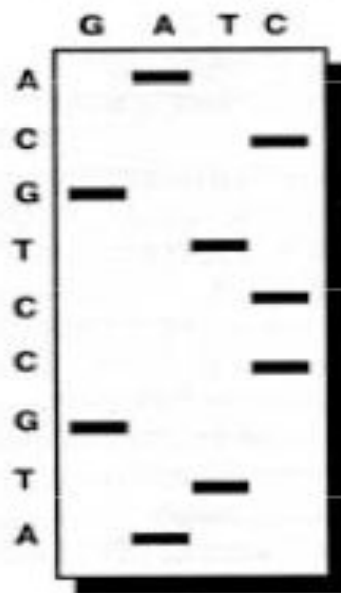
G  
G  
G  
T  
C  
A  
T  
T  
T  
G  
A  
C  
T  
A  
G  
T  
G  
G  
G  
A  
G  
G  
A  
T

Длина ДНК

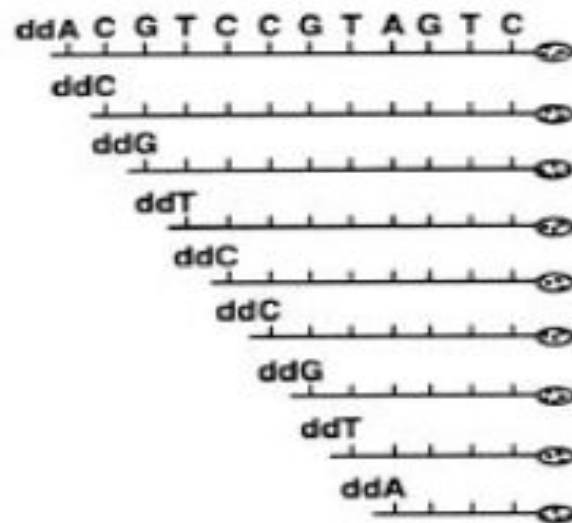


**a.**Denatured  
TemplateAdd dNTPs and  
Polymerase**b.**

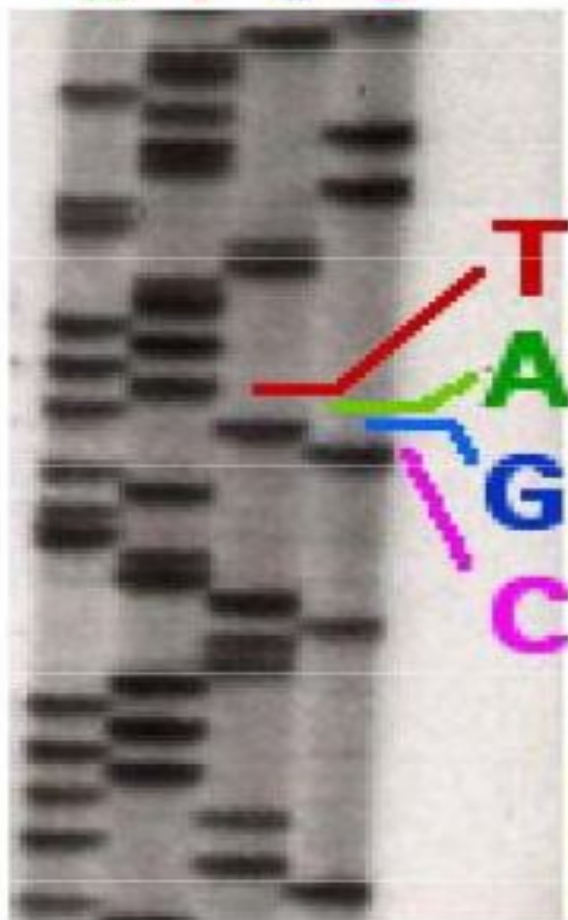
Denaturing Gel



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 разделения.

- 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.

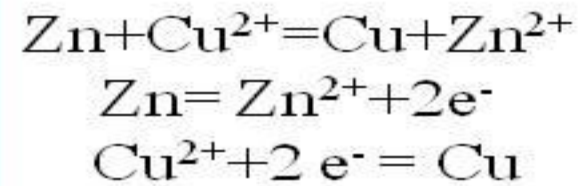
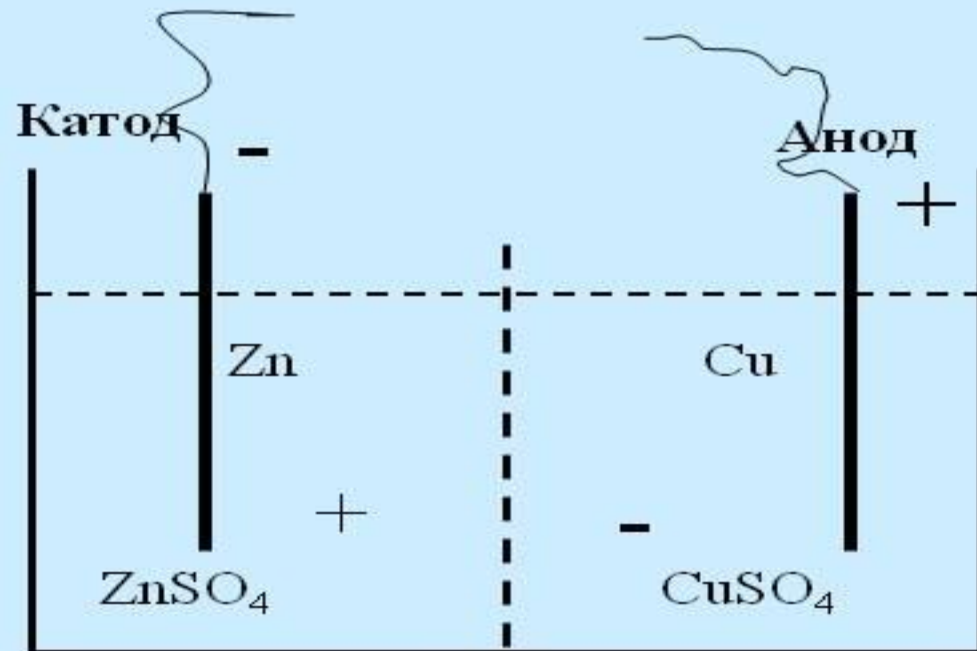
## Приборы в потенциометрии



# 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**.



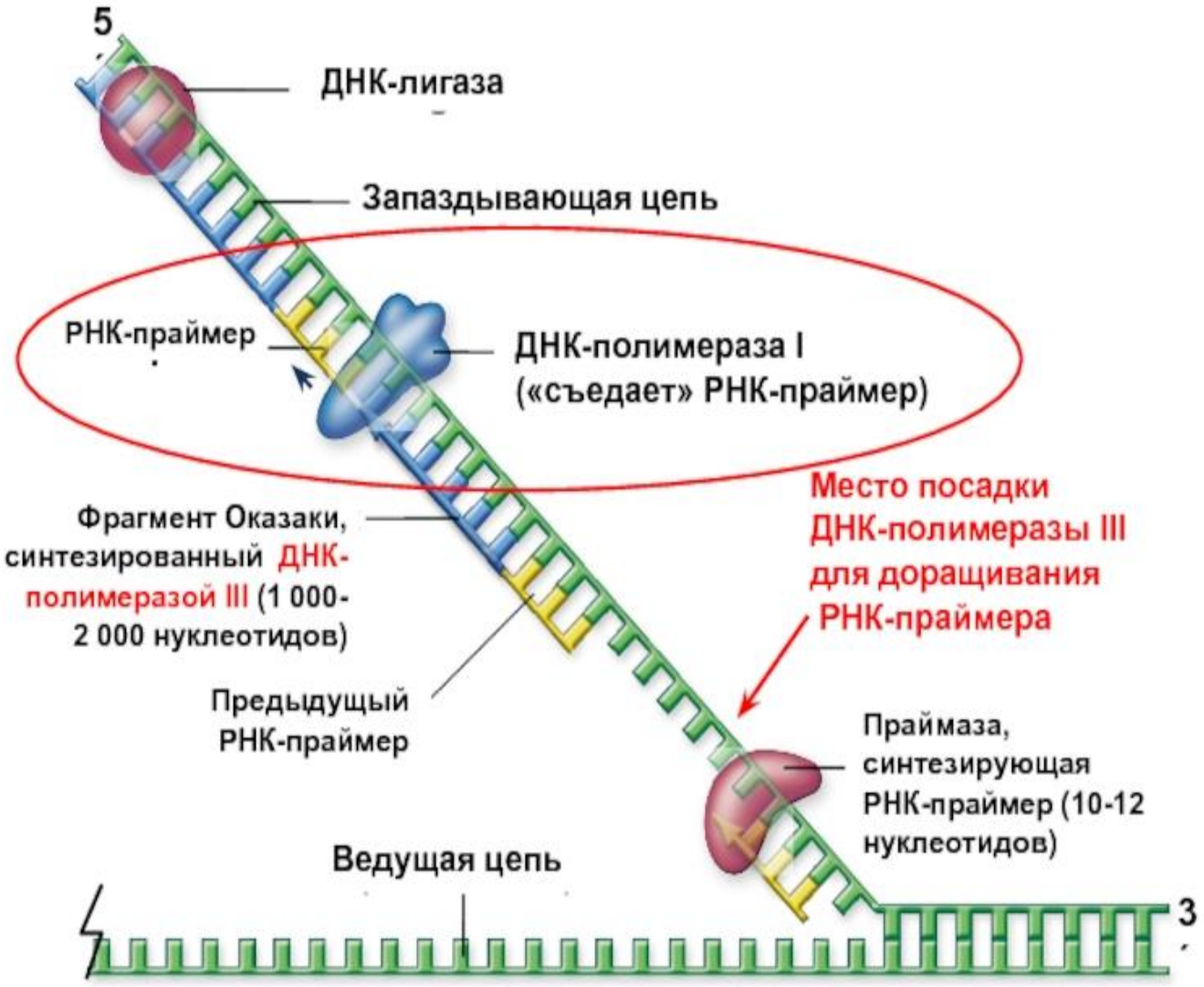
**Если пространственно разделить окислитель и восстановитель, то электроны будут переходить от восстановителя к окислителю по проводу, т.е. возникнет электрический ток**

# 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.



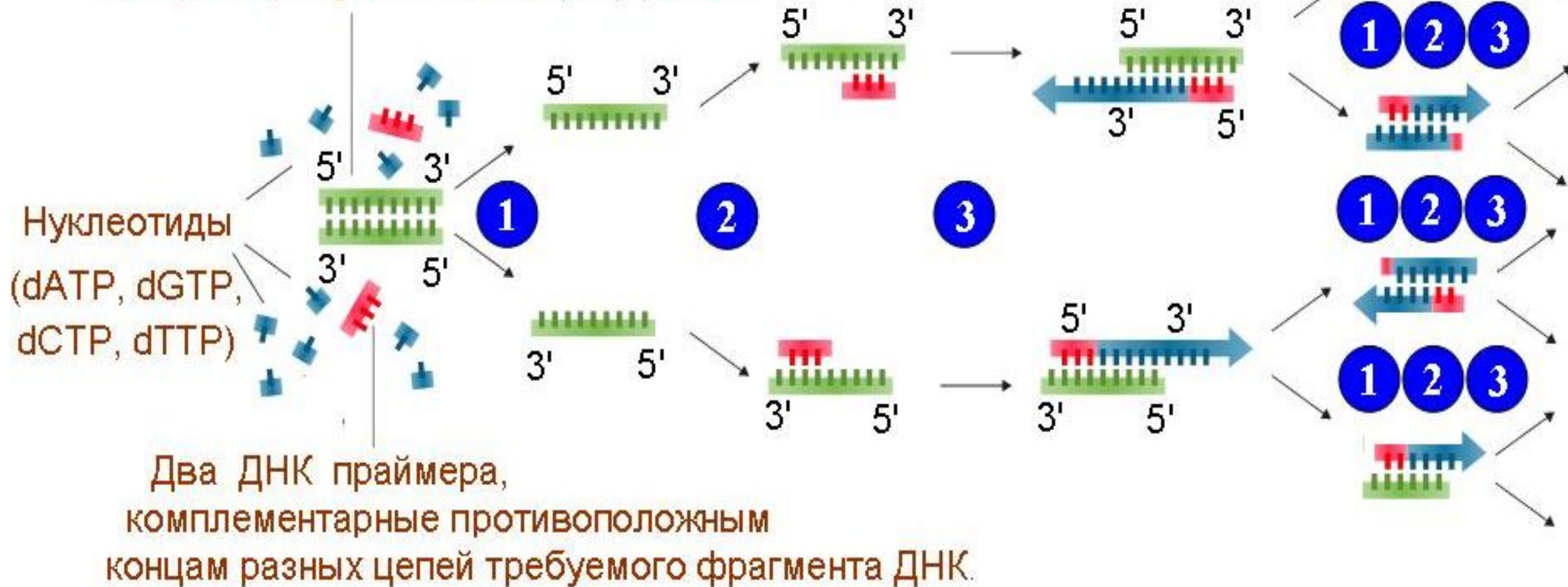




Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими **праймерами** (короткими фрагментами «затравочной» ДНК) в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «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

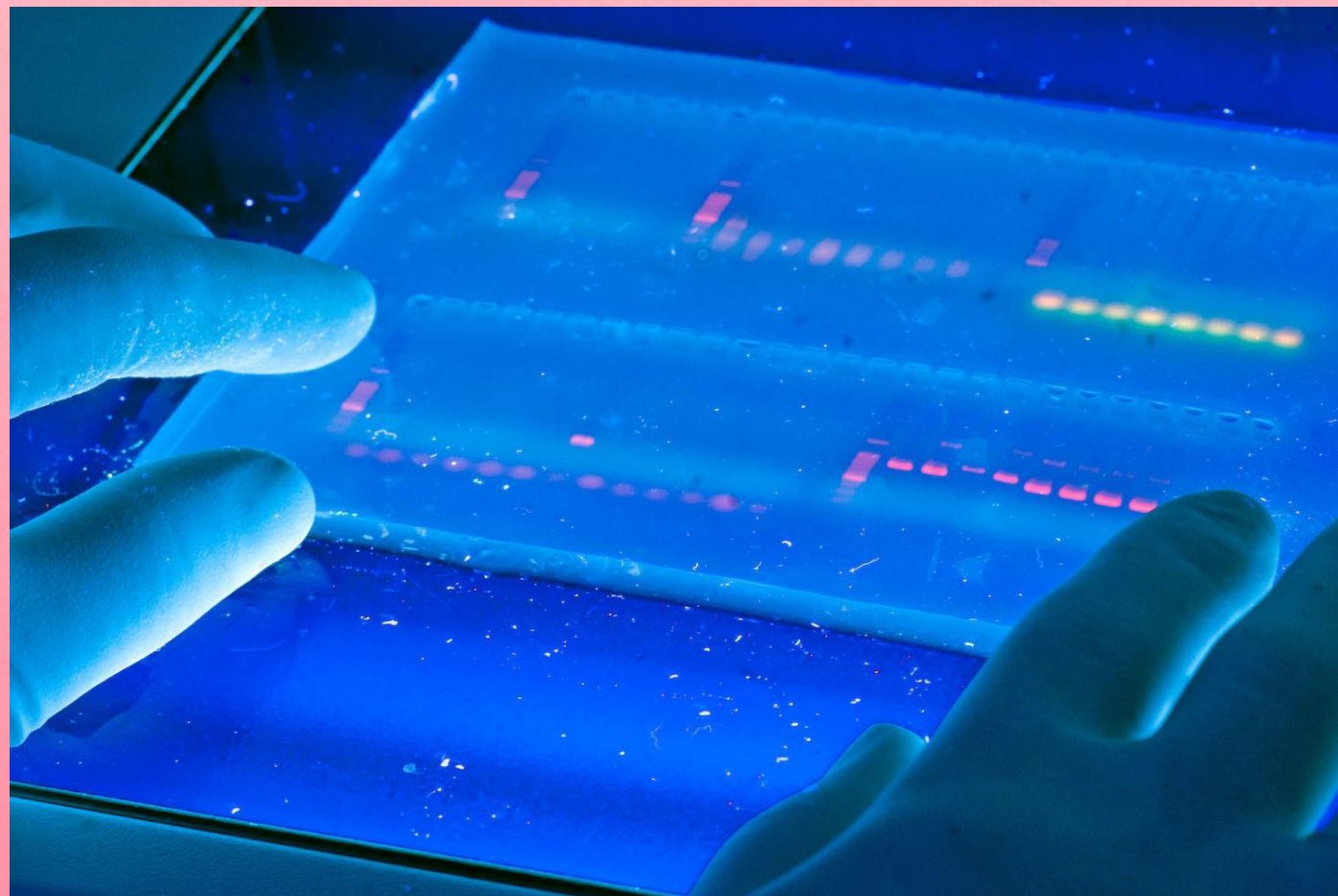
Что происходит	Температура	Длительность
<b>Этап 1: Денатурация (плавление)</b>		
Водородные связи разрываются, двуцепочечные молекулы ДНК распадаются на одноцепочечные	90-95°C	15 секунд
<b>Этап 2: Отжиг (гибридизация) праймеров</b>		
Водородные связи образуются между комплементарными фрагментами ДНК. Одноцепочечные праймеры гибридизуются с участками ДНК в начале и конце нужного фрагмента	55-65°C	30 секунд
<b>Этап 3: Элонгация</b>		
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!**