УДК 577(035.3)
ББК 28.070/28.072я73
П76

Серия основана в 2010 г.

Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / П76 редакторы К. Уилсон и Дж. Уолкер ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. — 848 с. : ил., [4] с. цв. вкл. — (Методы в биологии).

ISBN 978-5-94774-937-3

В учебном издании, написанном авторами из Великобритании, изложены основы теоретических концепций биохимии и молекулярной биологии в приложении к современным методам исследований, среди которых культивирование клеток, микроскопия, центрифугирование, иммунохимический анализ, методы биоинформатики и генной инженерии, методы выделения и очистки белков, хроматография, масс-спектрометрия, электрофорез, оптические методы и радиоизотопный анализ.

Для студентов вузов, преподавателей и аспирантов медико-биологического профиля, а также специалистов биохимиков, молекулярных биологов, химиков, биофизиков, фармакологов и медиков, работающих в области фундаментальных исследований.

УДК 577(035.3)
ББК 28.070/28.072я73

Первый тираж осуществлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 07-04-07008

Учебное издание

Серия: «Методы в биологии»

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Редакторы К. Уилсон и Дж. Уолкер

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*
Художник *Н. А. Новак*
Технический редактор *Е. В. Денюкова*. Корректор *Д. И. Мурадян*
Компьютерная верстка: *Т. Э. Внукова*

Подписано в печать 25.12.12. Формат 70×100/16.
Усл. печ. л. 68,90. Тираж 700 экз. Заказ Т-26.

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»
125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, http://www.Lbz.ru

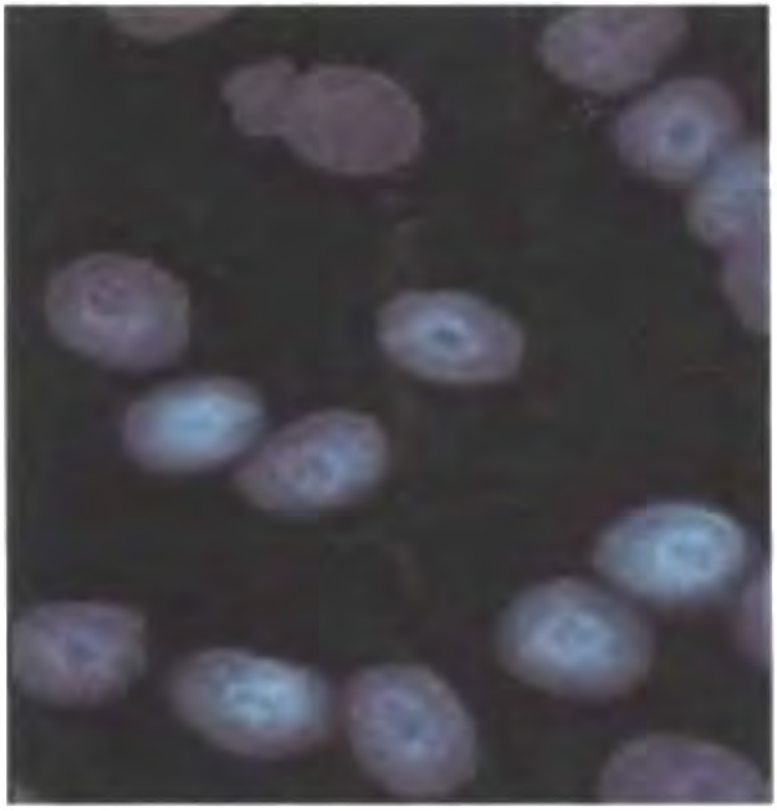
При участии ООО Агентство печати «Столица» www.apstolica.ru, e-mail: apstolica@bk.ru

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленного электронного оригинал-макета в типографии филиала ОАО «ТАТМЕДИА» «ПИК «Идел-Пресс». 420066, г. Казань, ул. Декабристов, 2. E-mail: idelpress@mail.ru

Originally published in the English language by Cambridge University Press under the title "Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology", Sixth edition.
© Copyright Cambridge University Press, 2005
© Перевод на русский язык, оформление. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013

ISBN 978-5-94774-937-3

а)



б)

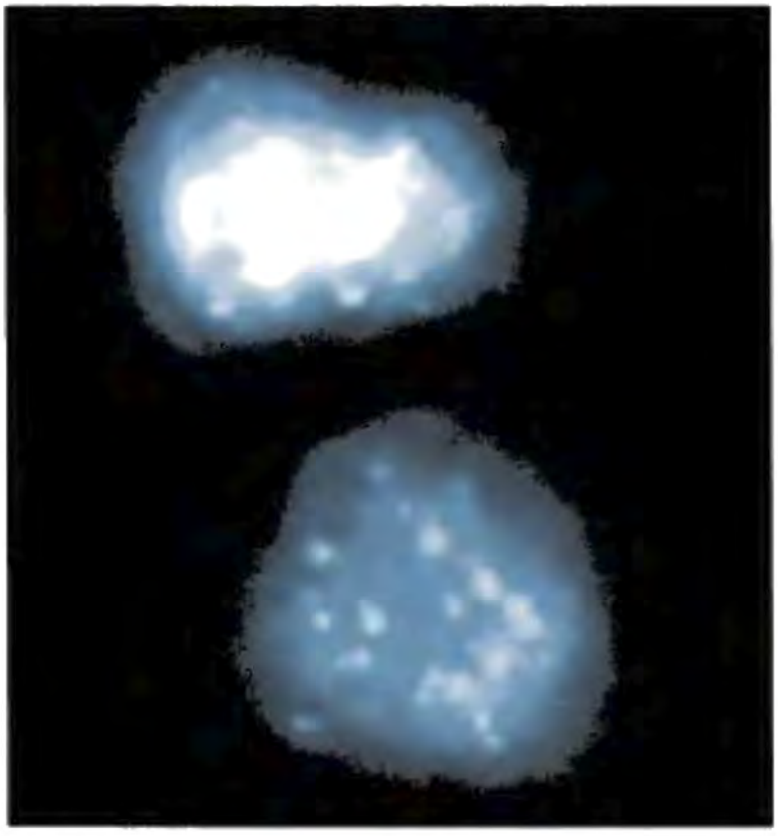


Рис. 2.4. Окрашивание микоплазмы в клетках. *а* — окрашивание с помощью негативного красителя Hoechst: клеточная ДНК в ядре окрашивается в синий цвет, что позволяет увидеть флуоресценцию ядра. *б* — окрашивание с помощью позитивного красителя Hoechst: окрашивается ДНК микоплазмы в цитоплазме клеток

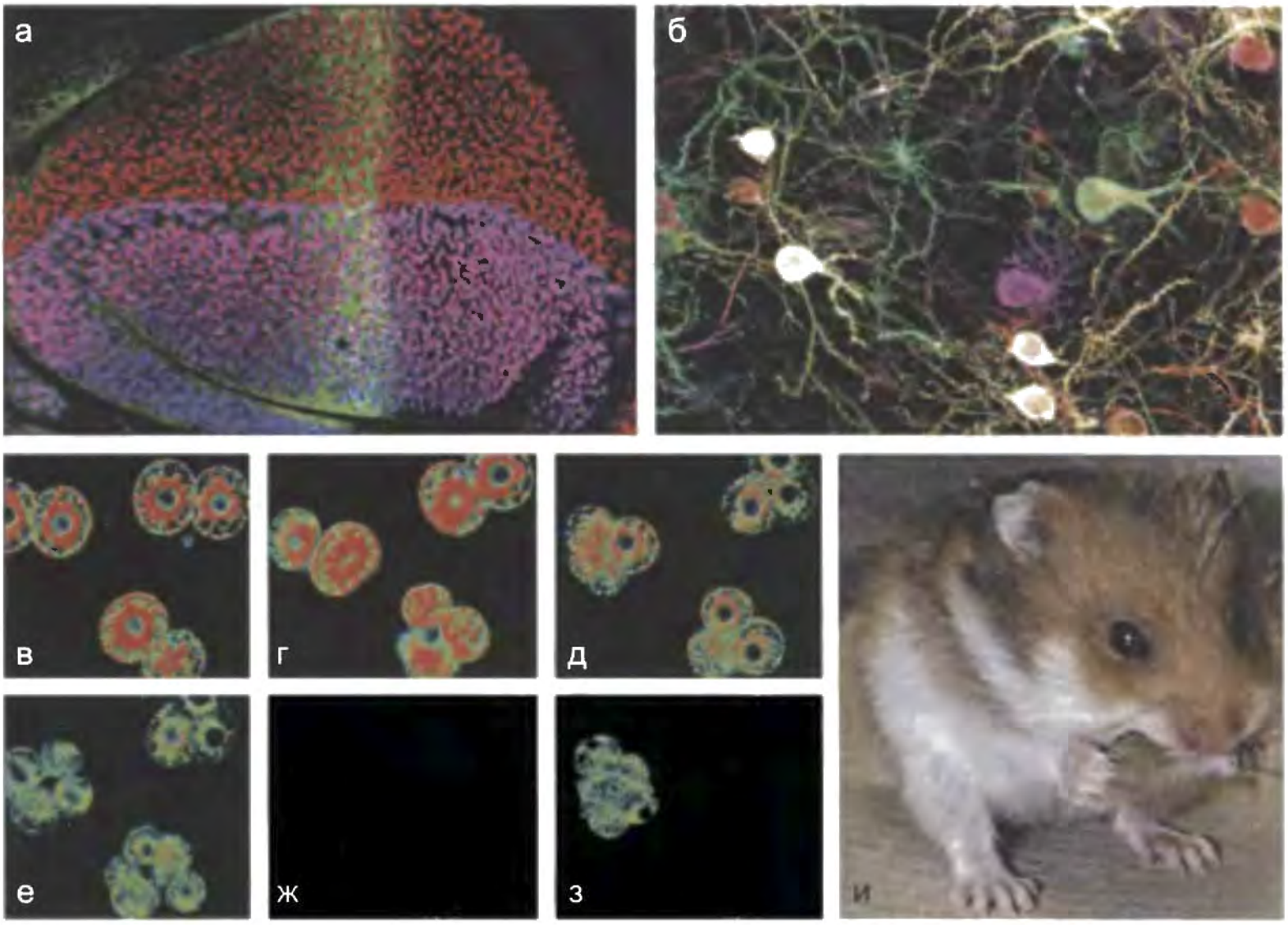


Рис. 4.13. Получение оптических срезов. Оптические срезы, полученные с помощью ЛСКМ (*а* и *б*), и двухфотонное изображение (*в*). *а*) Крыловой имагинальный диск дрозофилы третьего личиночного возраста. Изображение получено с помощью криптон-аргонового лазера мощностью 25 мВт, излучающего в синей (488 нм), желтой (568 нм) и красной области (647 нм). В качестве флуорофоров использовали флуоресцеин (возбуждение 496 нм, испускание 518 нм), лиссаминродамин (возбуждение 572 нм, испускание 590 нм) и цианин 5 (возбуждение 649 нм, испускание 666 нм). Изображение воспринималось одновременно в виде единого оптического среза через красный, зеленый и синий каналы соответственно и накладывалось для получения трехцветного (красный/зеленый/синий) изображения (см. рис. 4.11). Изображение отражает экспрессию трех генов крыла: *vestigial* (красный), *apterous* (синий) и *CiD* (зеленый). Области перекрывания экспрессии генов проявляются в виде дополнительных цветов. *б*) Нейроны, меченные различными липофильными красителями. *в*) Двухфотонное изображение трех живых эмбрионов хомяка, меченных митохондриальным красителем Mitotracker-X-rosamine. Изображения *в–з* получали с 24-часовым интервалом. Один из трех эмбрионов был позднее перенесен во взрослую самку, которая родила детеныша, названного Лазером, что подтверждает жизнеспособность образцов, перенесших подобную процедуру. Фотографии любезно предоставлены Джимом Вильямсом и Шоном Кероллом (*а*), Венбио Ганом и Джеффом Лихтманом (*б*), Джейн Сквиррелл и Берри Бевистером (*в*)

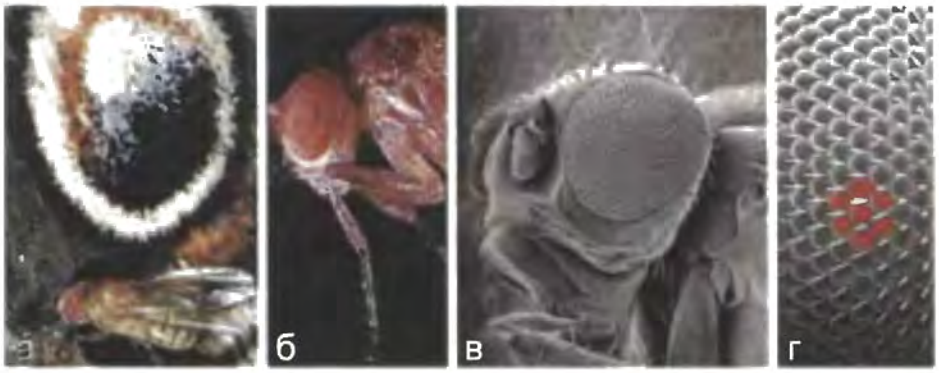


Рис. 4.17. Изображение, полученное с помощью светового микроскопа (стереомикроскопа, *а* и *б*) и электронного микроскопа (сканирующего электронного микроскопа, *в* и *г*). Изображение мушки *Drosophila melanogaster* на крыле бабочки *Precis coenia* (*а*) с дополнительным увеличением области головы красноглазой мушки (*б*). Изображение той же области головы мушки, полученное с помощью СЭМ (*в*) и дополнительно увеличенное изображение отдельных омматидий глаза (*г*). Обратите внимание, что изображение в стереомикроскопе имеет реальные цвета, в то время как изображение в СЭМ получается в цветах серой шкалы. В изображения, получаемые с помощью ЭМ, можно добавить цвет только цифровыми методами (*д*). Фотографии *б–г* любезно предоставлены Георгом Холдером

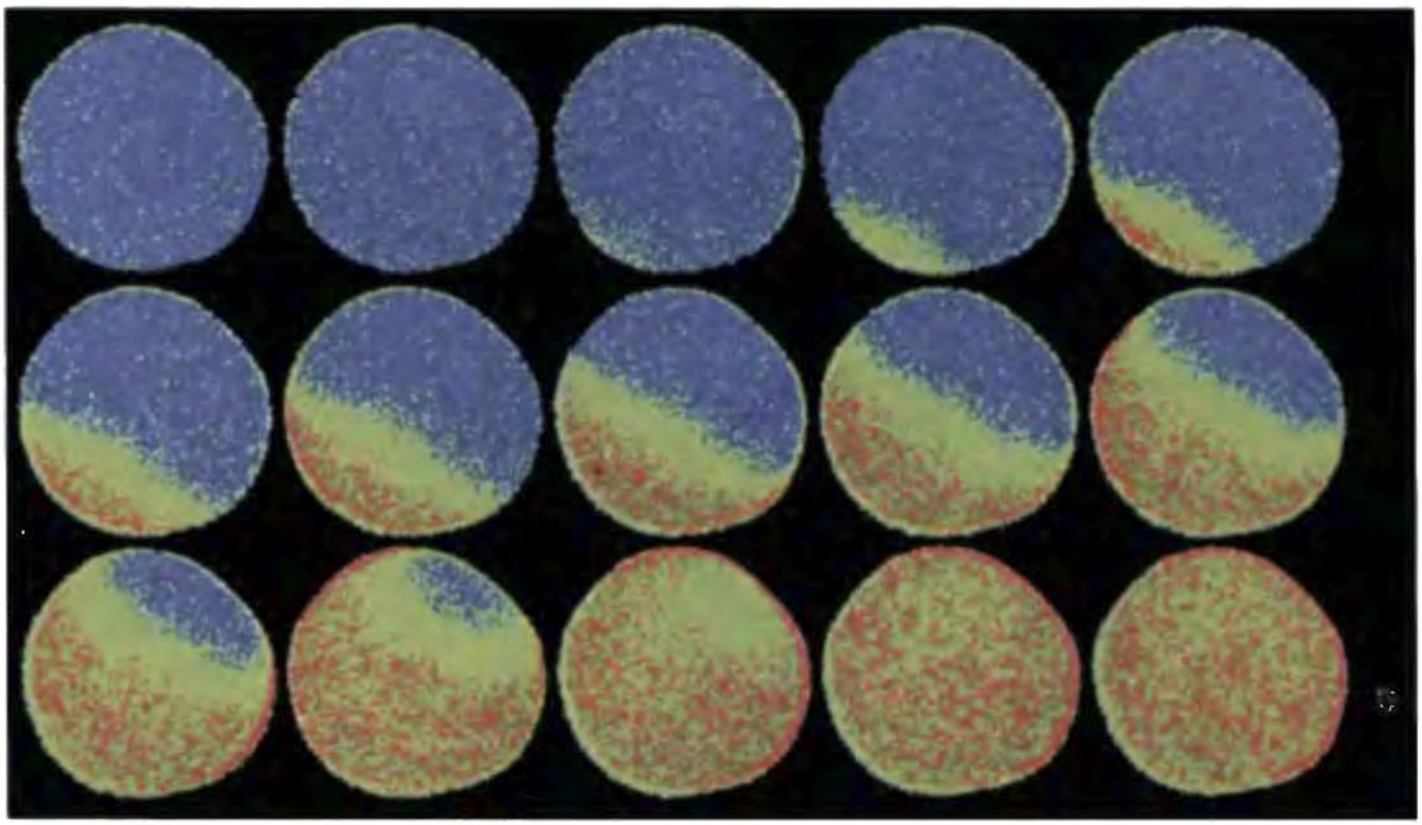


Рис. 4.21. Визуализация кальция в клетках. Волна проникновения кальция в оплодотворенную яйцеклетку морской звезды. В яйцеклетку с помощью микроинъекции ввели чувствительный к кальцию флуоресцентный краситель fluo-3, а затем осуществили оплодотворение путем добавления спермы. Покадровую съемку выполняли с помощью конфокального микроскопа (линза 40х, водная иммерсия). Изображения оптического среза в области экватора яйцеклетки получали каждые 4 с в нормальном режиме сканирования (каждый раз по два кадра), а затем изображения приводились к исходному изображению (до оплодотворения). Окраска изображений отражает следующие ситуации: синие области соответствуют низкому содержанию кальция, зеленые — промежуточному уровню, а красные — высокому. Следует заметить, что волна кальция распространяется через всю цитоплазму ооцита. Изображение любезно предоставлено Стивом Стрикером

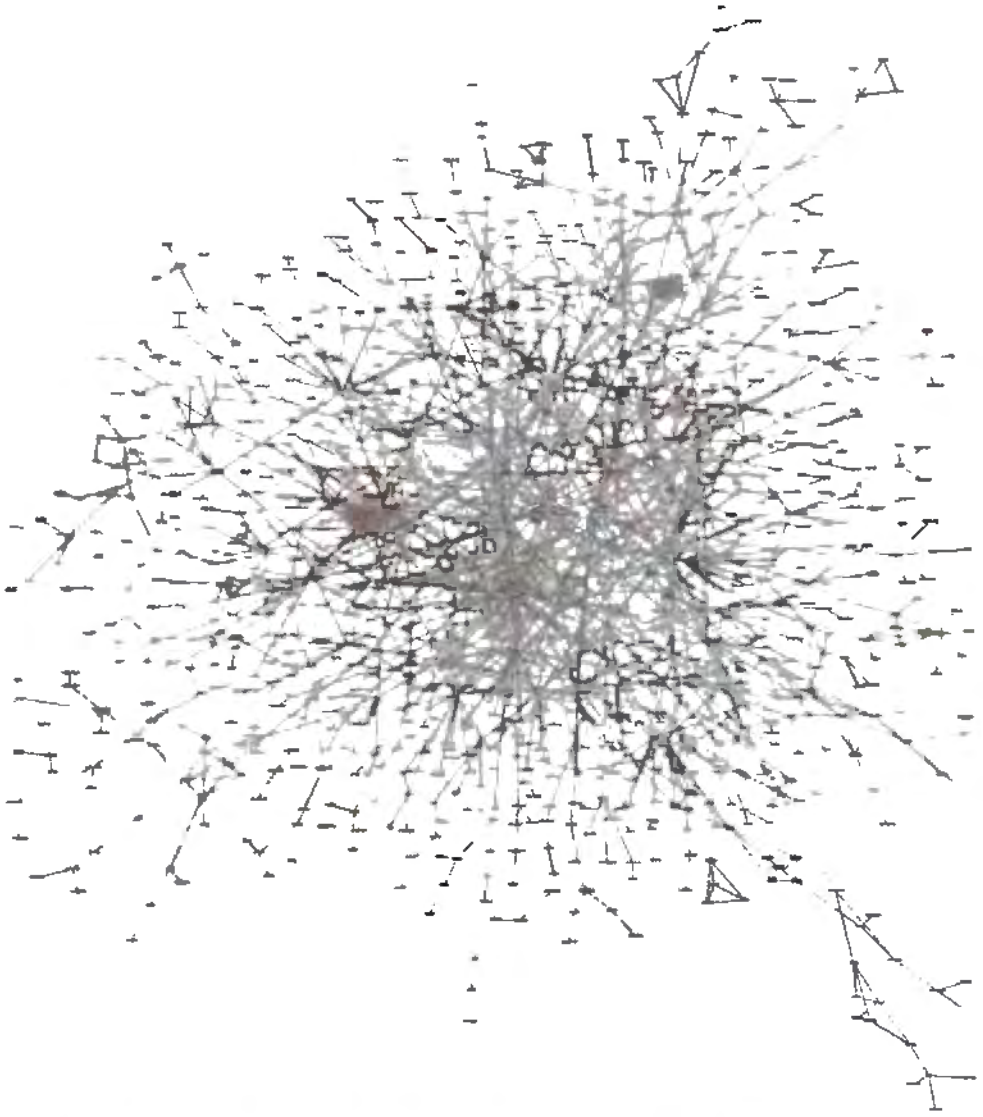


Рис. 8.11. Карта взаимодействий в протеоме дрожжей, созданная на основе опубликованных белковых взаимодействий (см. текст). Любезно предоставлено Бенно Швиковским, Петером Йетцем и Стенли Филдзом. Печатается с разрешения Nature Publishing Group

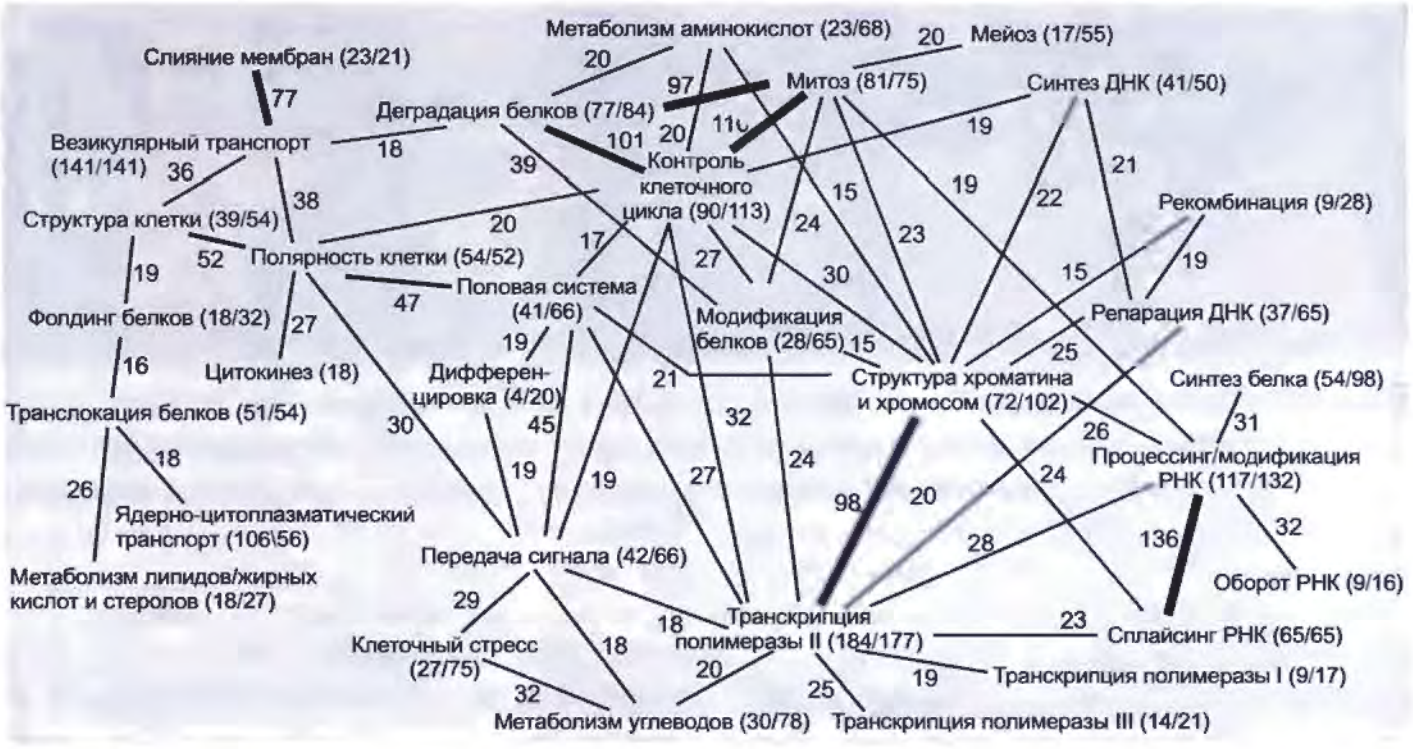


Рис. 8.12. Упрощенное представление рис. 8.11 с идентификацией взаимодействий между функциональными группами белков (см. текст). Любезно предоставлено Бенно Швиковским, Петером Йетцем и Стенли Филдзом. Печатается с разрешения Nature Publishing Group

Предисловие редакторов перевода

Если обратиться к истории развития «наук о живом» (к этим наукам относится и биохимия), станет очевидным, что выдающиеся открытия в этих науках были сделаны только при переходе научных исследований на качественно новый уровень. Так, создание технологий рекомбинантных ДНК стало возможным после открытия эндонуклеаз рестрикции II типа, распознающих определенные специфические последовательности ДНК. После разработки методов химического синтеза ДНК и РНК была создана основа для различных методов анализа с помощью ДНК- и РНК-зондов, нашедших широкое применение не только в науке, но также в медицине и криминалистике (ДНК-дактилоскопия). Химический синтез целых генов позволяет не только избежать сложной процедуры клонирования, но и оптимизировать последовательности эукариотических генов для их экспрессии в прокариотах. Накопление результатов химического и ферментативного секвенирования ДНК стало одной из предпосылок появления новой науки биоинформатики. В настоящее время количество белковых последовательностей в международных банках данных GeneBank и EMBL, полученных с помощью трансляции ДНК, в десятки тысяч раз превосходит количество аминокислотных последовательностей, полученных с помощью пептидного секвенирования. Без развития этих методов было бы просто невозможно определение нуклеотидных последовательностей геномов целых организмов, включая геном человека.

Совершенствование методов секвенирования ДНК позволило снизить себестоимость этого процесса в десятки тысяч раз. Например, в начале выполнения проекта по секвенированию генома человека его бюджет оценивался примерно в 10 млрд долл. США (в конечном итоге затраты на выполнение проекта составили меньше 3 млрд долл.). Секвенирование генома одного из открывателей двухцепочечной структуры ДНК Джеймса Уотсона стоило уже менее 1 млн долл., а уже в феврале 2009 г. на ежегодной конференции Advances in Genome Biology and Technology было объявлено, что секвенирование генома любого человека обойдется в 5000 долл. и может быть осуществлено всего за три минуты.

Среди наиболее революционных и практически важных методов анализа ДНК особо следует упомянуть полимеразную цепную реакцию (ПЦР)*. Сейчас без этого метода просто невозможно представить себе современную фундаментальную науку и такие области ее применения, как биотехнология и медицина.

---

* ПЦР в реальном времени/под ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова. — 2-е изд., испр. — М.: БИНОМ, 2009. — 221 с.

Различные методы определения структуры биологических молекул (рентгеноструктурный анализ, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия и т. д.) позволяют получать информацию о механизмах многих процессов (среди них ферментативный катализ, взаимодействие антиген–антитело, рецепторное распознавание и т. д.). Насколько важное значение имеют все эти методы для развития современной науки, можно понять на основании того факта, что ученые, разработавшие вышеупомянутые методы, были удостоены Нобелевских премий.

Эта книга (заметим, что вниманию читателей представляется перевод уже шестого (!) издания) во многом отличается от «классических» учебников биохимии и молекулярной биологии. Здесь читатель найдет не изложение известных фактов и теоретических концепций, а описание «маршрутов» получения новых знаний с помощью различных новейших методов и концепций. Уклон в «практическую» биохимию был сделан авторами осознанно, поскольку, как отмечается в предисловии авторов, необходимость в таком учебнике была связана с многочисленными просьбами студентов, прежде всего в Великобритании, а также в других странах.

Учебник имеет очень большой объем и состоит из 16 глав. Главы написаны специалистами в конкретных областях. Чтобы понять широту и полноту охвата темы достаточно изучить страницы оглавления: в книге отражены как общие приемы работы в биохимической лаборатории и особенности работы с культурами клеток, так и многие методы анализа — от общих (центрифугирование, микроскопия, электрофорез, методы выделения и очистки ДНК и белка, хроматография) до достаточно специфических (таких, как иммунохимический и радиоизотопный методы анализа). Отдельные главы посвящены обсуждению современных методов молекулярной биологии, биоинформатики, принципов работы с рекомбинантной ДНК, а также основ генетического анализа. Подробно изложены основы и методы спектрального анализа и масс-спектрометрии. Важное место отведено методам разделения и очистки клеточных компонентов и особенно методам выделения нуклеиновых кислот и белков (ферментов). Рассмотрены основные закономерности ферментативного катализа и взаимодействия рецепторов с лигандами. Можно смело сказать, что авторы сделали попытку «объять необъятное» — ведь здесь изложены основы почти всех современных физико-химических методов исследования, применяемых при изучении живых организмов.

Мы хорошо знаем, что аналогов такой книги в отечественной литературе просто нет. По близкой тематике имеется всего одна-единственная книга — Глик Б., Пастернак Дж. «Молекулярная биотехнология. Принципы и применение» (Пер. с англ. — М: Мир, 2002 г.). Учитывая темпы развития современной науки, издание нового учебника в этой области совершенно необходимо.

Эта книга адресована широкой аудитории студентов, аспирантов и специалистов различного профиля, в первую очередь биологам, химикам, биохимикам и биофизикам, фармакологам, а также медикам. Для многих специалистов она, возможно, станет отличным справочником в области практической биохимии и молекулярной биологии и даже по-настоящему настольной книгой.

А. В. Левашов,
В. И. Тишков

Предисловие редакторов шестого издания

В предисловиях к предыдущим изданиям авторы сформулировали свою задачу как создание учебного пособия для студентов, где будут изложены теоретические основы и практические детали, необходимые для понимания биохимии.

За 30 лет, которые прошли с момента публикации первого издания этой книги в 1975 г., в нашем понимании биохимических процессов в живых клетках произошли чрезвычайно важные и значительные изменения. За это время был завершен проект «Геном человека», выделились новые области знания — биоинформатика и протеомика. Многие знания, которыми мы сейчас оперируем, обязаны успехам молекулярной биологии, поэтому авторы решили расширить название (и содержание) книги, включив туда молекулярную биологию, что, безусловно, полностью отвечает первоначальной авторской идее.

Авторы старались пойти навстречу многочисленным пожеланиям, поступавшим из университетов Великобритании и из-за океана, где данная книга на протяжении многих лет используется студентами в качестве учебного пособия. В связи с этим книга была дополнена двумя новыми главами: одна посвящена клеточным культурам, другая — микроскопии. Кроме того, показалось полезным добавить разделы, посвященные принципам и практическим аспектам клинической биохимии, включая диагностическую энзимологию и статистические методы оценки биохимических данных, а также изложить подход для оценки качества экспериментальных данных, принятый в Великобритании (UK NEQAS).

Первоначальная идея — отразить лишь те экспериментальные методы, с которыми студенты знакомятся на практических занятиях в лаборатории, была пересмотрена и расширена. В настоящем издании обсуждаются все методы, которые сегодня помогают разобраться в различных аспектах функционирования клетки. Вот два примера реализации нового авторского подхода. Во-первых, в главе, посвященной методам масс-спектрометрии, уделено особое внимание применению этих методов для изучения белков и для решения задач протеомики. Во-вторых, в главе, посвященной мембранным рецепторам, детально рассмотрен аналитический метод — спектроскопия плазмонного резонанса, который в настоящее время играет весьма важную роль при изучении функций рецепторов и механизмов передачи

сигнала в клетке. Кроме того, все главы книги были переработаны с учетом последних научных достижений и снабжены примерами, которые помогут студентам лучше разобраться в изложении теоретических основ и особенностей применения соответствующих методов.

Нам приятно представить читателю пять новых авторов — это Элестер Эйткен (масс-спектрометрия), Энвар Бейдоун (культура клеток), Джон Файфф (клиническая биохимия), Кэй Олендик (центрифугирование) и Стефен Пэддок (микроскопия). Мы хотим выразить искреннюю благодарность всему авторскому коллективу за вклад в создание этого издания. С прискорбием вынуждены сообщить о безвременной кончине Дерека Гордона, автора двух глав по спектральным методам. Дерек был воодушевленным, преданным своему делу и очень уважаемым преподавателем биохимии, который всегда стремился объяснить студентам химические основы любого аналитического метода, который используется в биохимических исследованиях.

Авторы по-прежнему будут благодарны за все конструктивные замечания как со стороны студентов, которые обучаются по этому пособию, так и со стороны преподавателей, которые используют книгу в учебном процессе. Наконец, мы выражаем благодарность тем авторам и издателям, которые позволили воспроизвести в книге свои рисунки и фотографии. Особую благодарность мы выражаем Катрине Холлидей и ее коллегам в издательстве Cambridge University Press, оказавшим нам неоценимую поддержку при подготовке настоящего издания.

Джон Уолкер и Кейт Уилсон
Ноябрь 2004

Авторы

Э. Эйткен (*Professor A. Aitken*, Division of Biomedical & Clinical Laboratory Sciences, University of Edinburgh, George Square, Edinburgh EH8 9XD, Scotland, UK)

А.Р. Бейдоун (*Dr A.R. Baydoun*, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, College Lane, Hatfield, Herts AL10 9AB, UK)

Дж. Файфф (*Dr J. Fyffe*, Consultant Clinical Biochemist, Department of Clinical Biochemistry, Royal Hospital for Sick Children, Yorkhill, Glasgow G3 8SF, Scotland, UK)

Д. Гордон (*Professor D.B. Gordon (Deceased)*, Formerly, Department of Biological Sciences, Metropolitan University of Manchester, Chester Street, Manchester M15 6BH, UK)

К. Олендик (*Professor K. Ohlendieck*, Department of Biology, National University of Ireland, Maynooth, Co. Kildare, Ireland)

С. Пэддок (*Dr S.W. Paddock*, Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular Biology, University of Wisconsin, 1525 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA)

Р. Рейплэй (*Dr R. Rapley*, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, College Lane, Hatfield, Herts AL10 9AB, UK)

Р. Слейтер (*Professor R.J. Slater*, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, College Lane, Hatfield, Herts AL10 9AB, UK)

Р. Торп (*Professor R. Thorpe*, National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, UK)

С. Торп (*Dr S. Thorpe*, National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, UK)

Дж. Уолкер (*Professor J.M. Walker*, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, College Lane, Hatfield, Herts AL10 9AB, UK)

К. Уилсон (*Professor K. Wilson*, Emeritus Professor of Pharmacological Biochemistry, School of Life Sciences, University of Hertfordshire, College Lane, Hatfield, Herts AL10 9AB, UK)

Принятые сокращения

Эти сокращения использованы в книге без расшифровки.

АДФ	аденозин-5′-дифосфат
АМФ	аденозин-5′-монофосфат
АТФ	аденозин-5′-трифосфат
ГТФ	гуанозинтрифосфат
ДДТ	2,2-бис-(4-хлорфенил)-1,1,1-трихлорэтан
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
т. п. н.	тысяча пар нуклеотидов
цАМФ	циклический АМФ
ЦТФ	цитидинтрифосфат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат

e^-	электрон
FAD	флавинадениндинуклеотид (окисленный)
$FADH_2$	флавинадениндинуклеотид (восстановленный)
FMN	флавинмононуклеотид (окисленный)
$FMNH_2$	флавинмононуклеотид (восстановленный)
Hepes	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
M_r	относительная молекулярная масса
NAD^+	никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)
NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
$NADP^+$	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленный)
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный)
Pipes	1,4-пиперазинбис(этансульфоновая кислота)

P_i	неорганический фосфат
p.p.m.	части на миллион
p.p.b.	части на миллиард
PP_i	неорганический пирофосфат
r.p.m.	число оборотов в минуту
SDS	додецилсульфат натрия
Tris	2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

Глава 1

Теоретические основы биохимического анализа

1.1 ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ

1.1.1 Задачи биохимического анализа

Биохимия занимается изучением химических процессов, происходящих в живых организмах. Биохимические исследования имеют целью выяснение молекулярных основ функционирования клетки. Поэтому при биохимических исследованиях изучаются:

- структура, а также кинетические и термодинамические характеристики биомолекул, т. е. молекул, встречающихся в живых организмах;
- функции биомолекул, а также механизмы, посредством которых они узнают друг друга и вступают во взаимодействия, приводящие к упорядоченным анаболическим, катаболическим, сигнальным, иммунным и другим процессам, характерным для живых организмов;
- пути синтеза и разложения биомолекул, а также механизмы возникновения ошибок в ходе этих процессов;
- энергетика биологических процессов, в том числе мембранного транспорта, получение клеткой необходимой энергии, превращения энергии и энергетический обмен с окружающей средой;
- хранение, репликация, экспрессия, репарация, рекомбинация и контроль генетической информации, а также факторы, определяющие специфичность клетки.

Первые биохимические исследования были выполнены главным образом на таких простых прокариотах и эукариотах, как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa* и *Chlorella pyrenoidosa*. Накопление данных о природе клеточных компонентов и о механизмах контроля в этих организмах, а также осознание того, что существует определенная аналогия с многоклеточными организмами, именно это позволило использовать весь огромный спектр живых организмов в качестве моделей при детальных биохимических исследованиях. Биохимики чаще работают с моделями *in vitro*, чем с целыми клетками или организмами, поскольку это гораздо проще как для постановки эксперимента, так и для интерпретации результатов. Опасность,

однако, заключается в том, что при разрушении клеток или тканей для проведения экспериментов *in vitro* возможны артефакты, и полученные результаты могут быть далеки от реальной ситуации *in vivo*.

Последние годы, особенно последнее десятилетие, характеризуются огромными темпами накопления данных о функционировании клетки (количество публикаций увеличивается экспоненциально во времени). В значительной степени это вызвано развитием методов быстрого секвенирования фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении ферментами рестриктазами, методов клонирования генов и сайт-направленного мутагенеза (гл. 5 и 6), а также успехами в области секвенирования белков с помощью масс-спектрометрии (гл. 9). Подобное быстрое развитие послужило толчком для возникновения нескольких новых дисциплин, таких как **геномика** (изучение клеточных геномов), **протеомика** (изучение всего белкового состава клетки) и **молекулярная биология**, причем биохимия в широком понимании охватывает все эти области науки.

1.1.2 Планирование биохимического эксперимента

Успехи биохимии, как и любой другой науки, основаны на тщательном планировании, исполнении и анализе результатов эксперимента, цель которого заключается в поиске ответа на конкретный вопрос или в подтверждении гипотезы. Планирование эксперимента подразумевает выполнение некоторого числа обязательных стадий:

- идентификация объекта изучения;
- критическая оценка современного состояния знаний («литературы») по данному вопросу, в том числе плюсов и минусов принятой методологии, а также новых гипотез;
- формулировка вопроса или гипотезы, на изучение которых направлен эксперимент;
- тщательный выбор биологической системы (виды организмов, *in vivo* или *in vitro*);
- идентификация искомой переменной; учет других факторов, которые необходимо контролировать для того, чтобы результат эксперимента определялся исключительно искомой переменной;
- экспериментальный дизайн, включая статистический анализ результатов, тщательная оценка материалов и оборудования, а также вопросы техники безопасности;
- проведение эксперимента, включая необходимые градуировочные зависимости и контроль регистрируемых результатов;
- воспроизведение эксперимента, если это необходимо для однозначной интерпретации результатов;
- анализ результатов, в том числе выбор подходящего статистического метода обработки данных;
- формулировка основных выводов, следующих из полученных данных;
- формулировка новых гипотез и будущих экспериментов, основанных на результатах исследования.

Во многих биохимических экспериментах выполняются одни и те же процедуры, в частности, бывает важно измерять и контролировать pH, температуру и

содержание кислорода. Кроме того, в ходе биохимических исследований приходится готовить растворы с известной концентрацией и распределять малые объемы реагентов. В данной главе рассмотрены многие элементы эксперимента, необходимые как при его проведении, так и при анализе результатов.

1.2 ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ (РАЗМЕРНОСТИ)

1.2.1 Система СИ

Размерности всех параметров (единицы измерения) указаны в единицах СИ (СИ — **международная система единиц**, предложенная во Франции; Systéme International d'Unites). В табл. 1.1 приведены основные и производные единицы системы СИ; в табл. 1.2 — численные значения не-

Таблица 1.1. **Система СИ. Основные и производные единицы**

Параметр	Единица СИ	Сокращение	Вывод единицы СИ	Эквивалент в единицах СИ
Основные единицы				
Длина	метр	м		
Масса	килограмм	кг		
Время	секунда	с		
Сила электрического тока	ампер	А		
Температура	кельвин	К		
Светимость	кандела	кд		
Количество вещества	моль	моль		
Производные единицы				
Сила	ньютон	Н	$кг \cdot м \cdot с^{-2}$	$Дж \cdot м^{-1}$
Энергия, работа, тепло	джоуль	Дж	$кг \cdot м^2 \cdot с^{-2}$	Н·м
Мощность (в том числе излучения)	ватт	Вт	$кг \cdot м^2 \cdot с^{-3}$	$Дж \cdot с^{-1}$
Электрический заряд	кулон	Кл	А·с	$Дж \cdot В^{-1}$
Разность потенциалов, напряжение тока	вольт	В	$кг \cdot м^2 \cdot с^{-3} \cdot А^{-1}$	$Дж \cdot Кл^{-1}$
Электрическое сопротивление	ом	Ω, Ом	$кг \cdot м^2 \cdot с^{-3} \cdot А^{-2}$	$В \cdot А^{-1}$
Давление	паскаль	Па	$кг \cdot м^{-1} \cdot с^{-2}$	$Н \cdot м^{-2}$
Частота	герц	Гц	$с^{-1}$	
Магнитная индукция	тесла	Тл	$кг \cdot с^{-2} \cdot Н^{-1}$	$В \cdot с \cdot м^{-2}$
Другие производные единицы				
Площадь	квадратный метр	$м^2$		
Объем	кубический метр	$м^3$		
Плотность	килограмм на кубический метр	$кг \cdot м^{-3}$		
Концентрация	моль на кубический метр	$моль \cdot м^{-3}$		

Таблица 1.2. **Некоторые физические постоянные и связь внесистемных единиц с единицами СИ**

Постоянная и параметр с соответствующей единицей	Символ	Коэффициент пересчета в систему СИ
Постоянная Авогадро	N_A	$6{,}022 \cdot 10^{23}$ моль$^{-1}$
Постоянная Фарадея	F	$9{,}648 \cdot 10^{4}$ Кл · моль$^{-1}$
Постоянная Планка	h	$6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Дж · с
Универсальная газовая постоянная	R	8,314 Дж·К$^{-1}$ · моль$^{-1}$
Объем 1 моль идеального газа*		22,41 дм^3 · моль$^{-1}$
Скорость света в вакууме	c	$2{,}997 \cdot 10^{8}$ м · с$^{-1}$
Энергия		
Калория	кал	4,184 Дж
Эрг	эрг	10^{-7} Дж
Электрон-вольт	эВ	$1{,}602 \cdot 10^{-19}$ Дж
Давление		
Атмосфера	атм	101 325 Па
Бар	бар	10^5 Па
Миллиметры рт. ст.	мм Hg	133,322 Па
Температура		
Цельсия	°C	(t °C + 273,15) К
Фаренгейта	°F	(t °F – 32)5/9 + 273,15 К
Длина		
Ангстрем	Å	10^{-10} м
Дюйм	дюйм	0,0254 м
Масса		
Фунт	фунт	0,4536 кг

* При стандартной температуре и стандартном давлении

которых физических постоянных, выраженные в единицах СИ. В табл. 1.3 приведены приставки, используемые при указании величин, кратных 10, а в табл. 1.4 — связь внесистемных единиц объема с единицами СИ.

1.2.2 Растворы и способы выражения концентрации

Раствором называют гомогенную смесь одного или нескольких веществ с жидким компонентом (растворителем). Концентрация каждого растворенного вещества в растворе отражает его содержание в заданном количестве (по массе или по объему) растворителя. Простейшим способом выражения концентрации является указание массы растворенного вещества в единице объема растворителя (w/v), объема в единице объема (v/v) или массы в единице массы (w/w). Кроме того, w/v, v/v и w/w можно представить в виде процентов, для чего соответствующие данные умножают на 100. 1%-й раствор хлорида натрия содержит 1 г NaCl в 100 г раствора. Реже концентрации растворов выражают в частях растворенного вещества на миллион (ppm) или в частях на миллиард (ppb) по отношению ко всему раствору. В таком случае единицами измерения могут быть граммы на миллион (миллиард) граммов или см^3 на миллион (миллиард) см^3. Так, в воздухе содержится около 8 ppm оксида углерода CO в объемных единицах измерения. Если единицы ppm применяют для выражения концентрации

Таблица 1.3. **Приставки, используемые в размерностях**

Множитель	Приставка	Символ	Множитель	Приставка	Символ
10^{24}	йота	Y	10^{-1}	деци	d (д)
10^{21}	зетта	Z	10^{-2}	санти	c (с)
10^{18}	экза	E	10^{-3}	милли	m (м)
10^{15}	пета	P	10^{-6}	микро	μ (мк)
10^{12}	тера	T	10^{-9}	нано	n (н)
10^{9}	гига	G (Г)	10^{-12}	пико	p (п)
10^{6}	мега	M	10^{-15}	фемто	f (ф)
10^{3}	кило	к	10^{-18}	атто	a (а)
10^{2}	гекто	г	10^{-21}	зепто	z (ц)
10^{1}	дека	д	10^{-24}	йокто	y (й)

Таблица 1.4. **Связь внесистемных единиц объема с единицами СИ**

Внесистемная единица	Производная внесистемной единицы	Производная единицы СИ	Единица СИ
1 литр (л)	10^3 мл	1 $дм^3$	10^{-3} $м^3$
1 миллилитр (мл)	1 мл	1 $см^3$	10^{-6} $м^3$
1 микролитр (мкл)	10^{-3} мл	1 $мм^3$	10^{-9} $м^3$
1 нанолитр (нл)	10^{-6} мл	1 $нм^3$	10^{-12} $м^3$

водного раствора, то 1 г воды считают эквивалентным 1 $см^3$. Следовательно, 8 ppm означает 8 г вещества в 1000 $дм^3$ раствора, 8 мг в 1 $дм^3$, 8 мкг в 1 $см^3$ или 8 нг в 1 $мм^3$ (см. табл. 1.4).

Молярность

В системе СИ количество любого вещества измеряется в **молях**. 1 моль — это количество вещества, содержащее $6{,}022 \cdot 10^{23}$ молекул (число Авогадро). Иначе моль можно определить как количество вещества, в котором содержится число некоторых частиц, равное числу Авогадро. Таким образом, можно говорить о моле молекул, атомов, ионов и даже электронов. Для практических расчетов важно, что моль вещества равен его **молекулярной массе**, выраженной в граммах, а молекулярная масса представляет собой сумму масс атомов, составляющих данную молекулу. Обратите внимание, что принято употреблять термин «молекулярная масса», а не устаревший термин «молекулярный вес». В СИ концентрацию вещества выражают в молях в кубическом метре (моль/$м^3$) (см. табл. 1.1). Для лабораторной практики эти значения слишком велики, поэтому обычно концентрацию выражают в молях в кубическом дециметре ($дм^3$, 10^{-3} м). Кроме того, в некоторых учебниках и журналах, особенно в тех, что выходят в США, по-прежнему приняты устаревшие единицы — литр (л) и его производные (см. табл. 1.4). В данной книге объем выражен в кубических деци-

метрах или в их долях (табл. 1.4). **Молярность** раствора отражает число молей вещества в 1 дм^3 раствора. Молярность обозначают символом М, но поскольку в СИ заглавная буква М означает также приставку «мега», то для молярности рекомендуют использовать выражение моль/дм^3. Несмотря на это во многих учебниках и журнальных статьях молярность продолжают обозначать как М; мы в данной книге придерживаемся такого же способа обозначения.

Атомные и молекулярные массы измеряются в **дальтонах** (Да) или **килодальтонах** (кДа). Один дальтон соответствует $^1/_{12}$ массы изотопа углерода-12 (^{12}C). Однако биохимики предпочитают пользоваться **относительной молекулярной массой** (M_r), которая, по определению, равна отношению молекулярной массы вещества к $^1/_{12}$ массы изотопа ^{12}C. Следовательно, M_r — величина безразмерная. Так, относительная молекулярная масса хлорида натрия составляет 23 (Na) + 35,5 (Cl) = 58,5; 1 моль NaCl = 58,5 г. Если такое количество хлорида натрия растворить в воде и довести объем раствора до 1 дм^3, то получим одномолярный (1 М) раствор.

В биологических системах вещество чаще всего присутствует в небольших концентрациях, да и объемы растворов, используемых в эксперименте *in vitro*, обычно невелики. Поэтому концентрации рабочих растворов обычно выражают не в молях, а в ммоль/дм^3, мкмоль/дм^3 или нмоль/дм^3 (табл. 1.5).

ПРИМЕР 1 РАСЧЕТ МОЛЯРНОСТИ РАСТВОРА

Вопрос 1 Как приготовить 250 см^3 0,1 М раствора глюкозы?

Ответ Формула глюкозы $C_6H_{12}O_6$, поэтому ее молекулярная масса составляет (6·12) + (12·1) + (6·16) = 180 Да. При растворении 180 г глюкозы в 1 дм^3 воды получается 1 М раствор, следовательно, при растворении 18 г в 1 дм^3 получается 0,1 М раствор. Таким образом, для приготовления 250 см^3 0,1 М раствора нужно растворить в воде 4,5 г глюкозы и в мерной колбе довести объем раствора до 250 см^3.

Вопрос 2 Как приготовить 10 см^3 0,01 М раствора глюкозы из 0,1 М запасного раствора?

Ответ Применим следующую формулу: $M_1V_1 = M_2V_2$, где $M_1 = 0{,}1$, V_1 неизвестен, $M_2 = 0{,}01$, $V_2 = 10$ см^3. Таким образом, $0{,}1V_1 = 0{,}01 \cdot 10$, откуда $V_1 = 1{,}0$ см^3. Итак, для получения требуемого раствора необходимо отобрать 1,0 см^3 запасного раствора (для большей точности используйте подходящую автоматическую пипетку) и в мерной посуде довести объем до 10 см^3.

Вопрос 3 Какую молярность (приблизительно) имеет раствор, содержащий 20 ppm глюкозы?

Ответ Раствор с концентрацией 20 ppm содержит 20 г вещества в $1 \cdot 10^6$ г или 20 мг в 1 кг. Если считать, что плотность раствора равна 1 г/см^3, это соответствует концентрации 20 мг/дм^3. Отсюда молярность раствора глюкозы составляет $20 \cdot 10^{-3}/180$ М, т. е. $0{,}11 \cdot 10^{-3}$ М или 0,11 мМ.

Вопрос 4 Какова молярность чистой воды?

Ответ Молекулярная масса воды 2 + 16 = 18 Да. Следовательно, 1 дм^3 воды (1000 г при плотности 1 г/см^3) содержит 1000/18 = 55,6 М.

Таблица 1.5. **Способы записи молярной, миллимолярной и микромолярной концентраций вещества в различных объемах**

Моль (М)	Миллимоль (мМ)	Микромоль (мкМ)
1 моль/дм^3	1 ммоль/дм^3	1 мкмоль/дм^3
1 ммоль/см^3	1 мкмоль/см^3	1 нмоль/см^3
1 мкмоль/мм^3	1 нмоль/мм^3	1 пмоль/мм^3

Разведение

Разбавленные рабочие растворы часто готовят из более концентрированных запасных растворов. Для расчета разведения удобно пользоваться формулой $M_1V_1 = M_2V_2$, где M_1 и M_2 — молярности исходного и разведенного растворов соответственно, а V_1 и V_2 — их объемы. Для осуществления разведения необходимо знать значения трех величин, а четвертую рассчитать по данной формуле.

1.2.3 Концентрация или активность?

Диссоциация электролитов в растворах. Ионная сила раствора

При растворении хлорида натрия NaCl в воде происходит его диссоциация и в водном растворе присутствуют не молекулы NaCl, а ионы натрия (Na^+) и ионы хлора (Cl^-). Диссоциация вещества в растворе объясняется природой связи в данном соединении; в кристаллической решетки NaCl ионы натрия и хлора удерживаются исключительно за счет ионных взаимодействий. Хлорид натрия является типичным представителем неорганических солей, которые в водном растворе полностью диссоциируют. Процесс диссоциации таких веществ необратимый. Подобные соли называют **сильными электролитами** в отличие от частично диссоциированных **слабых электролитов**, к которым относятся многие другие соединения, в частности большинство органических кислот и оснований. Процесс диссоциации слабых электролитов обратим. Слабый электролит, такой как уксусная кислота, также может диссоциировать, несмотря на ковалентную связь между атомами кислорода и водорода в карбоксильной группе. Дело в том, что эта связь сильно поляризована, так что на водороде локализуется частичный положительный заряд. Диссоциация с отщеплением протона приводит к формированию на атоме кислорода отрицательного заряда, в делокализации которого принимают участие другие атомы кислорода карбоксильной группы. В результате карбоксильный анион (COO^-) оказывается более стабильным, чем карбоксильная группа, что и способствует протеканию диссоциации. Диссоциация слабых электролитов обсуждается в разд. 1.3. Некоторые органические вещества, такие как спирты, в том числе простые сахара типа глюкозы, вовсе не подвержены диссоциации в растворе, т. е. они **не электролиты**.

Для ряда биохимических исследований, как с использованием слабых, так и сильных электролитов, важнее уметь определять количество отдельных ионов в растворе, чем знать концентрацию вещества, из которого они образуются. **Ионная сила** (μ) является мерой электростатических взаимодействий ионов в растворе и зависит как от концентрации всех присутствующих ионов, так и от их заряда. Ионная сила рассчитывается по уравнению 1.1:

$$\mu = \frac{1}{2}(c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \ldots + c_n z_n^2) = \frac{1}{2}\Sigma c z^2 \qquad (1.1)$$

где Σ означает сумму всех слагаемых вида cz; c_1, $c_2 \ldots c_n$ — молярная концентрация каждого отдельного иона; z_1, $z_2 \ldots z_n$ — заряды ионов (так, для Na^+ и K^+ $z = +1$, для Cl^- и NO_3^- $z = -1$, для Ca^{2+} $z = +2$, для SO_4^{2-} $z = -2$).

В отличие от солей типа NaCl и KNO_3, построенных из одновалентных ионов, соли типа $MgSO_4$, содержащие двухвалентные ионы, ионизированы в меньшей степени благодаря образованию ионных пар. В этом процессе противоположно заряженные ионы в водном растворе притягиваются друг к другу, образуя прочно связанные пары, которые ведут себя как единые частицы. Так, в 0,25 М раствор $MgSO_4$ только 65% этого вещества представлено ионами магния и сульфата), а оставшиеся 35% существуют как ионные пары. Из-за образования ионных пар расчет ионной силы растворов таких солей усложняется.

В водных растворах анионы и катионы окружены оболочкой из противоположно заряженных ионов. Это относится и к молекуле воды, имеющей поляризованную связь O–H, так что на каждом атоме водорода сосредоточен заряд δ^+, а на атоме кислорода — заряд δ^-. Такая ионная оболочка несет определенный заряд, который по знаку противоположен заряду центрального иона и несколько меньше его по величине. Наличие ионной оболочки приводит к снижению эффективного заряда центрального иона и, следовательно, к ослаблению его притяжения к противоположно заряженным ионам. Данный эффект усиливается при повышении ионной силы раствора, что лежит в основе метода осаждения белков высаливанием (разд. 8.3.4).

Пример 2 **РАСЧЕТ ИОННОЙ СИЛЫ**

Вопрос Рассчитайте ионную силу 1) 0,1 М NaCl; 2) 0,1 М NaCl + 0,05 М KNO_3 + 0,01 М Na_2SO_4.

Ответ Для расчета ионной силы применим формулу $\mu = \frac{1}{2}\Sigma c z^2$.

1) Найдем cz^2 для каждого иона:
$Na^+ = 0{,}1 \cdot (+1)^2 = 0{,}1$ М
$Cl^- = 0{,}1 \cdot (-1)^2 = 0{,}1$ М

Следовательно, $\frac{1}{2}\Sigma c z^2 = 0{,}2/2 = 0{,}1$ М

2) Проведем аналогичный расчет:
$Na^+ = 0{,}1 \cdot (+1)^2 + 0{,}02 \cdot (+1)^2 = 0{,}12$ М
$Cl^- = 0{,}1 \cdot (-1)^2 = 0{,}10$ М
$K^+ = 0{,}05 \cdot (+1)^2 = 0{,}05$ М
$NO_3^- = 0{,}05 \cdot (-1)^2 = 0{,}05$ М
$SO_4^{2-} = 0{,}01 \cdot (-2)^2 = 0{,}04$ М

Следовательно, $\frac{1}{2}\Sigma cz^2 = \frac{1}{2}(0{,}36) = 0{,}18$ М

Замечание 1: единица измерения ионной силы — М (т. е. моль/л).
Замечание 2: для Na_2SO_4 $c = 0{,}02$, поскольку при диссоциации Na_2SO_4 образуется $2Na^+$.
Замечание 3: для 1 М раствора электролита типа 1:1 (NaCl) ионная сила равна 1 М, для электролита 2:1 ($MgCl_2$) — 3 М, для электролита 2:2 ($MgSO_4$) — 4 М, а для электролита 3:1 ($FeCl_3$) — 6 М.
Замечание 4: по мере повышения концентрации и ионной силы погрешность подобных расчетов постоянно возрастает, так что становится необходимым учитывать коэффициент активности.

Активность и коэффициент активности

От ионной силы зависит степень диссоциации вещества в растворе, так что эффективная концентрация ионизированного вещества, называемая *активностью* (A), связана с концентрацией через *коэффициент активности* (γ):

$$A_X = [X]\gamma_X \qquad (1.2)$$

где A_X — активность компонента X, [X] — концентрация X, а γ_X — коэффициент активности X. Коэффициент активности γ является мерой отклонения реального поведения частиц от их ожидаемого поведения. По мере увеличения ионной силы раствора коэффициенты активности ионов уменьшаются, из-за чего активность всегда ниже концентрации. Например, коэффициент активности Na^+ в 0,001 М растворе составляет 0,964, а в 0,1 М растворе 0,79. Напротив, при уменьшении ионной силы раствора коэффициент активности стремится к 1, а значения активности и концентрации иона сближаются. Этот вопрос обсуждается далее в разделе, посвященном pH (разд. 1.3.2). Если в результате диссоциации вещества возникают многозарядные ионы, коэффициент активности таких частиц существенно меньше 1 независимо от их знака заряда. Так, коэффициенты активности Mg^{2+} и Fe^{3+} в 0,001 М растворе при 25 °C составляют 0,872 и 0,738 соответственно.

В биохимических исследованиях довольно часто приходится иметь дело с веществами, для которых характерно расхождение между активностью и концентрацией. В подобных экспериментах непременно следует оценивать величину данного расхождения. Понятно, что влияние этого фактора наиболее существенно в тех случаях, когда изучают роль в процессе

именно данного иона. Следует также понимать, что pH-электроды и ионселективные электроды, которые часто применяют в биохимических исследованиях, измеряют активность, а не концентрацию анализируемого иона. Тем не менее в большинстве методов исследования, особенно с учетом того, что в биохимических экспериментах чаще всего применяют низкие концентрации реагентов, обычно допустимо рассматривать концентрацию и активность как взаимозаменяемые параметры. При необходимости значения коэффициентов активности органических и неорганических ионов можно найти в справочниках.

1.3 СЛАБЫЕ ЭЛЕКТРОЛИТЫ

1.3.1 Слабые электролиты в биохимии

Многие молекулы, играющие важную роль в биохимических процессах, являются слабыми электролитами, т. е. кислотами или основаниями, которые в водных растворах ионизированы лишь частично. В качестве примеров можно назвать аминокислоты, пептиды, белки, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты. Активность многих из перечисленных молекул находится в строгой зависимости от их состояния ионизации при том pH, которое имеет место внутри клетки или за ее пределами. Например, активные центры ферментов содержат функциональные группы — карбоксильные и аминогруппы боковых цепей аминокислот, из которых построены молекулы данного белка. Для осуществления каталитической функции ферментов эти функциональные группы должны находиться в строго определенном состоянии ионизации. Прежде чем перейти к детальному рассмотрению ионизации (диссоциации) сложных молекул, следует остановиться на диссоциации воды и сказать несколько слов о важности этого процесса.

1.3.2 Диссоциация слабых кислот и оснований

Диссоциация воды

Один из важнейших слабых электролитов — вода. Степень диссоциации воды незначительна, так что в ней присутствует очень небольшое количество ионов водорода и ионов гидроксила. На самом деле свободный ион водорода (протон) в водном растворе не существует, поскольку он взаимодействует с молекулой воды, образуя ион гидроксония (H_3O^+):

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + HO^-$$

$$H^+ + H_2O \rightleftarrows H_3O^+$$

Однако несмотря на то что свободных протонов в водном растворе нет, на практике принято говорить именно о ионах водорода, а не гидроксония. Для диссоциации воды при 24 °C константа равновесия составляет $1{,}8 \cdot 10^{-16}$. По-

скольку ионная сила чистой воды очень низкая, коэффициенты активности ионов водорода и гидроксила практически равны 1, так что для каждого из них значения концентрации и активности совпадают. Если учесть, что молярность чистой воды составляет 55,6 (см. выше), можно ввести новую константу K_W. Итак, коэффициент активности воды считают равным 1, тогда:

$$1{,}8 \cdot 10^{-16} \cdot 55{,}6 = [H^+][OH^-] = 1{,}0 \cdot 10^{-14} = K_W \qquad (1.3)$$

Константу K_W называют **ионным произведением воды**; эта величина не зависит от концентрации. При 24 °С $K_W = 10^{-14}$, при 0 °С $1{,}14 \cdot 10^{-15}$, а при 100 °С $5{,}45 \cdot 10^{-13}$. В воде ионы водорода и гидроксила образуются в стехиометрическом отношении 1:1, следовательно, при 24 °С оба иона должны присутствовать в концентрации $\sim 1{,}0 \cdot 10^{-7}$ М. По определению, данному датским биохимиком Соренсеном, pH представляет собой отрицательный логарифм активности иона водорода, поэтому pH чистой воды равен 7,0. Среду с таким значением pH называют нейтральной.

Подобные теоретические выкладки относительно pH воды хорошо известны. Реже можно встретить информацию о влиянии солей, таких как NaCl, на pH водного раствора. Многие соли — сильные электролиты, и в разбавленных водных растворах они практически полностью диссоциируют, но при этом не образуют ни ионов водорода, ни гидроксил-ионов. Могло бы показаться, что в таком случае соль не должна влиять на величину pH водного раствора. Однако подобное рассуждение не учитывает изменения ионной силы раствора. Например, в 0,1 М водном растворе NaCl коэффициенты активности ионов водорода и гидроксила снижаются до 0,83 и 0,76 соответственно. Следовательно, в этих условиях с учетом коэффициентов активности уравнение 1.3 выглядит иначе:

$$K_W = 1{,}0 \cdot 10^{-14} = 0{,}83[H^+] \cdot 0{,}76[OH^-]$$

Как и раньше, ионы водорода и гидроксила образуются в равных количествах, так что, как следует из уравнения, концентрация каждого из них равна $1{,}26 \cdot 10^{-7}$ М. Активность ионов водорода в растворе составляет $1{,}26 \cdot 10^{-7} \cdot 0{,}83 = 1{,}05 \cdot 10^{-7}$. Отсюда следует, что pH 0,1 М раствора NaCl равен 6,9. Отличие от pH чистой воды кажется весьма незначительным, однако, если учесть логарифмическую природу pH, получается, что концентрация ионов водорода возрастает на 26% по сравнению с чистой водой, а активность ионов водорода — только на 20%. Данное рассуждение еще раз подчеркивает необходимость учитывать активность вещества, а не его концентрацию, особенно в тех случаях, когда ионная сила рабочего раствора может повлиять на интерпретацию экспериментальных данных.

Диссоциация карбоновых кислот и аминов

Как мы уже подчеркивали ранее, многие важные для биохимии вещества содержат карбоксильную группу (–COOH), а также первичную (RNH_2), вторичную (R_2NH) или третичную (R_3N) аминогруппу, которые могут отдавать

или принимать протон. Запишем уравнение диссоциации слабой кислоты, которую часто обозначают HA:

$$\underset{\text{слабая кислота}}{HA} \rightleftarrows H^+ + \underset{\text{сопряженное основание (анион)}}{A^-}$$

Данная равновесная реакция может быть охарактеризована с помощью константы равновесия K_a, которую называют **константой диссоциации кислоты** или константой кислотности (уравнение 1.4). Численные значения подобных констант очень малы.

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \tag{1.4}$$

Заметьте, что в результате ионизации слабой кислоты высвобождается протон и образуется сопряженное основание, причем обе частицы имеют ионную природу.

Аналогичным образом, первичные, вторичные и третичные аминогруппы, выступающие в роли слабых оснований, могут присутствовать в растворе в ионизированной и неионизированной формах. Соответствующая реакция диссоциации характеризуется **константой диссоциации основания** (константой основности) K_b (уравнение 1.5):

$$\underset{\substack{\text{слабое основание}\\\text{(первичный амин)}}}{RNH_2} + H_2O \rightleftarrows \underset{\substack{\text{сопряженная кислота}\\\text{(замещенный ион аммония)}}}{RNH_3^+} + HO^-$$

$$K_b = \frac{[RNH_3^+][HO^-]}{[RNH_2][H_2O]} \tag{1.5}$$

В данном случае неионизированное основание принимает протон от воды, в результате чего образуется катионная форма этого вещества — сопряженная кислота, для которой также можно записать выражение для константы диссоциации по аналогии с (1.4). Если рассматривать данное уравнение в противоположном направлении, то оно имеет такой же вид, что и уравнение 1.4. Точно так же для сопряженного основания A^- можно записать выражение константы диссоциации по аналогии с (1.5).

Мы уже рассматривали связь между концентрацией, активностью и коэффициентом активности, поэтому следует понимать, что уравнения 1.4 и 1.5 не совсем корректны: в них отсутствуют коэффициенты активности для всех участников реакции. В полном виде уравнение 1.4 выглядит следующим образом:

$$K_a = \frac{[H^+]\gamma_{H^+} \cdot [A^-]\gamma_{A^+}}{[HA]\gamma_{HA}} \tag{1.6}$$

где γ_{H^+}, γ_{A^+} и γ_{HA} — коэффициенты активности для трех типов частиц.

Практическое применение данного уравнения мы обсудим ниже, но в целом нужно понимать, что если расхождение между концентрацией и активностью настолько существенно, что влияет на результаты эксперимента, то коэффициенты активности необходимо учитывать.

Диссоциацию слабой кислоты рассмотрим на примере уксусной кислоты (CH_3COOH):

$$\underset{\text{уксусная кислота}}{CH_3COOH} \rightleftarrows \underset{\text{ацетат-ион}}{CH_3COO^-} + H^+$$

Уксусную кислоту и сопряженное с нею основание — ацетат-анион — называют **сопряженной кислотно-основной парой**. Константу диссоциации кислоты можно записать в следующем виде:

$$K_a = \frac{[CH_3COO^-]\gamma_{Ac} \cdot [H^+]\gamma_{H+}}{[CH_3COOH]\gamma_{HAc}} = \frac{[\text{сопряженное основание}]\gamma_{Ac} \cdot [H^+]\gamma_{H+}}{[\text{слабая кислота}]\gamma_{HAc}}$$

где γ_{HAc} и γ_{Ac} — коэффициенты активности уксусной кислоты и ацетата соответственно.

K_a уксусной кислоты $1{,}75 \cdot 10^{-5}$, следовательно, $\lg K_a = 4{,}75$. Из уравнения 1.4 видно, что pK_a численно равно pH, при котором 50% кислоты находится в протонированной форме (не ионизировано), а 50% — в депротонированной форме (ионизировано).

Аналогичным образом можно записать выражение для константы диссоциации иона ацетата K_b:

$$CH_3COO^- + H_2O \rightleftarrows CH_3COOH + HO^-$$

$$K_b = \frac{[CH_3COOH]\gamma_{HAc} \cdot [HO^-]\gamma_{HO-}}{[CH_3COO^-]\gamma_{Ac}}$$

K_b ацетата составляет $1{,}77 \cdot 10^{-10}$, следовательно, $pK_b = 9{,}25$.

Перемножая две константы, получаем важный результат:

$K_a \cdot K_b = K_W = 1{,}0 \cdot 10^{-14}$ (при 24°),

следовательно,

$$pK_a + pK_b = pK_W = 14 \quad (1.7)$$

Данное соотношение справедливо для всех пар основание–кислота и позволяет найти одно значение pK, если известно другое.

Многие важные для биохимии молекулы являются амфотерными, т. е. одновременно содержат группы и с основными, и с кислотными свойствами, что позволяет им в водном растворе принимать или отдавать протон в зависимости от условий. Примером могут служить аминокислоты; эта их особенность обсуждается в разд. 8.1.

Когда речь идет об диссоциации слабых оснований, обычно принято рассматривать константы, относящиеся к сопряженной кислоте, т. е. K_a и pK_a, а не K_b или pK_b, характеризующие само основание. pK_a некоторых слабых кислот и оснований приведены в табл. 1.6. Запомните, что чем ниже численное значение pK_a, тем сильнее кислота (ионизирована в большей степени), и тем слабее сопряженное с нею основание. Слабые кислоты слабее ионизированы при низких pH и сильнее при высоких pH. Напротив, слабые основания преимущественно ионизированы при низких pH, но не ионизи-

Таблица 1.6. **pK_a некоторых кислот и оснований, наиболее часто используемых для приготовления буферных растворов**

Кислота или основание[a]	pK_a
Барбитуровая кислота	3,98
Винная кислота	2,96; 4,16
Глицилглицин	3,06; 8,13
Лимонная кислота	3,10; 4,76; 5,40
Угольная кислота	6,10; 10,22
Уксусная кислота	4,75
Фосфорная кислота	1,96; 6,70; 12,30
Фталиевая кислота	2,90; 5,51
Янтарная кислота	4,18; 5,56
Hepes	7,50
Pipes	6,80
Tris	8,14

[a] См. список сокращений в начале книги.

рованы при высоких. Подобная зависимость диссоциации слабых электролитов от pH играет важную роль, как в физиологических условиях, так и в экспериментах *in vitro*, в частности в таких аналитических методах, как электрофорез и ионообменная хроматография.

Диссоциация многоосновных кислот и оснований

Многоосновные кислоты и основания способны отдавать или принимать не один, а несколько протонов. Каждая ступень диссоциации вещества характеризуется константой K_a, при этом условились, что константа K_a^1 относится к кислоте с наиболее легко отдаваемым протоном, а константа K_a^n — к кислоте с последним из отдаваемых протонов. В биохимии одним из наиболее важных примеров многоосновного электролита является фосфорная кислота H_3PO_4:

$$H_3PO_4 \rightleftarrows H^+ + H_2PO_4^- \qquad pK_a^1 = 1{,}96$$

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows H^+ + HPO_4^{2-} \qquad pK_a^2 = 6{,}70$$

$$HPO_4^{2-} \rightleftarrows H^+ + PO_4^{3-} \qquad pK_a^3 = 12{,}30$$

Пример 3 РАСЧЕТ pH И СТЕПЕНИ ИОНИЗАЦИИ СЛАБОГО ЭЛЕКТРОЛИТА

Вопрос Найдите pH 0,01 М раствора уксусной кислоты и определите степень ее диссоциации; pK_a уксусной кислоты $1{,}75 \cdot 10^{-5}$.

Ответ Запишем уравнение для константы диссоциации уксусной кислоты:

$$K_a = \frac{[\text{ацетат}^-][H^+]}{[\text{уксусная кислота}]} = 1{,}75 \cdot 10^{-5}$$

Ацетат и ион водорода образуются в равном количестве, поэтому, приняв концентрацию одного из них за x, получим, что

концентрация неионизированной формы уксусной кислоты равна $0{,}01 - x$. Отсюда следует:

$$1{,}75 \cdot 10^{-5} = \frac{(x)(x)}{(0{,}01 - x)}$$

$$1{,}75 \cdot 10^{-7} - 1{,}75 \cdot 10^{-5}x = x^2$$

Можно решить это как квадратное уравнение или, проще, пренебречь вычитаемым $1{,}75 \cdot 10^{-5}x$, поскольку он очень мал. В таком случае получаем:

$x^2 = 1{,}75 \cdot 10^{-7}$
$x = 4{,}18 \cdot 10^{-4}$ М.

Это значит, что pH раствора 3,38.
Обратите внимание, что при решении задачи мы не учитывали коэффициентов активности ионов ацетата и водорода, которые при 25 °C в 0,01 М растворе составляют 0,90 и 0,91 соответственно. Если ввести оба эти множителя в наше уравнение и принять, что коэффициент активности уксусной кислоты равен единице, получим:

$$1{,}75 \cdot 10^{-5} = \frac{(x)0{,}90(x)0{,}91}{(0{,}01 - x)}$$

Решая это уравнение относительно x, получаем значение $4{,}61 \cdot 10^{-4}$ М и pH = 3,33. Видно, что здесь коэффициенты активности не столь важны.
Степень диссоциации (α) уксусной кислоты определяется как доля уксусной кислоты, находящейся в форме ацетата, и описывается уравнением:

$$\alpha = \frac{[\text{ацетат}]}{[\text{ацетат}] + [\text{уксусная кислота}]} =$$

$$= \frac{4{,}18 \cdot 10^{-4}}{(4{,}18 \cdot 10^{-4} + 0{,}01 - 4{,}18 \cdot 10^{-4})} =$$

$$= \frac{4{,}18 \cdot 10^{-4}}{0{,}01} = 4{,}18 \cdot 10^{-2} \text{ или } 4{,}18\%.$$

Таким образом, уксусная кислота находится в основном в неионизированной форме. При повышении pH доля ацетата будет возрастать в соответствии с уравнением Хендерсона–Хассельбаха.

1.4 БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ — ИХ ПРИРОДА И СПОСОБЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

1.4.1 Кривые титрования

Если проводить титрование слабой кислоты (например, уксусной) сильным основанием (например, гидроксидом натрия), осуществляя при этом непрерывный мониторинг pH с помощью pH-электрода, будет наблюдаться следующая картина. От исходного значения около трех (см. Пример 3) pH посте-

пенно повышается, а затем выходит на плато при нейтрализации половины имеющейся кислоты. При продолжении титрования плато, на котором имеет место весьма незначительный рост pH, сменяется более быстрым подъемом pH, заканчивающимся полной нейтрализацией кислоты. Форма кривой одинакова для всех слабых кислот, отличие состоит лишь в начальном значении pH и в значении pH, соответствующем нейтрализации половины кислоты. При титровании двухосновной кислоты (например, янтарной) на кривой появляются два плато, а при титровании трехосновной кислоты (например, фосфорной) — три плато. Во всех случаях значение pH в средней точке на плато равно pK_a, а протяженность плато приблизительно составляет $pK_a \pm 1$. Эта область плато и определяет суть **буферного раствора**, т. е. раствора, препятствующего изменению pH при добавлении кислоты или щелочи. При нейтрализации половины титруемого раствора в нем содержатся равные количества сопряженного основания и неионизированной кислоты. Это особенность всех буферных растворов. Сопряженное основание нейтрализует добавляемую кислоту, а неионизированная кислота нейтрализует добавляемую щелочь.

1.4.2 Уравнение Хендерсона–Хассельбаха

Приготовление буферного раствора основано на уравнении **Хендерсона–Хассельбаха**. Существует множество форм записи этого уравнения. Так, для буфера на основе слабой кислоты можно записать:

$$pH = pK_a + \lg\frac{[\text{сопряженное основание}]}{[\text{слабая кислота}]} \qquad (1.8а)$$

или

$$pH = pK_a + \lg\frac{[\text{ионизированная форма}]}{[\text{неионизированная форма}]} \qquad (1.8б)$$

Для буфера на основе сопряженного основания слабой кислоты:

$$pH = pK_a + \lg\frac{[\text{слабая кислота}]}{[\text{сопряженное основание}]} \qquad (1.9а)$$

или

$$pH = pK_a + \lg\frac{[\text{неионизированная форма}]}{[\text{ионизированная форма}]} \qquad (1.9б)$$

Вообще говоря, при соблюдении полной корректности четыре приведенные уравнения должны содержать коэффициенты активности для всех типов частиц, однако для простоты они опущены.

1.4.3 Буферная емкость

Из уравнения Хендерсона–Хассельбаха следует, что при равенстве концентраций (точнее активностей) слабой кислоты и сопряженного основания их отношение равно 1, $\lg 1 = 0$, следовательно, $pH = pK_a$. Это объясняет форму кривой титрования, а именно, наличие плато при нейтрализации

половины имеющейся кислоты. Способность буферного раствора сохранять значение pH при добавлении сильной кислоты или щелочи определяется его **буферной емкостью** β. Буферная емкость — это число молей кислоты или щелочи, необходимое для изменения pH буферного раствора на 1, т. е.:

$$\beta = \frac{db}{dpH} = \frac{-da}{dpH} \qquad (1.10)$$

где db и da — количество щелочи и кислоты соответственно, а dpH — результирующее изменение pH. Буферная емкость β максимальна в диапазоне pH, соответствующем $pK_a \pm 1$, что подтверждает наше наблюдение относительно протяженности плато на кривой титрования. В табл. 1.6 перечислены некоторые слабые кислоты и основания, наиболее часто используемые для приготовления буферных растворов.

1.4.4 Приготовление буферного раствора

Буферный раствор можно приготовить двумя способами: либо добавляя сильное основание (0,5 М NaOH) к рассчитанному количеству слабой кислоты в соответствии с уравнением Хендерсона–Хассельбаха, либо смешивая рассчитанные количества слабой кислоты и ее натриевой соли. В обоих случаях смесь растворяют в чуть меньшем объеме воды, чем требуется, с помощью pH-метра проверяют и корректируют pH, а затем в мерной посуде добавляют воду до конечного объема. При смешивании необходимого количества слабой кислоты и сопряженного основания в принципе сразу должен получаться раствор с требуемым значением pH, однако на практике по ряду причин pH может несколько отличаться от желаемого значения. Это расхождение может объясняться тем, что, во-первых, расчет был сделан на основе молярной концентрации, а не активности, во-вторых, температура раствора и, следовательно, pK_a могут быть некорректными. Как уже отмечалось выше, pH раствора чувствителен к изменениям ионной силы, что следует учесть при добавлении к запасному буферному раствору других реагентов. Простое разведение запасного буферного раствора практически не оказывает влияния на его pH, однако снижает буферную емкость.

Выбор буферного раствора

При выборе буферной системы для конкретного эксперимента надо учитывать ряд факторов:

- следует выбирать буфер с таким значением pK_a, которое максимально приближено к требуемому значению pH, по крайней мере, отличается от него не более чем на ± 1, поскольку вне этого диапазона в растворе слишком мало слабой кислоты или слабого основания, чтобы создавать достаточную буферную емкость;
- следует использовать такую концентрацию буфера, чтобы буферная емкость удовлетворяла условиям эксперимента. Чаще всего используют буферные системы с концентрацией от 0,05 до 0,5 М;

- буферный раствор не должен образовывать нерастворимые комплексы с катионами или анионами, участвующими в исследуемой реакции (так, фосфатный буфер способен осаждать многозарядные катионы, а также может выступать метаболитом или ингибитором реакции);
- буфер должен быть нетоксичным, способным проникать через мембраны и не поглощать в видимом или ультрафиолетовом диапазоне длин волн.

Пример 4 **ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФОСФАТНОГО БУФЕРА**

Вопрос Приготовьте 1 дм^3 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,1; pK_a^2 фосфорной кислоты 6,8, атомные массы Na, P и O равны 23, 31 и 16 Да соответственно.

Ответ Действие буферной системы в данном случае основано на уравнении:

$$H_2PO_4^- \rightleftarrows HPO_4^{2-} + H^+ \qquad pK_a = 6{,}8$$

Такой буфер готовят смешением двух солей — двузамещенного и однозамещенного фосфата натрия (Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4).

Применяя соответствующее уравнение Хендерсона–Хассельбаха (уравнение 1.8), получаем

$$7{,}1 = 6{,}8 + \lg \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$0{,}3 = \lg \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$2 = \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

Общая концентрация двух типов анионов должна составлять 0,1 М. Отсюда следует, что $[HPO_4^{2-}]$ = 0,067 М, а $[H_2PO_4^-]$ = 0,033 М. Молекулярные массы соответствующих солей равны 142 и 120 Да, поэтому для получения буфера берут навески 0,067 · 142 = 9,51 г Na_2HPO_4 и 0,033 · 120 = 3,96 г NaH_2PO_4. Навески растворяют приблизительно в 800 см^3 дистиллированной воды, затем проверяют pH и при необходимости доводят его до нужного значения, а затем общий объем раствора доводят до 1 дм^3.

1.5 pH-ЭЛЕКТРОД И КИСЛОРОДНЫЙ ЭЛЕКТРОД

1.5.1 Электроды сравнения

Полуэлементы и гальванические элементы

Одним из наиболее распространенных методов контроля состояния реакционной среды в биохимическом эксперименте является измерение pH (т. е. активности ионов водорода). На второе место по частоте применения, пожалуй, можно поставить измерение концентрации кислорода. Наилучшим методом контроля в обоих случаях является использование

электродов, которые специфическим образом реагируют на присутствие конкретного иона или молекулы (**аналита**). Работа таких электродов (чаще всего изготовленных из платины) основано на том, что аналит способен принимать электроны от электрода или отдавать их ему. Перенос электронов лежит в основе реакций окисления и восстановления: прием электронов аналитом приводит к его восстановлению, а потеря электронов — к окислению. В общем виде окислительно-восстановительную реакцию можно представить следующим образом:

$$\underset{\text{окисленная форма}}{aX} + ne^- \rightleftarrows \underset{\text{восстановленная форма}}{bY}$$

Здесь X — восстанавливаемая химическая частица, Y — окисляемая частица, e^- — электрон, a, n и b — небольшие целые числа.

Переход электронов на электрод или от него приводит к возникновению потенциала E так называемого **индикаторного полуэлемента**. Количественно этот потенциал можно определить при сопряжении данного электрода с электродом сравнения, на котором создается постоянный потенциал известной (условной) величины. Экспериментально определяемый потенциал, являющийся суммой потенциалов, генерируемых двумя полэлементами, коррелирует с потенциалом, производимым индикаторным полуэлементом. Два полуэлемента должны соединяться солевым мостиком, через который могут проходить электроны, сохраняя электронейтральность системы. Два полуэлемента, соединенные подобным образом, составляют **гальваническую ячейку** (гальванический элемент).

Экспериментально измеряемый потенциал (E, в вольтах) в любом полуэлементе описывается **уравнением Нернста**:

$$E = E^0 - 2{,}303(RT/nF)\lg(A_Y/A_X) = \\ = E^0(-0{,}0592/n)\lg(A_Y/A_X) \text{ при } 25\ ^\circ\text{C} \qquad (1.11)$$

где E^0 — **стандартный окислительно-восстановительный потенциал** (также называемый просто стандартным потенциалом), A_X и A_Y — активности окисленной и восстановленной форм аналита соответственно, F — число Фарадея (электрический заряд одного моля электронов, $9{,}648 \cdot 10$ Дж·В$^{-1}$·моль$^{-1}$), R — универсальная газовая постоянная (8,314 Дж·моль$^{-1}$·К$^{-1}$), n — число молей электронов, принимающих участие в реакции на электроде, T — абсолютная температура, при 25 °C $2{,}303\ RT/F = 0{,}59159$ В.

При равенстве активностей окисленной и восстановленной форм аналита $A_Y/A_X = 1$, $\lg 1 = 0$, так что $E = E^0$. Важно запомнить, что именно отношение двух активностей, а не их абсолютные величины, определяют экспериментально измеряемую величину потенциала E. Таким образом, уравнение Нернста определяет потенциал полуэлемента, в котором действующие частицы имеют разные активности.

Для измерения потенциала индикаторного элемента чаще всего используют один из двух типов электродов сравнения — **каломельный электрод** или **хлорсеребряный электрод**.

Насыщенный каломельный электрод

Электрод состоит из двух концентрических трубочек. Во внутренней трубке расположен платиновый электрод, находящийся в контакте с пастой из ртути, хлорида ртути и хлорида калия. В нижней части внутренней трубки имеется небольшое отверстие, через которое она сообщается с внешней трубкой, заполненной насыщенным раствором хлорида калия, который исполняет роль солевого мостика, соединяющего полуэлемент с индикаторным полуэлементом, отделенным пористой пробкой (рис. 1.1, *а*). Такой полуэлемент можно записать с помощью следующей схемы:

$$Hg \,|\, Hg_2Cl_2 \,|\, KCl \,||\, \text{анализируемый раствор}$$

Здесь две вертикали обозначают солевой мостик, соединяющий полуэлемент с индикаторным полуэлементом.

Возникновение потенциала на каломельном электроде описывается уравнением:

$$\underset{\text{хлорид ртути (каломель)}}{\frac{1}{2}Hg_2Cl_2} + e^- \rightleftarrows \underset{\text{ртуть}}{Hg} + Cl^-$$

Стандартный потенциал этого полуэлемента $E^0 = +0{,}241$ В.

Хлорсеребряный электрод

Электрод представляет собой проволоку из металлического серебра, покрытую слоем хлорида серебра и помещенную в трубку, заполненную насыщенным раствором хлорида серебра и хлорида калия. Связь с анализируемым раствором осуществляется через отверстие на дне трубки, которое закрыто пористой пробкой и покрыто слоем твердого хлорида калия. Возникновение потенциала в полуэлементе можно описать уравнением:

$$AgCl + e^- \rightleftarrows Ag + Cl^-$$

Стандартный потенциал этого полуэлемента $E^0 = +0{,}197$ В.

Роль насыщенного раствора хлорида калия в обоих типах электродов сравнения сводится к поддержанию постоянной концентрации реагирующих частиц.

Стандартный водородный электрод

Каломельный и хлорсеребряный электроды находят широкое применение, но их собственный стандартный потенциал измеряют по отношению к международному стандарту, в роли которого выступает **стандартный водородный электрод**. Он состоит из платинового электрода, помещенного в раствор соляной кислоты с активностью 1, через который пропускают газообразный водород под давлением 1 атм (101 325 Па), так что его активность также 1. В результате устанавливается равновесие:

$$H^+ + e^- \rightleftarrows \frac{1}{2}H_2$$

Если активности ионов водорода и газообразного водорода равны 1, стандартный восстановительный потенциал электрода при 25 °С считают рав-

ным 0,00 В. Для рутинной работы в лаборатории такие электроды не применяют из-за их громоздкости.

Стандартный восстановительный потенциал впервые начали использовать химики; активность ионов водорода равна 1, что соответствует pH 0. Поскольку большинство биохимических реакций в живых клетках происходят при нейтральных значениях pH (около 7,0), биохимикам пришлось ввести новую шкалу стандартных восстановительных потенциалов, основанных на pH 7,0. Такие стандартные потенциалы обозначают $E^{0'}$. Их численные значения меньше соответствующих значений E^0. В табл. 1.7 приведены стандартные окислительно-восстановительные потенциалы некоторых редокс-пар, представляющих интерес для биохимии. Положительные значения $E^{0'}$ соответствуют более сильным окислительным системам, а отрицательные — более сильным восстановительным системам, чем в случае стандартного водородного электрода. Полуэлементы такого типа, как представлены в табл. 1.7, соединены в пары: в одном происходит окисление, в другом — восстановление. Движущей силой суммарной реакции является изменение свободной энергии ($\Delta G^{0'}$), возникающее из-за разности потенциалов ($\Delta E^{0'}$) в двух полуэлементах:

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta E^{0'}$$

где $\Delta E^{0'} = (E^{0'}_{\text{окисл. полуэлемента}} - E^{0'}_{\text{восст. полуэлемента}})$

Некоторые полуэлементы интересны тем, что в окисленном и восстановленном состояниях окрашены в различные цвета. Это так называемые **индикаторы**; они находят широкое применение для изучения ферментативных реакций (см. разд. 15.2.2). Примеры индикаторов представлены в табл. 1.8.

Таблица 1.7. **Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы (25 °C) некоторых редокс-пар, важных для биохимии**

$E^{0'}$, В	Полуреакция
– 0,42	$2H^+ + 2e^- \rightleftarrows H_2$
– 0,32	$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftarrows NADH$
– 0,22	$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows FADH_2$
– 0,20	Ацетальдегид $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows$ этанол
– 0,19	Пируват $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows$ лактат
– 0,17	Оксалоацетат $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows$ малат
– 0,03	Фумарат $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows$ сукцинат
+ 0,08	Цитохром *b* $(Fe^{3+}) + e^- \rightleftarrows$ цитохром *b* (Fe^{2+})
+ 0,25	Цитохром *c* $(Fe^{3+}) + e^- \rightleftarrows$ цитохром *c* (Fe^{2+})
+ 0,29	Цитохром *a* $(Fe^{3+}) + e^- \rightleftarrows$ цитохром *a* (Fe^{2+})
+ 0,30	$\frac{1}{2} O_2 + H_2O + 2e^- \rightleftarrows H_2O_2$
+ 0,80	$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftarrows H_2O$

Таблица 1.8. **Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы некоторых индикаторов (25 °С)**

$E^{0'}$, В	Индикатор
– 0,45	Метиловый фиолетовый
– 0,36	Бензиловый фиолетовый
– 0,36	Феррицианид калия (красная кровяная соль)
– 0,22	2,6-Дихлорфенолиндофенол (ДФИФ)
– 0,08	2,3,5-Трифенилтетразолийхлорид (ТФТХ)
– 0,08	Феназин метосульфат (ФМС)
– 0,01	Метиленовый синий

1.5.2 pH-Электрод и другие ион-селективные электроды

Принцип действия pH-электрода

pH-Электрод — это один из **ион-селективных электродов** (ИСЭ), реагирующих на наличие в растворе одного специфического иона (H^+). В отличие от каломельного и хлорсеребряного электродов механизм действия ИСЭ основан не на окислительно-восстановительных реакциях, а на **градиенте концентрации иона**. Однако измерения с помощью и тех, и других электродов проводят методом **потенциометрии**, т. е. определяют потенциал электрода, а не силу электрического тока.

pH-Электрод представляет собой прочную стеклянную трубку, заполненную 0,1 М соляной кислотой, на конце трубки находится тонкая пористая стеклянная пластинка-мембрана. В раствор кислоты погружена серебряная проволочка, покрытая слоем хлорида серебра. Этот Ag/AgCl-электрод выполняет функцию внутреннего стандарта с постоянным потенциалом. Пористая мембрана обычно имеет толщину 0,1 мм, причем внешний и внутренний слои толщиной 10 нм представляют собой гидратированный гель, в котором имеются участки связывания ионов водорода или натрия. На внутренней стороне мембраны эти участки преимущественно заняты ионами водорода из соляной кислоты, а на внешней стороне — ионами обоих видов. В основном же мембрана состоит из сухого силикагеля, внутри которого участки связывания заняты ионами натрия. Большинство связанных ионов из обоих гидратированных слоев могут свободно диффундировать в раствор, а ионы водорода из анализируемого раствора могут диффундировать в противоположном направлении, вытесняя связанные ионы натрия (**ионообменное равновесие**). Никакие другие катионы из анализируемого раствора не способны занимать участки связывания, что объясняет высокую специфичность электрода. Заметьте, что ионы водорода не могут пройти сквозь сухой слой стеклянной мембраны, а ионы натрия могут. Таким образом, мембрана имеет два гидратированных слоя с разной активностью ионов водорода, разделенных системой для транспорта ионов натрия.

Принцип действия pH-электрода основан на том, что при наличии в мембране градиента активности ионов водорода возникает потенциал, величина которого задается уравнением Нернста (уравнение 1.11). Таким образом, в данном случае потенциал определяется исключительно градиентом активности ионов водорода в мембране, а не соотношением активностей окисленных и восстановленных частиц. Более того, поскольку активность ионов водорода на внутренней поверхности мембраны постоянна (там 0,1 М HCl), наблюдаемый потенциал зависит от активности ионов водорода в анализируемом растворе. Как видно из уравнения 1.11, равенство активностей ионов водорода на двух сторонах мембраны (в случае, если анализируемый раствор представляет собой 0,1 М HCl) приводит к нулевому потенциалу (0 В). На практике, однако, это не так. Существует небольшой **потенциал асимметрии** (E^*), наличие которого до некоторой степени объясняется контактом между стеклянным электродом и электродом сравнения. В результате потенциал на мембране описывается уравнением:

$$E = E^* + 0{,}059\ \text{pH}$$

Поскольку со временем химический состав пористой мембраны изменяется, изменяется и потенциал асимметрии. Это объясняет необходимость регулярной калибровки электрода. При 10-кратном изменении активности ионов водорода на мембране (что эквивалентно изменению pH анализируемого раствора на единицу) изменение разности потенциалов на мембране составляет 59,2 мВ. Поскольку в уравнение Нернста входит абсолютная температура, чувствительность измерений pH зависит от температуры среды.

Чаще всего pH-электрод представляет собой стеклянный электрод (рис. 1.1, *б*) или комбинированный электрод (рис. 1.1, *в*), содержащий встроенный каломельный электрод сравнения.

Работа с pH-электродом и его калибровка

Стеклянная мембрана pH-электрода хрупкая и легко бьется. Кроме того, важно, чтобы ее поверхность оставалась влажной, поэтому, когда электрод не используется, мембрана должна быть погружена в воду. Если мембрана пересушена, перед калибровкой электрод следует выдержать в 6 М соляной кислоте, а затем промыть водой. Для калибровки обычно используют два стандартных буферных раствора, охватывающих диапазон pH, в котором будут проводиться измерения. Чаще всего применяют раствор 0,05 М гидрофталата калия (pH 4,008) и 0,01 М раствор буры (pH 9,18). Электрод промывают водой, снимают капли фильтровальной бумагой, помещают в буферный раствор и выдерживают до установления равновесия, а затем с помощью кнопки «калибровка» выставляют показание pH-метра в соответствии с известным pH буфера. Эту процедуру повторяют со вторым буферным раствором, приводя к соответствующему значению pH с помощью кнопок «slope» или «temperature». Через 1–2 ч работы может оказаться необходимым вновь откалибровать прибор. Хорошо откалиброванный инструмент должен работать с погрешностью не более ± 0,2 единицы pH.

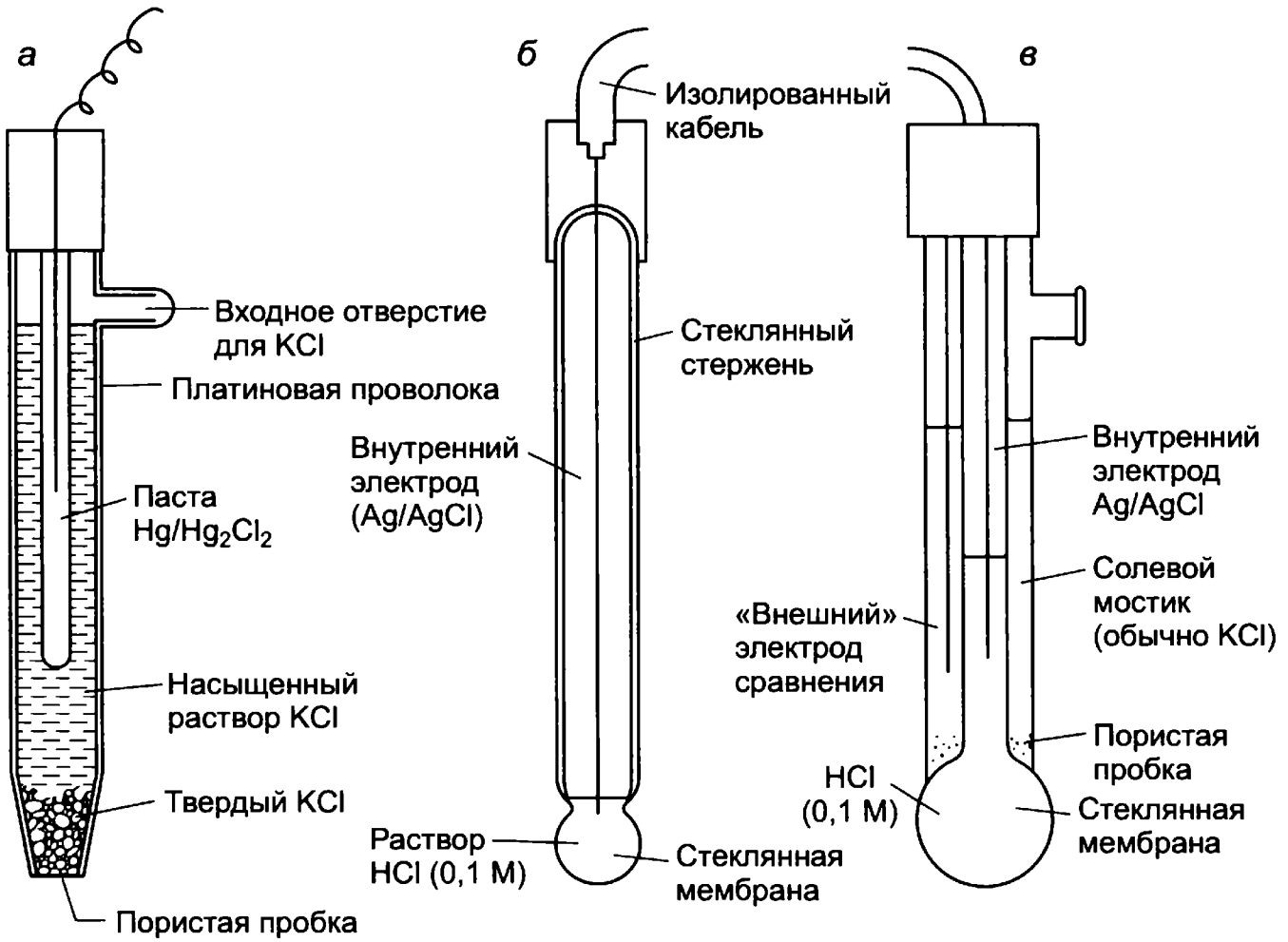


Рис. 1.1. Разные электроды: *а* — каломельный электрод сравнения; *б* — стеклянный электрод; *в* — комбинированный электрод

Ошибки при измерении pH

При определении pH возможны ошибки, вызванные перечисленными ниже факторами:

- неадекватный контроль температуры анализируемого раствора;
- неправильный уход за электродом и ошибки при калибровке;
- недостаточное время для установления равновесия между электродом и анализируемым раствором;
- наличие в анализируемом растворе других солей, которые диссоциируют на ионы и изменяют коэффициенты активности компонентов буфера;
- наличие в растворе органических растворителей, таких как этиловый спирт, изменяющих коэффициенты активности компонентов буфера;
- наличие в анализируемом растворе белков, способных покрывать стеклянную мембрану и влиять на процесс ионного обмена на гидратированной поверхности мембраны;
- pH > 12; из-за низкой концентрации ионов водорода происходит замещение ионов водорода на внешнем гидратированном слое мембраны ионами натрия из анализируемого раствора, так что электрод реагирует на присутствие ионов натрия и регистрируемое значение pH оказывается ниже реального значения — **натриевая,** или **щелочная**, **ошибка**. Для определения высоких значений pH применяют специальные стеклянные электроды, в которых натрий заменен литием.

Ион-селективные электроды

Существуют электроды для определения концентрации Li^+, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^- и NO_3^-. Принцип их действия очень похож на принцип действия pH-электрода. Мембрана в таких электродах сделана из специального алюмосиликатного стекла или неорганического кристалла. Например, в электродах для определения ионов фтора используются кристаллы LaF_3, селективно реагирующие на адсорбцию ионов фтора. Основным недостатком большинства подобных электродов является отсутствие абсолютной специфичности по отношению к анализируемому иону. Селективность выражают с помощью **коэффициента селективности** — отношение «ответа» на конкурирующие ионы к «ответу» на анализируемый ион. Таким образом, специфичность электрода обратно пропорциональна коэффициенту селективности. Большинство фирменных ИСЭ характеризуются хорошим линейным ответом на анализируемый ион и быстрым временем отклика. Автоматизированные системы с применением ИСЭ широко используются в клинических биохимических лабораториях для определения натрия, калия, кальция и хлора (см. разд. 1.7.2).

Газочувствительные электроды

Существуют электроды для определения концентрации таких газов, как CO_2 и NH_3, причем принцип их действия аналогичен тому, что лежит в основе действия ИСЭ. В случае электрода на CO_2 внешняя стеклянная мембрана pH-электрода впаяна внутрь проницаемого для CO_2 мембранного мешка из политетрафторэтилена или полиэтилена, содержащего 0,1 М KCl и слабый бикарбонатный буфер. Газообразный CO_2 диффундирует от образца сквозь мембрану до тех пор, пока не будет достигнуто равенство его концентрации с обеих сторон мембраны. Внутри мешка образуется угольная кислота, дающая при диссоциации ионы бикарбоната и водорода. Благодаря наличию бикарбонатного буфера концентрацию бикарбоната в мешке можно считать постоянной, поэтому изменение pH напрямую связано с концентрацией CO_2 в анализируемом образце.

Биосенсоры и оптические сенсоры

Биосенсоры по сути представляют собой ИСЭ или газочувствительные электроды с иммобилизованными ферментами или клетками, которые реагируют на анализируемое вещество или его метаболит. Происходящие при этом химические превращения преобразуются в электрический или оптический сигнал. Важными примерами являются сенсоры на глюкозу, мочевину и холестерин. Биосенсор на мочевину содержит чувствительный к аммонию электрод, на поверхности которого иммобилизован фермент уреаза. Уреаза превращает мочевину из анализируемого образца в аммоний, количество которого измеряется электродом:

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightleftarrows 2NH_3 + CO_2$$

Биосенсоры на глюкозу и холестерин основаны на окислении анализируемого вещества (соответственно под действием глюкозооксидазы и холестеролоксидазы), а измерение осуществляется либо амперометрическим

методом по выделению пероксида водорода на аноде, либо напрямую по поглощению кислорода с помощью кислородного электрода:

$$\beta\text{-D-глюкоза} + O_2 \rightleftarrows \text{D-глюкозо-1,5-лактон} + H_2O_2$$

$$\text{холестерин} + O_2 \rightleftarrows \text{4-холестен-3-он} + H_2O_2$$

Оптические сенсоры используются для определения АТР, они регистрируют свет, испускаемый в присутствии люциферазы (разд. 15.2.2). Фотоумножитель усиливает световой сигнал, что позволяет проводить анализ АТР с очень высокой чувствительностью.

1.5.3 Кислородный электрод

Принцип действия

Кислород используется в двух фундаментальных процессах, необходимых для поддержания жизни — дыхания и фотосинтеза. Раньше при изучении этих процессов использовали манометр, измеряющий изменения объемов газов. Изобретение кислородного электрода произвело революцию в биохимических исследованиях механизмов окислительного фосфорилирования в митохондриях и фотосинтеза в хлоропластах. Кислородный электрод представляет собой **электрохимическую ячейку**, содержащую платиновый катод и серебряный анод, отделенные от анализируемого раствора проницаемой для кислорода мембраной. На электроды подается поляризационный потенциал 0,6 В, в результате чего вблизи поверхности катода электроны расходуются на восстановление кислорода, а на аноде электроны высвобождаются в результате окисления:

На катоде: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftarrows 2H_2O$ *Процесс восстановления*

На аноде: $4Ag + 4Cl^- \rightleftarrows 4AgCl + 4e^-$ *Процесс окисления*

Удаление кислорода на катоде в результате его восстановления стимулирует диффузию дополнительного количества кислорода через мембрану, так что процесс восстановления на катоде продолжается— возникает электрический ток, сила которого прямопропорциональна количеству кислорода (так называемому **напряжению кислорода**) в анализируемом растворе. Таким образом, кислородный электрод работает как **амперометрический детектор** (измерении тока при постоянном напряжении).

Важно создать условия, при которых диффузия кислорода из объема раствора к поверхности мембраны не являлась бы лимитирующим фактором для возникновения тока. Чтобы решить эту проблему, анализируемый раствор интенсивно перемешивают. Кислородный электрод позволяет непрерывно регистрировать разность потенциалов, например, при окислительном фосфорилировании (рис. 1.2). Перед каждым экспериментом электрод следует калибровать с помощью насыщенной воздухом воды (обычно для этого в воду помещают кристалл дитионита натрия). Концентрацию кислорода в насыщенной воздухом воде при разных температурах можно найти в таблицах физических величин.

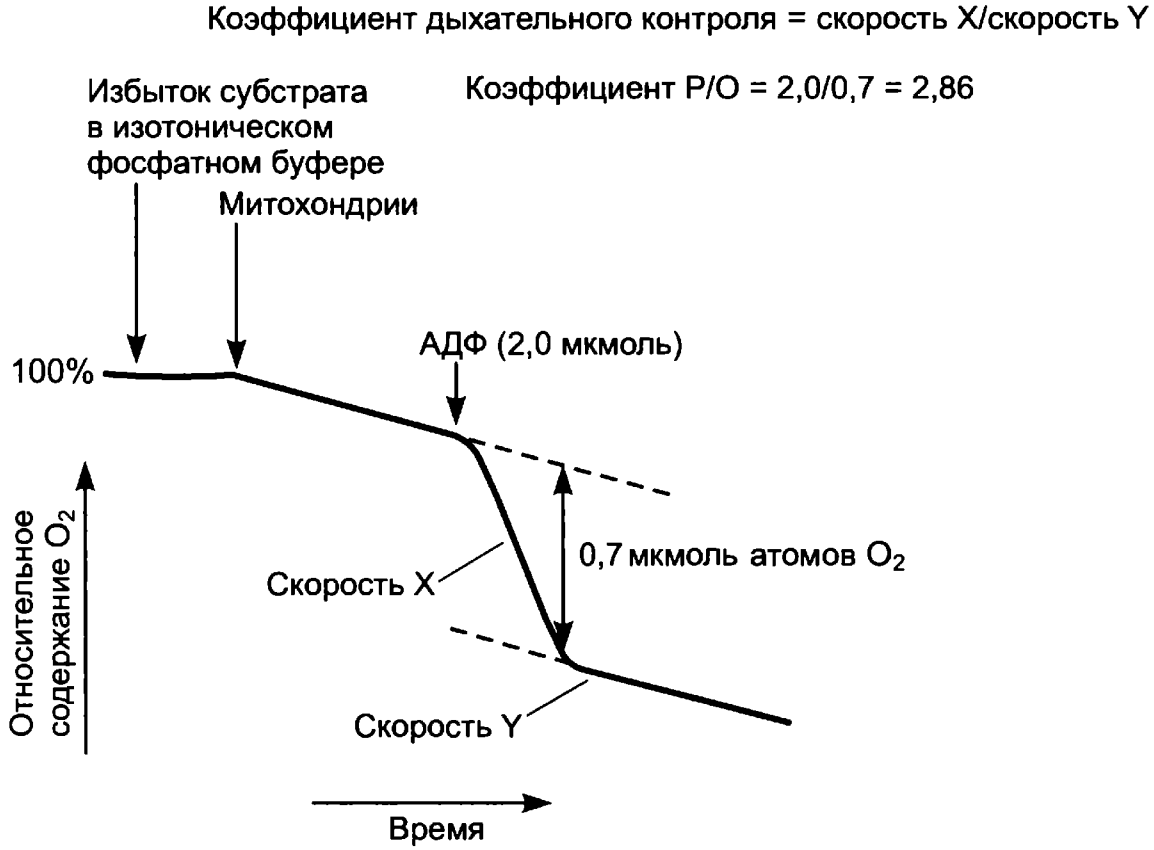


Рис. 1.2. Типичная кривая потребления кислорода в интактных митохондриях, полученная с помощью кислородного электрода

Существуют самые разные варианты кислородных электродов. Наиболее широко используется электрод фирмы Rank (Великобритания), схематически изображенный на рис. 1.3. Реакционный сосуд имеет объем 3 $см^3$.

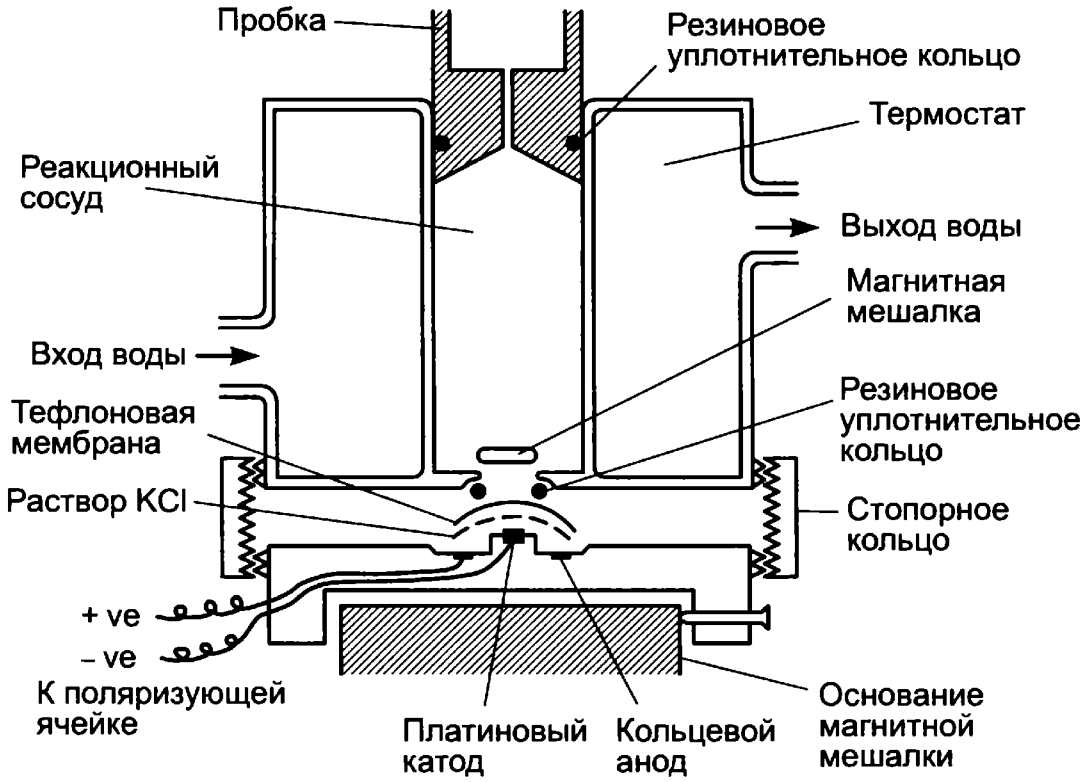


Рис. 1.3. Схема конструкции кислородного электрода фирмы Rank

Проницаемая мембрана может быть изготовлена из тефлона, целлофана или силиконовой резины. Все типы мембран чувствительны к присутствию в растворе примесей, особенно белков. Анод и катод соединены между собой через раствор хлорида калия.

Применение кислородного электрода

Кислородный электрод применяют при изучении любых биохимических процессов, в которых происходит поглощение кислорода или реакции с участием кислорода. Метод показал прекрасные результаты при изучении контроля дыхания, влияния ингибиторов на митохондриальное дыхание, а также для определения коэффициента P : O при окислительном и фотосинтетическом фосфорилировании. На рис. 1.2 изображен график потребления кислорода в целых митохондриях. До момента добавления АДФ митохондрии медленно потребляют кислород. После добавления АДФ потребление кислорода увеличивается из-за синтеза АТФ (скорость X) до полного использования всего добавленного АДФ, после чего вновь снижается (скорость Y). Отношение скоростей X и Y является мерой **коэффициента дыхательного контроля**. Зная количества добавленного АДФ и потребленного кислорода, можно рассчитать **коэффициент P : O**. На рис. 1.4 показаны результаты эксперимента, в котором изучалось влияние ингибиторов дыхания и способы преодоления этого ингибирования с помощью доноров электронов.

Существуют различные варианты кислородного электрода, которые позволяют анализировать кислородный обмен не в жидкости, а в газовой фазе.

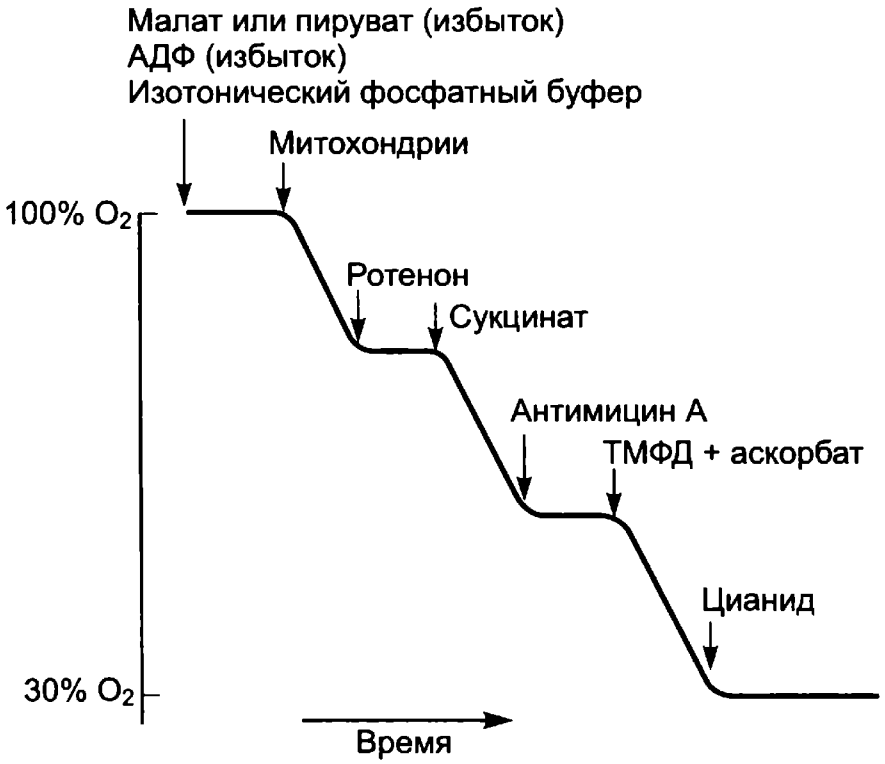


Рис. 1.4. Влияние ингибиторов электронного транспорта и доноров электронов на митохондриальное дыхание. ТМФД — тетраметилфенилендиамин

1.5.4 Электрохимические методы анализа отдельных клеток

Созданные в последние годы миниатюрные электроды стимулировали развитие количественного анализа на уровне клеток. **Микроэлектроды** с диаметром носика от 1 до 5 мкм, временем отклика порядка нескольких микросекунд и чувствительностью на уровне нескольких цептомолей вещества (т. е. 10^{-21} моль, около 600 молекул) позволяют изучать динамику клеточных процессов. Такие электроды чаще всего изготавливают из углеродного волокна; они обычно имеют форму диска или цилиндра. С помощью ион-селективных микроэлектродов можно следить за внутриклеточным содержанием H^+, Li^+, Ca^{2+} и Mg^{2+}, а платиновые микроэлектроды применяют для анализа веществ, подвергающихся быстрому окислению или восстановлению на поверхности электрода. К таким веществам относится допамин: метод позволяет анализировать его высвобождение из одной-единственной нервной клетки. Микроэлектроды использовали также для изучения динамики процесса экзоцитоза. Например, на хромаффинных клетках мозгового вещества быка было показано, что за один акт экзоцитоза высвобождается от 5 до 10 аттомоль (10^{-18} моль) серотонина.

1.6 КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

1.6.1 Химический анализ и возможные ошибки

При проведении многих биохимических исследований приходится определять концентрацию или количество какого-либо вещества в образце. Например, при изучении механизма действия фермента, трансмембранного транспорта или передачи сигнала в клетке определяют содержание того или иного компонента при изменении экспериментальных условий и на основании этого рассчитывают кинетические или термодинамические параметры. Эти величины далее используют для установления механизма биологического процесса. Вне зависимости от основной цели проведения такого рода количественных определений, все полученные экспериментальные данные должны оцениваться с точки зрения их достоверности и надежности выведенных на их основании заключений. Для этого нужно подвергнуть экспериментальные данные определенной статистической обработке с помощью одной или нескольких стандартных процедур. Соответствующая статистическая обработка результатов — обязательное требование при публикации научной статьи в журнале. В следующих разделах рассмотрены некоторые теоретические и практические аспекты статистической обработки экспериментальных данных.

Анализируемый образец

Количественному анализу подвергают весьма разнообразные образцы, например препараты очищенного белка, нуклеиновой кислоты или клеточных органелл, гомогенат или суспензию клеток, гомогенат ткани, физиологические жидкости (моча, сыворотка крови, цельная кровь), а также фракция вещества после хроматографического разделения. Способ отбора пробы за-

висит от той среды, в которой содержится анализируемое вещество (вода, солевой раствор, сыворотка, моча). При правильном отборе пробы должен быть получен репрезентативный образец анализируемого вещества. В случае гомогенных водных растворов отобрать пробу просто, но если раствор вязкий, то отобрать необходимый объем гораздо сложнее. Особенно трудно получить репрезентативный образец в случае гетерогенной среды. Может понадобиться предварительная экстракция, позволяющая получить анализируемое вещество в более доступной форме. К возможным методам экстракции относятся **жидкостная экстракция**, при которой анализируемый материал экстрагируют с помощью органического растворителя, например дихлорметана или хлороформа, и **твердофазная экстрация**, представляющая собой вариант адсорбции или ионообменной хроматографии. Некоторые образцы могут оказаться слишком концентрированными для непосредственного анализа, в таком случае встает вопрос о выборе подходящего разбавителя, например, если концентрация вещества в сыворотке или плазме крови слишком высокая, разбавление образца водой неминуемо изменило бы и его концентрацию, и активность, а разбавление «контрольной» сывороткой или плазмой было невозможно.

Выбор метода анализа

Выбор метода анализа сопряжен с выбором соответствующего экспериментального оборудования. Для анализа одного и того же образца часто можно использовать несколько методов; выбор того или иного метода делается на основании следующих критериев:

- наличие необходимого оборудования;
- точность и пределы обнаружения конкурирующих методов;
- точность и пределы обнаружения, необходимые для конкретного анализа;
- наличие в образце веществ, мешающих определению;
- оценочная стоимость метода (это особенно важно в серийных анализах);
- возможный риск, связанный с проведением анализа, и необходимые меры предосторожности;
- метод выбора, предлагаемый в литературе;
- персональные предпочтения.

К наиболее часто используемым в биохимии количественным методам анализа относятся спектрофотометрия в видимой и УФ области, флуоресцентный анализ, хроматография (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газожидкостная хроматография (ГЖХ) в сочетании со спектрофотометрией или масс-спектрометрией, ион-селективные электроды и иммунологические методы анализа, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)). Когда метод выбран, необходимо его приспособить к анализируемой системе и подтвердить его применимость, о чем сказано в последующих разделах. Если измерения предполагается проводить на протяжении длительного времени, необходимо удостовериться в отсутствии «дрейфа» показаний прибора. Обычно это делают с помощью **внутреннего стандарта** — набора контрольных

образцов, покрывающих весь измеряемый диапазон значений, которые промеряют каждый раз при проведении анализа. При любых отклонениях показаний для этих контрольных образцов необходимо переделать всю серию измерений.

Об ошибках измерения

Любое количественное определение неизбежно сопряжено с некоторой неточностью. Эта неточность, называемая **ошибкой измерения**, оценивают по разности между «истинным» и экспериментально полученным значениями. Истинное значение обычно неизвестно, за исключением тех случаев, когда анализируют стандартные образцы (т. е. образцы известного состава). Во всех других случаях истинное значение получают также путем анализа. Ошибки измерения приводят к тому, что результаты анализа имеют высокую, среднюю или низкую достоверность в зависимости от применяемого метода (но об абсолютной правильности никогда нельзя говорить).

Экспериментальные ошибки бывают двух типов: **систематические** и **случайные**.

Систематические ошибки

Систематические ошибки — это воспроизводящиеся ошибки, которые можно идентифицировать и либо исключить, либо уменьшить. Наиболее часто они бывают связаны с дефектами или ограничениями приборов, но иногда возникают из-за ошибок в постановке эксперимента. Это могут быть неправильное обращение со стеклянными и автоматическими пипетками, ошибки приготовления запасных растворов, а также неправильная калибровка или использование pH-метров. Эти ошибки могут быть **постоянными** (т. е. иметь одно и то же значение независимо от количества анализируемого вещества в образце) или **пропорциональными** (т. е. изменяться с изменением количества определяемого вещества в образце). Таким образом, вклад ошибок этих двух типов в один и тот же экспериментальный результат будет неодинаковым. Оба типа систематических ошибок имеют одну из трех следующих причин:

- *Ошибка исследователя*: эта ошибка может быть минимизирована путем тренинга или при автоматизации метода.
- *Ошибка прибора*: от такой ошибки избавиться нельзя, так что следует рассмотреть возможность использования другого метода анализа. Ошибка прибора может быть связана как с устройством прибора, так и со свойствами образца.
- *Ошибка метода*: подобная ошибка может быть идентифицирована путем сравнения измерений с данными, полученными альтернативным методом.

Идентификация систематических ошибок

Систематические ошибки всегда воспроизводятся и могут быть как отрицательными, так и положительными, т. е. могут понижать или повышать экспериментальный результат по отношению к «истинному» значению.

Важным свойством этого типа ошибок является возможность их идентификации и коррекции. Существует четыре основных способа идентификации систематических ошибок:

- *Использование холостой пробы*, т. е. образца, про который известно, что он не содержит анализируемого вещества. Если при анализе холостой пробы вы получаете ненулевой ответ, значит что-то неправильно. Холостые пробы трудно приготовить при анализе сложных систем, таких как сыворотка крови.
- *Использование стандартных растворов сравнения* — растворов анализируемого вещества с известной концентрацией. Выбранный метод анализа должен давать ожидаемое значение.
- *Использование альтернативного метода*. Если результаты, получаемые с помощью выбранного и альтернативного метода, различаются, то как минимум один из методов имеет какие-то дефекты.
- *Использование внешнего стандарта*. Это подразумевает наличие стандартного образца сравнения, который анализируют другие исследователи в других лабораториях с помощью того же самого или иного метода. Если при сравнении результатов выявляется ошибка, превышающая случайную ошибку (см. ниже), это говорит о наличии систематической ошибки. Использование внешнего стандарта — это обычная практика, применяемая в клинических биохимических лабораториях (разд. 1.7.3).

Случайные ошибки

Случайные ошибки бывают вызваны непредсказуемыми и часто неконтролируемыми неточностями в различных манипуляциях при проведении эксперимента. Эти ошибки могут быть как положительными, так и отрицательными. Часто причина таких ошибок связана со сложностью отбора вязких проб, внезапными отклонениями нулевой линии прибора, а также с отсутствием у исследователя навыка работы с прибором и интерпретации результатов.

Стандартная рабочая процедура

Минимизация систематических и случайных ошибок особенно важна в тех случаях, когда аналитические данные используются для постановки диагноза или планирования лечения, как это обычно бывает, например, в рутинном клиническом биохимическом анализе и при разработке новых лекарств. В подобных случаях при проведении анализа пользуются **стандартной рабочей процедурой** (СРП), в которой подробно описано качество реагентов, приготовление стандартных растворов, способ калибровки приборов и порядок выполнения работы.

1.6.2 Оценка применимости метода анализа

Все аналитические методы имеют ряд **рабочих характеристик**, указывающих на то, как конкретный метод работает в определенных условиях.

Знание этих характеристик позволяет исследователю решить, пригоден ли данный метод для выполнения поставленной задачи или нет. Основные рабочие характеристики при выборе метода анализа следующие:

- *Точность* — мера воспроизводимости конкретного набора измерений с одним и тем же анализируемым образцом. Если повторные измерения дают близкие результаты, говорят о **высокой точности** метода. Напротив, если значения различаются, говорят о **низкой** или **плохой точности**. В биохимической аналитической практике обычно стараются выбрать метод, обеспечивающий максимально высокую точность в общих рамках поставленной задачи. Однако точность метода часто не одинакова во всем диапазоне измерений (см. ниже) и в различные моменты времени. Поэтому обычно говорят о точности метода **внутри серии** и **между сериями**. Точность внутри серии подразумевает разброс результатов измерений одного и того же образца в рамках одного эксперимента, выполненного в течение одного дня. Точность между сериями — разброс результатов измерений одного и того же образца, анализировавшегося в рамках разных экспериментальных серий на протяжении какого-то времени. Поскольку вероятность изменения условий при проведении различных серий экспериментов больше, высокая точность между сериями имеет особую ценность. Следует иметь в виду, что даже полученные с высокой точностью результаты могут быть далеки от «истинного» значения (т. е. имеет место **высокая погрешность** или **систематическая ошибка**), что вызвано действием какого-то неизвестного фактора. Методы оценки точности анализов результатов обсуждаются ниже. Термин **неточность** чаще всего используют биохимики-клиницисты, поскольку, по их мнению, он лучше отражает вариабельность в повторных анализах.
- *Погрешность (или ошибка)* — это различие между средним значением анализа одного образца и «истинным» значением. Как уже говорилось, «истинное» значение обычно неизвестно, за исключением измерений стандартных образцов. В других случаях погрешность оценивают косвенным путем, используя принятые международные стандарты, внешние стандарты (см. выше) или статистические методы, которые обсуждаются ниже.
- *Предел обнаружения (или чувствительность)* — наименьшая концентрация анализируемого вещества, с определенной достоверностью отличная от нулевой. Концентрации ниже предела обнаружения сопровождается указанием, что они ниже предела обнаружения. Методы анализа имеют разные пределы обнаружения, и этот фактор может быть важным для выбора метода анализа в конкретном эксперименте. Например, для определения концентрации белка метод Бредфорд, метод Лоури, метод с бицинхониновой кислотой имеют пределы обнаружения 20, 10 и 0,5 мкг/см^3 соответственно. В клинической биохимической практике чувствительность метода оценивается количеством вещества, которое при анализе не дает ложноотрицательного результата (разд. 1.7.1).

- *Диапазон измерений* — это диапазон концентраций анализируемого вещества, в котором измерения воспроизводятся; нижней границей этого диапазона является предел обнаружения. В большинстве случаев диапазон измерений описывается калибровочной кривой (разд. 1.6.6). Как уже упоминалось выше, точность метода во всем диапазоне измерений может варьировать.
- *Специфичность (селективность) определения* показывает влияние других веществ, присутствующих в образце, на определение анализируемого вещества; в присутствии мешающих веществ измеряемое значение оказывается завышенным или заниженным. Простой примером — определение глюкозы в присутствии других гексоз, таких как манноза и галактоза. В клинической биохимической практике при хорошей селективности метода давать устойчивый отрицательный результат для известных отрицательных контролей (разд. 1.7.1).
- *Чувствительность измерения* характеризуется изменением измеряемых параметров при изменении количества анализируемого вещества. В большинстве случаев чувствительность измерения определяют как угол наклона линейного калибровочного графика.
- *Устойчивость метода* характеризуется одинаковыми результатами при небольших изменениях условий эксперимента — pH, температуры или количества добавленных реагентов. Для проведения рутинных анализов устойчивость — очень важная характеристика.

Рабочие характеристики метода анализа выявляют с помощью известных тестов и стандартных образцов. Определять их можно в любом порядке, но обычно наибольшее внимание уделяют специфичности, пределу обнаружения и диапазону измерений. Если какой-то метод используется постоянно, может встать вопрос о применении специальных процедур для оценки качества данных (разд. 1.7.3).

1.6.3 Оценка точности

После нахождения численных значений количества и(или) концентрации анализируемого вещества экспериментатор должен задаться вопросом, насколько он может быть уверен в том, что полученные данные достаточно близки к «истинному» значению (т. е. какова погрешность определения?). Кроме того, может возникнуть вопрос о сопоставимости качества полученных данных с тем, что известно из литературы (т. е. какова точность метода?). После того как на эти вопросы получен ответ, результаты можно далее использовать в последующих исследованиях; ошибочные же данные должны быть отброшены. К сожалению, определить точность по одному-единственному показанию не представляется возможным, поэтому все измерения приходится проводить в нескольких **повторностях**, а затем подвергать полученные данные соответствующей статистической обработке.

Если какое-либо измерение проводить несколько раз, а затем построить график зависимости частоты встречаемости каждого результата от

его значения, должна получаться колоколообразная кривая, симметричная относительно среднего значения. Такой тип распределения называют **гауссовым** или **нормальным распределением**. В таком случае точность отражает наличие случайных ошибок. Однако, если график сдвинут от среднего значения в какую-либо сторону, это говорит о наличии систематических ошибок. Рассмотрим три статистических параметра для оценки точности результатов в случае их нормального распределения.

Стандартное отклонение, коэффициент вариации и дисперсия — характеристики точности анализа

Эти три статистические параметра используются для оценки разброса данных относительно **среднего значения** $\bar{x}$ (которое рассчитывают путем сложения всех значений и деления на их общее количество). Каждый из параметров имеет свои достоинства. Во всех трех случаях параметр отражает ширину нормального распределения, причем чем уже распределение, тем меньше значение параметра и тем выше точность полученных экспериментальных данных.

Стандартное отклонение (s) для набора данных рассчитывают по уравнению 1.12 или 1.13:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \qquad (1.12)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i^2 - [\sum(x_i)^2/n)]}{(n-1)}} \qquad (1.13)$$

Здесь $(x_i - \bar{x})$ — разность между значением каждого конкретного измерения (x_i) и средним из всех значений ($\bar{x}$). Поскольку эта разность может быть как положительной, так и отрицательной и поскольку распределение значений относительно среднего значения симметрично, результат их сложения дает нуль. Поэтому для расчета стандартного отклонения берут квадрат разности — всегда положительное число и извлекают квадратный корень.

Стандартное отклонение (SD) имеет ту же размерность, что и измеряемый параметр, и в этом состоит одно из его преимуществ. Математическая суть нормального распределения такова, что 68,2% площади под кривой (и, следовательно, 68,2% значений из общего набора данных) лежит в пределах одной величины стандартного отклонения (с обеих сторон от среднего значения), 95,5% площади под кривой лежит в пределах двух SD, а 99,7% — в пределах трех SD. Ровно 95% площади под кривой попадает в диапазон между средним значением и 1,96 SD. Точность полученных данных обычно выражают как среднее ± 1 SD.

Разность $(n - 1)$ называется **числом степеней свободы** данного распределения; это важная переменная. Каждый набор данных имеет число степеней свободы, равное числу отдельных измерений (n). При расчете любого дополнительного параметра, характеризующего набор данных (среднее значение, стандартное отклонение и др.), число степеней свободы

уменьшается на единицу, а затем еще на единицу для каждого следующего параметра. Многие компьютеры снабжены программами расчета стандартного отклонения. Однако в некоторых из них расчет производится на основании уравнения 1.12, в котором в знаменателе вместо $(n - 1)$ стоит просто n. При больших n, скажем >30, различие между двумя способами расчета несущественно, но при малых n, n <10, использование для расчета n вместо $(n - 1)$ приведет к значительной недооценке стандартного отклонения. Это в свою очередь может привести к неверному выводу относительно точности полученного набора данных. Таким образом, для большинства аналитических биохимических расчетов принципиально важно производить расчет стандартного отклонения, используя в знаменателе $(n - 1)$.

Коэффициент вариации (CV, также известный как **относительное стандартное отклонение**) для набора данных представляет собой стандартное отклонение, выраженное в процентах от среднего значения:

$$CV = \frac{s \cdot 100\%}{\bar{x}} \qquad (1.14)$$

Поскольку среднее значение и стандартное отклонение имеют одинаковую размерность, коэффициент вариации — величина безразмерная (проценты). Поэтому коэффициент вариации удобно использовать при сравнении результатов в различных единицах измерения.

Дисперсия набора данных представляет собой среднее из квадратов разностей отдельных значений и среднего значения. Эта величина равна квадрату стандартного отклонения, поэтому обозначается как s^2. Единица измерения данной величины — квадрат единицы измерения исходного параметра, поэтому для оценки точности данных дисперсию используют гораздо реже, чем стандартное отклонение или коэффициент вариации. Роль дисперсии станет ясна позднее, когда мы будем говорить о сравнении двух наборов данных.

Для сравнения стандартного отклонения и коэффициента вариации в качестве меры точности набора данных рассмотрим следующую ситуацию. Предположим, что два образца А и Б сыворотки крови были проанализированы на содержание глюкозы с помощью глюкозооксидазы (разд. 15.2.5) по 20 раз каждый. Среднее значение для А составило 2,00 мМ при стандартном отклонении ±0,10 мМ, а для Б — 8,00 мМ при стандартном отклонении ±0,41 мМ. Из сравнения стандартных отклонений могло бы показаться, что значение А было определено точнее, чем значение Б. Однако при этом не учитываются абсолютные значения А и Б. Если их принять во внимание и рассчитать коэффициент вариации для каждого образца, получим значения 5,0% и 5,1%, что говорит об одинаковой точности определения в обоих случаях. Из данного примера следует, что стандартное отклонение вполне применимо для оценки точности определения конкретного набора данных, но для сравнения точности разных наборов данных, особенно имеющих различные средние значения, удобнее пользоваться коэффициентом вариации. Большинство хорошо разработанных аналитических методов имеют коэффициенты вариации в пределах 5%, а некоторые автоматизированные методы — менее 2%.

1.6.4 Оценка погрешности

Статистический анализ совокупностей данных

Хотя стандартное отклонение и коэффициент вариации характеризуют точность, с которой получен набор данных, они ничего не говорят о том, насколько среднее значение близко к «истинному». Для ответа на этот вопрос нужно ввести понятия **доверительной вероятности** и **доверительного интервала**. Для набора данных, состоящего из очень большого числа отдельных значений (когда n велико), среднее значение (иначе называемое математическим ожиданием) равно **среднему по совокупности данных** (μ), а стандартное отклонение равно **стандартному отклонению для совокупности** (σ). Обратите внимание, что греческими буквами принято обозначать параметры, относящиеся к совокупностям данных, а латинскими буквами — обычные параметры. Два названных параметра являются наилучшей оценкой «истинных» значений, поскольку они основаны на большом количестве отдельных измерений, так что влияние случайных ошибок сведено к минимуму. На практике параметры, отвечающие совокупности данных, определяют редко, а простые параметры связаны с большей неопределенностью. Неопределенность простого среднего значения, отличающегося от среднего по совокупности, уменьшается пропорционально квадратному корню из числа значений, составляющих набор данных, т. е. $1/\sqrt{n}$. Таким образом, для снижения неопределенности в два раза необходимо увеличить количество измерений в четыре раза, а для снижения неопределенности в 10 раз количество измерений следует увеличить в 100 раз. Это соотношение еще раз подчеркивает важность правильной оценки допустимой неопределенности при определении экспериментальных результатов до начала проведения самого эксперимента. Современные автоматизированные аналитические приборы позволяют проводить большое количество повторных измерений с высокой скоростью. При изложении результатов всегда полезно сообщать количество измерений, на основании которых рассчитаны среднее значение и стандартное отклонение, поскольку эта информация позволяет оценить качество приводимых данных.

Пример 5 ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Вопрос В одном образце сыворотки крови, взятой натощак у больного диабетом, определяли концентрацию глюкозы 5 раз. Были получены значения 2,3, 2,5, 2,2, 2,6 и 2,5 мМ. Найдите точность анализа для этого набора данных.

Ответ Точность определения обычно выражают либо как стандартное отклонение от средней величины, либо как коэффициент вариации среднего значения. Следовательно, необходимо найти эти статистические параметры.

Среднее значение

$$\bar{x} = \frac{2{,}3 + 2{,}5 + 2{,}2 + 2{,}6 + 2{,}5}{5} = 2{,}42 \text{ мМ}$$

. *Стандартное отклонение*

Для расчета s используем оба уравнения 1.12 и 1.13:

x_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	x_i^2
2,2	–0,22	0,0484	4,84
2,3	– 0,12	0,0144	5,29
2,5	+0,08	0,0064	6,25
2,5	+0,08	0,0064	6,25
2,6	+0,18	0,0324	6,75
$\sum x_i$ 12,1	$\sum$0,00	$\sum$0,1080	$\sum$29,39

По уравнению 1.12 получаем:

$$s = \sqrt{(0{,}108/4)} = 0{,}164 \text{ мМ}$$

По уравнению 1.13 получаем:

$$s = \sqrt{\frac{29{,}39 - (12{,}1)^2/5}{4}} = \sqrt{\frac{29{,}39 - 29{,}28}{4}} = 0{,}166 \text{ мМ}$$

Коэффициент вариации

По уравнению 1.9:

$$CV = \frac{0{,}165 \cdot 100\%}{2{,}42} = 6{,}82\%$$

Обсуждение

В данном случае оценить точность результатов легче с помощью коэффициента вариации; получен неожиданно высокий результат 6,82% для такого типа анализа. Автоматизация метода безусловно снизила бы это значение по крайней мере вдвое. Обратите внимание, что здесь правильно приводить результат расчета с одним знаком после запятой. На практике статистические методы обработки следует применять к гораздо более обширным наборам данных, чем в этом примере.

Доверительные интервалы, доверительная вероятность и коэффициент Стьюдента

Если считать, что среднее значение по совокупности данных является наилучшей оценкой «истинного» значения, возникает вопрос: как связаны определяемое в эксперименте среднее значение со средним по совокупности? Ответ на этот вопрос можно получить на основании понятий доверительного интервала и доверительной вероятности. **Доверительная вероятность** характеризует достоверность результатов в процентах. Ее значение задается самим экспериментатором в зависимости от целей исследования. **Доверительный интервал** математическим об-

разом связывает между собой среднее и среднее по совокупности. Доверительный интервал — это значения вблизи среднего значения, куда с определенной вероятностью (определяемой доверительной вероятностью) попадает среднее по совокупности. Соотношение между двумя средними значениями математическим образом выражается через стандартное отклонение для набора данных, квадратный корень из числа значений в наборе данных и **коэффициент Стьюдента** (t):

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \tag{1.15}$$

где $\bar{x}$ — среднее значение, μ — среднее по совокупности, s — стандартное отклонение, n — число измерений, t — коэффициент Стьюдента. Выражение $s/\sqrt{n}$ известно как **стандартная ошибка среднего** и является мерой того, насколько среднее значение близко к среднему по совокупности.

Доверительная вероятность может устанавливаться на любом уровне, вплоть до 100%. Например, для определенных целей может оказаться приемлемой доверительная вероятность всего лишь 50%. Однако это означает, что в одном случае из двух полученное среднее значение не может служить в качестве оценки среднего по совокупности. Напротив, выбор доверительной вероятности 95% или 99% означает, что соответственно лишь в одном случае из 20 или в одном из ста среднее не отражает среднее по совокупности. На практике в большинстве биохимических исследований доверительная вероятность устанавливается на уровне от 90 до 99%, чаще всего 95%.

Коэффициент Стьюдента t связан с количеством произведенных измерений и используется в ряде статистических методов обработки данных. Значения этого коэффициента для различного числа экспериментальных данных (и, следовательно, для разного числа степеней свободы) при определенной доверительной вероятности можно найти в статистических таблицах. Некоторые значения приведены в табл. 1.9. Обратите внимание, что по мере увеличения числа измерений (и, следовательно, числа степеней свободы) коэффициент Стьюдента уменьшается. При больших n для доверительного интервала 95% значение $t \rightarrow 1{,}96$, и иногда в литературе можно встретить формулу 1.15 именно с этим коэффициентом. Не следует думать, что термин «коэффициент Стьюдента» был выбран специально для «образовательных» целей, т. е. для студентов. На самом деле, Стьюдент — это псевдоним английского математика В. Госсета, который первым в 1908 г. рассчитал значения этого коэффициента, и которому его работодатель запрещал публиковать работы под собственным именем.

Критерии отбора выпадающих значений — Q-тест

Очень часто при проведении количественного анализа встает вопрос: следует ли отбросить то или иное значение из общего набора данных, прежде чем приступить к статистической обработке всего набора. Такие результаты важно уметь идентифицировать, поскольку они оказывают слишком

Таблица 1.9. **Численные значения коэффициента Стьюдента**

Степень свободы	Доверительный интервал, %					
	50	90	95	98	99	99,9
2	0,816	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,765	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,741	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,727	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,718	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,711	1,895	2,365	2,998	3,500	5,408
8	0,706	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,703	1,833	2,262	2,821	3,250	4,798
10	0,700	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
15	0,691	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
20	0,687	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
30	0,683	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646

сильное влияние на среднее значение и на стандартное отклонение. При рассмотрении подобных значений в первую очередь нужно убедиться в том, что они не являются результатом экспериментальной или арифметической ошибки. После подтверждения этого подозрительного значения его значимость следует оценить с помощью **Q-теста** (теста Диксона). Как и другие тесты, которые будут описаны ниже, данный тест основан на **нулевой гипотезе**, утверждающей, что между сравниваемыми данными нет различия. Если доказано, что гипотеза верна, подозрительное значение откидывать нельзя. На основе подозрительного значения рассчитывают экспериментальный коэффициент Q ($Q_{эксп}$), а затем сравнивают его с табличным значением критического коэффициента Q ($Q_{табл}$) для определенной доверительной вероятности и числа экспериментальных данных (табл. 1.10). Если $Q_{эксп} < Q_{табл}$, нулевая гипотеза считается подтвержденной и подозрительное значение отбрасывать не следует, но если $Q_{эксп} > Q_{табл}$, его можно отбросить. Тест основан на том, что при нормальном распределении 95,5% значений лежат в диапазоне двух стандартных отклонений в окрестности среднего. На установление пределов приемлемости или неприемлемости экспериментальных данных влияет выбранная доверительная вероятность. Если доверительная вероятность высокая, диапазон приемлемых значений широкий, и поэтому существует риск учета ошибочных значений. Если же до-

Таблица 1.10. **Значения Q для выбраковки выпадающих значений**

Число измерений	Q (95% доверительная вероятность)
4	0,83
5	0,72
6	0,62
7	0,57
8	0,52

верительная вероятность слишком низкая, диапазон приемлемых данных слишком узкий, и существует риск выбраковки правильных данных. На практике чаще всего используют доверительную вероятность в пределах от 90 до 95%. Приведенные в табл. 1.10 значения $Q_{табл}$ основаны на 95% доверительной вероятности.

Расчет $Q_{эксп}$ осуществляют по уравнению 1.16, в которое входит разность между подозрительным значением и ближайшим к нему приемлемым значением (**пробел**), а также полный **диапазон** экспериментальных значений:

$$Q_{эксп} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} = \frac{\textbf{пробел}}{\textbf{диапазон}} \qquad (1.16)$$

где x_n — исследуемое значение в серии $x_1, x_2, x_3, \ldots, x_{n-1}, x_n$.

Пример 6 ОЦЕНКА ПОГРЕШНОСТИ НАБОРА АНАЛИТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Вопрос Рассчитайте доверительные интервалы при доверительной вероятности 50, 95 и 99% для значений концентраций глюкозы в сыворотке, приведенных в Примере 5.

Ответ Погрешность подобного эксперимента описывается доверительным интервалом, соответствующим диапазону значений, в котором с определенной вероятностью находится «истинное» значение.

Как было рассчитано в Примере 5, $\bar{x}$ = 2,42 мМ, а s = 0,16 мМ. Из табл. 1.9 следует, что при степени свободы, равной четырем (число экспериментальных точек минус единица), и доверительной вероятности 50% t = 0,741, так что доверительный интервал для совокупности значений определяется следующим образом:

$$\text{Доверительный интервал} = 2{,}42 \pm \frac{0{,}741 \cdot 0{,}16}{\sqrt{5}}$$
$$= 2{,}42 \pm 0{,}05 \text{ мМ}$$

Для доверительной вероятности 95% и того же числа степеней свободы t = 2,776, следовательно:

$$\text{Доверительный интервал} = 2{,}42 \pm \frac{2{,}776 \cdot 0{,}16}{\sqrt{5}}$$
$$= 2{,}42 \pm 0{,}20 \text{ мМ}$$

И, наконец, для доверительной вероятности 99% и того же числа степеней свободы t = 4,604, следовательно:

$$\text{Доверительный интервал} = 2{,}42 \pm \frac{4{,}604 \cdot 0{,}16}{\sqrt{5}}$$
$$= 2{,}42 \pm 0{,}33 \text{ мМ}$$

Обсуждение

Расчет показывает, что с вероятностью 50% среднее по совокупности лежит в диапазоне от 2,37 до 2,47 мМ, с вероятностью 95% — в диапазоне от 2,22 до 2,62 мМ и с вероятностью 99% — в диапазоне от 2,09 до 2,75 мМ. Обратите внимание, что по мере увеличения доверительной вероятности диапазон значений, в котором может находиться среднее

по совокупности, также возрастает. Вы можете сами рассчитать, что, если бы стандартное отклонение и среднее значение были определены на основании 20 экспериментальных точек (т. е. при четырехкратном увеличении числа измерений), диапазон значений среднего по совокупности при доверительной вероятности 50 и 95% сузился бы соответственно до 2,42 ± 0,02 мМ и 2,42 ± 0,07 мМ. Это еще раз подчеркивает преимущество большого количества экспериментальных точек. В то же время всегда следует учитывать, какая погрешность приемлема в том или ином конкретном эксперименте.

Пример 7 **УСТАНОВЛЕНИЕ ВЫПАДАЮЩИХ ЗНАЧЕНИЙ**

Вопрос Если бы в серию измерений, описанных в примере 6, входило бы еще одно значение 3,0 мМ, следовало бы его рассматривать как выпадающее значение при доверительной вероятности 95%?

Ответ В соответствии с уравнением 1.6:

$$Q_{эксп} = \frac{3{,}0 - 2{,}6}{3{,}0 - 2{,}2} = \frac{0{,}4}{0{,}8} = 0{,}5$$

Из табл. 1.10 для шести экспериментальных точек находим, что $Q_{табл} = 0{,}62$. Поскольку $Q_{эксп} < Q_{табл}$, значение 3,0 мМ отбрасывать не следует, так как существует 95% вероятность, что оно принадлежит к той же серии данных, что и остальные пять значений. Можно показать, что для дополнительного значения 3,3 мМ $Q_{эксп} = 0{,}64$, т. е. это значение надо отбросить как ошибочное.

1.6.5 Оценка применимости аналитического метода — использование *t*-тестов

Для ответа на вопрос, одинаковы ли средние значения в двух сериях данных, можно использовать *t*-тесты. Два набора данных должны соответствовать нормальному распределению и иметь одинаковую дисперсию. Существует три варианта *t*-тестов:

- *Непарный t-тест* используется для выяснения, отличаются ли между собой средние значения двух наборов данных.
- *Парный t-тест* используется для выяснения, отличаются ли между собой средние значения двух наборов данных при определенной парности значений в двух совокупностях (каждому значению в одном наборе соответствует значение в другом наборе).
- *Одновыборочный t-тест* используется для выяснения, равно ли среднее значение набора данных определенной величине.

Каждый из этих тестов основан на нулевой гипотезе, постулирующей отсутствие различий между средними в двух наборах данных. Тесты определяют справедливость этой гипотезы. Притягательность данных тестов состоит в простоте их выполнения и интерпретации.

Анализ стандартного раствора — одновыборочный *t*-тест

Как только экспериментатор остановил свой выбор на определенном биохимическом методе анализа, он должен попробовать его в конкретных лабораторных условиях. Этот этап подразумевает многократное измерение **стандартного раствора** анализируемого вещества с целью расчета среднего значения и стандартного отклонения в серии полученных данных. А далее встает вопрос: соответствует ли полученное среднее значение (в пределах ошибки эксперимента) известному значению для стандартного раствора этого вещества? Для ответа на этот вопрос применим *t*-тест.

Результаты измерения стандартного раствора используют для расчетов среднего значения и стандартного отклонения, а на их основе по уравнению 1.17 рассчитывают коэффициент Стьюдента ($t_{\text{расч}}$). Это значение сравнивают с известным табличным значением ($t_{\text{табл}}$) для определенного числа степеней свободы и требуемой доверительной вероятности (табл. 1.10).

$$t_{\text{расч}} = \frac{(\text{известное значение} - \bar{x})\sqrt{n}}{s} \qquad (1.17)$$

Критические табличные значения *t* разграничивают определенные уровни вероятности. Если $t_{\text{расч}} > t_{\text{табл}}$, считается, что полученные данные относятся к другой экспериментальной серии, чем известный стандартный раствор при выбранной доверительной вероятности. Это означает, что полученные результаты не согласуются со значением для стандартного раствора, и, следовательно, в них содержится ошибка. До разрешения этой проблемы не имеет смысла использовать выбранный метод для анализа неизвестного образца.

Сравнение двух аналитических методов — непарный *t*-тест

При осуществлении количественного биохимического анализа часто возникает необходимость сравнить два альтернативных метода, чтобы убедиться в том, что они дают одинаковый результат (в пределах ошибки эксперимента). Для этой цели тестовый образец анализируют с помощью каждого из этих методов в нескольких повторностях. Затем для каждого набора данных определяют среднее и стандартное отклонение и применяют *t*-тест Стьюдента. В данном случае *t*-тест определяет, насколько перекрываются два набора данных: чем меньше расчетное значение $t_{\text{расч}}$, тем больше область совпадающих значений.

При использовании табличных критических значений *t* следует учесть, что число степеней свободы равно сумме значений в двух наборах ($n_1 + n_2$) минус 2. Чем больше число степеней свободы, тем меньшего значения $t_{\text{расч}}$ достаточно для превышения критического значения при заданной доверительной вероятности. Способ расчета $t_{\text{расч}}$ зависит от того, совпадают ли стандартные отклонения для двух наборов данных. Это обычно легко определить простым сравнением. Однако если возникают сомнения, следует применить ***F*-тест** (назван по имени предложившего его ученого Фишера). *F*-Тест основан на нулевой гипотезе, постулирующей отсутствие различий в дисперсиях двух наборов данных. В соответствии с этим тестом рассчитывают *F* ($F_{\text{расч}}$) — отношение большей из двух дисперсий к меньшей.

Затем это значение сравнивают с критическим табличным значением $F_{табл}$ (табл. 1.11). Если расчетное значение меньше табличного, нулевая гипотеза считается доказанной, и два стандартных отклонения принимаются равными. Если дисперсии имеют близкие значения, для получения $t_{расч}$ для двух наборов данных используют уравнения 1.18 и 1.19. Если это не так, применяют уравнения 1.20 и 1.21.

$$t_{расч} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{общ}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \qquad (1.18)$$

$$S_{общ} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \qquad (1.19)$$

$$t_{расч} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}} \qquad (1.20)$$

$$\text{Число степеней свободы} = \left\{ \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{[(s_1^2/n_1)^2/(n_1+1)] + [(s_2^2/n_2)^2/(n_2+1)]} \right\} - 2 \qquad (1.21)$$

Здесь $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ — рассчитанные средние значения для двух наборов данных, s_1^2 и s_2^2 — стандартные отклонения для двух наборов данных, а n_1 и n_2 — число экспериментальных точек в каждом наборе.

На первый взгляд приведенные уравнения могут показаться довольно устрашающими, но на самом деле они всего лишь связывают между собой среднее значение ($\bar{x}$), дисперсию (s^2) и число измерений (n_1), а производимые математические операции достаточно просты.

Пример 8 ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ МЕТОДА АНАЛИЗА

Вопрос Известно, что стандартный раствор глюкозы имеет концентрацию 5,05 мМ. Образцы этого стандартного раствора анализировали с помощью глюкозооксидазного метода (см. разд. 15.2.5), рутинного метода в данной лаборатории. Концентрацию глюкозы в образце определяли по калибровочной кривой, построенной с помощью методов наименьших квадратов. Были получены следующие значения: 5,12, 4,96, 5,21, 5,18 и 5,26 мМ. Соответствует ли полученный набор данных известной концентрации глюкозы в пределах ошибки метода?

Ответ Прежде всего, необходимо рассчитать среднее значение и стандартное отклонение, а затем найти коэффициент Стьюдента.

Используя уравнения 1.12 и 1.13, получаем $\bar{x}$ = 5,15 мМ и s = ± 0,1 мМ. Для расчета $t_{расч}$ возьмем уравнение 1.17:

$$t_{расч} = \frac{(5{,}05 - 5{,}15)\sqrt{5}}{0{,}1} = 2{,}236$$

Обратите внимание, что отрицательный знак разности между двумя средними значениями здесь не учитывается. Из табл. 1.9 для доверительной вероятности 95% и четырех степеней свободы находим, что $t_{табл}$ = 2,776. Поскольку расчетное значение меньше критического табличного значения, делаем вывод, что определенное нами среднее значение согласуется с известным значением. Используя уравнение 1.14, можно определить, что коэффициент вариации для измеренных значений составляет 1,96%.

Пример 9 СРАВНЕНИЕ ДВУХ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОВТОРНОГО АНАЛИЗА ОДНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

Вопрос Возможности глюкозооксидазного и гексокиназного методов определения концентрации глюкозы (см. разд. 15.2.5) сравнивали с помощью анализа образца сыворотки крови, взятой у пациента натощак. Были получены следующие результаты: с глюкозооксидазой — 2,3, 2,5, 2,2, 2,6 и 2,5 мМ, с гексокиназой — 2,1, 2,7, 2,4, 2,4 и 2,2 мМ. Определите, одинаковый ли результат дают два метода при доверительной вероятности 95%.

Ответ Используя стандартные формулы 1.12 и 1.14, можно рассчитать средние значения, стандартные отклонения и дисперсию для каждого набора данных.

Глюкозооксидазный метод:

$\bar{x}$ = 2,42 мМ, s = 0,16 мМ, s^2 = 0,026 мМ^2

Гексокиназный метод:

$\bar{x}$= 2,36 мМ, s = 0,23 мМ, s^2 = 0,053 мМ^2

Теперь к двум значениям дисперсии можно применить F-тест, чтобы определить, можно ли считать их одинаковыми:

$$F_{\text{расч}} = \frac{0{,}053}{0{,}026} = 2{,}04$$

Для двух наборов данных с числом степеней свободы четыре и при доверительной вероятности 95% $F_{\text{табл}}$ = 6,39 (табл. 1.11).
Поскольку расчетное значение F меньше критического табличного значения, можно считать, что две дисперсии не различаются. Следовательно, применяем формулы 1.18 и 1.19:

$$S_{\text{общ}} = \sqrt{\frac{0{,}16 \cdot 4 + 0{,}23 \cdot 4}{8}} = \sqrt{\frac{0{,}64 + 0{,}92}{8}} = \sqrt{0{,}195} = 0{,}442$$

$$t_{\text{расч}} = \frac{2{,}42 - 2{,}36}{0{,}442}\sqrt{\frac{5 \cdot 5}{10}} = (0{,}06/0{,}442)1{,}58 = 0{,}21$$

По табл. 1.9 находим, что для доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы восемь $t_{\text{табл}}$ = 2,306. Поскольку расчетное значение коэффициента Стьюдента меньше табличного, два набора данных считаем совпадающими и делаем вывод, что при доверительной вероятности 95% два метода дают одинаковый результат.

Сравнение двух альтернативных методов анализа — парный t-тест

В одном из вариантов описанного выше способа сравнения двух аналитических методов на основании анализа одного стандартного образца серию анализируемых образцов промеряют по одному разу с помощью двух аналитических методов. В данном случае повторных измерений образцов не делают. К разности значений, полученных двумя методами для каждого

Таблица 1.11. **Критические значения *F* при доверительной вероятности 95%**

Число степеней свободы для S_2	Число степеней свободы для S_1							
	2	3	4	6	10	15	30	∞
2	19,0	19,2	19,2	19,3	19,4	19,4	19,5	19,5
3	9,55	9,28	9,12	8,94	8,79	8,70	8,62	8,53
4	6,94	6,59	6,39	6,16	5,96	5,86	5,75	5,63
5	5,79	5,41	5,19	4,95	4,74	4,62	4,50	4,36
6	5,14	4,76	4,53	4,28	4,06	3,94	3,81	3,67
7	4,74	4,35	4,12	3,87	3,64	3,51	3,38	3,23
8	4,46	4,07	3,84	3,58	3,35	3,22	3,08	2,93
9	4,26	3,86	3,63	3,37	3,14	3,01	2,86	2,71
10	4,10	3,71	3,48	3,22	2,98	2,84	2,70	2,54
15	3,68	3,29	3,06	2,79	2,54	2,40	2,25	2,07
20	3,49	2,10	2,87	2,60	2,35	2,20	2,04	1,84
30	3,32	2,92	2,69	2,42	2,16	2,01	1,84	1,62
∞	3,00	2,60	2,37	2,10	1,83	1,67	1,46	1,00

образца, применяют *t*-тест. Это пример использования парного *t*-теста. В данном случае $t_{\text{расч}}$ определяют по формуле 1.22:

$$t_{\text{расч}} = \frac{\bar{d}}{s_{\text{d}}}\sqrt{n} \qquad (1.22)$$

$$s_{\text{d}} = \sqrt{\frac{\sum(d_{\text{i}} - \bar{d})^2}{n-1}} \qquad (1.23)$$

где d_{i} — разность между парными результатами, $\bar{d}$ — средняя разность между парными результатами, n — число парных результатов, а s_{d} — стандартное отклонение разностей между парными результатами.

1.6.6 Методы построения градуировочного графика

При проведении количественного биохимического анализа часто пользуются градуировочным графиком, построенным путем определения известных количеств анализируемого вещества по выбранной методике. **Градуировочный график** отражает зависимость измеряемых параметров (поглощение, площадь пика и др.) от соответствующих известных количеств стандартного вещества. Для построения градуировочного графика необходимо приготовить стандартный раствор анализируемого вещества и сделать несколько разведений этого раствора. Принято каждое измерение повторять несколько раз и использовать средние значения ± SD. Обычно график, построенный по экспериментальным точкам, отклоняется от линейности. Не рекомендуется проводить по точкам прямую «на глаз», поскольку такой подход слишком субъективен и не воспроизводится. Чаще всего для проведения прямой по точкам пользуются **регрессионным анализом (методом наименьших квадратов)**, однако следует

Пример 10 СРАВНЕНИЕ ДВУХ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ С ПОМОЩЬЮ НЕСКОЛЬКИХ ОБРАЗЦОВ

Вопрос Образцы сыворотки крови, взятой у пациента натощак, анализировали с помощью глюкозооксидазного и гексокиназного методов. Были получены следующие результаты:

Глюкозооксидазный метод, мМ	Гексокиназный метод, мМ	Разность d_i	Разность минус средняя разность	(Разность минус средняя разность)^2
1,1	0,9	0,2	0,08	0,0064
2,0	2,1	–0,1	–0,22	0,0484
3,2	2,9	0,3	0,18	0,0324
3,7	3,5	0,2	0,08	0,0064
5,1	4,8	0,3	0,18	0,0324
8,6	8,7	–0,1	–0,22	0,0484
10,4	10,6	–0,2	–0,32	0,1024
15,2	14,9	0,3	0,18	0,0324
18,7	18,7	0,0	–0,12	0,0144
25,3	25,0	0,3	0,18	0,0324
		Среднее ($\bar{d}$) 0,12		

Совпадают ли результаты двух методов при доверительной вероятности 95%?

Ответ Прежде чем отвечать на вопрос, обратим внимание, что 10 проанализированных образцов были выбраны так, чтобы покрывать весь диапазон измерений для данных методов. Чтобы понять, можно ли считать одинаковыми результаты методов при заданной доверительной вероятности, необходимо определить $t_{расч}$ и сравнить их с $t_{табл}$ для числа степеней свободы, равного 9. Сначала по уравнению 1.23 рассчитаем s_d. Необходимые данные возьмем из вышеприведенной таблицы.

$$s_d = \sqrt{[\sum(d_i - \bar{d})^2]/(n-1)} = \sqrt{(0{,}356/9)} = 0{,}199$$

По уравнению 1.22

$$t_{расч} = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{s_d} = (0{,}12\sqrt{10})/0{,}199 = 1{,}907$$

Из табл. 1.9 для доверительной вероятности 95% и числа степеней свободы 9 находим, что $t_{табл} = 2{,}262$. Поскольку расчетное значение меньше табличного, можно считать, что при доверительной вероятности 95% два метода дают одинаковый результат. Внимательно рассматривая исходные данные, можно заметить, что глюкозооксидазный метод дал завышенные результаты для семи образцов из 10.

Альтернативным способом сравнения двух методов является представление результатов в виде графика x/y с привлечением регрессионного анализа. Если переменная y соответствует результатам, полученным с помощью глюкозооксидазы, получим:

угол наклона прямой	1,0016
точка пересечения прямой с осью y	0,1057
коэффициент корреляции r	0,9997

Угол наклона прямой очень близок к 1, это подтверждает сходство двух наборов данных, а наличие небольшого положительного отрезка, отсекаемого на оси y, говорит о том, что глюкозооксидазный метод дает завышенные результаты.

помнить, что наклон кривой и точка пересечения с осью координат также характеризуется точностью, которая определяется экспериментальной ошибкой, заложенной в значения x и y.

Математические основы метода наименьших квадратов здесь рассматриваться не будут, хотя принцип метода простой. Если между двумя переменными, такими как концентрация или количество анализируемого вещества и величина измеряемого параметра, наблюдается линейная зависимость, «оптимальная» прямая, описывающая эту зависимость, задается формулой $y = mx + c$, где x и y — две переменные, m — угол наклона прямой, а c — отрезок, отсекаемый на оси y. Во-первых, предполагается (и это справедливо в большинстве случаев), что ошибка в определении y много больше ошибки в определении x (это не означает, что в определении x вообще нет ошибки). Во-вторых, предполагается, что неопределенности (стандартные отклонения) всех значений y имеют один порядок величины. Метод удовлетворяет двум критериям. Первый состоит в том, что прямая должна проходить через точку с координатами $\bar{x}$ ($\bar{x}$, $\bar{y}$), где $\bar{x}$ и $\bar{y}$ — средние значения x и y соответственно. В соответствии со вторым критерием угол наклона прямой (m) основан на расчете оптимальных значений m и c, при которых наблюдаются минимальные отклонения между отдельными экспериментальными значениями y и соответствующими значениями на «оптимальной» прямой. Поскольку отклонения могут быть как положительными, так и отрицательными (экспериментальные точки могут лежать как выше, так и ниже «оптимальной» прямой), в методе используют квадраты отклонений экспериментальных точек от «оптимальной» прямой (все это положительные числа), их суммирование и выбор таких значений m и c, для которых наблюдается наименьшее отклонение. Конечный результат регрессионного анализа — уравнение «оптимальной» прямой, соответствующей полученным экспериментальным точкам. По уравнению строят градуировочную кривую, которую, в свою очередь, используют для определения концентрации анализируемого вещества. Современные калькуляторы умеют производить регрессионный анализ и рассчитывать стандартные отклонения для m и c, а также определять «адекватность» данных, которая выражается **коэффициентом корреляции** r или **коэффициентом детерминации** r^2. Чем строже корреляция между двумя переменными, тем ближе значение r подходит к +1 или –1. Значения r приводят с точностью до четырех знаков после запятой; в хороших корреляциях r обычно превосходит 0,99. Если получены значения 0,98 и ниже, к таким данным следует относиться внимательнее, поскольку это означает наличие определенных отклонений от линейности.

При построении градуировочного графика следует помнить о некоторых важных факторах.

- *Выбор диапазона значений.* Диапазон количества (концентрации) стандартного вещества должен покрывать предполагаемый диапазон количества (концентрации) анализируемого вещества, причем экспериментальные точки должны быть равномерно распределены. Из-

мерения анализируемого образца за пределами этого диапазона некорректны, поскольку нет доказательств, что полученное с помощью регрессионного анализа уравнение справедливо и там. Хорошо бы установить диапазон измерений и предел обнаружения для выбранного метода. Рекомендуется определить также точность (стандартное отклонение) метода в разных участках диапазона измерений и отразить это на градуировочном графике. Подобный график называют **профилем точности**. Обычно точность метода снижается (стандартное отклонение возрастает) на концах изучаемого диапазона, и это определенным образом влияет на возможности его использования. Например, определение тестостерона в сыворотке крови мужчин и женщин проводится различными методами, поскольку этот показатель для мужчин и женщин нельзя определять с приемлемой точностью по одному и тому же градуировочному графику (содержание тестостерона в норме для мужчин 10–30 нМ, для женщин < 3 нМ).

- *Использование холостого образца*, т. е. образца, про который известно, что он не содержит анализируемого вещества. По возможности использование холостого образца следует предусматривать в любом анализе (к сожалению, это не всегда возможно, например, при анализе сыворотки крови). Результат такого измерения следует вычитать из результатов всех остальных измерений. В двулучевых спектрофотометрах эту процедуру осуществляется автоматически, если холостой образец помещают в кювету сравнения.
- *Форма градуировочного графика*. Не следует думать, что все градуировочные графики обязательно линейные. Это может быть кривая, описываемая, например, квадратным уравнением $y = ax^2 + bx + c$, где a, b и c — константы, либо логарифмическая зависимость.
- *Повторная градуировка*. Строить новый градуировочный график следует регулярно. Расчеты, основанные на старых градуировочных графиках, неприемлемы.

1.6.7 Внутренние стандарты

Дополнительным способом контроля небольших изменений хода градуировочной кривой во времени и, соответственно, концентрации анализируемого вещества в образце является использование **внутреннего стандарта**. Идеальным внутренним стандартом может быть вещество, структура и физические свойства которого максимально близки таковым у анализируемого вещества и которое при выбранном методе анализа ведет себя аналогичным образом. Количественный результат измерения этого внутреннего стандарта может отличаться от результата измерения анализируемого вещества, важно, чтобы соотношение двух результатов оставалось постоянным. Чаще всего в качестве внутренних стандартов используют структурные изомеры анализируемых веществ.

Известное количество стандарта добавляют к каждой пробе анализируемого образца и измеряют в той же серии измерений, что и сами образцы. На основании показаний для стандарта и диапазона концентраций анали-

зируемого вещества строят градуировочную кривую, которая представляет собой зависимость относительных показаний для анализируемого вещества от его концентрации.

Внутренние стандарты часто применяют при проведении жидкостной и газо-жидкостной хроматографии, поскольку они помогают ориентироваться при незначительных изменениях во времени потока жидкости или газа в колонке. В данном случае важно, чтобы внутренний стандарт выходил с колонки рядом с анализируемым веществом (но, конечно, хорошо от него отделялся).

Если выбранный метод анализа подразумевает предварительный отбор пробы, например твердофазную экстракцию, необходимо добавлять известное количество внутреннего стандарта к анализируемому образцу на возможно более ранних стадиях, поскольку это позволяет контролировать процесс, начиная с предварительных стадий. Любые потери анализируемого вещества при его выделении из анализируемого образца сопровождаются такими же потерями внутреннего стандарта, поэтому получаемый в конечном итоге относительный результат измерения двух веществ истинным образом отражает содержание анализируемого вещества.

1.7 ОСНОВЫ КЛИНИЧЕСКОГО БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

1.7.1 Анализ жидкостей организма с целью диагностики, прогнозирования и мониторинга

Многие заболевания человека могут возникать либо в результате аномального метаболизма, либо из-за нарушения нормальной клеточной активности. В обоих случаях имеет место характерное и значительное изменение биохимического профиля физиологических жидкостей организма. Количественный биохимический анализ большого числа разнообразных веществ в жидкостях и тканях организма очень помогает при диагностике заболевания и в дальнейшей терапии. В данном разделе мы остановимся на биохимических и химико-аналитических основах клинических методов анализа и их связи с общими принципами количественного биохимического анализа, которым был посвящен разд. 1.6.

В таких жидкостях организма, как кровь, спинномозговая жидкость и моча, и у здорового, и у больного человека содержится большое количество неорганических ионов и органических молекул. Некоторые из этих химических веществ реализуют свои биологические функции в жидких средах организма, но для большинства из них это не так. Наличие этой последней группы веществ в жидкой среде связано с тем, что как действие нормальных секреторных механизмов, так и происходящий в определенные моменты синтез и распад отдельных клеток и органелл в большинстве органов приводят к высвобождению компонентов клетки (главным образом тех, что локализованы в цитоплазме) в межклеточную жидкость, а затем в кровь. В конечном итоге они попадают к главным органам выведения — печени, почкам и легким, в результате чего эти компоненты клеток и продукты их

разложения выводятся из организма с фекалиями, мочой или выдыхаемым воздухом. Примерами клеточных компонентов, относящихся к данной категории, могут служить ферменты, гормоны, промежуточные метаболиты, а также небольшие неорганические и органические ионы.

Концентрация, количество или активность конкретного клеточного компонента, определяемая в жидкостях здорового организма в некоторый момент времени, зависит от ряда факторов, среди которых следует выделить следующие: химические свойства клеточного компонента, эндогенные, индивидуальные и экзогенные (внешние) факторы.

- *Химические свойства клеточного компонента*. Некоторые молекулы по своей природе являются нестабильными вне нормального клеточного окружения. Например, некоторые ферменты стабильны только в присутствии своих субстратов и(или) коферментов, которые во внеклеточной жидкости могут находиться в очень низкой концентрации или отсутствовать вовсе. Молекулы, способные выступать в качестве субстратов катаболических ферментов, обнаруживаемых во внеклеточных жидкостях, в частности в крови, также подвергаются быстрому разложению. Поэтому клеточные компоненты, относящиеся к этим двум группам веществ, имеют короткое время полураспада вне клетки и в жидкостях организма присутствуют лишь в низких концентрациях.
- *Эндогенные факторы*: возраст, пол, масса тела, беременность. Например:
  а) концентрация холестерина в сыворотке у мужчин выше, чем у женщин в период до менопаузы, но после менопаузы различие уменьшается;
  б) активность щелочной фосфатазы в сыворотке у детей выше, чем у взрослых, кроме того, она повышается у женщин во время беременности;
  в) у полных людей концентрация инсулина и триглицеридов в сыворотке выше, чем у худых людей;
  г) концентрация сывороточного креатинина (продукт метаболизма креатина, важный для мышечной активности) выше у индивидов с большой мышечной массой;
  д) концентрации половых гормонов различаются у мужчин и у женщин и изменяются с возрастом.
- *Экзогенные факторы*: время, физическая нагрузка, прием пищи, стресс. Некоторые гормоны секретируются по-разному в разное время суток. Кортизол, в меньшей степени тиреотропный гормон (ТТГ) и пролактин активнее секретируются днем, нежели ночью. Так, максимум содержания в крови кортизола приходится на 9 ч утра, а минимум наблюдается между 11 ч вечера и 5 ч утра. Секреция женских половых гормонов зависит от фазы менструального цикла, а секреция 25-гидроксихолекальциферола (витамина D_3) изменяется в течение года, причем максимум приходится на конец лета. Концентрация в крови глюкозы, триглицеридов и инсулина возрастает практически сразу после приема пищи. Стресс, в том числе и вызванный взятием у пациента крови, может стимулировать выработку ряда гормонов и нейромедаторов, таких как пролактин, кортизол, адренокортикотропного гормона (АКТГ) и адреналина.

Влияние перечисленных факторов на степень высвобождения компонентов клетки во внеклеточную жидкость неизбежно приводит к тому, что даже у здоровых людей результаты анализа любого важного для диагностики вещества могут быть подвержены определенной **внутрииндивидуальной вариабельности** (для одного и того же индивида результаты анализов, сделанных в разное время, различаются) и, конечно, еще более выраженной **межиндивидуальной вариабельности** (различные результаты анализов у разных индивидов). Важнее то, что наличие заболевания приводит к еще большей внутри- и межиндивидуальной вариабельности.

При многих клинических состояниях происходит нарушение целостности клеток, находящихся в поврежденных органах. Клетки могут стать «менее герметичными», а в более тяжелых случаях действительно погибнуть (**некроз**) и «выпустить» содержимое в окружающую внеклеточную жидкость. В огромном большинстве случаев степень высвобождения определенного компонента из клетки в окружающее пространство (по сравнению с нормой) отражает степень поражения органа, и именно на этой взаимосвязи основан диагностический принцип клинических биохимических анализов. Если причина повреждения органа действует длительное время и происходящие изменения необратимы (т. е. орган не способен к самовосстановлению), как, например, при циррозе печени, количество претерпевающих некроз клеток будет постепенно сокращаться, так что в конечном итоге высвобождение клеточных компонентов также будет уменьшаться, несмотря на то, что клетки органа продолжают повреждаться. В таких случаях измеряемые концентрации веществ уже не отражают реальной степени поражения органа.

Существует четыре основных направления, по которым клинический биохимический анализ может дополнять предварительный диагноз, основанный на истории болезни и клиническом обследовании пациента:

- *Подтверждение или отклонение предварительного диагноза* путем обнаружения и количественного определения аномальных количеств веществ, связанных с данным заболеванием. Например, концентрация миоглобина, тропонина I (в сердечной мышце), креатинкиназы (особенно МВ-изоформы, см. разд. 1.7.3) и аспартаттрансаминазы в сыворотке крови возрастает при инфаркте миокарда, который сопровождается гибелью клеток в некоторых тканях сердца. Тесты могут помочь и в дифференциальной диагностике, например, для выявления различных форм желтухи (пожелтения кожи под действием желтого пигмента билирубина — метаболита распада гема) определяют активности аланинтрансаминазы и аспартаттрансаминазы и проверяют, связан ли билирубин с β-глюкуроновой кислотой или нет.
- *Мониторинг состояния пациента после проведения лечения*. Регулярное проведение анализов позволяет определить момент возвращения анализируемых показателей к норме. Например, после перенесенного инфаркта миокарда повышенные активности ферментов в сыворотке крови обычно снижаются до нормы в течение 10 дней (разд. 1.7.3, рис. 1.6). Аналогичным образом, мониторинг в крови опухолевых мар-

керов, таких как CA125, помогает следить за ходом выздоровления или выявить рецидив заболевания при раке яичников.

- *Выявление скрытой формы заболевания у внешне здоровых людей* в результате обнаружения повышенного уровня определенных веществ, например глюкозы в сыворотке крови при диабете или иммунореактивного трипсина при муковисцидозе. Сегодня уже повсеместно принято использовать показатель уровня холестерина в крови для оценки степени риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Это особенно важно учитывать у пациентов с наследственной предрасположенностью. Британская ассоциация гиперлипидемии установила верхний допустимый предел сывороточного холестерина на уровне 5,2 мМ. Врачи рекомендуют своим пациентам соблюдать здоровую диету с малым содержанием жиров и регулярные физические упражнения. При уровне холестерина выше 6,6 мМ следует назначать «статиновые» препараты, снижающие уровень холестерина.
- *Обнаружение побочных эффектов лечения*. Например, если пациент получал гепатотоксический препарат, наличие нежелательных побочных эффектов на печень можно определить путем регулярного проведения анализов. Продолжением этого направления является **терапевтический лекарственный мониторинг**, при котором в организме пациентов, принимающих препараты типа фенитоина или карбамазепина (назначаемые при лечении эпилепсии) с низким терапевтическим индексом (отношение дозы, вызывающей токсический эффект, к дозе, оказывающей терапевтическое действие), регулярно проверяют уровень этих препаратов и следят за функциями печени с целью подтверждения эффективности и безопасности лечения.

Нормальный диапазон

Для рутинного использования биохимического теста в клинической диагностике с целью определения какого-либо вещества необходимо, чтобы этот тест обладал определенными характеристиками (разд. 1.6.2), в частности, **специфичностью** и **чувствительностью**. Чувствительность отражает долю пациентов с определенным заболеванием, которые были идентифицированы с помощью данного теста. Специфичность отражает долю пациентов, не страдающих этим заболеванием, что было корректно подтверждено с помощью данного теста. Математическим образом сказанное выше можно выразить так:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{истинный положительный тест} \cdot 100\%}{\text{общее число больных}}$$

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{истинный отрицательный тест} \cdot 100\%}{\text{общее число здоровых пациентов}}$$

В идеале для конкретного теста оба эти показателя должны быть равны 100%, но это не всегда выполнимо. Чаще всего проблемы возникают в тех случаях, когда изменение количества анализируемого вещества в образце невелико по сравнению с нормальным диапазоном значений у здоровых людей. Оба показателя отражают рабочие характеристики метода, но так-

же важно иметь возможность рассчитать вероятность того, что при наличии положительного результата теста у пациента действительно имеется данное заболевание. Для этого служит такая характеристика метода, как его **предсказательная способность**. Она отражает долю пациентов с положительным тестом, действительно страдающих данным заболеванием:

$$\text{Положительная предсказательная способность} = \frac{\text{число действительно больных пациентов}}{\text{число положительных тестов}}$$

$$\text{Отрицательная предсказательная способность} = \frac{\text{число здоровых пациентов}}{\text{число отрицательных тестов}}$$

Концепцию предсказательной способности метода можно проиллюстрировать на примерах — проведение внутриутробного скрининга синдрома Дауна и дефекта нервной трубки плода. Предварительный тест на наличие подобных отклонений у плода состоит в определении в крови матери содержания α-фетопротеина (АФП), человеческого хориогонадотропина (чХГ) и неконъюгированного эстриола (НЭ). При наличии дефектов у плода показатель чХГ повышен, а показатели АФП и НЭ понижены по сравнению со значениями при нормальном развитии плода. Результаты теста обсчитывают в соответствии со сроком беременности и возрастом матери и определяют риск этих дефектов. Если риск высокий, проводят дополнительные тесты, в том числе анализ клеток плода, отбираемых из амниотической жидкости с помощью специальной иглы (**амниоцентез**). Подобная процедура позволяет определять синдром Дауна в двух случаях из трех (67%) и дефект нервной трубки в четырех случаях из пяти (80%). Хотя рабочие характеристики данного метода не 100%, они достаточно высокие, чтобы его применение было оправдано.

Правильная интерпретация результатов биохимического анализа в значительной степени зависит от использования правильного выбора нормального диапазона значений, с которым полученные данные предстоит сравнить. Как обсуждалось выше, большинство веществ, имеющих диагностическую значимость, подвержены значительной внутри- и межиндивидуальной вариабельности. Кроме того, выбранный для определения конкретного вещества метод анализа характеризуется точностью, погрешностью и селективностью, что не может не влиять на результаты анализа. Ввиду этих биологических и аналитических факторов каждая лаборатория должна установить свой собственный нормальный диапазон значений для каждого анализируемого вещества на основании тестирования многих (сотен) здоровых индивидов. Привлечение добровольцев для определения нормального диапазона значений сопряжено с серьезными практическими и этическими проблемами, поскольку при определении «нормы» для получения необходимого биологического материала используются инвазивные методы. Наибольшие затруднения связаны с определением нормального диапазона показателей у детей, особенно новорожденных.

Для исследуемой популяции нормальный диапазон часто соответствует среднему значению измеряемого показателя ±1,96 × стандартное отклонение. В этот диапазон попадает 95% населения. Большинство показателей в норме подчиняется нормальному распределению индивидуальных значений, но иногда экспериментальные данные ложатся несимметрично, чаще всего сдвинуты в область высоких значений. В подобных случаях для установления нормального диапазона принято строить логарифмическую зависимость, но даже при этом в нормальный диапазон могут попадать значения, обнаруженные у больных. Показатели биохимического анализа в норме представлены в табл. 1.12.

Таблица 1.12. **Показатели биохимического анализа в норме**

Анализируемое вещество	Норма	Комментарии
Натрий	133–145 мМ	
Калий	3,5–5,0 мМ	Значения возрастают при гемолизе или продолжительном контакте с клетками
Мочевина	3,5–6,5 мМ	Значения зависят от пола и возраста, например у мужчин старше 70 лет этот показатель может достигать 12,1 мМ
Креатинин	75–115 мМ (муж.) 58–93 мМ (жен.)	Синтез креатинина (метаболит креатина) связан с мышечной массой, а также отражает качество работы почек. В старшем возрасте у обоих полов значения возрастают на 5–20%
Аспартаттрансаминаза (АСТ)	< 40 МЕд/дм^3	В перинатальный период значения достигают 80 МЕд/дм^3 и снижаются до нормальных значений для взрослых около 18 лет. Значения до 60 МЕд/дм^3 иногда встречаются у женщин старше 50 лет. При гемолизе результаты завышены
Аланинтрансаминаза (АЛТ)	< 40 МЕд/дм^3 (до 60 лет)	Более высокие значения встречаются у мужчин
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	< 122 МЕд/дм^3 (взрослые) < 455 МЕд/дм^3 (дети младше 12 лет)	Двух- и трехкратное повышение уровня может наблюдаться в подростковом периоде, чуть повышенные значения встречаются у пожилых людей и женщин во время беременности
Холестерин	Норма не определена; рекомендованный показатель < 5,2 мМ	Показатели уровня холестерина у взрослого населения не подчиняется нормальному распределению (растянуто, причем низких значений сравнительно мало). У большинства людей этот показатель < 10 мМ, с довольно значительным «хвостом» вплоть до 20 мМ. Мужчины часто имеют более высокие значения, чем женщины того же возраста, но у женщин после менопаузы значения приближаются к таковым для мужчин. Обычно этот показатель увеличивается с возрастом

1.7.2 Работа в клинической биохимической лаборатории

В Великобритании в типичном госпитале общего профиля клиническая биохимическая лаборатория обслуживает ежегодно около 400 000 человек. В таком госпитале обычно работают около 60 групп врачей. Каждый рабочий день в биохимическую лабораторию поступает около 1200 заявок на выполнение различных анализов. При обследовании одного пациента выполняется в среднем семь специфических аналитических тестов. Итак, обычная биохимическая лаборатория в госпитале выполняет от двух с половиной до трех миллионов анализов в год. Большинство лабораторий выполняют около 200 различных тестов, которые можно разделить на восемь видов (табл. 1.13).

Большинство заявок в лабораторию поступает в рабочем режиме, но иногда требуется выполнить экстренные анализы в любое время суток. Большое количество анализов, а также необходимость круглосуточной работы семь дней в неделю привело к тому, что большинство тестов осуществляется и обрабатывается в автоматическом режиме.

Таблица 1.13. **Показатели биохимического анализа для подтверждения клинического диагноза**

Анализируемые вещества	Примеры
Вещества, поступающие из пищи	Холестерин, глюкоза, жирные кислоты, триглицериды
Продукты распада	Билирубин, креатинин, моча
Тканеспецифичные мессенджеры	Адренокортикотропный гормон (АКТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), тиреотропный гормон (ТТГ)
Общие мессенджеры	Кортизол, инсулин, тироксин
Ответ на мессенджер	Тест на толерантность к глюкозе для оценки уровня секреции инсулина. Оценка функций гипофиза
Функции органов	Функции надпочечников — кортизол, АКТГ
	Функции почек — K^+, Na^+, мочевина, креатинин
	Функции щитовидной железы — свободный тироксин (cT_4), свободный трийодтиронин (cT_3), ТТГ
Маркеры повреждения органов	Сердце — тропонин I, креатинкиназа (КК-МВ), АСТ, лактатдегидрогеназа (ЛДГ)
	Печень — АЛТ, ЩФ, γ-глутамилтрансфераза (ГГТ), билирубин, альбумин
Маркеры специфических заболеваний	Специфические белки («опухолевые маркеры»), секретируемые отдельными органами, — антиген простаты (ПСА), СА-125 (яичники), кальцитонин (щитовидная железа), α_1-фетопротеин (печень)

Для эффективной работы лаборатории необходимо, чтобы были выполнены три важных условия:

- информировать врачей госпиталя о порядке выполнения тестов, соответствующих тем или иным клиническим состояниям, а также о правилах сбора, хранения и транспортировки образцов для анализа;
- обеспечивать выполнение анализа биологических образцов на должном уровне и в необходимые сроки;
- предоставлять врачам необходимую информацию для интерпретации результатов анализа и проведения дополнительных анализов.

Информация для клиницистов обычно содержится в специальном руководстве, составленном старшим персоналом лаборатории, в котором дается описание каждого теста, инструкция по отбору и хранению образцов, обычное расписание работы лаборатории и приблизительное время, необходимое для выполнения анализа. Это время может составлять от одного часа до нескольких недель. Большинство биохимических анализов выполняются с сывороткой или плазмой крови. Обычно предпочитают работать с сывороткой, ведь концентрация большинства анализируемых веществ в двух жидкостях практически одинакова. Сыворотку получают в результате свертывания крови и удаления полученного осадка путем центрифугирования. Для получения плазмы к образцу крови нужно добавить антикоагулянт, а затем удалить эритроциты центрифугированием. В качестве антикоагулянтов используют гепарин или ЭДТА в зависимости от целей анализа. Например, ЭДТА образует комплексы с ионами кальция, так что определить кальций в плазме с ЭДТА не представляется возможным. Для определения глюкозы к образцам добавляют фторид/оксалат не в качестве антикоагулянта, а для предотвращения гликолиза при транспортировке и хранении образцов. Для хранения образцов крови имеются специальные вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянты или другие добавки. Кроме того, существуют пробирки со специальными веществами, способствующими скорейшему свертыванию крови при приготовлении сыворотки. Многие емкости для образцов крови содержат гель определенной плотности, так что он размещается между слоем сыворотки и слоем клеток и создает барьер, действующий до четырех суток. Кроме того, осуществляют биохимический анализ цельной крови, мочи, спинномозговой жидкости (жидкости, окружающей спинной и головной мозг), фекалий, пота, слюны и амниотической жидкости. Важно, чтобы образцы отбирались в соответствующий контейнер в нужное время (это особенно важно при анализе содержания гормонов, таких как кортизол, имеющих определенный суточный ритм секреции) и были подписаны (с указанием имени пациента и возможной биологической опасности). Для подачи в лабораторию к образцам прикладывают подписанную врачом форму заявки с указанием необходимых деталей и краткого указания причины подачи заявки, что поможет интерпретировать результаты и определить другие подходящие тесты.

При поступлении в лабораторию как сам образец, так и соответствующая форма заявки регистрируются (получают номер и штрих-код). Необходимо

проверить правильность заполнения формы, а также состояние образца и правильный выбор контейнера. Если имеет место какое-либо несоответствие с принятым протоколом, такие образцы далее не анализируют. Правильно оформленные образцы готовят к анализу обычно путем центрифугирования, чтобы получить плазму или сыворотку крови. Форма заявки обрабатывается компьютером, при этом происходит идентификация пациента и в **его?? (да пациент САМ в базе данных)** базу данных **на него??** заносится сделанный врачом запрос. Учитывая большое количество пациентов, эти детали должны позволять точно идентифицировать конкретное лицо, поэтому в **его (??) базе данных на пациента??** должна быть указана фамилия, адрес, дата рождения, данные о госпитале или доставившей пациента бригаде скорой помощи, а также регистрационный номер.

Организация проведения анализа

В большинстве клинических лабораторий работа проводится в трех основных подразделениях:

- отдел автоматических анализаторов,
- отдел иммуноанализа,
- отдел ручных методов анализа.

Отдел автоматических анализаторов

Автоматические анализаторы, предназначенные для выполнения клинических биохимических тестов, производят многие фирмы. Схема типичного анализатора представлена на рис. 1.5. Анализатор имеет несколько устройств карусельного типа для размещения образцов (по 15 в каждом),

Рис. 1.5. Автоматический анализатор Olympus 640. Воспроизводится с разрешения Olympus Diagnostic Division, Великобритания

причем на каждую карусель может приходиться до 50 различных реагентов. Реагенты различают по штрих-кодам. Карусели для отмывки/подготовки образцов и карусель для проведения реакций содержат до 200 кювет, в которых инициируется и регистрируется каждая конкретная реакция. Анализаторы имеют высокую производительность и такой временной цикл работы, которые позволяют производить манипуляции или считывать результаты в конкретной кювете каждые 4–20 с (в зависимости от модели прибора). Общее время, необходимое для проведения анализа конкретного образца, зависит от специфической реакции. Приведем пример типичного реакционного цикла при определении содержания глюкозы в сыворотке с помощью гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы с регистрацией поглощения NADH при 340 нм (разд. 15.2.5).

- *Время 0*: В реакционную кювету добавляют реагент 1 (АТФ, Mg^+ и гексокиназа в буфере Pipes, pH 7,6). Разводят деионизованной водой и перемешивают.
- *Время 30 с*: Добавляют образец сыворотки. Разбавляют деионизованной водой и перемешивают. Следят за поглощением при 340 нм 3 мин — это нулевая точка.
- *Время 3 мин 30 с*: Добавляют реагент 2 (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, NAD^+) и перемешивают. Общий объем смеси 250 мкл. Определяют поглощение при 340 нм каждые 20 с.
- *Время 8 мин*: Регистрируют последнее значение поглощения NADH по сравнению с нулевой точкой. Рассчитывают концентрацию глюкозы в образце и записывают в базу данных. Моют кювету. Цикл завершен. Если изменение поглощения выходит за пределы калибровочной кривой, анализатор автоматически начнет повторный анализ с меньшим количеством образца.

Анализаторы оснащены самыми современными спектрофотометрами с волоконной оптикой; они позволяют одновременно регистрировать показания на нескольких длинах волн. Кроме того, для измерений может использоваться кислородный электрод и три или четыре других ион-селективных электрода. Для анализа могут применяться одноразовые кюветы, которые автоматически загружаются в карусель и выгружаются из нее. Если применяют многократно используемые кюветы, то их отмывка осуществляется в специальном отмывочном блоке с чередованием кислотного, щелочного и спиртового растворов в различных комбинациях, завершающаяся ополаскиванием водой и высушиванием. Одноразовые кюветы выбрасывают в герметично закрывающиеся мешки, а все жидкости после проведения анализа отсасывают насосом в специальные контейнеры с дезинфицирующими веществами. Работа анализатора контролируется с помощью встроенного компьютерного устройства, а также через центральный лабораторный компьютер. Большинство анализаторов имеют около 25 встроенных программ для анализа целого ряда веществ, которые основаны на пяти аналитических подходах (табл. 1.14). Кроме того, обычно персонал имеет возможность запрограммировать выполнение других методов анализа.

Таблица 1.14. **Методы количественного анализа веществ с помощью автоматических анализаторов**

Аналитический метод	Примеры анализируемых веществ
Ион-селективные электроды	K^+, Na^+, Li^+, Cl^-
Спектрофотометрия в УФ и видимом диапазоне	Мочевина, креатинин, кальций, ураты
Турбидиметрия	IgG, IgA, IgM, D-димер (продукт метаболизма фибриногена)
Определение скорости реакции	Ферменты: АСТ, АЛТ, ГГТ, ЩФ, КК, ЛДГ
EMIT-анализ	Терапевтический лекарственный мониторинг: фенитоин, карбамазепин

EMIT-анализ — иммуноанализ с ферментативным усилением; АСТ — аспартаттрансаминаза, АЛТ — аланинаминотрансфераза, ГГТ — γ-глутамилтрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза, КК — креатинкиназа, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

В каждой лаборатории обычно имеется по крайней мере два автоматических анализатора с примерно одинаковыми возможностями, что необходимо для обеспечения бесперебойной работы. Анализатор считывает регистрационный номер образца (штрих-код) и запрашивает базу данных центрального компьютера о том, какие именно тесты следует провести с этим образцом. Затем тесты в автоматическом режиме расставляются в порядке приоритетности и анализатор программируется на отбор определенного объема образца с помощью специального устройства (которое также способно обнаружить в образце частички свернувшейся крови), добавление необходимых объемов реагентов в нужном порядке и регистрацию показаний через определенные промежутки времени. С такими же интервалами измеряются и **внутренние стандарты**. Анализатор в автоматическом режиме осуществляет добавление всех реагентов и сообщает о необходимости пополнить запас какого-либо из них. После расчета результатов оператор должен оценить их либо на самом анализаторе, либо уже в базе данных компьютера. Если результат соответствует ожидаемому, его можно сравнить с предыдущими результатами для того же пациента.

Иммуноанализ

Иммуноанализ, осуществляемый с помощью современных автоматических анализаторов, главным образом основан на методах флуоресценции или поляризации флуоресценции. Диапазон определяемых веществ может различаться (зависит от фирмы-производителя прибора), но обычно включает в себя основные эндокринологические тесты (например, на функцию щитовидной железы), терапевтические препараты (теофиллин, дигоксин) и наркотические вещества (опиаты, марихуана). Результаты, полученные на автоматических анализаторах, обычно обрабатываются в том же режиме, как и для неавтоматических, и сравниваются с предыдущими данными для пациента.

Проведение анализа вручную

Подобный подход к биохимическому анализу сопряжен с гораздо большими затратами ручного труда. Таким образом выполняются аналитические процедуры типа электрофореза, иммуноэлектрофореза и некоторые более сложные спектрофотометрические исследования. В качестве примера можно привести определение катехоламинов (для диагностики феохромоцитомы), 5-гидроксииндолуксусной кислоты (для диагностики карциноидного синдрома) или гемоглобина A1c (у больных диабетом).

Обработка результатов

Работающий на приборе оператор или заведующий лабораторией оценивают результаты анализа, исходя из соответствующих данных для внутренних стандартов, используемых в лаборатории. Внутренние стандарты анализируют по крайней мере дважды в день или вводят их в каждую серию анализируемых образцов. Далее результаты анализа образцов подвергают автоматизированной обработке, в результате которой выявляются либо аномальные результаты, либо результаты, требующие определенных комментариев со стороны старшего персонала лаборатории.

1.7.3 Диагностическая энзимология

Определение активности или количества ферментов в сыворотке крови давно используется при постановке клинического диагноза и прогнозировании хода заболевания. По месту реализации основной биологической функции ферменты сыворотки можно разделить на три категории.

- *Специфические ферменты сыворотки.* Нормальная физиологическая функция этих ферментов реализуется в сыворотке. В качестве примеров можно привести ферменты, участвующие в метаболизме липопротеинов и свертывании крови.
- *Секретируемые ферменты.* Они тесно связаны с первой группой ферментов. Примерами могут служить панкреатическая липаза, простатическая кислая фосфатаза, амилаза слюны.
- *Другие ферменты* (неспецифические для сыворотки ферменты). Физиологическая функция этих ферментов реализуется не в сыворотке. Они высвобождаются во внеклеточное пространство и попадают в сыворотку в результате нормальной жизнедеятельности клеток или в большем количестве при повреждении клеток, гибели клеток, а также при таких морфологических изменениях, которые наблюдаются, например, при опухолях. В сыворотке нормальные субстраты и(или) кофакторы этих ферментов могут отсутствовать или находиться лишь в очень низких концентрациях.

Наличие в сыворотке ферментов этой последней из перечисленных категорий особенно важно для диагностики заболеваний. Если клетка повреждена, ее содержимое высвобождается на протяжении нескольких

часов, причем первыми появляются ферменты цитоплазмы, поскольку для их высвобождения необходимо лишь нарушение целостности плазматической мембраны. Высвобождению этих ферментов после повреждения клетки способствует большой градиент их концентрации (содержимое ферментов в клетке в 1000 раз выше, чем за ее пределами). Целостность клеточной мембраны особенно легко нарушается в результате таких явлений, при которых происходит нарушение энергетического обмена, в частности при недостатке кислорода. Она также нарушается под действием токсических химических веществ (некоторых лекарств), микроорганизмов, в определенных иммунных состояниях или имеет генетические причины. При этом высвобождаемые из клеток вещества необязательно обнаруживаются в сыворотке в таких же относительных количествах, в которых они присутствовали в клетке. Возможные вариации отражают различия в скорости их метаболизма и выведения из организма и, следовательно, их времени полураспада в сыворотке, которое может составлять от нескольких часов (для щелочной фосфатазы кишечника, глутатион-S-трансферазы, креатинкиназы) до нескольких дней (для щелочной фосфатазы печени, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы).

Клиническое значение неспецифических белков в сыворотке определяется рядом факторов:

- *Специфичность для определенных органов*: немногие ферменты встречаются лишь в одном определенном органе, но, к счастью, некоторые ферменты в одних тканях содержатся в гораздо большем количестве, чем в других. В результате относительное содержание набора ферментов в сыворотке часто отражает состояние какого-либо органа.
- *Изоферменты*: некоторые важные для клинической диагностики ферменты существуют в виде изоферментных форм, и во многих случаях их относительное содержание различается в разных тканях, так что измерение содержания изоферментов в сыворотке позволяет определить их источник.
- *Нормальный диапазон значений*: активности неспецифических ферментов в сыворотке у здоровых людей всегда ниже, чем в сыворотке пациентов, например, с заболеваниями печени. Во многих случаях степень отличия активности конкретного фермента от нормы указывает на степень поражения клеток поврежденного органа.
- *Различная скорость роста активности в сыворотке*: для каждого фермента характерна своя скорость увеличения активности в сыворотке в результате повреждения клеток органа. Более того, скорость возвращения активности каждого фермента к нормальному диапазону значений в результате проведенного лечения служит индикатором выздоровления пациента.

Практическое использование возможностей энзимологии для диагностики проиллюстрировано на примере болезней сердца и печени.

Ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда

Нормальное функционирование сердца зависит от наличия кислорода. Поступление кислорода может снижаться в результате постепенного отложения богатых холестерином атеросклеротических бляшек на стенках коронарных артерий. С ростом этих отложений все чаще может возникать такая ситуация, когда количество доставляемого кислорода в определенные моменты, например при активной физической нагрузке, будет недостаточным. Это приводит к временной ишемии сердца (недостатку кислорода), сопровождающейся болью в груди; такое состояние называют **стенокардией** (грудной жабой). Хотя боли могут быть довольно сильными, подвергшиеся временному недостатку кислорода клетки сердечной мышцы не повреждаются и не высвобождают своего содержимого. Однако в случае полной закупорки артерий бляшками или небольшими сгустками крови (тромбами), которые не могут двигаться дальше из-за разросшихся бляшек, наступает **инфаркт миокарда**. Это состояние сопровождается такой же сильной болью, но в данном случае происходит необратимое повреждение клеток сердечной мышцы с высвобождением их содержимого. Этот процесс не одномоментный, он длится несколько часов. Если у больного сильная боль в груди, очень важно понять, произошел ли у него инфаркт или нет. Примерно в одном случае из пяти у больных с инфарктом миокарда не отмечается характерной боли (безболевой инфаркт миокарда), врачам же необходимо подтвердить диагноз инфаркта. Это в первую очередь устанавливают с помощью электрокардиограммы (ЭКГ), но показания ЭКГ не всегда однозначны, поэтому для окончательной постановки диагноза осуществляют анализ сыворотки крови на ферментативную активность. Обычно измеряют активность трех следующих белков:

- *Креатинкиназа* (КК) превращает креатинфосфат (задействованный в метаболизме мышц) в креатин. КК — это димерный белок, состоящий из двух мономеров, один обозначают как М (мышцы), другой как В (brain, головной мозг). Существуют три изоформы этого белка: КК-ММ, КК-МВ и КК-ВВ. Распределение этих изоферментов в тканях существенно различается: сердечная мышца содержит 80–85% КК-ММ и 15–20% КК-МВ, скелетные мышцы — 99% КК-ММ и 1% КК-МВ, а головной мозг, желудок, кишечник и мочевой пузырь содержат преимущественно ВВ-форму. Активность КК возрастает в целом ряде клинических ситуаций, но поскольку МВ-форма присутствует почти исключительно в сердечной мышце, увеличение ее активности в сыворотке однозначно свидетельствует об инфаркте миокарда, даже если общая активность КК остается в пределах нормы. Повышенный уровень общей активности КК в сыворотке регистрируется через 6 ч после инфаркта, а максимум достигается через 24–36 ч. Однако повышение активности КК-МВ можно зарегистрировать уже через 3–4 ч после инфаркта, 100%-я чувствительность достигается через 8–12 ч, а максимум активности — через 10–24 ч. Уровень активности КК-МВ остается повышенным на протяжении 2–4 суток.

- *Аспартатаминотрансфераза* (АСТ) — одна из трансаминаз, задействованных в промежуточном метаболизме. Она существует во многих тканях, но особенно много ее в сердце и печени. После инфаркта миокарда активность фермента в сыворотке возрастает и достигает максимума через 48–60 ч. Для ранней диагностики повреждения сердечной мышцы этот показатель не имеет особой ценности, но используется в случаях поздней диагностики заболевания у пациентов с болями в области сердца.
- *Лактатдегидрогеназа* (ЛДГ) — тетрамерный белок, состоящий из двух типов мономеров, обозначаемых как Н (heart, сердце) и М (мышцы). Существует пять изоферментов ЛДГ: ЛДГ1 (Н4), ЛДГ2 (Н3М), ЛДГ3 (Н2М2), ЛДГ4 (НМ3) и ЛДГ5 (М4). Форма ЛДГ1 преобладает в сердце, головном мозге и почках, а ЛДГ5 — в скелетных мышцах и печени. После инфаркта миокарда общая активность ЛДГ и активность ЛДГ1 возрастают и достигают максимума через 48–72 ч. Последующее снижение активности происходит значительно медленнее, чем в случае КК или АСТ. Диагностическая ценность измерений ЛДГ в основном связана с возможностью оценки восстановления пациента после перенесенного инфаркта.

Типичные изменения активностей трех перечисленных ферментов после инфаркта миокарда представлены на рис. 1.6. Анализ всех трех активностей проводился с помощью автоматического анализатора.

- *Общую активность КК* определяют с помощью последовательности сопряженных реакций (разд. 15.2.2), катализируемых гексокиназой и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой в присутствии *N*-ацетилцистеина в качестве активатора. Измеряют увеличение поглощения при 340 нм или поляризацию флуоресценции:

$$\text{креатинфосфат} + \text{АДФ} \rightleftarrows \text{креатин} + \text{АТФ}$$
$$\text{АТФ} + \text{D-глюкоза} \rightleftarrows \text{D-глюкозо-6-фосфат}$$
$$\text{D-глюкозо-6-фосфат} + \text{NAD(P)}^+ \rightleftarrows \text{D-глюкозо-6-фосфат} + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$$

- *Активность КК-МВ* определяют, ингибируя активность М-мономера путем добавления к образцу сыворотки антител к М-мономеру. Это приводит к ингибированию активности КК-ММ и М-субъединицы КК-МВ. Активность КК-ВВ при этом не меняется, но обычно в сыворотке ее вовсе невозможно определить, так что вся остаточная активность обусловлена В-субъединицей КК-МВ. Ее измеряют в соответствии с описанным выше методом с использованием сопряженных реакций, а полученное значение удваивают, получая при этом оценочное значение для активности КК-МВ. Другой способ определения КК-МВ основан на применении антител: КК-МВ связывается с анти-КК-МБ, нанесенными на микрочастицы; образующийся комплекс отмывают от несвязанных форм КК и добавляют анти-КК-ММ, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Они связываются с комплексом антиген–антитело; затем производят отмывку несвязанного материала, добавляют 4-метилумбеллиферонфосфат

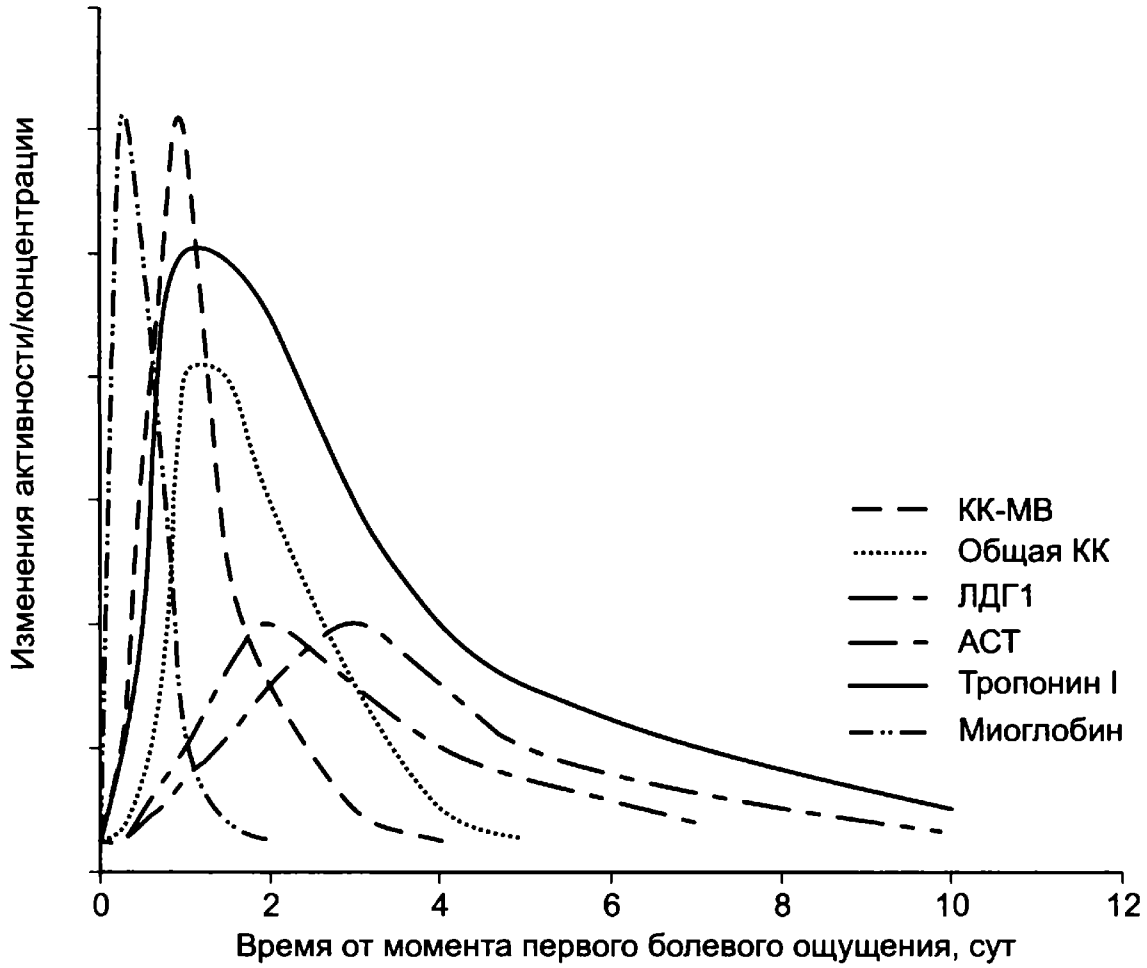


Рис. 1.6. Изменения активности ферментов, а также содержания миоглобина и тропонина I при инфаркте миокарда. Относительно верхней границы нормального диапазона происходят кратные (несколько раз) изменения в зависимости от масштаба поражения, однако характерная форма кривой во времени всегда сохраняется. КК — креатинкиназа, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АСТ — аспартатаминотрансфераза

в качестве субстрата и измеряют флуоресценцию выделяющегося 4-метилумбеллиферона. Полученные значения выражают не в единицах активности, а в единицах концентрации (нг/см^3).

- *Активность аспартатаминотрансферазы* определяют с помощью сопряженной реакции, катализируемой малатдегидрогеназой. Измеряют снижение поглощения при 340 нм.

$$\text{L-Аспартат} + \text{2-оксоглутарат} \rightleftarrows \text{оксалоацетат} + \text{L-глутамат}$$
$$\text{оксалоацетат} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftarrows \text{малат} + \text{NAD}^+$$

- *Активность лактатдегидрогеназы.* Общую активность ЛДГ определяют по увеличению поглощения при 340 нм с лактатом в качестве субстрата. Для определения активности ЛДГ1 в качестве субстрата берут 2-гидроксибутират, поскольку его использовать могут лишь ЛДГ1 и ЛДГ2.

Общая ЛДГ: $\text{лактат} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{пируват} + \text{NADH} + \text{H}^+$

ЛДГ1: $\text{2-гидроксибутират} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{2-кетобутират} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Необходимость быстро и однозначно распознавать инфаркт миокарда способствовала появлению других тестов; в настоящее время наряду с определением активности трех перечисленных ферментов широко используются два теста, основанные на определении миоглобина и тропонина I.

Миоглобин. Концентрация миоглобина в сыворотке крови после инфаркта миокарда возрастает быстрее, чем концентрация КК-МВ: увеличение концентрации можно обнаружить уже через 1–2 ч, 100% чувствительность и максимальный уровень достигаются через 4–8 ч, возврат к нормальным значениям происходит через 12–24 ч. Однако изменения концентрации миоглобина не специфичны исключительно для инфаркта миокарда, поскольку подобные изменения происходят и при других синдромах, таких как повреждение или раздавливание мышц, например при автомобильных катастрофах. Миоглобин в сыворотке определяют методами ВЭЖХ или иммуноанализа.

Тропонин I — это один из трех белков (два другие — тропинин Т и тропонин С), комплекс которых регулирует сокращаемость клеток миокарда. Активность этого белка в сыворотке после инфаркта миокарда возрастает с ростом активности КК-МВ; 100% чувствительность и максимум активности также достигаются через то же самое время. Отличие состоит в том, что повышенный уровень тропонина I сохраняется около 4 сут после появления первых симптомов болезни. Нормальный диапазон значений не превышает 1 нг/см^3, но через 24 ч после инфаркта миокарда концентрация тропонина I в сыворотке достигает 30–50 нг/см^3. Анализ осуществляют с помощью иммунологического сэндвич-анализа, при котором антитела метят с помощью щелочной фосфатазы. В качестве субстрата используют 4-метилумбеллиферонфосфат и измеряют флуоресценцию при высвобождении 4-метилумбеллиферона. Определение тропонина I в сыворотке используют для того, чтобы исключить повреждение сердечной мышцы у пациентов с болью в груди, поскольку этот показатель остается повышенным еще несколько дней после инфаркта миокарда. Важно, чтобы анализ не проводился слишком рано, поскольку он может дать ложноотрицательный результат. Ограничения метода связаны с тем, что повышенный уровень этого белка наблюдается не только при инфаркте миокарда, но и при повреждениях других мышц раздавливанием.

Мониторинг состояния пациента, перенесшего инфаркт миокарда, обычно состоит в измерениях активности ферментов, концентрации миоглобина и тропонина I, содержания в крови калия и глюкозы, а также газов в артериальной крови. После первого инфаркта в течение нескольких дней может последовать второй. В таком случае приведенный на рис. 1.6 характер изменения активности ферментов в сыворотке вновь воспроизводится с учетом остаточных активностей на момент второго инфаркта. Лучшим показателем нового инфаркта является рост активности КК-МВ, а вот показатели уровня тропонина I могут не отразить этого события.

Чувствительность и специфичность (разд. 1.7.1) ЭКГ и ферментативной диагностики при инфаркте миокарда дополняют друг друга. Так, специфичность ЭКГ составляет 100%, а ферментативных методов — лишь 90%, напротив, чувствительность ЭКГ близка к 70%, а ферментативных методов — около 95%.

Болезни печени

Ферментативные методы используются в рутинных анализах при дифференциальной диагностике различных заболеваний печени:

- *Гепатит* — общее воспаление печени, которое чаще всего бывает вызвано вирусной инфекцией, но также может быть последствием заражения крови (септицемии) или инфекционного мононуклеоза. Проявляется в виде умеренного некроза клеток печени и, следовательно, сопровождается относительно слабовыраженным высвобождением клеточных ферментов.
- *Цирроз* — общее поражение клеток печени и их замещение фиброзной тканью. Чаще всего заболевание вызвано злоупотреблением алкоголем, но также может быть следствием хронического гепатита, различных аутоиммунных заболеваний и генетических нарушений. В любом случае при циррозе имеет место массивное поражение клеток печени с высвобождением клеточных ферментов.
- *Рак*: первичные и вторичные опухолевые поражения печени.
- *Холестаз* — нарушение оттока желчи в кишечник в результате перекрытия желчных протоков желчными камнями или опухолью, либо в результате разрушения клеток печени на фоне цирроза или хронического гепатита. Проявлением данного состояния является **обструктивная желтуха** (появление в кожных покровах билирубина — желтого метаболита гема).

Пациенты с этими заболеваниями печени часто обращаются к врачу с одинаковыми симптомами, именно с этим связана необходимость проведения дифференциальной диагностики с использованием ультразвуковых методов (УЗИ), магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии (КТ), микроскопии биоптатов, а также тестов на функционирование печени. Для проведения дифференциальной диагностики обычно анализируют активности пяти ферментов.

- *Аспартатаминотрансфераза* (АСТ) и *аланинаминотрансфераза* (АЛТ). Как обсуждалось выше, эти ферменты встречаются в разных тканях организма, однако их относительное содержание в сыворотке крови характерно для определенных заболеваний печени. Например, если отношение АСТ/АЛТ < 1, это может говорить о протекании острого вирусного гепатита или о начале развития обструктивной желтухи, если АСТ/АЛТ = 1, то имеет место обструктивная желтуха, вызванная вирусным гепатитом, а если АСТ/АЛТ > 1, то речь идет о циррозе печени.
- *γ-Глутамилтрансфераза* (ГГТ) осуществляет перенос γ-глутамильной группы и может анализироваться с помощью γ-глутамил-4-нитроанилина в качестве субстрата; за ходом реакции следят при 400 нм по высвобожде-

нию 4-нитроанилина. ГГТ имеется в разных органах: ее много в печени, особенно в желчных протоках, а также в почках, поджелудочной железе и простате, но фермент из этих источников не вносит вклад в уровень ферментативной активности в сыворотке. Повышенная ферментативная активность в сыворотке наблюдается при циррозе, вторичных опухолях печени и холестазе и обычно сопровождается ростом активности щелочной фосфатазы (ЩФ), особенно при холестазе. Синтез фермента индуцируется алкоголем и некоторыми лекарствами, что также приводит к повышению уровня ферментативной активности в сыворотке.

- *Щелочная фосфатаза* (ЩФ) встречается в большинстве тканей организма, но особенно много ее в желчных протоках, почках, костях и плаценте. Активность фермента можно анализировать с помощью 4-нитрофенилфосфата в качестве субстрата по высвобождению 4-нитрофенола при 400 нм. Активность фермента возрастает при обструктивной желтухе. Параллельные измерения активности АЛТ могут помочь в дифференциальной диагностике обструктивной желтухи и гепатита, поскольку при обструктивной желтухе активность ЩФ возрастает сильнее, чем активность АЛТ. Снижение активности ЩФ в сыворотке указывает на прекращение холестаза. Повышенный уровень ЩФ в сыворотке, кроме того, может наблюдаться при различных заболеваниях костей, при активном росте и при беременности.

1.7.4 Оценка качества анализов

Для оценки точности и погрешности результатов биохимических тестов, проведенных в клинической биохимической лаборатории, лаборатория принимает участие в **схемах внешней оценки качества**, наряду с использованием **системы внутреннего контроля**, которая подразумевает регулярный анализ стандартных образцов, покрывающих весь диапазон измерений тестируемого вещества. В Великобритании существуют две основные схемы внешней оценки качества клинического биохимического анализа: **UK National External Quality Assessment Scheme** (UK NEQAS, веб-сайт www.ukneqas.org.uk), координированная с Медицинским центром королевы Елизаветы в Бирмингеме, и **Wales External Quality Assessment Scheme** (WEQAS, веб-сайт www.weqas.com), координированная с Университетом при госпитале Уэльса в Кардиффе. Большинство клинических лабораторий в госпиталях Великобритании участвуют в обеих схемах. Эти организации раз в две недели распространяют стандартные образцы человеческой сыворотки. В схеме UK NEQAS образцы содержат несколько веществ с неизвестной концентрацией в области диапазона измерений. Каждый раз концентрации веществ изменяются. Напротив, WEQAS распространяет четыре или пять образцов, содержащих тестируемые вещества в различной концентрации внутри диапазона измерений. В обоих случаях лабораториям предлагаются несколько схем оценки качества анализа различных образцов, содержащих наборы родственных между собой веществ, например химические вещества, пептидные гормоны, стероидные гормоны, вещества для терапевтического лекарственного

мониторинга. Лаборатории выбирают те схемы, которые им ближе по диапазону выполняемых анализов.

Лабораториям предлагается анализировать образцы из схемы внешней оценки качества параллельно с рутинным анализом клинических образцов и сообщать результаты в соответствующий центр. Центры проводят полный статистический анализ представленных результатов и сообщают их лабораториям в конфиденциальном порядке. Данные представляются в виде результатов анализа в одной лаборатории по сравнению со всеми другими собранными данными и с соответствующими данными, полученными отдельными методами (например, глюкозооксидазный и гексокиназный методы для определения глюкозы), а также для конкретной марки лабораторного оборудования. Результаты представляются в виде таблиц, гистограмм и графиков и сравниваются с результатами нескольких предыдущих анализов. Сравнение с ранее полученными данными позволяет отслеживать изменения качества определения каждого анализируемого вещества. Те данные, которые воспринимаются как неудовлетворительные, идентифицируются и отслеживаются. Некоторые результаты типичных отчетов UK NEQAS и WEQAS представлены в табл. 1.15 и на рис. 1.7.

Клинический аудит и аккредитация лабораторий

Клинические лаборатории не только участвуют в схемах внешней оценки качества, но и подвергаются **клиническому аудиту**. Эта систематическая критическая проверка общей работы лаборатории проводится в соответствии с заявленными самой этой лабораторией стандартами и национальными стандартами. Что касается аналитических методов, клинический аудит оценивает следующие аспекты работы лаборатории: правомерность использования методов анализа, клиническая интерпретация результатов, процедуры приема и анализа образцов, а также представление полученных результатов. Таким образом, хотя аудит и включает в себя оценку результатов анализа, в первую очередь он сосредотачивается на методах получения данных с целью их нормализации и усовершенствования. Конечная цель клинического аудита — обеспечить наилучшее обслуживание пациентов экономически выгодным способом. Аудит обычно осуществляется младшим врачебным персоналом госпиталя; процедура длится несколько дней и вовлекает весь персонал лаборатории.

С процессом клинического аудита тесно связан процесс **аккредитации** лаборатории. Однако в то время как клинический аудит главным образом приносит пользу самой лаборатории, ее сотрудникам и в конечном итоге пациентам, аккредитация — это публичное и государственное признание профессионального уровня и статуса лаборатории и ее персонала. За процесс аккредитации отвечает либо специальная общественная организация, либо государственное учреждение или агентство. В разных странах приняты разные схемы аккредитации. В Великобритании аккредитация клинической биохимической лаборатории проводится на добровольных началах; этот процесс осуществляет Аккредитационная комиссия по клинической патологии (CPA) или реже Аккредитационная служба Великобритании (UKAS). В США аккредитация обязательна и осуществляется одним из пол-

Таблица 1.15. **Примеры данных UK NEQAS и WEQAS по определению глюкозы в сыворотке (мМ)**

а) **Данные UK NEQAS** (воспроизводится с разрешения UK NEQAS, лаборатория Wolfson EQA, Бирмингем)

Метод анализа	*n*	Среднее	SD	CV,%
Все методы	635	18,68	0,60	3,2
Анализатор глюкозы Beckman	62	18,22	0,41	2,2
Beckman Synchron CX3/CX7	59	18,25	0,38	2,1
Глюкозооксидаза/дегидрогеназа	148	18,78	0,63	3,4
Roche Hitachi/Modular	75	18,60	0,52	2,8
Другие дискретные анализаторы	47	18,89	0,82	4,4
Гексокиназа + Г6ФДГ	297	18,84	0,61	3,2
Дискретный анализатор	47	18,57	0,59	3,2
Система Olympus	132	19,05	0,51	2,7
Roche Integra	51	18,86	0,62	3,3
Ortho Vitros	112	18,46	0,37	2,0
700/750/950	47	18,39	0,40	2,2
250	59	18,52	0,35	1,9

SD — стандартное отклонение, CV — коэффициент вариации.
Анализатор глюкозы фирмы Beckman использует глюкозооксидазный метод анализа и измеряет потребление кислорода с помощью кислородного электрода. Метод Vitros основан на так называемом методе «сухой химии», который заключается в том, что образец помещают на пленку, напоминающую фотографическую пленку, в которую исходно включены реагенты для глюкозооксидазного метода. В результате реакции образуется голубая окраска, которую регистрируют в отраженном свете.
Эти данные касаются лаборатории, которая использовала гексокиназный метод анализа и представила результат 18,7 мМ. UK NEQAS рассчитала усеченное среднее значение и рассматривала его в качестве целевого значения. Это среднее значение из всех представленных данных, полученных тем же методом, за исключением результатов ± 2SD от среднего. Оно составило 18,84. На основании различия между усеченным средним и результатом, полученным в лаборатории, UK NEQAS также рассчитала погрешность и систематическую ошибку и сравнила эти данные с результатами анализа того же вещества, представленные лабораторией за прошедшие шесть месяцев, отражающие анализ 12 наиболее свежих образцов, распространявшихся UK NEQAS. Это позволяет выявить тенденцию представления завышенных или заниженных результатов. В данном случае лаборатория постоянно дает заниженный результат, однако в приемлемых пределах.
Представленные в табл. результаты приведены также в виде гистограммы на рис. 1.7.

номочных органов, таких как Американский институт патологоанатомов. Существуют также службы, осуществляющие аккредитацию неклинических аналитических лабораторий, например в Великобритании — это Национальная служба аккредитации измерительных лабораторий (NAMAS) и Британский институт стандартов (BSI). Международная организация по аккредитации лабораторий (ILAC), Европейская организация по аккредитации (EA) и Азиатско-тихоокеанское сотрудничество по аккредитации лабораторий (APLAC) — примеры трех из многочисленных международных организаций, призванных стандартизовать национальные правила аккредитации аналитических лабораторий.

Назначенные аккредитационной комиссией эксперты устанавливают соответствие лаборатории принятым аккредитационной организацией

Таблица 1.15. ***Продолжение***

б) **Данные WEQAS** (воспроизводится с разрешения WEQAS, Университет госпиталя Уэльса, Кардифф)

Аналитический метод		Номер образца 1	2	3	4
Полученный результат		7,2	3,7	17,2	8,7
Гексокиназа	Среднее	6,9	3,6	17,0	8,4
	SD	0,2	0,1	0,5	0,3
	Количество	220	221	219	219
Аэросет	Среднее	7,2	3,8	17,3	8,5
	SD	0,15	0,08	0,045	0,2
	Количество	8	8	9	8
Общее	Среднее	7,0	3,7	17,2	8,6
	SD	0,28	0,20	0,54	0,33
	Количество	388	392	388	389
WEQAS SD		0,26	0,16	0,6	0,3
SDI		1,15	0,63	0,33	1,0

SD — стандартное отклонение, SDI — индекс стандартного отклонения.

Эти данные касаются лаборатории, которая анализирует глюкозу с помощью системы Аэросет гексокиназным методом. Отчет WEQAS содержит также данные всех других лабораторий, использующих гексокиназу, и все результаты, полученные на системе Аэросет. Графа «общее» отражает результаты, полученные всеми методами на различном оборудовании. Все данные, выпадающие из диапазона среднее ± 2 SD были отброшены, что объясняет небольшие колебания общего числа измерений в каждом случае. Значения SD были рассчитаны на основании профилей точности для каждого анализируемого вещества; значения SDI рассчитывали по формуле (лабораторный результат минус среднее значение для данного метода)/SD, рассчитанное WEQAS. Этот индекс является мерой общей ошибки и включает в себя как точность, так и погрешность определения. Четыре показателя SDI, полученные на основании данных лаборатории, использовали для расчета общего SDI для анализируемого вещества, который в данном случае оказался равен 0,78. Показатель SDI меньше единицы означает, что все оценки попали в диапазон среднее ± 1 SD, что считается весьма хорошим показателем. Если SDI >2, то результаты считают неприемлемыми.

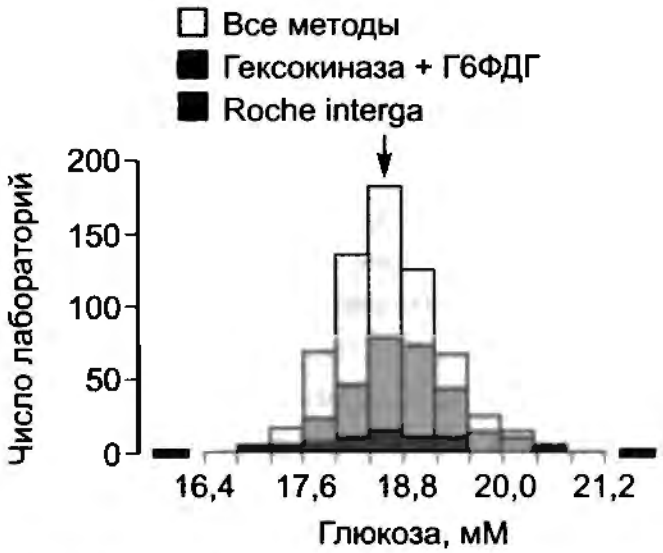


Рис. 1.7. Гистограмма оценки качества результатов определения глюкозы в сыворотке, соответствующая данным табл. 1.15а. Стрелка указывает на местонахождение результата, полученного лабораторией. Воспроизводится с разрешения UK NEQAS, лаборатория Wolfson EQA, Бирмингем

стандартам. Эти стандарты охватывают широкий диапазон аспектов работы лаборатории: точность и погрешность определения, временные рамки проведения анализа, клиническая значимость проводимых тестов, компетенция персонала, безопасность работы, качество административных и технических систем обеспечения, а также качество руководства лабораторией и ведения документации. В случае успешного прохождения аккредитации лаборатория признается соответствующей государственным стандартам и, следовательно, оказывающей качественные услуги в области здравоохранения. Срок аккредитации обычно составляет три года.

1.8 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ

Практически все экспериментальные работы, осуществляемые в биохимической лаборатории, представляют определенный риск для здоровья исполнителя. При планировании любого эксперимента необходимо предварительно обдумать все вопросы, касающиеся безопасности работ. Риск для здоровья персонала связан с разными источниками:

- *Химическая опасность.* Любые химические вещества в определенной степени могут быть опасны для организма человека. Во-первых, они могут вызывать раздражение и оказывать краткосрочный эффект при контакте. Во-вторых, они могут оказывать разъедающее действие и серьезно, иногда необратимо, повреждать кожные покровы. Примерами таких веществ могут служить сильные кислоты и щелочи. В-третьих, вещества могут оказывать токсическое действие при попадании в организм в результате проглатывания, вдыхания или впитывания через кожу. Внутри организма их эффект может варьировать от слабого до чрезвычайно сильного (яды, например цианиды), канцерогенного (бензол или винилхлорид) или тератогенного (талидомид). Наконец, особую опасность представляет работа с радиоактивными веществами (гл. 14).
- *Биологическая опасность.* В качестве примеров можно назвать жидкие среды человеческого организма, которые могут нести в себе инфекции, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), лабораторных животных, способных вызывать аллергию и быть переносчиками некоторых заболеваний, патогенных животных и культуры клеток, а также микроорганизмы, в том числе и генно-инженерные формы. В Великобритании все эксперименты с животными должны осуществляться в соответствии с правилами Министерства внутренних дел. Все эксперименты с культурами клеток и тканей должны проводиться в специальных микробиологических боксах, снабженных системой вентиляции, которая направляет поток стерильного воздуха в сторону от экспериментатора.
- *Электрическая и механическая опасность.* Вся электроаппаратура должна эксплуатироваться и поддерживаться в соответствии с правила-

ми, установленными производителями. Особую опасность представляет оборудование для проведения электрофореза. Следует крайне осторожно пользоваться также центрифугами, особенно работающими на высоких скоростях, в частности, всегда придерживаться правил эксплуатации и уравновешивания роторов.

- *Общие риски.* Наиболее распространенные источники опасности — иглы от шприцев, разбитая стеклянная посуда и емкости с жидким азотом.

Персоналу лаборатории следует придерживаться общих мер предосторожности, снижающих возможность подвергнуться перечисленным рискам. К подобным мерам безопасности относится ношение рабочей одежды (застегивающейся наглухо — при работе с микроорганизмами), защитных очков и одноразовых перчаток. Хорошее правило — никогда не работать в лаборатории в одиночестве, чтобы при необходимости кто-то мог оказать пострадавшему необходимую помощь. В Великобритании правила работы в лаборатории подчиняются таким законодательным актам, как «Здоровье и безопасность на рабочем месте» (1974), «Контроль вредных для здоровья веществ» (1994) и «Управление здоровьем и безопасностью в рабочем законодательстве» (1999). Законодательство требует, чтобы перед началом проведения работ была произведена оценка возможных рисков. Этот процесс предполагает выявление потенциальной опасности для работников с оценкой степени тяжести возможных последствий и вероятности таких событий. Если возможные последствия оцениваются как имеющие среднюю степень тяжести или тяжелые, а степень вероятности несчастного случая достаточно высокая, следует предпринимать определенные действия. Для проведения подобной оценки необходимо знать степень опасности от использования каждого химического вещества. Данные по токсичности химических веществ широко доступны через компьютерные базы данных и печатные справочные издания и должны быть доступны в каждой лаборатории. Если данные по токсичности веществ известны, следует рассмотреть возможность использования вместо них других, менее токсичных веществ; если же принято решение продолжать работу с токсическими веществами, необходимо предпринять все меры для снижения риска и определить порядок действий в случае возникновения несчастного случая. В том числе следует наладить связь со службами скорой медицинской помощи. Обычно в лаборатории должен быть человек, ответственный по технике безопасности. Произведенная оценка риска оформляется в виде соответствующего отчета и подписывается лицом, выполнившим данную работу, и одним из ответственных лиц в лаборатории. При выполнении любых работ в лаборатории важно придерживаться следующих правил:

- при прикапывании жидкостей пользоваться автоматическими пипетками, такими как пипетки фирмы Gilson; никогда не отбирать жидкость в пипетку ртом, какой бы безвредной эта жидкость не казалась;
- при работе с опасными веществами пользоваться тягой; убедиться в том, что действуете по всем правилам;

- баллоны с газом использовать согласно инструкциям производителя;
- знать местонахождение средств защиты, таких как ванночки для промывания глаз и огнетушители;
- выбрасывать биологический материал, использованную стеклянную посуду, носики пипеток, битую посуду и др. в специально отведенные для этого места.

1.9 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Аналитическая химия

BURNETT, D. (2002) *A Practical Guide to Accreditation in Laboratory Medicine*. ACB Ventures, London. Понятный и удобный справочник; полезен при проведении биохимических анализов.

HARRIS, D.C. (2003) *Quantitative Chemical Analysis*, 6th edn. Freeman, New York. Прекрасный учебник, отражающий все аспекты клинического анализа.

KENKEL, J. (2000) *A Primer on Quality in the Analytical Laboratory*. Lewis, Boca Ration, FL. Хорошее введение в общие вопросы контроля качества анализа.

SAUNDERS, G.C. and PARKES, H.C. (1999) *Analytical Molecular Biology*, LGC, Teddington, Middx. В книге есть прекрасная глава, посвященная качеству работ в молекулярно-биологической лаборатории.

Клиническая биохимия

BURTIS, C.A. and ASHWOOD, E.R. (2001) *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th edn., Saunders, Philadelphia. Изложение принципов и методов клинической биохимии в доступной форме.

SMITH, A.F. and BECKETT, G.J. (1998) *Lecture Notes on Clinical Biochemistry*, 6th edn. Blackwell Science, Oxford. Прекрасное справочное издание, отражающее все аспекты клинической биохимии.

Обработка данных

JONES, R. and PAYNE, B. (1997) *Clinical Investigation and Statistics in Laboratory Medicine*. ACB Ventures, London. Текст посвящен исключительно аналитическим методам в клинической биохимии.

TOWNEND, J. (2002) *Practical Statistics for Environmental and Biological Sciences*. Wiley, Chichester. Краткое, доступное «нетехническое» введение в статистику.

Методология исследования

BALNAVES, M. and CAPUTI, P. (2001) I*ntroduction to Quantitative Research Methods: An Investigative Approach*. Sage Publications, London. Простой и понятный текст с акцентом на практические аспекты анализа. Содержит обучающий CD-ROM.

FESLING, M.F.W. (2003) Principles: The need for better experimental design. *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**, 341–345. Иллюстрация роли грамотного экспериментального дизайна при постановке модельных экспериментов.

Техника безопасности

Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. Approved Code of Practice and Guidance. HSE Books, Kingston upon Thames. Постепенный подход к пониманию практических приложений COSHH.

Глава 2

Методы культивирования клеток

2.1 ВВЕДЕНИЕ

Культивирование клеток представляет собой метод, состоящий в выделении клеток и выращивании их *in vitro*, полученных из тканей или целых органов животных, микроорганизмов или растений. Как правило, животные клетки предъявляют более сложные требования к питательной среде и обычно нуждаются в более строгих условиях для роста и хранения. В отличие от них клетки микробов и растений менее требовательны к условиям выращивания. Независимо от источника используемого материала при культивировании клеток руководствуются одними и теми же основными принципами: стерильная чистота культуры клеток, использование необходимых методов стерилизации и поддержание условий для оптимального роста клеток.

Культуры клеток могут быть использованы для различных целей. Например, это идеальный источник материала для изучения внутриклеточных процессов, включая синтез белков, механизмы передачи сигналов и метаболизм лекарств. Их также широко применяли для анализа механизмов действия лекарств, межклеточных взаимодействий и для генетических исследований. Кроме того, методы культивирования клеток адаптированы для медицинских нужд и применяются в тех случаях, когда генетические нарушения могут быть определены с помощью хромосомного анализа клеток, полученных, например, от беременных женщин. На изолированной культуре клеток можно проводить качественный и количественный анализ вирусных инфекций. В промышленности культивированные клетки применяются для тестирования фармакологических и токсических воздействий компонентов фармацевтических препаратов. Таким образом, эта технология представляет собой весьма полезный инструмент и предлагает удобную систему, которая является относительно дешевой и при использовании которой удается избежать правовых, моральных и этических вопросов, связанных с экспериментами на животных.

В этой главе обсуждаются фундаментальные принципы, лежащие в основе культивирования клеток, а также набор подходов и методов, приме-

няемых обычно для выращивания животных, бактериальных и растительных клеток. Такая информация должна обеспечить базовыми знаниями новичков в области культивирования клеток и может служить подспорьем для тех, кто имеет лишь ограниченные навыки работы в этой области. Особое внимание уделяется условиям работы и общим принципам безопасности, необходимым для работы с культурой тканей.

2.2 ЛАБОРАТОРИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

2.2.1 Лаборатория для культивирования клеток

Обустройство и поддержание работы лаборатории, в которой осуществляется культивирование клеток, представляют собой, вероятно, наиболее важный аспект культивирования, поскольку стерильная окружающая среда имеет важнейшее значение для манипуляций с клетками и клеточной средой, которые должны быть свободны от посторонних микроорганизмов. Если рост таких организмов остается неконтролируемым, они будут опережать в росте клетки в культуре, приводя в конечном итоге к их гибели из-за высвобождения токсинов и/или истощения питательной среды.

По возможности в лаборатории необходимо обеспечить приготовление сред, а также выделение, изучение, проверку и поддержание культуры в контролируемых стерильных условиях. В идеале для выполнения каждой из перечисленных задач должна отводиться отдельная комната. Однако часто помещения для работы с культурой клеток, особенно в академических учреждениях, являются частью лабораторий и, следовательно, ограничены в пространстве. Поэтому довольно часто можно увидеть такие ограниченные перегородками пространства, где предусмотрено соблюдение необходимых требований. Такое решение вполне приемлемо при условии выполнения основных рекомендаций. Например, необходимо соблюдение стерильных методов работы (обсуждаемых ниже). Должны существовать подходящие помещения для приготовления сред и стерилизации, а весь материал для культуры клеток до его использования должен содержаться в стерильных условиях. Кроме того, все поверхности в пределах пространства для работы с культурой должны быть гладкими, чтобы предотвратить впитывание сред и других материалов, которые могут стать хорошей средой для размножения микроорганизмов и приводить к заражению культуры. Поверхности должны быть легкоочищаемыми, а все отходы немедленно уничтожаться. Процедура уничтожения может требовать предварительного автоклавирования, которое выполняется при температуре 121 °C и давлении 105 Па в течение определенного времени. Эти условия необходимы для уничтожения микроорганизмов.

В инкубаторах необходимо обеспечить ежедневную проверку температуры и наличие газа путем контроля давления в баллоне с CO_2. Водяные бани должны содержаться в чистоте, а пространство под рабочими поверхностями в вытяжных шкафах следует регулярно протирать, удаляя всю пролитую жидкость.

2.2.2 Оборудование для работы с культурами клеток

Для работы с культурой клеток необходимо следующее оборудование: вытяжной шкаф для работы с культурой, инкубатор(ы), автоклав и микроскоп. Ниже дается краткое описание этого и другого необходимого оборудования.

Вытяжные шкафы для культуры клеток

Вытяжной шкаф для работы с культурой клеток является основным элементом оборудования, в котором выполняются все манипуляции с клетками; он предназначен не только для защиты культуры от заражения, но и для защиты работающего от культуры клеток. Такие вытяжные шкафы обычно называются **ламинарами**, так как в них создается непрерывное плавное течение (ламинарное течение) стерильного воздуха, который проходит через специальный фильтр для очистки от микрочастиц (HEPA, high efficiency particulate air). Существует два типа ламинарных вытяжных шкафов — горизонтальные и вертикальные. Горизонтальные вытяжки направляют воздух прямо на оператора, и как правило, используются для приготовления сред или для работы с неинфекционным материалом, включая материал из растений. Вертикальные вытяжки (**боксы биологической безопасности**) лучше всего подходят для работы с опасными организмами, поскольку воздух внутри вытяжки фильтруется до его попадания в окружающую среду.

В настоящее время существует по крайней мере три класса вытяжек с различным уровнем защиты для культуры, работающего персонала или для того и другого; их описание приводится ниже.

Вытяжные шкафы I класса. Эти вытяжки, как и вытяжки II класса, снабжены экраном, который обеспечивает не только барьер между работающим и клетками, но также позволяет доступ в вытяжку через отверстие у основания экрана (рис. 2.1). Этот экран препятствует слишком сильному притоку воздуха извне и, что более важно, обеспечивает хорошую защиту работающего. Культуры клеток также защищены, но в меньшей степени по сравнению с условиями в вытяжках класса II, поскольку воздух, поступающий снаружи, затем уходит через внутреннюю камеру к верхней части вытяжки. Такие вытяжки подходят для работы с невысоким уровнем риска и когда требуется только защита работающего персонала.

Вытяжные шкафы II класса наиболее распространены в лабораториях для работы с культурой тканей. В отличие от вытяжек I класса, здесь всасываемый снаружи воздух проходит через решетку перед рабочей поверхностью и фильтруется через HEPA-фильтр в верхней части вытяжки до попадания на культуру тканей (рис. 2.1). Такой механизм защищает работающего и дает гарантию того, что попадающий на культуру воздух почти стерилен. Вытяжки II класса предназначены для работы с культурами животных клеток и с токсичными или инфекционными веществами невысокого или среднего уровня опасности, но не подходят для работы с патогенными организмами, где требуется высокий уровень герметичности.

Вытяжные шкафы III класса необходимы в тех случаях, когда требуется надежная защита как работающего, так и материала. Такие вытяжки являются полностью герметичными и снабжены двумя карманами-перчатками, надевая которые работник может работать с материалом внутри шкафа (рис. 2.1). Таким образом, работающий человек полностью защищен, поэтому вытяжки класса III подходят для работы с патогенными организмами, включая образцы тканей, несущих известные патогены человека.

Практические советы и техника безопасности при работе с культурами клеток в вытяжных шкафах. Все вытяжки должны постоянно поддерживаться в чистоте и порядке, поскольку нагромождения вещей могут мешать потоку воздуха, а загрязнения служат источником инфекции. Таким образом, следует принять за правило размещать в шкафу только необходимые предметы и протирать всю рабочую поверхность до и после использования с помощью технического этилового спирта (70% спирта, 30% очищенной воды), который уничтожает споры бактерий и

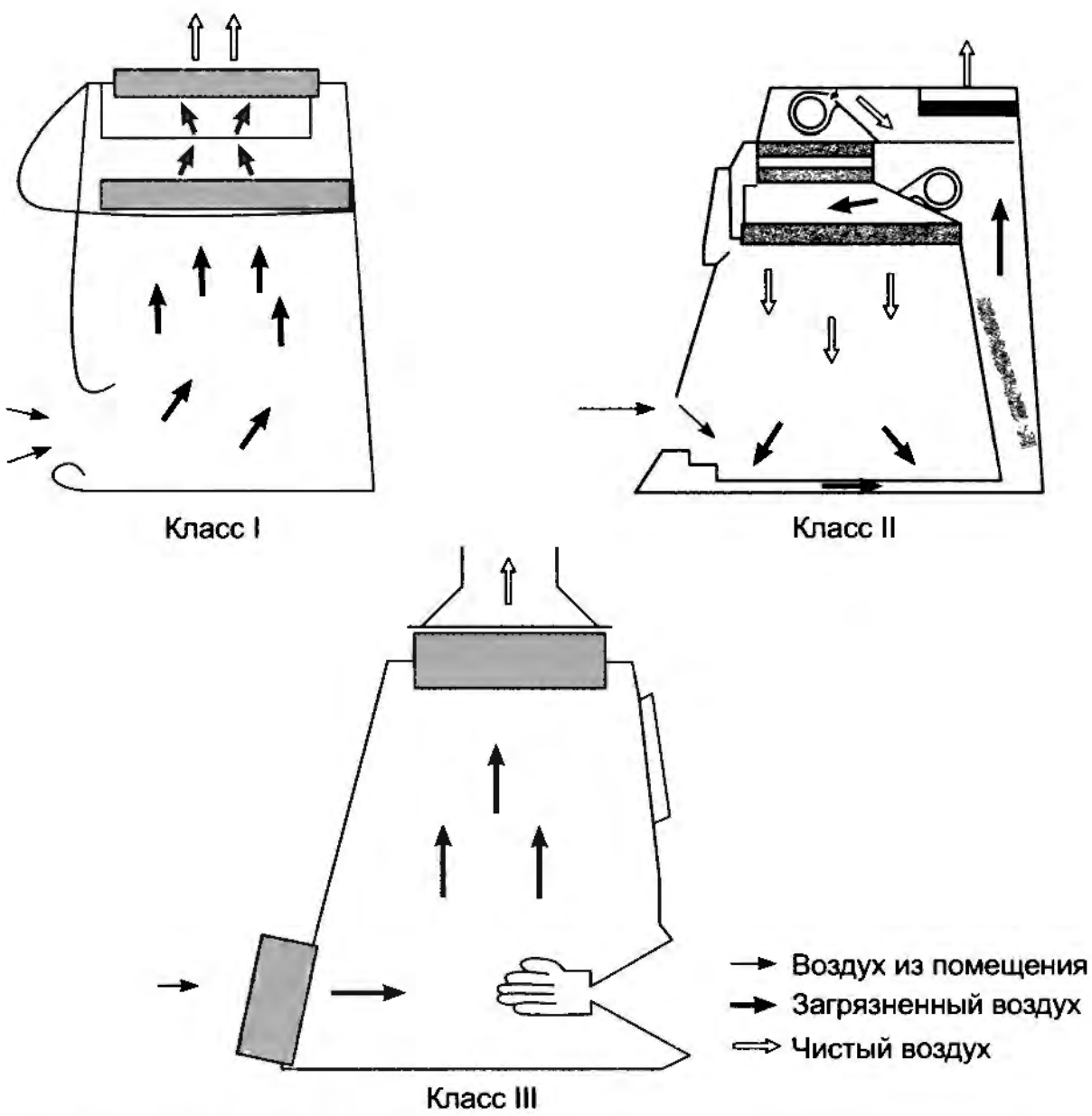


Рис. 2.1. Схема устройства вытяжных шкафов для работы с культурой тканей

грибов путем обезвоживания и фиксации клеток и таким образом предотвращает заражение культуры.

Некоторые шкафы могут быть оснащены источником коротковолнового ультрафиолетового излучения, которое используется для облучения внутреннего пространства вытяжки с целью уничтожения микроорганизмов. Если имеется ультрафиолетовый свет, включайте его на 15 минут, чтобы простерилизовать внутреннее пространство вытяжки, в том числе и рабочую поверхность. Однако следует помнить, что ультрафиолетовое излучение может вызывать повреждение кожи и глаз, поэтому следует придерживаться мер предосторожности, гарантирующих отсутствие прямого контакта работающего с ультрафиолетовым светом в процессе стерилизации. Как только стерилизация закончена, поместите переднюю панель (в вытяжках I и II классов) на место. Кроме того, всегда включайте вытяжку по крайней мере за 10 минут до начала работы, позволяя стабилизироваться потоку воздуха. Во это время следите за потоком воздуха и проверьте все датчики на передней панели вытяжки, чтобы убедиться в том, что все процессы нормально контролируются.

Углекислотные инкубаторы

Инкубаторы снабжены водяной рубашкой, что помогает поддерживать и регулировать условия для оптимального роста клеток, обычно нуждающихся в постоянной температуре 37 °С и содержании в воздухе 5–10% CO_2. Наличие в воздухе CO_2 гарантирует поддержание в культуральной среде требуемого физиологического уровня pH (обычно pH 7,2–7,4). CO_2 поступает в инкубатор из газового баллона через клапан, который впускает CO_2 всякий раз, когда его уровень падает ниже установленного значения от 5 до 10%. Поступающий во внутренний отсек инкубатора газ растворяется в культуральной среде, содержащей бикарбонат. Последний реагирует с H^+ (образующимся в процессе клеточного метаболизма), давая угольную кислоту, находящуюся в состоянии равновесия с водой и CO_2, таким образом поддерживая в культуральной среде pH ~ 7,2.

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows CO_2 + H_2O$$

Такие инкубаторы обычно увлажняются с помощью подноса со стерильной водой, установленного в его нижней части. Испарение воды создает атмосферу высокой влажности, что помогает предотвращать испарение среды из культуры.

Кроме углекислотных инкубаторов культуры клеток выращивают в суховоздушных инкубаторах, которые не увлажняются и основаны на использовании альтернативных буферных систем, таких как 4(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота (Hepes) или морфолинопропансульфоновая кислота (Mops) для поддержания pH в клеточной среде. Преимущество такой системы состоит в том, что устраняется риск заражения через поднос с водой в увлажняющем отсеке. Однако недостатком такого инкубатора является быстрое испарение культуральной среды, что может служить источником стресса у клеток. Одним из путей решения проблемы может быть размещение подноса с культурой клеток в боксе

в виде сэндвича, содержащего маленькие баночки со стерильной водой. В таком боксе с приоткрытой крышкой атмосфера внутри сэндвича будет увлажняться благодаря испарению воды из банок, что уменьшает риск испарения среды из культуры.

Практические советы и меры предосторожности при использовании инкубаторов для культуры клеток. В инкубаторе должны постоянно поддерживаться температура 37 °С и 5%-й уровень CO_2. Термометр, находящийся обычно на внутренней стороне стеклянной двери инкубатора, позволяет контролировать температуру. Уровень CO_2 внутри можно проверить и отрегулировать при помощи газового анализатора, например, фирмы Fryrite Reader. Необходимы регулярные проверки также уровня CO_2 в газовых баллонах, из которых CO_2 подается в инкубаторы; если уровень CO_2 становится очень низким, баллоны следует заменить на новые. Большинство инкубаторов имеют встроенный сигнал предупреждения, который срабатывает, как только уровень CO_2 внутри камеры падает. В таком случае газовый баллон должен быть немедленно заменен, чтобы избежать стресса или гибели клеток. В настоящее время стало возможным присоединять два газовых баллона к камере автоматического переключения, которая осуществляет переключение на второй баллон, если первый оказался пуст. Использование такого устройства весьма целесообразно.

При работе с увлажняемым инкубатором важно содержать поднос с водой чистым, без микроорганизмов. Для этого в воду добавляют различные вещества, например антимикробный агент Roccal в концентрации 1%. Могут быть использованы такие продукты, как Themerosal или SigmaClean (фирмы Sigma-Aldrich). Однако для поддержания инкубатора в рабочем состоянии необходимо регулярно мыть внутреннюю часть камеры, используя любой из выше приведенных реагентов, а затем 70%-й этиловый спирт. Недавно были созданы инкубаторы из омедненных материалов, которые, благодаря антимикробным свойствам меди, уменьшают риск микробного заражения.

Микроскопы

Для визуализации клеток в культуре обычно используют **инвертированные микроскопы в режиме фазового контраста** (см. гл. 4). Такие микроскопы довольно дороги, но ими легко оперировать; источник свет расположены над, а линзы объектива — под предметным столиком, на который помещают клетки. Наблюдение за клетками с помощью микроскопа может обеспечить полезной информацией об их морфологии и состоянии. Так можно идентифицировать ранние признаки стресса клеток и предпринять необходимые действия, чтобы не потерять культуру.

Другое оборудование

Среди других видов оборудования, необходимого для работы с культурой клеток, назовем центрифуги для осаждения клеток, водяные бани для оттаивания замороженных образцов клеток и нагревания среды до 37 °С перед ее использованием, холодильник и морозильную установку для хранения сред и других материалов, необходимых для поддержания культуры

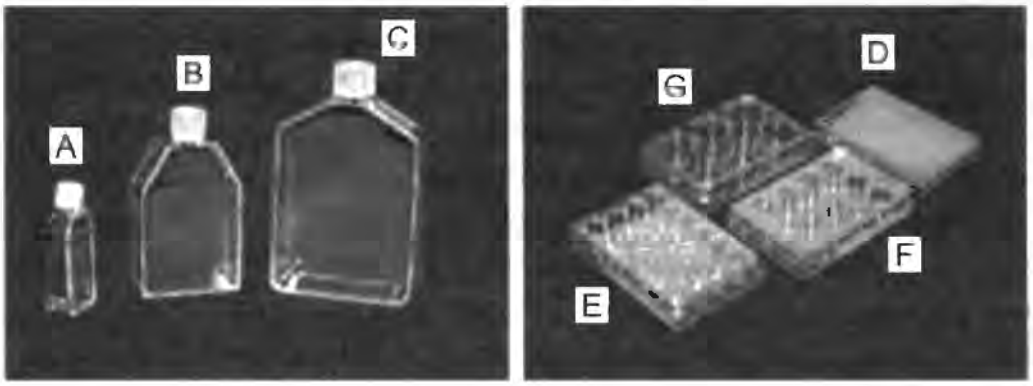


Рис. 2.2. Пластиковая посуда, используемая обычно для работы с культурой клеток. (A–C) Т-флаконы; (D–G) образцы многолуночных планшетов; (A) Т-25 (25 см²), (B) Т-75 (75 см²); (C) Т-225 (225 см²), (D) 96-луночный планшет; (E) 24-луночный планшет; (F) 12-луночный планшет и (G) 6-луночный планшет

клеток. Некоторые клетки для роста нуждаются в прикреплении к поверхности и поэтому называются адгезивными. Эти клетки наращиваются в нетоксичной полистирольной посуде, содержащей биологически инертную поверхность, на которой клетки могут прикрепляться и расти. Для этих целей используются различные типы пластиковой посуды, включая чашки Петри, многолуночные планшеты (с 96, 24, 12 или 6 лунками) и флаконы с завинчивающимися крышками, которые маркируются по площади поверхности (в см²) как Т-25, Т-75 и Т-225. Примеры пластиковой посуды представлены на рис. 2.2.

2.3 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК

В лаборатории, в которой работают с культурами клеток, должно уделяться очень серьезное внимание технике безопасности. Особенно это касается тех случаев, когда ведутся работы с патогенными микробами или свежими тканями человека или приматов, а также клетками, которые могут содержать агенты, использующие человека в качестве хозяина. Пример такой ситуации — работа с лимфоцитами человека, которые могут содержать инфекционные агенты, например вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и/или вирус гепатита В. Таким образом, в случае работы со свежей человеческой тканью важно до начала работы определить инфекционное состояние донора и предпринять все необходимые меры безопасности, чтобы устранить или уменьшить риск, которому подвергается исследователь. Минимальные условия безопасности при проведении такого типа работы обеспечит вытяжной шкаф класса II; работник должен носить защитную одежду, включая резиновые перчатки и маску для лица. Такая работа должна выполняться в соответствии с действующим руководством по технике безопасности.

Кроме риска от использования биологического материала, исследователь должен хорошо ориентироваться на рабочем месте и уметь пользоваться необходимым оборудованием, поскольку оно также может служить серьезным источником опасности. Культуральный бокс должен регулярно

обслуживаться и проверяться (приблизительно каждые шесть месяцев), что гарантирует безопасность работы. Кроме того, работающий должен обеспечивать свою собственную безопасность, выполняя некоторые общие правила, например воздерживаться от еды и питья во время работы в боксе и использовать наконечник для пипетки, а не отсасывать жидкость ртом, чтобы не допустить попадания в организм опасных веществ. Необходимо носить резиновые перчатки и соответствующую защитную одежду, например чистый лабораторный халат; после контакта с нестерильным или зараженным материалом перчатки выбрасывают, а одежду стирают и стерилизуют.

2.4 МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК

2.4.1 Общие правила

Для поддержания окружения культуры клеток чистым и безопасным следует постоянно применять соответствующие методы стерилизации. Это означает, что работать нужно в условиях, в которых невозможно заражение культуры микроорганизмами из окружающей среды. В частности, следует мыть руки антисептическим мылом и обеспечивать чистоту рабочей поверхности, а также стерилизовать ее с помощью 70%-го этилового спирта перед началом работы. Все процедуры, включая приготовление среды и манипуляции с клетками, должны выполняться в шкафу для клеточной культуры, который поддерживается в стерильных условиях.

При работе с культурой не следует разговаривать, чихать или кашлять. Для каждой отдельной процедуры должна быть использована чистая пипетка; среду из разных флаконов нельзя отбирать одной и той же пипеткой, так как это значительно увеличивает риск перекрестного загрязнения. Все пролитые жидкости нужно быстро убирать, чтобы избежать заселения микроорганизмами из воздуха. Невыполнение подобных требований может приводить к заражению культур. Снизить риск заражения можно с помощью антибиотиков. Однако соблюдение стерильности в работе устраняет необходимость в антибиотиках. В случае заражения культуры ее следует немедленно удалить из лаборатории, продезинфицировать и проавтоклавировать, чтобы предотвратить распространение заражения. Ни при каких условиях емкость с зараженной культурой нельзя открывать внутри бокса или инкубатора. Более того, все отходы должны быть обеззаражены и выброшены немедленно после завершения работы. Такие правила работы подчиняются установленным национальным правилам безопасности, которые требуют, чтобы перед выбрасыванием отходы от работы с клеточной культурой, включая среду, инактивировались с использованием дезинфицирующих средств, а все загрязненные материалы перед выбрасыванием или сжиганием автоклавировались.

Риск заражения является наиболее общей проблемой при работе с культурой клеток. Заражению способствуют различные факторы, включая несоблюдение правил работы, недостаточный уровень стерильности и личной

гигиены работающих. Последний фактор важен, поскольку наиболее общим источником инфекций, таких как бактерии, дрожжи и грибы, является именно исполнитель работы. Поддерживая рабочее место в чистоте и применяя необходимые методы стерилизации, можно уменьшить риск инфекций. Однако, если заражение произошло, следует немедленно отреагировать и решить эту проблему. В связи с этим необходимо знать возможные типы инфекций и как они выглядят.

В культуре клеток животных бактериальные и грибковые инфекции относительно легко идентифицировать и изолировать. Другой наиболее общий тип заражения — это микоплазма. Это очень маленькие (приблизительно 3 мкм в диаметре) самореплицирующиеся прокариоты. Они теряют жесткую клеточную стенку и обычно инфицируют цитоплазму клеток млекопитающих. Существует по крайней мере пять видов, способных заразить клетки в культуре: *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* и *Acholeplasma laidlawii*. Заражение этими организмами нелегко идентифицировать и устранить. Кроме того, если заражение вовремя не выявить, микоплазма будет оказывать медленное, но вредное действие на культуру, включая изменения в метаболизме, синтезе ДНК, РНК и белков, морфологии и росте. Это может приводить к невоспроизводимым, ненадежным экспериментальным результатам и быть причиной появления опасных биологических продуктов.

2.4.2 Идентификация и уничтожение бактериальных и грибковых инфекций

Бактериальное и грибковое заражение легко определить, поскольку инфицирующие агенты определяются невооруженным глазом даже на ранних стадиях. Заражение можно подозревать при увеличении мутности и изменении цвета культуральной среды, происходящих из-за изменения pH, вызываемого инфекцией. Кроме того, бактерии могут быть легко идентифицированы под микроскопом, где они выглядят как подвижные округлые тельца. Грибы отличаются длинными гифами и образуют в среде пушистые колонии. В большинстве случаев наиболее простое решение — удаление и уничтожение зараженных культур. На ранних стадиях можно попытаться устранить инфицирующие микроорганизмы, используя многократные промывания и инкубацию с антибиотиками или антигрибковыми агентами, однако, как правило, это неразумно, так как манипуляции с зараженными культурами на стерильном рабочем месте увеличивает вероятность распространения заражения.

Необходимо регулярно выполнять проверку культур на стерильность, являющуюся одной из составляющих правильной лабораторной практики и гарантирующую отсутствие в культуре микробных организмов. Это особенно важно, когда готовят продукты культуры клеток или клетки для хранения. Как правило, присутствие таких организмов определяется достаточно рано для того, чтобы принять необходимые мер безопасности и избежать распространения заражения в лаборатории. Процедура тестирования обычно состоит в культивировании суспензии клеток или продуктов

в подходящей среде, такой как триптон-соевый бульон для определения бактерий или тиогликолевая среда для определения грибов. Смесь инкубируют в течение 14 дней, но осматривают ежедневно на присутствие мутности, которая служит индикатором микробного роста. Очень важно ставить параллельно положительный и отрицательный контроли для тестируемого образца. Для этих целей вместо тестируемых клеток или продуктов используются суспензия бактерии типа *Bacillus subtilis* или грибов. В качестве отрицательного контроля служат флаконы с ростовой средой, в которую не вносят посевной материал. Любое заражение в культуре клеток приводит к помутнению среды, что является положительным контролем. Отрицательный контроль должен оставаться прозрачным. Зараженные культуры выбрасывают, а прозрачные культуры являются безопасными для использования или хранения.

2.4.3 Обнаружение заражений микоплазмами

Как отмечается большинством исследователей, работающих с культурой клеток, наиболее распространенным является заражение микоплазмами. Причина этого состоит в том, что такая инфекция неочевидна при наблюдении в световом микроскопе и не определяется по помутнению в среде. Возникающие изменения едва различимы и проявляются, как правило, в замедлении роста и изменении клеточного метаболизма и функций. Однако после уничтожения микоплазм клетки обычно относительно быстро возвращаются к исходной морфологии и нормальной скорости пролиферации.

Заражение микоплазмами в культурах до последнего времени было трудно определять, и образцы приходилось анализировать в специальных лабораториях. В настоящее время в наличии имеются усовершенствованные методы для обнаружения микоплазм. Для анализа используют либо саму инфицированную культуру, либо применяют непрямое окрашивание ДНК, используя флуоресцентным красителем Hoechst 33258. Раньше суспензию клеток вносили в жидкую среду и инкубировали в аэробных условиях при 37 °С в течение 14 дней. Флакон с незасеянной средой использовали в качестве отрицательного контроля. Аликвоты среды отбирали каждые три дня и высевали на чашку с агаром, которую инкубировали в анаэробных условиях. Затем спустя 14 дней все чашки анализировали с помощью инвертированного микроскопа при 300-кратном увеличении. Положительный контроль показывает типичное образование колоний микоплазмы, которые имеют непрозрачную гранулярную центральную зону, окруженную полупрозрачной каймой (такие структуры напоминают по внешнему виду яичницу-глазунью, рис. 2.3). Параллельно можно ставить положительные контроли на чашках и во флаконах с известными штаммами микоплазмы, такими как *Mycoplasma orale* или *Mycoplasma pneuponiae*.

Метод связывания ДНК предлагает быстрое альтернативное определение микоплазмы и основывается на том принципе, что Hoechst 33258 флуоресцирует в ультрафиолетовом свете, когда связывается с ДНК. Таким образом, флуоресценция проявляется в цитоплазме зараженных микоплазмой клеток. В незараженных клетках флуоресценция возникает только в ядрах.

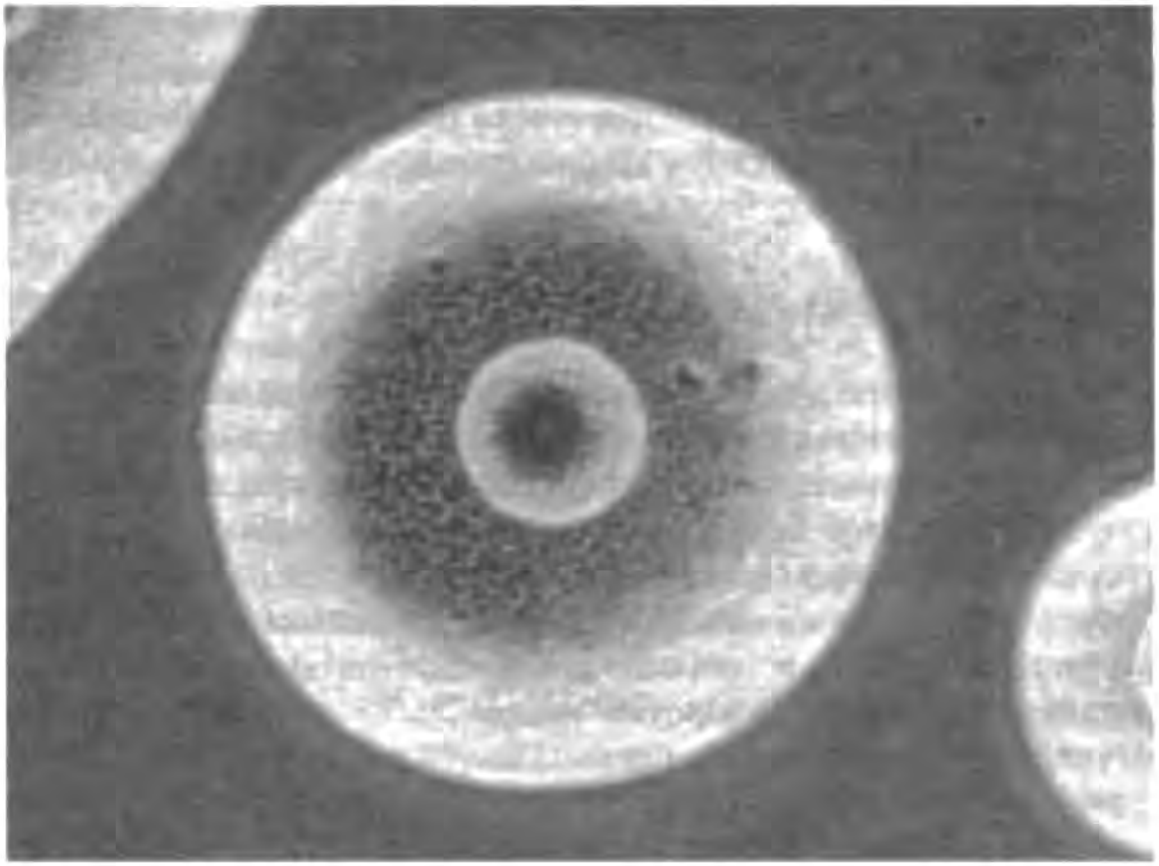


Рис. 2.3. Фотография микоплазмы, демонстрирующая непрозрачную гранулярную центральную зону, окруженную полупрозрачной каймой; такая структура напоминает по внешнему виду яичницу-глазунью

Исследование с помощью Hoechst 33258 быстрое, но относительно менее чувствительное по сравнению с описанным выше методом культивирования. Для этого метода аликвоту тестируемой культуры помещают на стерильное покровное стекло в культуральную чашку диаметром 35 мм и инкубируют при 37 °С в клеточном инкубаторе; клетки при этом прикрепляются. Покровное стекло затем фиксируют добавлением свежеприготовленного фиксатора, состоящего из одной части ледяной уксусной кислоты и трех частей метанола. На покровное стекло добавляют свежеприготовленный раствор Hoechst 33258, инкубируют в темноте при комнатной температуре, позволяя красителю связаться с ДНК, а затем наблюдают ультрафиолетовую флуоресценцию при 1000-кратном увеличении. Флуоресценция ДНК микоплазмы выглядит как небольшие кокки или филаменты в цитоплазме зараженных клеток (рис. 2.4, *б*; цветная вклейка). В незараженных культурах проявляется только флуоресценция ядер клеток на фоне темной цитоплазмы (рис. 2.4, *а*; цветная вклейка). Однако и в этом методе возможны ошибки, включая ложноотрицательные результаты. Чтобы их устранить, клетки до использования культивируют в свободной от антибиотиков среде на протяжении двух-трех пассажей. Важное значение имеет положительный контроль со штаммом микоплазмы, высеянным на покровное стекло. Такие контроли должны храниться вне лаборатории, чтобы избежать заражения. Важно быть уверенным также, что флуоресценция не результат бактериального заражения или свечения включений в материале пластиковой посуды,

попавших туда в процессе производства. В первом случае (при бакзаражении) светящиеся частицы крупнее, чем флуоресцирующие кокки или филаменты микоплазмы. Включения же в пластик дают неравномерную флуоресценцию, зависящую от размера частиц, обычно обнаруживаемых в пластике.

2.4.4 Уничтожение микоплазмы

До недавнего времени для уничтожения микоплазмы чаще всего использовали антибиотики, например гентамицин. Этот подход, однако, эффективен не во всех случаях, поскольку не все штаммы микоплазмы чувствительны к гентамицину. Более того, терапия с помощью антибиотиков не всегда приводит к продолжительному эффекту, а большинство лекарств могут оказаться токсичными для культуры клеток. Недавно появился бактерицидный препарат нового поколения, названный Plasmocin™, оказавшийся эффективным против микоплазмы даже при относительно низких, нетоксичных концентрациях. Антибиотики, содержащиеся в этом препарате, активно транспортируются в клетки, облегчая уничтожение внутриклеточной микоплазмы, но не оказывая вредного воздействия на клеточный метаболизм.

Кроме антибиотиков появляются различные другие продукты, которые призваны быстро и эффективно уничтожать микоплазму, не оказывая вредного влияния на клетки. Один из таких продуктов, Mynox, представляет собой биологический агент, который встраивается в мембрану микоплазмы, нарушая ее целостность и в конечном итоге инициируя ее разрушение. Этот процесс происходит примерно в течение часа после внесения Mynox; дополнительное преимущество состоит в том, что этот агент не является антибиотиком и поэтому не будет приводить к появлению устойчивых штаммов. Он безопасен для культур и удаляется при замене среды. Более того, это высокочувствительный реагент, детектирующий такие малые количества ДНК микоплазмы, как 1–5 фг, что соответствует присутствию 2–5 клеток микоплазмы на образец; он эффективен против множества распространенных видов микоплазмы, встречающихся в культуре клеток.

2.5 ТИПЫ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК. ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Клетки, используемые в культуре, разделяются на два типа — первичную культуру и клеточную линию.

2.5.1 Первичные культуры клеток

Первичные культуры представляют собой клетки, полученные непосредственно из тканей после ферментативного разделения или из фрагментов ткани, называемых эксплантами и культивируемых в искусственной среде. Первичным культурам отдается предпочтение, поскольку считается, что

они сохраняют свои характеристики и отражают реальное состояние клеток *in vivo*. Однако недостаток использования первичной культуры состоит в том, что их выделение может быть трудоемким и приводить к гетерогенной популяции клеток. Более того, первичные культуры имеют ограниченный срок жизни и могут использоваться в культуре ограниченный период времени.

Первичные культуры могут быть получены из различных тканей, и их источник зависит от выделяемого типа клеток. Например, клетки, выделенные из эндотелия кровеносных сосудов, называются эндотелиальными клетками, тогда как клетки из медиального слоя сосуда или других подобных тканей являются гладкомышечными клетками. Хотя оба вида клеток могут быть получены из одних и тех же сосудов, эндотелиальные клетки отличаются по морфологии и функции, растут обычно монослоем и напоминают крупную гальку. Гладкомышечные клетки вытянуты, имеют веретенообразные выступы на обоих концах и растут слоями даже в культуре. В дополнение к этим клеткам существуют другие широко используемые первичные культуры, происходящие из различных тканей, включая фибробласты из соединительных тканей, лимфоциты из крови, нейроны из нервных тканей и гепатоциты из ткани печени.

2.5.2 Клеточные линии

Клеточные линии состоят из клеток одного вида, обладающих способностью к неограниченному росту. Они обычно получаются после трансформации клеток одним из нескольких способов, включая обработку канцерогенами или заражение вирусом, например обезьяньим вирусом SV40, вирусом Эпштейна–Барр или вирусом Абельсона (вирус лейкоза грызунов). Это воздействие приводит к тому, что клетки теряют способность к регулярному росту. Трансформированные клетки растут непрерывно и, в отличие от первичной культуры, имеют неограниченный период жизни (становятся «**бессмертными**»). Недостаток состоит в том, что трансформированные клетки, как правило, теряют некоторые присущие им *in vivo* характеристики. Например, некоторые линии клеток не экспрессируют определенные тканеспецифичные гены. Одним из примеров является неспособность линий клеток печени продуцировать факторы свертывания. Линии клеток, однако, имеют некоторые преимущества по сравнению с первичными культурами и не только потому, что бессмертны. Они требуют меньше сыворотки для роста, имеют более короткое время удвоения и могут расти, не прикрепляясь и не прилипая к поверхности сосуда.

В настоящее время доступны многие линии клеток из разных банков, что упрощает их получение. Одной их крупнейших организаций, владеющих клеточными линиями, является Европейская коллекция клеточных линий животных (European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC), находящаяся в Салисбури (Великобритания). Несколько различных линий клеток, предлагаемых этой организацией, представлено в табл. 2.1.

Таблица 2.1. **Некоторые часто используемые клеточные линии, предоставляемые банками клеток**

Клеточная линия	Морфология	Виды	Происхождение ткани
BAE-1	Эндотелий	Бычий	Аорта
BHK-21	Фибробласты	Сирийский хомяк	Почка
CHO	Фибробласты	Китайский хомяк	Яичник
COS-1/7	Фибробласты	Африканская зеленая мартышка	Почка
HeLa	Эпителий	Человек	Шейка матки
HEK-293	Эпителий	Человек	Почка
HT-29	Эпителий	Человек	Толстая кишка
MRC-5	Фибробласты	Человек	Легкие
NCI-H660	Эпителий	Человек	Легкие
NIH/3T3	Фибробласты	Мышь	Эмбрион
THP-1	Моноциты	Человек	Кровь
V-79	Фибробласты	Китайский хомяк	Легкие
HEP1	Гепатоциты	Человек	Печень

2.5.3 Среда для культуры клеток и условия выращивания животных клеток

Среда, используемая для роста животных клеток, представляет собой сложную смесь питательных веществ (аминокислот, углеводов, например глюкозы, и витаминов), неорганических солей (содержащих ионы магния, натрия, калия, кальция, фосфата, хлорида, сульфата и бикарбоната) и широкий спектр антибиотиков. В определенных ситуациях в состав среды включают фунгицид типа амфотерицина B, хотя это не всегда необходимо. Для удобства и легкости контролирования состояния среды может быть добавлен индикатор pH феноловый красный. При pH 7,2–7,4 его цвет красный, но как только pH становится кислым или щелочным, индикатор станет желтым или цвета фуксии соответственно.

Другим ключевым компонентом среды для культуры клеток является сыворотка крови, обычно бычьей или телячьей. Она придает культуральной среде буферные свойства, но, что более важно, повышает прикрепляемость клеток и дает дополнительные питательные вещества и гормоно-подобные факторы роста, которые содействуют нормальному росту клеток. Попытки культивировать клетки в отсутствие сыворотки обычно не приводят к получению здоровых культур, даже если клетки могут сами продуцировать факторы роста. Однако, несмотря на эти преимущества, присутствие сыворотки все чаще оспаривается и не только из-за того, что с ней могут быть внесены неизвестные компоненты, включая инфекционные агенты, такие как вирусы и микоплазма. Последний случай возникновения «коровьего бешенства» (губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота) стал дополнительным источником беспокойства, поскольку отражает определенный риск для персонала, работающего с клеточной культурой. В результате

возникает необходимость в создании альтернативных продуктов. В связи с этим в настоящее время производители реагентов для культуры клеток разработали свободные от сыворотки среды, содержащие различные компоненты, включая альбумин, трансферрин, инсулин, факторы роста и другие элементы, необходимые для оптимального роста клеток. Их применение осуществляется весьма успешно, особенно в фармацевтических и биотехнологических компаниях, производящих лекарства или биологические продукты для человека или животных.

2.5.4 Приготовление среды для культуры клеток животных

Приготовление культуральной среды может восприниматься как простая процедура, которой часто не уделяется необходимого внимания. В результате большинство инфекций в лабораториях, работающих с культурами клеток, происходит из зараженной среды. Следуя простым, но эффективным рекомендациям, описанным в разд. 2.4.1, можно предотвратить или свести к минимуму риск заражения сред в процессе их приготовления.

Приготовление среды должно выполняться внутри культурального бокса и обычно состоит в добавлении необходимого количества сыворотки вместе с антибиотиками к определенному объему среды. Количество используемой сыворотки зависит от вида клеток, но обычно варьирует между 10% и 20%. Среди антибиотиков чаще всего применяются пенициллин и стрептомицин, которые ингибируют широкий спектр грамположительных и грамотрицательных бактерий. Действие пенициллина основано на ингибировании последнего этапа в синтезе клеточной стенки бактерий, тогда как стрептомицин блокирует синтез белка.

Приготовленная смесь, называемая полной клеточной средой, до момента использования хранится при 4 °C. Чтобы снизить расход реактивов и риск заражения, следует готовить только необходимое количество среды и употреблять ее в короткий промежуток времени. В качестве дополнительной меры предупреждения заражения следует всегда проверять прозрачность среды до ее использования. Любая среда, которая покажется непрозрачной или мутной, должна быть немедленно выброшена. Кроме проверки прозрачности пристальное внимание должно быть уделено цвету среды, который при физиологических значениях pH остается красным благодаря присутствию фенолового красного. Среда, которая выглядит кислой (желтая) или щелочной (фуксия), должна быть выброшена, поскольку такие экстремальные значения pH будут влиять на жизнеспособность и рост клеток.

2.5.5 Субкультура (пассированная культура) клеток

Субкультивирование представляет собой процесс, посредством которого клетки наращиваются, разводятся в свежей клеточной среде и помещаются в новый культуральный флакон, что способствует их дальнейшему росту. Этот процесс, известный также как пассирование, играет существенную роль для поддержания клеток в здоровом и жизнеспособном состоянии,

иначе, спустя определенный период времени в непрерывной культуре, они могут погибать. Причина этого заключается в том, что прикрепленные клетки растут непрерывным слоем, который со временем занимает всю поверхность культуральной чашки, и при этом они становятся **конфлюэнтными** (слитыми в единую массу). Как только это происходит, клетки прекращают делиться и переходят в состояние покоя, при котором они не растут (**старение**) и умирают. Таким образом, чтобы поддерживать клетки в состоянии жизнеспособности и облегчать эффективную трансформацию, их необходимо субкультивировать, избегая тем самым полного ингибирования роста. В идеальной ситуации клетки следует пересевать до того, как они достигнут конфлюэнтного состояния.

Для наращивания и субкультивирования клеток используют один из следующих методов. Выбор конкретного метода зависит от того, находятся клетки в суспензии или прикреплены.

Субкультивирование адгезивных (прикрепленных) клеток. Прикрепленные клетки собирают либо механическим способом с помощью резинового шпателя, либо с помощью протеолитических ферментов. Клетки в суспензии просто разводятся свежей средой путем добавления к данному объему суспензии клеток равного объема среды.

Механический сбор клеток. Этот метод простой и легкий. Он состоит в осторожном выскабливании клеток с ростовой поверхности в культуральную среду с помощью резинового шпателя («резинового полицейского»), который имеет жесткую полистирольную ручку и гибкое полиэтиленовое соскребающее лезвие (рис. 2.5). Такой метод подходит не для всех видов клеток, поскольку соскребание может приводить к повреждению клеточной мембраны и гибели клеток. До применения такого метода важно выполнить тест, при котором проверяют жизнеспособность и рост небольшого образца клеток после механического сбора.

Сбор клеток с использованием протеолитических ферментов. Можно применять различные протеолитические ферменты, включая трипсин — протеолитический фермент, который разрушает белковые связи между клетками и между клетками и поверхностью флакона, в котором они растут. В результате сбор клеток при помощи этого фермента приводит к высвобождению отдельных клеток, что является идеальным для субклонирования, поскольку каждая клетка будет затем делиться и расти, обеспечивая размножение культуры.

Трипсин обычно используется в комбинации с ЭДТА, который усиливает действие фермента. Сам по себе ЭДТА также эффективен для отделения прикрепившихся клеток, поскольку он образует хелатный комплекс с Ca^{2+}, необходимым для некоторых адгезионных молекул, облегчающих взаимодействия клетки с клеткой или клетки с матриксом. Хотя ЭДТА обладает более мягким действием по отношению к клеткам, чем трипсин, некоторые виды клеток могут сильно прикрепляться к пластику, и в таком случае все же необходимо использовать трипсин.

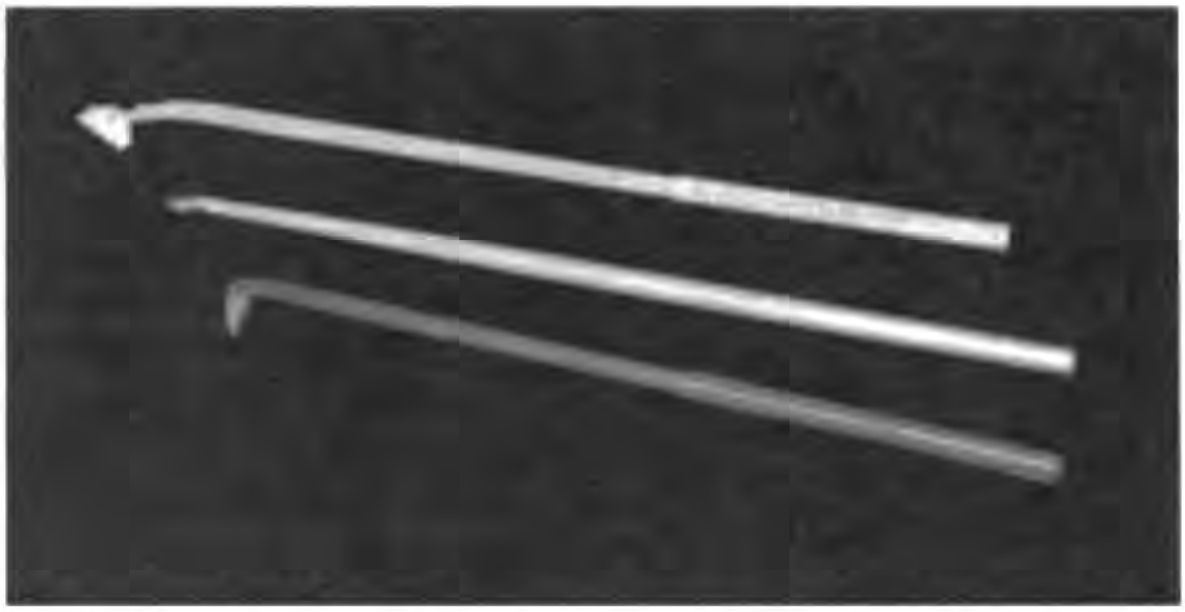


Рис. 2.5. Шпатели для сбора клеток

Стандартная процедура для отделения прикрепившихся клеток с использованием ЭДТА и трипсина состоит в приготовлении рабочего раствора 0,1%-го трипсина и 0,02%-го ЭДТА в свободном от Ca^{2+}/Mg^{2+} фосфатно-солевом буфере (PBS, phosphate buffer saline). Ростовая среда отсасывается из конфлюэнтной культуры, и клетки промываются по меньшей мере дважды свободной от сыворотки средой, например PBS свободным от Ca^{2+} или Mg^{2+}, чтобы удалить следы сыворотки, которая может инактивировать трипсин. Раствор трипсин-ЭДТА (приблизительно 1 $см^3$ на 25 $см^2$ площади поверхности) добавляется затем на монослой клеток и перемешивается круговыми движениями в течение нескольких секунд. Избыток раствора трипсин-ЭДТА отсасывают, оставляя количество, необходимое для образования тонкой пленки, покрывающей монослой. Флакон затем инкубируют при 37 °С в инкубаторе для культуры клеток в течение 2–5 минут, периодически проверяя в световом микроскопе, не начали ли открепляться клетки. Необходимо быть уверенным, что клетки не передерживаются в трипсине, поскольку это может приводить к повреждению поверхности клетки, вызывая ее гибель. Важно поэтому, чтобы реакция протеолиза быстро останавливалась добавлением полной среды, содержащей сыворотку, которая инактивирует трипсин. Суспензию клеток собирают в стерильную центрифужную пробирку, и клетки осаждают при 1000 об/мин в течение 10 минут, а затем вновь ресуспендируют в известном объеме свежей полной культуральной среды, создавая требуемую плотность клеток.

Как и для всех процедур при работе с культурой тканей, необходимо постоянно соблюдать условия стерильности. Это означает, что все выше перечисленные процедуры должны выполняться в культуральном боксе в стерильных условиях. Важно придерживаться и других меры безопасности, включая хранение запасного раствора трипсина. Он должен храниться замороженным при –20 °С и при необходимости помещаться в водяную баню до состояния оттаивания. Любое дополнительное время в водяной бане при 37 °С будет инактивировать ферментативную активность трипсина. Рабочий раствор должен храниться при 4 °С после приготовления не более трех месяцев.

Субкультура клеток в суспензии. Для клеток в суспензии важно первоначально исследовать аликвоту клеток под микроскопом, чтобы установить, растут ли клетки в виде отдельных клеток или в группе. Если культура наращивается в виде отдельных клеток, аликвоты анализируют, как описано ниже в разд. 2.5.6, и затем пересеивают в новый флакон с разведением до желаемой плотности с помощью свежей среды, таким образом исходная среда, в которой наращивались клетки, не истощается. Однако, если среда истощилась и кажется кислой, клетки центрифугируют при 1000 об/мин, ресуспендируют в свежей среде и переносят в новый флакон. Клетки, растущие группами, прежде всего центрифугируют и ресуспендируют в свежей среде до образования отдельных клеток с помощью пипетки Пастера.

2.5.6 Подсчет клеток

При субкультивировании клеток для оптимального роста очень важно высевать их с определенной плотностью. Если плотность клеток низкая, им понадобится больше времени, чтобы достигнуть конфлюэнтности, и некоторые из них могут умереть до достижения этого состояния. В то же время высеянные с большой плотностью клетки будут достигать конфлюэнтности слишком быстро, что приводит к невоспроизводимости экспериментальных результатов. Это происходит по той причине, что трипсин может расщеплять поверхностные белки, включая рецепторы лекарств, и необходимо некоторое время (иногда несколько дней), чтобы их восстановить. Отсутствие таких белков на поверхности клетки может поэтому приводить к изменению реакций на лекарства, специфичные по отношению к таким рецепторам.

В настоящее время существует несколько методов для подсчета клеток, и среди них наиболее распространено применение гемоцитометра. Его преимущество состоит в простоте и дешевизне. Он представляет собой маленькую стеклянную камеру с решетками, высеченными в стекле. Камера имеет фиксированный объем и расчерчена на девять больших квадратов размером 1 мм × 1 мм и глубиной 0,1 мм; большие угловые квадраты содержат по 16 маленьких квадратов каждый (рис. 2.6).

Таким образом, каждый закрытый покровным стеклом кубик имеет объем 0,1 мм^3 (площадь 1,0 мм^2 и высота 0,1 мм) или 10^{-4} см^3. Зная это, можно определить концентрацию клеток (и общее число клеток) и выразить ее в пересчете на кубический сантиметр. Процедура подсчета состоит в нанесении приблизительно 10 мкл клеточной суспензии в чистую камеру гемоцитометра и подсчете клеток внутри четырех угловых квадратов с помощью микроскопа при 20-кратном увеличении. Результат подсчетов представляют в виде числа клеток на 1 см^3 суспензии.

Чтобы гарантировать точность, покровное стекло должно быть установлено плотно на месте, что достигается его увлажнением: следует подышать на стекло и осторожно накрыть им камеру, прижимая до тех пор, пока не появятся кольца Ньютона (обычно в виде радуги). Следует подсчитать общее число клеток в каждом из угловых квадратов с

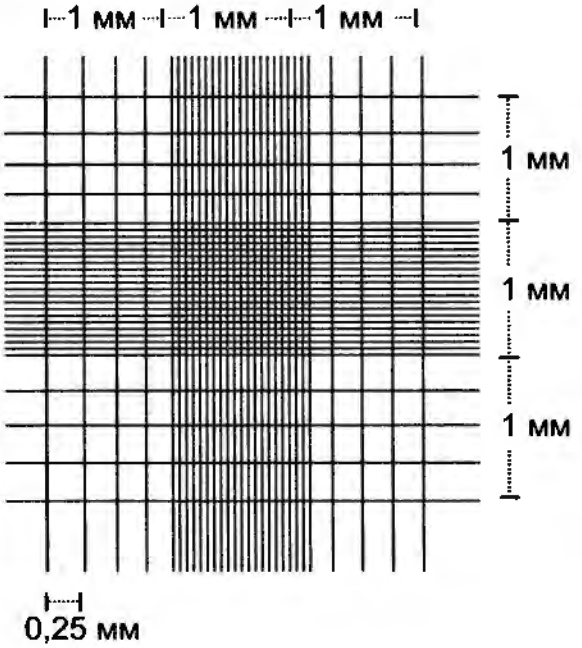


Рис. 2.6. Гемоцитометр

площадью 1 мм^3, причем считают только клетки, касающиеся верхнего или левого края, но не нижнего или правого края. Кроме того, не нужно подсчитывать клетки вне больших квадратов, даже если они находятся в поле зрения. Если имеются группы клеток, их считают за одну клетку. В оптимальном варианте нужно подсчитать более 100 клеток, чтобы гарантировать высокую степень точности подсчета. Если общее число клеток меньше 100 или если более 10% подсчитанных клеток собрано в кластеры, то исходную клеточную суспензию необходимо тщательно перемешать, а затем повторить процедуру подсчета. Аналогичным образом, если общее число клеток превышает 400, суспензию нужно развести, чтобы получить число клеток от 100 до 400.

Поскольку некоторые клетки не выживают после обработки трипсином, целесообразно до начала подсчета к небольшой аликвоте клеточной суспензии добавлять равный объем красителя трипанового синего. Этот краситель не захватывается живыми клетками, а только мертвыми. Таким образом, наблюдаемые под микроскопом живые клетки будут выглядеть как яркие полупрозрачные структуры, тогда как мертвые клетки окрашены в голубой цвет (см. разд. 2.5.12). Поэтому число мертвых клеток можно вычесть из общего числа клеток, и, таким образом, плотность высева будет точно соответствовать числу живых клеток.

Выполнение расчетов

Число клеток обычно приводят в расчете на кубический сантиметр и определяют умножением среднего числа клеток на **фактор пересчета**, который является постоянным для каждого гемоцитометра. Фактор пересчета оценивается как 1000 на основании того факта, что каждый подсчитанный большой квадрат имеет общий объем 10^{-4} см^3.

Таким образом:

$$\text{Клетки в 1 см}^{-3} = \frac{\text{Число подсчитанных клеток}}{\text{Число подсчитанных квадратов}} \times \text{Фактор пересчета}$$

Если суспензию клеток до подсчета разводили, то должен приниматься во внимание фактор разведения. Поэтому:

$$\text{Клетки в 1 см}^{-3} = \frac{\text{Число подсчитанных клеток}}{\text{Число подсчитанных квадратов}} \times \text{Фактор пересчета} \times \text{Фактор разведения}$$

Чтобы определить общее число выращенных клеток, число клеток в 1 $см^3$ умножают на исходный объем жидкости, из которой был взят образец этих клеток, т. е.:

Общее число клеток = Клетки в 1 $см^{-3}$ · Общий объем клеток

Альтернативные методы определения числа клеток

Существуют и другие методы подсчета клеток в культуре, включая прямое измерение с помощью **электронного счетчика Култера**. Это автоматический метод подсчета и измерения размера микроскопических частиц. Счетчик состоит из стеклянного зонда с электродом, который соединен с осциллографом (рис. 2.7). Зонд имеет на конце маленькое отверстие фиксированного диаметра. Когда его помещают в суспензию клеток, клетки проникают через отверстие, вызывая кратковременное увеличение сопротивления из-за частичного прерывания электрического тока. Это приводит к перепадам напряжения, регистрируемым осциллографом, и каждый перепад подсчитывается как клетка. Недостатком этого метода является то, что он не позволяет различать живые и мертвые клетки.

ПРИМЕР 1 ПОДСЧЕТ ЧИСЛА КЛЕТОК

Вопрос Подсчитать общее число клеток, суспендированных в конечном объеме 5 $см^3$, учитывая, что клетки перед подсчетом были разведены вдвое, а число клеток, определенное с помощью гемоцитометра составило 400.

Ответ

$$\text{Клетки в см}^{-3} = \frac{\text{Число подсчитанных клеток}}{\text{Число подсчитанных больших квадратов}} \cdot \text{Фактор пересчета} =$$

$$= \frac{400}{4} \cdot 1000 = 100\,000 \text{ клеток/см}^3$$

Поскольку фактор разведения равен 2, то исходное число клеток в 1 $см^3$ равно:

$100\,000 \cdot 2 = 200\,000$ клеток/$см^3$.

Таким образом, в объеме 5 $см^3$ общее число клеток:

$200\,000 \cdot 5 = 1\,000\,000$ клеток.

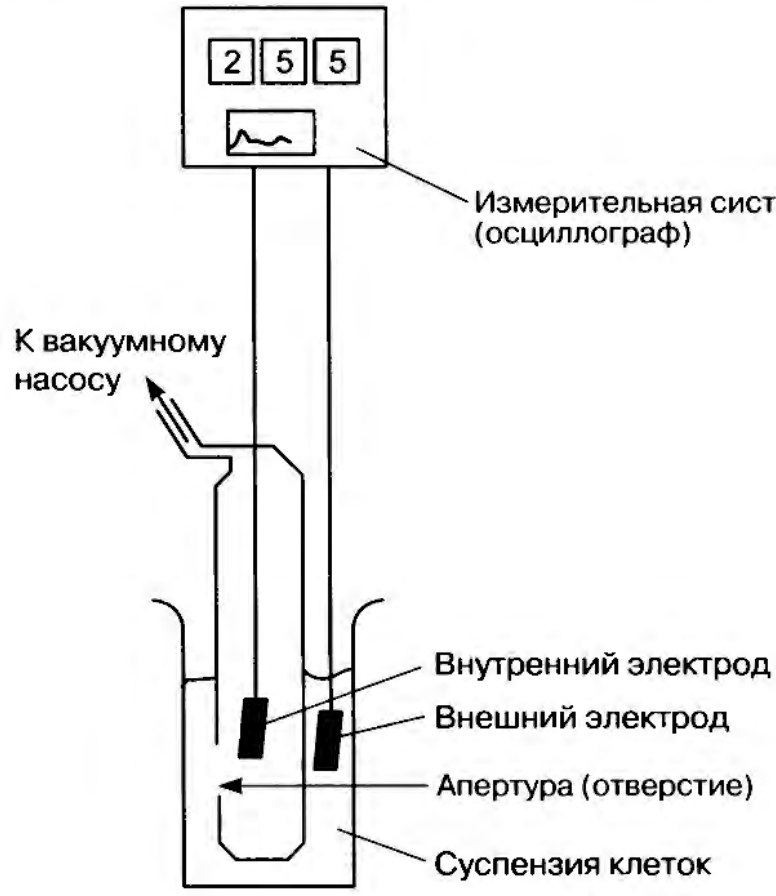


Рис. 2.7. Счетчик Култера. Клетки, проходя через отверстие, создают сопротивление между внутренним и внешним электродами, которое регистрируется осциллографом

Косвенным образом клетки могут быть подсчитаны посредством определения общего клеточного белка с использованием стандартной кривой соотношения количества белка к числу клеток. Однако содержание белка в клетке может варьировать в процессе культивирования и не отражать истинного числа клеток. Содержание ДНК в клетке также может быть использовано как показатель числа клеток, поскольку содержание ДНК в диплоидных клетках обычно постоянно. Однако оно может изменяться во время клеточного цикла и поэтому не дает точной оценки числа клеток.

2.5.7 Высев клеток на чашки с культуральной средой

Как только клетки подсчитаны, их можно высевать в той плотности, при которой достигается оптимальный рост. При субклонировании клеток очень важно высевать их с необходимой плотностью. Если плотность клеток низкая, они будут нуждаться в более длительном периоде времени для достижения конфлюэнтности и некоторые из них могут погибнуть до достижения этой точки. В то же время высеянные с высокой плотностью клетки будут достигать конфлюэнтности слишком быстро, приводя к невоспроизводимым экспериментальным результатам, как это уже обсуждалось выше (см. разд. 2.5.6). Плотность высева варьирует в зависимости от вида клеток и от площади поверхности культурального флакона, в который их помещают. Эти факторы следует учесть при определении плотности, с которой высеваются клетки данного вида для конкретных экспериментальных целей.

2.5.8 Поддержание клеток в культуре

После высева клеток важно тщательно маркировать флаконы с указанием даты, вида клеток и числа пересевов или субклонирования. Кроме того, должен быть установлен строгий режим субклонирования и питания, что позволяет клеткам получать питание через определенные интервалы. При этом также не истощается среда, не допускается избыточный рост клеток или сверхконфлюэнтность. Этого можно добиться, следуя стандартной процедуре поддержания клеток в жизнеспособном состоянии при оптимальных ростовых условиях. Кроме того, культуру следует ежедневно наблюдать под инвертированным микроскопом, уделяя особое внимание изменениям в морфологии и клеточной плотности. Форма клеток может быть важным показателем для определения статуса растущих культур. Круглые или плавающие клетки обычно являются плохим сигналом и могут служить индикатором инфекционного поражения или гибели клеток. Присутствие слишком крупных клеток может также быть полезным для определения состояния клеток, поскольку число таких клеток увеличивается в процессе старения культуры или когда она становится менее жизнеспособной. Необходимо избегать экстремальных значений pH, регулярно заменяя используемую среду свежей. Эту процедуру выполняют через день до тех пор, пока культура не станет на 90% конфлюэнтной, при этом клетки либо отбирают для экспериментов, либо обрабатывают трипсином и субклонируют, следуя процедуре, описанной в разд. 2.5.5.

Объем среды, добавляемой в культуру, зависит от конфлюэнтности клеток и площади поверхности флаконов, в которых наращиваются клетки. Например, клетки, имеющие конфлюэнтность ниже 25%, могут культивироваться в ~1 $см^3$ среды на 5 $см^2$ поверхности, а те, что имеют конфлюэнтость между 25% и 40% или более 45% должны получать 1,5 $см^3$ или 2 $см^3$ культуральной среды на 5 $см^2$ соответственно. Целесообразно при замещении среды пипетировать ее либо на стенках флакона, либо на его поверхности, удаленной от прикрепившихся клеток, чтобы избежать прямого контакта с монослоем и повреждения или смещения клеток.

2.5.9 Кинетика роста животных клеток в культуре

При поддержании оптимальных условий культуры клетки следуют характерному графику роста (рис. 2.8), проявляющемуся в медленной начальной фазе роста (лаг-фазе), где существует повышенная клеточная активность, но нет явного увеличения клеточного роста. Длительность этой фазы зависит от нескольких факторов, включая жизнеспособность клеток, плотность, при которой они были высеяны, и состав среды.

За лаг-фазой следует экспоненциальная фаза, в которой происходит быстрое увеличение числа клеток с высокой метаболической активностью. Эта фаза со временем переходит в стационарную фазу, при которой нет дальнейшего увеличения роста из-за истощения питательных веществ в среде, накопления токсичных продуктов метаболизма или ограничения в

Рис. 2.8. Кривая роста, демонстрирующая фазы роста клеток в культуре

ростовом пространстве. Если клетки не собрать, то они начнут погибать, переходя к фазе отмирания на кривой роста.

2.5.10 Криоконсервация клеток

Клетки можно хранить для дальнейшего использования, замораживая их в жидком азоте. Этот процесс известен как **криоконсервация** и является эффективным способом поддержания запасных культур. Действительно, когда имеется в распоряжении хорошая культура, целесообразно хранить ее аликвоты в замороженном состоянии. Это обеспечивает возобновляемый источник клеток, которые могут быть использованы в дальнейшем без необходимости приготовления новой партии культуры из тканей. Однако замораживание может приводить к некоторым летальным изменениям в клетках, включая образование кристаллов льда и изменении в концентрации электролитов и pH. Чтобы свести к минимуму такой риск, до замораживания к клеткам обычно добавляют предохраняющее вещество типа ДМСО, понижающее температуру замерзания и предотвращающее образование кристаллов льда внутри клеток. Кроме того, процесс замораживания выполняют постепенно, позволяя клеткам сначала медленно охлаждаться от комнатной температуры до –80 °C со скоростью 1–3 град/мин. Эта начальная стадия может выполняться в камере для заморозки или специальном контейнере («MrFrosty»), заполненном изопропанолом, что обеспечивает необходимую циклическую скорость охлаждения ~ 1 град/мин. Когда этот процесс завершен, криогенные емкости, представляющие собой полипропиленовые пробирки, выдерживающие низкую температуру порядка –190 °C, вынимают и немедленно помещают в сосуд с жидким азотом, где они могут оставаться бесконечно долго до их востребования.

Существующая процедура заморозки клеток состоит в наращивании клеток, как это описано в разд. 2.5.5, и ресуспендировании их в 1 см^3 специальной сре-

ды для замораживания, которая представляет собой культуральную среду, содержащую 40% сыворотки. В суспензии определяют число клеток и разводят ее до конечного значения от 10^6 до 10^7 клеток на $см^3$. Аликвоту 0,9 $см^3$ переносят в криогенную емкость, помеченную этикеткой с названием типа клеток, числом пассажей и датой сбора. Затем объем суспензии доводят до 1 $см^3$ добавлением 100 $мм^3$ ДМСО в конечной концентрации 10%. Клетки затем следует осторожно перемешать путем поворачивания или переворачивания емкости и поместить в контейнер «MrFrosty». Замороженные пробирки затем переносят в контейнер с жидким азотом. На этой стадии клетки могут храниться замороженными до тех пор, пока не возникает необходимость в их использовании.

Все процедуры должны выполняться в стерильных условиях, чтобы избежать заражения культуры, поскольку заражение обязательно проявится, как только замороженные клетки заново начнут культивировать. В качестве дополнительной меры предосторожности целесообразно заменить ростовую среду за 24 часа до подращивания клеток для замораживания. Более того, желательно, чтобы клетки, используемые для замораживания, находились в экспоненциальной фазе роста и не были слишком конфлюэнтными, если они уже находятся в стадии задержки роста.

2.5.11 Высев клеток после разморозки

При необходимости замороженные клетки можно оживить, вынимая криогенные емкости из хранилища с жидким азотом и помещая их в водяную баню при 37 °C на 1–2 мин или до тех пор, пока расплавятся кристаллы льда. Важно, чтобы бутылочки не нагревались выше 37 °C, так как это может вызвать быструю гибель клеток. Оттаявшую суспензию клеток затем переносят в центрифужную пробирку, в которую добавляют свежую среду, и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отбрасывают, чтобы удалить ДМСО, использованный в процессе заморозки, а осадок клеток ресуспендируют в 1 $см^3$ свежей среды, используя пипетку Пастера, стараясь разделить слипшиеся комки клеток до отдельных клеток. Необходимое количество свежей заранее подогретой среды добавляют в культуральный флакон, и клетки переносят в этот флакон, который затем помещают в клеточный инкубатор, где клетки прикрепляются и растут.

2.5.12 Определение жизнеспособности клеток

Определение жизнеспособности клеток — очень важный момент, так как выживание и рост клеток может зависеть от плотности, с которой они были высеяны. Степень жизнеспособности обычно определяют, подсчитывая живые и погибшие клетки, используя **метод вытеснения красителя**. Обычно живые клетки вытесняют определенные красители, которые захватываются погибшими клетками. В результате мертвые клетки окрашиваются, в то время как живые клетки остаются полупрозрачными из-за неспособности красителя проникать в цитоплазму. Одним из часто применяемых в таких исследованиях красителей является трипановый синий. Суспензию клеток сначала инкубируют с красителем в концентрации 0,4%, помещают

в гемоцитометр, а затем рассматривают в инвертированном микроскопе при 100-кратном увеличении. Клетки подсчитывают, как это описано в разд. 2.5.6, считая отдельно живые и погибшие клетки.

Общее число клеток вычисляют, используя следующее уравнение, как это описано выше:

$$\text{Клетки в 1 см}^{-3} = \frac{\text{Число подсчитанных клеток}}{\text{Число подсчитанных квадратов}} \times \text{Фактор пересчета} \times \text{Фактор разведения}$$

Процент жизнеспособных клеток определяют по формуле:

$$\%\ \text{жизнеспособных клеток} = \frac{\text{Число подсчитанных неокрашенных клеток}}{\text{Общее число подсчитанных клеток}} \times 100$$

Во избежание недооценки жизнеспособности клеток важно, чтобы клетки до подсчета не оставались с красителем более пяти минут, поскольку захват клетками трипанового синего усиливается со временем, так что краситель может начать захватываться и живыми клетками. Кроме того, трипановый синий имеет высокое сродство к белкам сыворотки и поэтому может давать сильный фон при окрашивании. Следовательно, суспензия клеток не должна содержать сыворотку, от которой ее перед подсчетом клеток отмывают с помощью PBS.

2.6 КУЛЬТУРА КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

Как и в случае животных клеток, чистые бактериальные культуры (культуры, которые содержат только один вид организма) культивируют рутинным способом и поддерживают неограниченно долго, используя набор стандартных методов. Однако, поскольку бактериальные клетки проявляют более широкую степень разнообразия в смысле требований к питанию и к окружающим условиям, методы их культивации различны и зависят от конкретных видов. Ниже обсуждаются основные методы культивирования и техника безопасности при работе с бактериальной культурой клеток.

2.6.1 Техника безопасности при работе с бактериальными культурами

Культура микробных клеток, подобно клеткам животных, требует внимания и стерильных методов работы не только для предотвращения загрязнения чистой культуры другими организмами. Очень важно уделять внимание технике безопасности работающих в лаборатории, особенно при контакте с потенциально опасными организмами. Методы стерилизации и условия безопасности, описанные для культуры клеток животных, должны применяться и здесь. Кроме того, инструменты, используемые для культивирования,

должны до и после употребления стерилизоваться нагреванием в пламени горелки Бунзена. Чтобы избежать распространения бактерий, рабочие поверхности необходимо дезинфицировать с помощью бактерицидного средства и/или ультрафиолетового облучения. Это необходимо для предотвращения быстрого распространения бактерий, переносимых по воздуху. Перед тем как что-то выбросить, необходимо правильно обработать все использованные материалы; в частности, необходимо осуществлять автоклавирование всей пластиковой посуды и отходов культуры тканей до уничтожения.

2.6.2 Питание бактерий

Рост бактерий требует гораздо более простых условий, чем было описано для клеток животных. Однако из-за их разнообразия состав используемой среды варьирует в значительной степени и определяется способом питания культивируемых организмов. Последние обычно разделяют на две основные группы: **автотрофы** (организмы, которые способны самостоятельно синтезировать пищу в форме сахаров, используя солнечную энергию) или **гетеротрофы** (организмы, которые не способны самостоятельно синтезировать питательные вещества, а получают энергию, расщепляя поглощаемые органические молекулы). Далее организмы подразделяются на **хемо-** или **фотоавтотрофы** или **гетеротрофы**. Хемо- и фотоавтотрофы используют углекислый газ в качестве источника углерода, но получают энергию из различных источников: хемоавтотрофы используют неорганические вещества, в то время как фотоавтотрофы — солнечный свет. Обе группы, хемогетеротрофы и фотогетеротрофы, используют органические вещества как основной источник углерода, но фотогетеротрофы используют в качестве источника энергии свет, а хемогетеротрофы получают энергию в процессе метаболизма органических веществ.

2.6.3 Среда для бактериальной культуры клеток

Для культивирования бактерий используются различные среды — сложные и простые. Сложные среды обычно составляются из природных веществ, включая мясной и дрожжевой экстракт, из-за чего их состав не может быть точно определен — часто он просто неизвестен. Такая среда богата питательными веществами и поэтому обычно подходит для культивирования прихотливых организмов, которые требуют смеси питательных веществ для роста. Простые среды, напротив, обычно предназначаются для специфических потребностей культивируемых бактериальных штаммов и поэтому составлены из известных компонентов, соединенных вместе в требуемых количествах. Такой подход обычно используется, чтобы выбрать или элиминировать определенные штаммы, пользуясь отличием их требований к питанию. Например, желчные соли могут быть включены в среду для селективного культивирования кишечных бактерий (грамотрицательных бактерий, например *Salmonella* или *Shigella*), поскольку рост большинства других грамотрицательных или грамположительных бактерий будет ингибироваться.

2.6.4 Процедура культивирования бактериальных клеток

Бактерии культивируют в лаборатории на жидких или твердых средах. Жидкая среда обычно распределяется в колбы и засевается аликвотами организмов, которые нужно вырастить. Затем колбы непрерывно взбалтываются в шейкере, который совершает круговые движения, перемешивая и обеспечивая поддержание культуры в суспензии. Для таких культур важно оставлять пространство в колбе над средой, чтобы облегчить соответствующее поступление кислорода в раствор. Таким образом, объем среды в колбе не должен превышать 20% общего объема. Это особенно важно для аэробных бактерий и менее важно для анаэробных микроорганизмов.

При крупномасштабном наращивании культур используют ферментеры или биореакторы, оснащенные перемешивающими устройствами для улучшения смешивания и газового обмена. Такие реакторы (рис. 2.9) обычно снабжены устройствами для измерения pH, концентрации кислорода и температуры. Кроме того, большинство реакторов снабжено водяной рубашкой с проточной холодной водой, чтобы отводить тепло, производимое во время ферментации. Существуют также отводы для CO_2 и других газов, образующихся в процессе клеточного метаболизма.

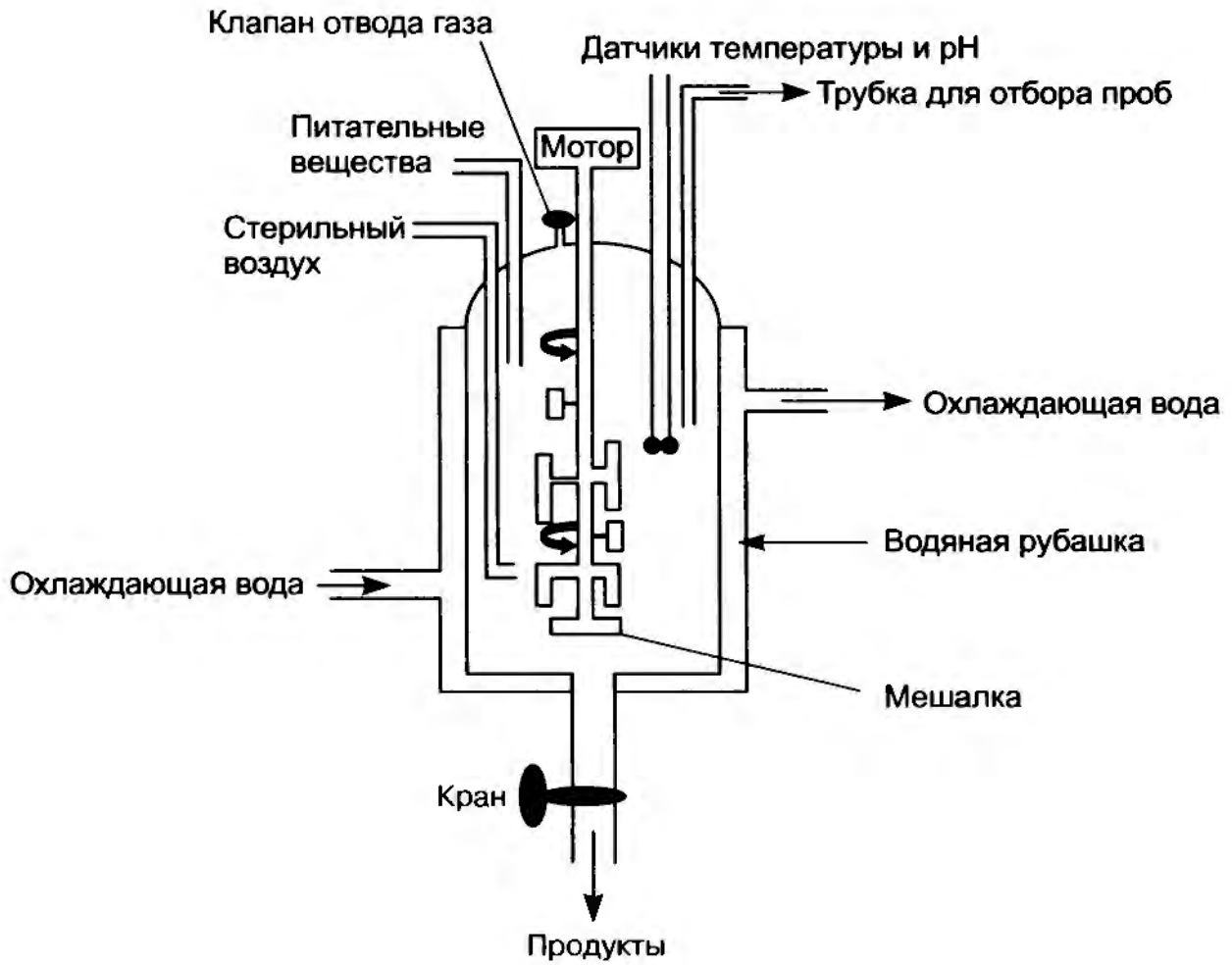


Рис. 2.9. Схема устройства ферментера

При использовании ферментеров следует придерживаться определенных мер предосторожности, чтобы уменьшить возможность заражения переносимыми по воздуху микроорганизмами, когда воздух пропускают в культуре. Поэтому необходима стерилизация воздуха, что достигается с помощью фильтра (с размером пор ~0,2 мкм), размещенного на входе потока воздуха в камеру.

Твердая среда обычно получается при затвердевании жидкой среды в присутствии 1–2% экстракта агара морских водорослей, который, хотя и является органическим соединением, не разлагается большинством микробов и поэтому лишь обеспечивает постепенное затвердение среды, на которой может расти бактерия. Агаризованная среда широко применяется для разделения смешанных культур и выделения чистых культур бактерий. Это достигается путем нанесения разведенной суспензии бактерий штрихом на поверхности чашки с агаром с помощью стерильной петли. Клетки, нанесенные штрихом на чашку, будут расти в виде отдельных колоний, причем каждая колония представляет собой результат деления единственной клетки и, таким образом, состоит из клеток одного вида.

После выделения клетки могут быть культивированы либо в периодическом, либо в непрерывном режиме. Периодическое культивирование обычно используется для рутинного наращивания в жидкости, при котором аликвоты клеток вносятся в стерильную колбу, содержащую конечное количество среды. Такие системы называются замкнутыми, поскольку пищевое обеспечение ограничивается тем, которое имеется в начале роста культуры. При таких условиях рост будет продолжаться до тех пор, пока не истощатся питательные вещества в среде или не произойдет избыточного накопления токсичных продуктов метаболизма, выделяемых микробами. Таким образом, в этой системе клеточный состав и физиологическое состояние клеток будет изменяться на всем протяжении цикла роста.

В непрерывном режиме (так называемые «открытые» системы) среда постоянно заменяется. Цель — поддержание клеток в экспоненциальной фазе роста, что достигается путем контроля содержания питательных веществ, биомассы и продуктов метаболизма с помощью изменения скорости разбавления культуры. Непрерывные системы сложнее в эксплуатации, но дают определенные преимущества по сравнению с периодическими системами в том смысле, что в них поддерживается рост в стационарном режиме, при котором имеется тесная связь между делением клетки и биосинтезом. В результате физиологическое состояние культуры более четко определено и сопровождается лишь очень небольшими изменениями в процессе цикла культивации. Основной проблемой открытых систем является риск заражения, связанный с разбавлением культуры. Однако, придерживаясь стерильных методов работы в процессе внесения питательных веществ или сбора клеток, можно уменьшить риск такого рода заражений. Кроме того, вся система может быть автоматизирована путем соединения культуральных сосудов с резервуарами через электромагнитные клапаны, которые могут быть приведены в действие и открываться, когда это необходимо. Это сводит к минимуму прямой контакт с оператором или окружающей внешней средой и уменьшает риск заражения.

2.6.5 Количественная оценка роста бактериальных культур

Для количественной оценки роста бактериальных клеток в культуре существует ряд методов, включая прямой подсчет клеток с помощью гемоцитометра, как это описано выше (разд. 2.5.6). Однако такой способ подходит только для клеток в суспензии. Когда клетки выращивают на чашках с твердым агаром, для оценки роста культуры может быть использован подсчет клеток в колониях. Этот метод основан на утверждении, что каждая колония происходит из отдельной клетки, что не всегда имеет место, поскольку ошибки в разведении и/или штриховании могут иногда привести к слиянию нескольких клеток, продуцирующих колонии. Кроме того, субоптимальные условия культивирования могут быть причиной медленного роста, приводя к недооценке числа клеток. Когда клетки наращивают в суспензии, изменения мутности ростовой среды могут быть определены спектрофотометрически по графику зависимости поглощения от числа клеток. Такой график должен быть построен для каждого вида клеток с помощью серии образцов с известным числом клеток (см. также разд. 12.4.1).

2.7 КУЛЬТУРА КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Клетки растений, представляющие собой **тотипотентные** клетки (т. е. способные развиваться в целое взрослое растение посредством регенерации), используются в лаборатории для получения культуры тканей. Для облегчения регенерации новых растений из полностью дифференцированных клеток обычно применяются разные методы. Это достигается путем воздействия на клетки различными индукторами, включая гормоны (ауксины, цитокины), в результате чего запускается новая программа развития и регенерации нового растения. Как и в случае всех других культур тканей, культура тканей растений нуждается в стерильном окружении, стерильных условиях работы и создании определенных условий роста. Основные лабораторные требования подобны описанным выше для животных клеток, но с определенными модификациями, специфическими для культуры тканей растений. Например, вместо стандартных углекислотных инкубаторов, необходимых для выращивания клеток животных, могут использоваться бокс для выращивания растения или комната с контролируемыми внешними условиями. Другие условия окружающей среды, необходимые для оптимального роста, различаются в зависимости от видов растений, но, как правило, растения нуждаются в свете определенного типа и интенсивности, а также в соблюдении соответствующей длительности циклов пребывания на свету и в темноте.

2.7.1 Техника безопасности при работе с культурой клеток растений

Требования техники безопасности в данном случае относительно упрощены по сравнению с теми, что предъявляются при работе с животными

или бактериальными клетками. Однако некоторые ткани растений могут быть опасными, если они заражены микроорганизмами, и поэтому следует предпринимать определенные меры предосторожности, чтобы предотвратить перенос или распространение заражения, и, что более важно, предохранить работающего от вдыхания спор. Требования техники безопасности включают стерилизацию поверхности образца с помощью подходящих агентов, например раствора гипохлорита (1–10%). Такие агенты сами являются источником дополнительного риска, поскольку могут нанести вред работающему. Гипохлорит, например, может при вдыхании вызывать сильное раздражение бронхов.

2.7.2 Среда для культуры растений

Модели культур растительных клеток, используемые *in vitro*, представляют собой инкубацию частей растения в подходящей среде в определенных условиях. Для этих целей в настоящее время доступен широкий спектр различных химических сред, предлагаемых коммерческими фирмами. Среди наиболее широко используемых сред можно назвать среды Murashige and Skoog, Gamborg B5, Nitsche, Shenck and Hildebrandt, а также McCown's Woody Plant Medium.

Кроме сбалансированной смеси, среда может содержать питательные макро- (азот, фосфор, калий, кальций, магний и сера) и микроэлементы (железо, марганец, цинк, бор, медь, молибден и хлор), витамины (витамины B) и источники углерода (обычно сахароза или D-глюкоза). Регуляторы роста, включая цитокины, такие как зеатин (встречающийся в природе) или его синтетический аналог 6-фурфуриламинопурин (кинетин), могут использоваться для стимуляции клеточного деления. Некоторые культуры нуждаются в ауксиноподобных регуляторах, способствующих развитию клеток. К таковым относятся встречающаяся в природе индолилуксусная кислота или синтетические компоненты, такие как 2,4-дихлорофеноксиуксусная кислота. Рост можно дополнительно усилить внесением насыщенных кислородом перфторированных веществ, таких как перфтородекалин (Flutec PP5), который улучшает снабжение клеток кислородом и, таким образом, стимулирует рост. Чтобы увеличить проницаемость плазматической мембраны в состав среды иногда включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как сополимер полиэтилена и полипропилен Pluronic F68. Некоторые среды могут содержать активированный древесный уголь (0–3%) или поливинилпирролидон (ПВП), а также антиоксиданты для предотвращения потемнения среды, происходящего в результате высвобождения, окисления и полимеризации фенола. Хотя обычно в состав сред не включают антибиотики, их применяют в случаях сильного заражения тканей. Могут использоваться также задерживающие рост химикаты, такие как паклобутразол, что позволяет сгладить анатомические и физиологические аномалии, связанные с инкубацией ткани в течение длительного времени. Необходимость в такой проверке снижается, когда используют твердую среду с агаром в конечной концентрации приблизительно 1%.

2.7.3 Культуры клеток растений

Выращивание культуры растительных клеток или тканей начинают с вырезания и стерилизации поверхностей эксплантов, которые могут быть выбраны из любой части растения в зависимости от объекта исследований. Для выделения протопластов часто предпочитают листья (клетки, лишенные целлюлозной оболочки), пыльники — для получения гаплоидов, меристемы побегов — для пролиферации культур побегов, а концы корней — для корневых культур.

Экспланты

Экспланты могут быть срезаны из растений, выращиваемых либо в поле, либо теплично, или высева, инкубируемого в стерильных условиях. Для стерилизации поверхности наиболее часто применяют обработку 1–10%-м раствором гипохлорита натрия, при этом хлор действует в качестве биоцида. Спустя определенный период времени (~ 5 минут) избыток гипохлорита должен быть удален путем обильного промывания стерильной дистиллированной водой.

Экспланты чаще выживают *in vitro*, если брали физиологически активную (т. е. неспящую) ткань. Многие экспланты содержат способную к клеточному делению меристемную ткань. Недифференцированный каллус образуется вскоре после вырезания и содержит клетки с небольшим количеством цитоплазмы, но с большими вакуолями. Такая ткань может образовать локальные центры роста, из которых может происходить каллогенез (признак побега), ризогенез (инициация корня) или оба процесса. Способность каллуса к такому органогенезу является генетически контролируемой, но может быть стимулирована *in vitro* изменением соотношения в среде цитокинина и ауксина. Высокое соотношение цитокинина к ауксину обычно благоприятствует пролиферации побегов, тогда как низкое соотношение обычно ускоряет пуск корней. На практике молодые растения могут быть получены *in vitro* из органогенного каллуса путем поддержания пролиферации побега в богатой цитокинином среде и дальнейшего переноса покрытых листьями побегов в богатую ауксином среду для индукции роста корня.

Корни также могут быть получены *in vitro* при условии, что растения защищены от десикации. Органогенез из каллуса обычно не рекомендуется для размножения растений *in vitro* (микровоспроизведение), поскольку доказано, что это приводит к генетически аномальным растениям. Большая степень хромосомной стабильности может быть достигнута, по пока еще плохо понятным причинам, с использованием меристемы побегов в качестве исходных эксплантов. Культуры меристем являются поэтому подходящим начальным материалом для микровоспроизведения. Культура меристем может также использоваться для излечения растений, инфицированных вирусами, после воздействия высокой температуры (термотерапия) и/или химических веществ (химиотерапия).

Каллусы

Каллус (недифференцированная ткань на ране в растении) часто используется как исходный материал для получения суспензионной куль-

туры, в которой смесь одиночных клеток и клеточных агрегатов инкубируется в жидкой среде, искусственно аэрируемой, чтобы предотвратить перегрузку клеток водой. Легкость образования суспензии в значительной степени предопределена генетически, а с хрупкостью иногда удается бороться путем эмпирического подбора концентрации кальция в среде, изменения газовой смеси, режима регуляции роста растения, добавлением антиоксидантов или комбинацией этих факторов.

Суспензия клеток

Суспензия клеток может расти в периодическом, подпитываемом или непрерывном режиме в малых, средних или больших объемах. Например, одиночные клетки можно получить на инкубируемых предметных стеклах микроскопа, при этом необходимым условием является знание клонального происхождения растения. Для периодического наращивания небольшого объема культуры предпочтение отдают колбе Эрленмейера с широким горлом, которую встряхивают на горизонтальной платформе орбитального шейкера. Для выращивания культур в больших масштабах разработаны ферментеры емкостью от 1 до 50 000 дм^3.

Клеточная суспензия представляет собой прекрасную модельную систему для изучения деления, развития, дифференцировки и промежуточного метаболизма клетки благодаря легкости внесения анализируемых веществ, а также отбора клеток и среды для анализа. Однако из-за физиологических свойств суспензий растительных клеток с ними труднее работать, чем с микробными клетками. Кроме того, высокая стоимость среды для культуры растений, более длительное время ферментации (обычно занимающее недели), более высокие цены на продукцию и потенциально возможные изменения в числе наборов хромосом (нестабильность плоидии), экспрессируемых в клетках при продолжительном культивировании, — все это значительно уменьшает их пригодность для коммерческого использования в качестве лекарств, пищевых добавок, парфюмерных изделий, биоцидов и т. д. Несмотря на эти трудности, проводятся исследования в области использования ферментеров для синтеза вторичных продуктов растений, поскольку такие компоненты либо невозможно, либо экономически невыгодно синтезировать химическим путем. Поскольку многие подобные вещества производятся из растений, обнаруженных только в экологически чувствительных регионах, на производителей химических продуктов оказывается давление для выбора альтернативных источников сырья.

Суспензии культуры клеток растений удобно использовать для отбора мутантов путем выращивания колоний в присутствии селектирующего агента. В идеале следует использовать суспензии, состоящие из единичных гаплоидных клеток. Такие суспензии можно получить в результате последовательной фильтрации через серию фильтров, снижая размер пор до 50 мкм. Выросшие из одной клетки колонии, выбранные для получения большего выхода, обычно переносятся в среду для наращивания, что может вызывать некоторый стресс и подавлять деление клетки, но в то же время способствовать некоторой степени дифференцировки.

Протопласты

Протопласт представляет собой сферическую, осмотически чувствительную клетку с целой клеточной мембраной, но потерявшей клеточную стенку. Он может быть приготовлен из целой клетки после удаления клеточной стенки ферментативным путем с использованием пектиназы в сочетании с целлюлазой, либо механически путем дисперсии подвергнутой плазмолизу ткани, в которой протопласты выходят из клеточной стенки в результате инкубации в концентрированном растворе осмотического агента, например маннита (~ 500 мМ). При сравнении двух методов ферментативное выделение дает более высокий выход однородного протопласта. Однако условия инкубации должны быть тщательно определены и проконтролированы, чтобы избежать слишком длительной инкубации с деградирующими клеточную стенку ферментами, что может изменить метаболизм, приводя к гибели клетки.

Протопласты могут быть выделены из здоровых листьев, которые предварительно стерилизуют в растворе гипохлорита в течение 10 минут. Нижний слой эпидермиса снимают, а лист разрезают на маленькие кусочки и икубируют с ферментативной смесью в темноте при 25 °С в течение ночи. Протопласты, высвобожденные в суспензию, можно затем отделить от обломков клетки и очистить методом фильтрации с использованием тонкой нейлоновой сети в сочетании с центрифугированием при небольшой скорости и последующим отмыванием. Качество выделения можно проверить путем анализа жизнеспособности протопластов с помощью таких красителей, как диацетат флуоресцеина или Evans Blue. Первый краситель аккумулируется жизнеспособными протопластами и затем превращается эндогенными эстеразами во флуоресцеин, который может увидеть в ультрафиолетовом микроскопе. Напротив, краситель Evans Blue не поглощается живыми протопластами и поэтому может быть использован, чтобы отличить их от погибших клеток.

Протопласты начинают делиться и образовывать новые каллусы, спустя 24 часа, с последующей регенерацией новой клеточной стенки. Для облегчения этого процесса свежевыделенные протопласты до выращивания следует подсчитать, чтобы определить эффективную плотность инокулята для посева (10^4 клеток/см^3). Для подсчета опять-таки может быть использован гемоцитометр. В некоторых экспериментах требуется слияние протопластов, в частности это может быть полезно в экспериментах по разведению растений, где половая несовместимость между родами представляет собой определенное ограничение. Слияние протопластов может быть индуцировано либо химическими, либо физическими методами (электрослияние). При химическом методе такие агенты слияния, как полиэтиленгликоль (ПЭГ, в концентрации ~ 30%) или раствор хлорида кальция с высоким значением pH (1,1% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ в 10%-м манните, pH 10,4), могут быть использованы для инициации процесса, который завершается менее чем за 30 мин.

Электрослияние выполняется в две стадии. Сначала протопласты помещают в слабопроводящую среду между двумя электродами (платиновые проволоки, помещенные параллельно на предметном стекле микроскопа).

Затем между электродами создается высокочастотное переменное поле (0,5–1,5 МГц), в результате чего протопласты выстраиваются в линию в процессе, известном под названием **диэлектрофорез**. На следующем этапе подается один или несколько коротких (10–200 мкс) импульсов постоянного тока (1–3 кВт/см), что вызывает образование пор в мембранах протопластов и позволяет их слияние в зонах тесного контакта мембран. По сравнению с химическими методами этот метод позволяет осуществлять контроль процесса слияния.

2.8 ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Культуры клеток различных типов из животных, растений или микробов все чаще применяются не только учеными для изучения активности изолированных клеток, но также различными биотехнологическими и фармацевтическими компаниями для производства ценных биологических продуктов, включая противовирусные вакцины (полиовакцина), антитела (например, ОКТ3, используемый для подавления иммунного отторжения органов в трансплантационной хирургии) и различных рекомбинантных белков. Применение технологии рекомбинантной ДНК привело к возникновению многих продуктов из бактериальных клеток или клеток млекопитающих для лечения людей. В этой связи можно назвать коммерческое производство фактора VIII для лечения гемофилии, инсулина для лечения диабета, β- и α-интерферона для противораковой химиотерапии и эритропоэтина для лечения анемии. Бактериальные культуры также широко используются для других промышленных целей, включая крупномасштабное производство клеточных белков, регуляторов роста, органических кислот, спиртов, растворителей, стеролов, поверхностно-активных веществ, витаминов, аминокислот и др.

Важным применением микробных клеток является разложение отходов, особенно в сельском хозяйстве и пищевой промышленностях. Микробные клетки также используются для биоконверсии отходов в полезные продукты и в токсикологических исследованиях, где некоторые из таких организмов заменяют животных для первичного токсикологичекого тестирования ксенобиотиков. Недавно были разработаны системы клеток бактерий и млекопитающих, позволяющие заменить и дополнить использование животных в токсикологических исследованиях. Клетки бактерий и млекопитающих являются, без сомнения, лучшими системами. Культуры клеток растений используются для генетической трансформации и соматической гибридизации, а слияние протопластов оказалось особенно ценным в экспериментах по размножению растений, где оно применяется для преодоления механизмов половой несовместимости, предотвращающей образование жизнеспособных зигот.

2.9 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

BALL, A.S. (1997). *Bacterial Cell Culture: Essential Data.* John Wiley&Sons, Inc., New York. Изложение основ и методов ведения клеточных культур.

DAVIS, J.M. (2002). *Basic Cell Culture: A Practical Approach,* 2nd edn. Oxford University Press, Oxford. Понятное изложение основных методов культивирования клеток.

DICSON, R.A. and GONZALES, R.A. (1994). *Plant Cell Culture: A Practical Approach.* Oxford University Press, Oxford. Основы методов и применения культуры клеток растений.

FRESHNEY, R.I. (2000). *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Tehnique,* 4th edn. John Wiley&Sons, Inc., New York. Понятное изложение методов и применений культур клеток животных.

FURR, A.K. (ed.) (1995). *CRC Handbook of Laboratory Safety,* 4th edn. CRC Press, Boca Raton, FL. Полное пособие по безопасности проведения работ в лаборатории.

HSC ADVISORY COMMITTEE ON DANGEROUS PATHOGENS (2001). *The Management Design and Operation of Microbiological Containment Laboratories.* HSC books, Sudbury. Инструкции и требования, а также техническая информация по оснащению и проведению экспериментов в лабораториях, предназначенных для работы с клеточными культурами.

PAREKH, S.R. and VINCI, V.A. (2003). *Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial, and Plant Cells.* Humana Press, Totowa, NJ. Хороший обзор внедренных методов промышленного скрининга, культивирования и наращивания клеток млекопитающих, микробов и растений.

Глава 3
Центрифугирование

3.1 ВВЕДЕНИЕ

Для понимания молекулярно-биологических закономерностей функционирования клетки очень важное значение имеет биохимический анализ субклеточных структур, надмолекулярных комплексов и отдельных макромолекул. В свою очередь, анализ биохимических и физиологических свойств органелл и биологических молекул имеет смысл проводить лишь в том случае, если при отделении от других клеточных компонентов биологические функции сохранены. Важнейшим методом разделения различных компонентов при анализе клеточного гомогената является **центрифугирование**. Создание первой **аналитической ультрацентрифуги** Сведбергом в 1920-х гг. и развитие методов **препаративного центрифугирования** Альбертом Клодом с коллегами в 1940-х гг. сделало центрифугирование одним из главных методов биологических и биохимических исследований на многие десятилетия. В современной биохимии центрифуга служит незаменимым инструментом и используется практически при любых исследованиях клеточных компонентов. Аналитическое центрифугирование применяется главным образом при изучении очищенных макромолекул или выделенных надмолекулярных комплексов, а препаративное центрифугирование — для реального разделения клеток, их компонентов, мембранных везикул и других частиц.

Многие студенты в практикуме выполняют препаративное центрифугирование, а иногда аналитическое центрифугирование. В данной главе имеется краткое введение, где обсуждаются теоретические основы седиментации, имеется также обзор практических аспектов использования центрифуги в биохимической лаборатории, описание метода препаративного центрифугирования и краткого ознакомления с техникой ультрацентрифугирования при анализе биохимических свойств макромолекул. Для облегчения понимания теоретических основ центрифугирования представлены схемы устройства различных роторов и диаграммы, отражающие процесс разделения. Восприятие студентами учебного материала нередко затруднено из-за отсутствия четкой связи между теоретическими знаниями и их практическим применением. Для преодоления этого препятствия

авторы сопроводили описание метода препаративного центрифугирования пояснительной схемой и детальным обсуждением методики фракционирования клеточных элементов конкретного образца ткани. Смысл каждой стадии препаративного разделения объясняется на примере фракционирования гомогената скелетных мышц. Аффинные методы разделения представляют собой не только мощнейший инструмент для очистки биологических молекул (см. разд. 11.8), они могут также использоваться при разделении интактных клеточных органелл и мембранных везикул; в данной главе приведен пример аффинного разделения высокоочищенных везикул плазмалеммы из скелетных мышц с помощью агглютинации лектинов. Традиционно при указании общего выхода и степени очистки конкретных клеточных структур в результате центрифугирования используются активности маркерных ферментов. Здесь в качестве примера приводится распределение ключевых ферментов в различных фракциях митохондрий из печени. Однако в более современных процедурах фракционирования применяют более удобные методы анализа, такие как анализ белков в геле с последующим иммуноблоттингом. С помощью мини-гелей и различных приспособлений для переноса на мембрану можно получить надежные результаты всего за несколько часов, что очень удобно при рутинном анализе большого числа образцов. Методы электрофоретического разделения обсуждаются в гл. 10, а в данной главе дано лишь общее представление о распределении типичных маркерных белков во фракциях плазмалеммы, выделенных аффинным методом.

Некоторые пептиды и белки способны осуществлять сложные биохимические реакции при соблюдении физиологических условий, а вот многие важные элементы клетки не существуют в изолированном виде. Следовательно, если рассматривать отдельные белки в качестве основных структурных единиц протеома (см. разд. 8.5), то белковые комплексы — это функциональные единицы клетки. В связи с этим изучение надмолекулярных белковых комплексов — одна из главных задач современной биохимии. Важное значение биохимического анализа рассмотрено на примере седиментационного анализа высокомолекулярного мембранного комплекса — дистрофин-гликопротеинового комплекса из скелетных мышц, при этом объясняется принцип центрифугирования в градиенте сахарозы.

3.2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕДИМЕНТАЦИИ

Из сравнения с **седиментацией**, связанной с действием гравитационного поля Земли (g = 981 см/с^2), о которым мы все знаем из нашей обыденной жизни, вполне понятно увеличение скорости седиментации в центрифуге (g > 981 см/с^2). Проиллюстрируем это простым примером: если в ведро с водой всыпать немного песка, песчинки медленно осаждаются на дно под действием силы гравитации, но если при этом ведро покачивать круговым движением, песок осядет значительно быстрее. Аналогичным образом, частицы биоматериала осаждаются гораздо быстрее под действием

центробежного поля. Относительное центрифужное поле — это создаваемое центрифугой центробежное поле, выраженное в единицах ускорения свободного падения (g). Для детального ознакомления с силами, действующими на взвешенные в жидкой среде частицы, рекомендуем читателю обратиться к учебникам по центрифугированию (см. разд. 3.6). Ниже мы кратко обсудим уравнения, используемые при практическом центрифугировании.

При проведении центрифугирования нужно помнить следующее:

- чем плотнее биологический материал, тем быстрее он осаждается в центрифуге;
- чем тяжелее биологические частицы, тем быстрее они движутся в поле центрифуги;
- чем плотнее буферная система, тем медленнее частицы движутся в поле центрифуги;
- чем больше **коэффициент вязкости**, тем медленнее движутся частицы;
- чем больше центробежная сила, тем быстрее осаждаются частицы;
- скорость оседания конкретной частицы равна нулю при равенстве плотностей частицы и среды.

Движущиеся в вязкой среде биологические частицы преодолевают силу трения, которая действует в противоположном седиментации направлении и равна скорости движения частицы, умноженной на коэффициент вязкости. Коэффициент вязкости зависит от размера и формы частицы. По мере продвижения образца ко дну центрифужной пробирки, скорость его перемещения возрастает благодаря увеличению радиального расстояния. Сила трения, кроме того, пропорциональна скорости их движения. Сила трения, действующая на частицу, движущуюся в вязкой жидкости, определяется скоростью движения частицы и коэффициентом вязкости и направлена в сторону, противоположную седиментации.

Из уравнения 3.1 для расчета относительного центробежного ускорения видно, что для разделения центрифугированием биологических частиц необходимо задать определенную **скорость вращения ротора**, радиальное расстояние и длительность процесса. Скорость осаждения частиц зависит от **центробежного ускорения** G (см/с^2), которое в свою очередь определяется радиальным расстоянием r (см) между частицей и осью вращения и квадратом **угловой скорости** вращения ротора ω (рад/с):

$$G = \omega^2 r \qquad (3.1)$$

ПРИМЕР 1 РАСЧЕТ ЦЕНТРОБЕЖНОГО УСКОРЕНИЯ

Вопрос Каково центробежное ускорение в точке, отстоящей на 5 см от центра вращения, при угловой скорости 3000 рад/с?

Ответ Для расчета центробежного ускорения G воспользуемся уравнением $G = \omega^2 r$

$G = (3000)^2 \cdot 5$ см/с^2 $= 4{,}5 \cdot 10^7$ см/с^2

Средняя угловая скорость при вращении жесткого тела вокруг фиксированной оси определяется отношением углового смещения к тому промежутку времени, за которое оно произошло. Один радиан (1 рад) — центральный угол, опирающийся на дугу, длина которой равна радиусу круга. Поскольку 360° составляет 2π рад, один оборот ротора описывает дугу 2π рад. Соответственно угловая скорость ротора может быть выражена через число его оборотов (об.) в минуту:

$$\omega = \frac{2\pi \cdot \text{об./мин}}{60} \tag{3.2}$$

Наконец, центробежное ускорение можно записать как

$$G = \frac{4\pi^2 (\text{об./мин})^2 r}{3600} \tag{3.3}$$

ПРИМЕР 2 РАСЧЕТ УГЛОВОЙ СКОРОСТИ

Вопрос Для осаждения микросомальной фракции из гомогената клеток печени ультрацентрифугу разгоняют до скорости 40 000 об./мин. Какова при этом угловая скорость ω в радианах в секунду?

Ответ Угловую скорость ω можно рассчитать по уравнению:

$$\omega = \frac{2\pi \cdot \text{об./мин}}{60}$$

$$\omega = 2 \cdot 3{,}1416 \cdot 40\,000/60 \text{ рад/с} = 4188{,}8 \text{ рад/с}$$

Центрифужное ускорение — это создаваемое центрифугой центробежное ускорение, выраженное в единицах ***g*** (ускорение свободного падения, 981 см/с^2). **Относительное центробежное ускорение** (ОЦУ), которое представляет собой отношение центробежного ускорения при определенном радиусе и скорости вращения к ускорению силы тяжести, может быть рассчитано по следующей формуле:

$$\text{ОЦУ} = \frac{4\pi^2 (\text{об./мин})^2 r}{(3600 \cdot 981)} \tag{3.4}$$

Таким образом, ОЦУ измеряется в единицах ***g***; обороты в минуту чаще всего сокращенно записывают как об./мин (или r.p.m). В краткой форме ОЦУ = $1{,}12 \cdot 10^{-5}$ $(\text{об./мин})^2 r$.

Хотя ОЦУ легко рассчитывается по формуле, в руководствах по центрифугированию обычно приводится **номограмма** для перехода от ОЦУ к скорости вращения ротора для различного расстояния между осью вращения и серединой столбика жидкости в центрифужной пробирке. Номограмма состоит из трех столбцов: радиальное расстояние (мм), относительное центробежное ускорение (· ***g***) и скорость вращения ротора (об./мин). Для перехода от ОЦУ к скорости вращения ротора в об./мин при различных радиусах следует провести прямую, соединяющую известные значения в двух столбцах, тогда третье неизвестное определяется как точка пересечения этой линии с третьим столбцом (см. рис. 3.1).

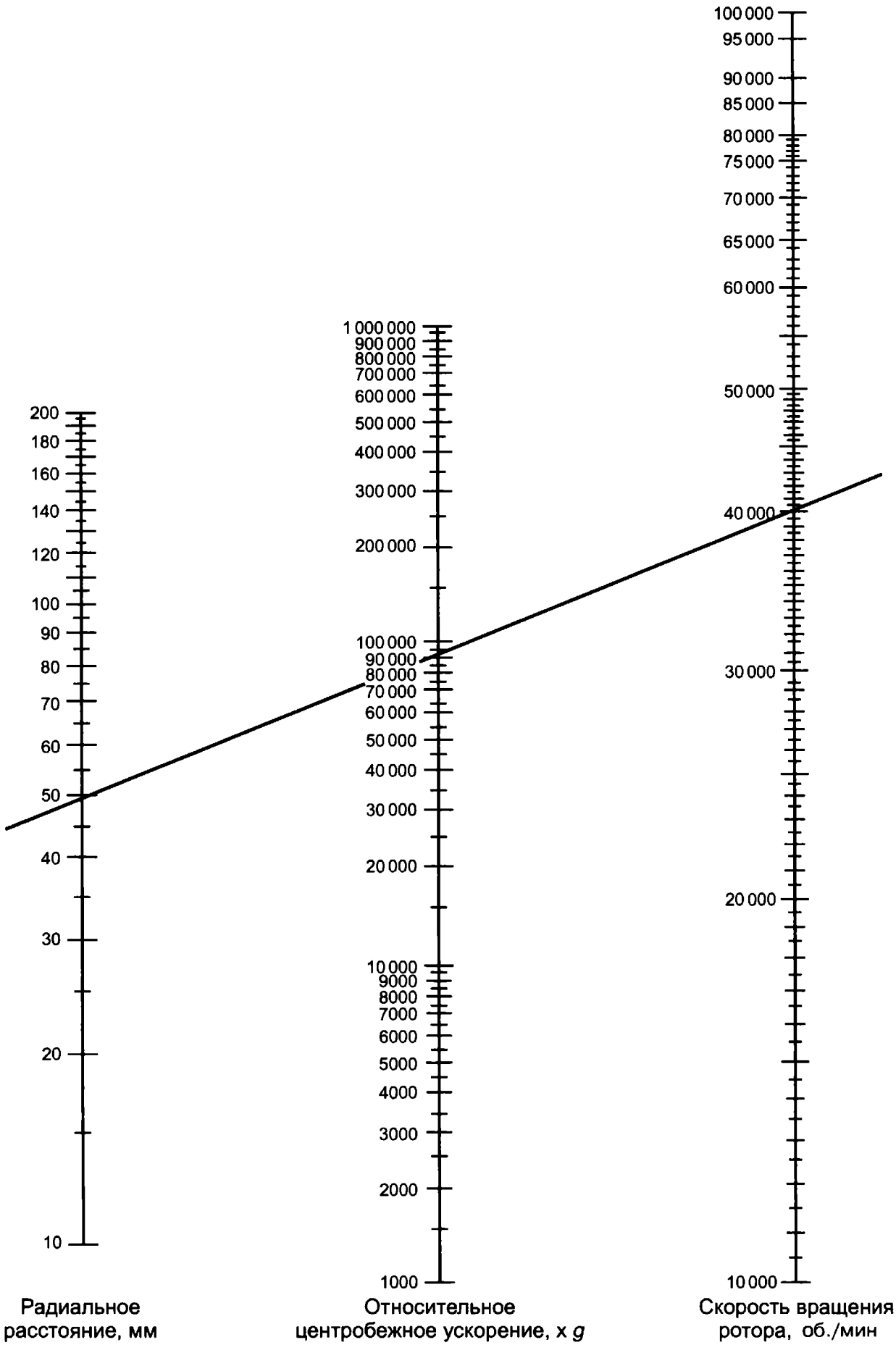


Рис. 3.1. Номограмма для расчета относительного центробежного ускорения для заданных скорости вращения и радиуса ротора. Значения в трех столбцах соответствуют радиальному расстоянию (мм), относительному центробежному ускорению (· ***g***) и скорости вращения ротора (об./мин). Для перехода от ОЦУ к скорости вращения ротора и обратно следует провести прямую через известные значения в двух столбцах. Искомая величина определяется отрезком, отсекаемым этой прямой на третьем столбце. Печатается с любезного разрешения Beckman–Coulter

Скорость осаждения биологических частиц в суспензии зависит не только от центробежного ускорения, но и от природы частиц, т. е. их плотности и радиуса, а также от вязкости среды. **Закон Стокса** так описывает скорость осаждения жесткой сферической частицы:

$$v = \frac{2}{9} \frac{r^2(\rho_p - \rho_m)}{\eta} \boldsymbol{g} \qquad (3.5)$$

где v — скорость осаждения сферической частицы, $^2/_9$ — постоянная для сферы, r — радиус частицы, ρ_p — плотность частицы, ρ_m — плотность среды, $\boldsymbol{g}$ — ускорение силы тяжести, η — вязкость среды.

ПРИМЕР 3 РАСЧЕТ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ЦЕНТРОБЕЖНОГО УСКОРЕНИЯ

Вопрос Для ротора с фиксированным углом минимальный радиус — расстояние до верха центрифужной пробирки (r_{min}), равное 3,5 см, а максимальный радиус — расстояние до дна пробирки (r_{max}), равное 7,0 см. Положение минимального и максимального радиусов отмечено на схеме ротора с фиксированным углом (рис. 3.2, *а*). Каковы значения относительного центробежного ускорения (ОЦУ) в нижней и в верхней части центрифужной пробирки, если ротор вращается со скоростью 20 000 об./мин?

Ответ Относительное центробежное ускорение можно рассчитать по формуле:

ОЦУ = $1{,}12 \cdot 10^{-5}$ (об./мин)$^2 r$.

Для верха пробирки:

ОЦУ = $1{,}12 \cdot 10^{-5} \cdot (20\,000)^2 \cdot 3{,}5\boldsymbol{g} = 15\,680\boldsymbol{g}$

Для дна пробирки:

ОЦУ = $1{,}12 \cdot 10^{-5} \cdot (20\,000)^2 \cdot 7{,}0\boldsymbol{g} = 31\,360\boldsymbol{g}$

Данный расчет показывает, что для роторов с фиксированным углом относительное центробежное ускорение на дне пробирки и в ее верхней части может весьма сильно различаться (в данном примере практически в 2 раза).

Таким образом, смесь биологических частиц, имеющих форму, близкую к сферической, разделяется в процессе центрифугирования в соответствии с плотностью и/или размером частиц. Время осаждения (в секундах) сферической частицы определяется по формуле:

$$t = \frac{9}{2} \frac{\eta}{\omega^2 r_p^{\,2}(\rho_p - \rho_m)} \cdot \ln(r_b/r_t) \qquad (3.6)$$

где t — время осаждения частицы, η — вязкость среды, r_p — радиус частицы, r_b — расстояние от центра вращения до дна пробирки, r_t — расстояние от центра вращения до мениска жидкости, ρ_p — плотность частицы, ρ_m — плотность среды, ω — угловая скорость вращения ротора.

Скорость осаждения биологической частицы также может быть определена через **коэффициент седиментации** s

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} \qquad (3.7)$$

Поскольку скорость седиментации при данном центробежном ускорении можно определять при разных температурах и в различных средах, экс-

периментальные данные по седиментации приводят в виде относительных величин к коэффициенту седиментации в воде при 20 °С ($S_{20,w}$). Коэффициенты седиментации биологических макромолекул в воде весьма малые величины, их обычно выражают в **единицах Сведберга**, S (см. разд. 3.5). 1 S соответствует 10^{-13} с.

3.3 ТИПЫ ЦЕНТРИФУГ. ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

3.3.1 Типы центрифуг

Без центрифугирования сегодня не обходится практически ни одно биохимическое, цитологическое или молекулярно-биологическое исследование. В зависимости от конкретной задачи используют центрифуги различного устройства и размера. Однако общим для всех центрифуг является наличие расположенного в центре мотора, который вращает ротор с размещенными в нем образцами. Частицы, которые предстоит разделить, обычно суспендируют в буферном растворе в специальных пробирках или контейнерах, помещают в подходящий ротор. Биологические среды, в которых происходит разделение, подбираются при каждом центрифугировании; они могут сильно различаться, например, в случае препаративного и аналитического разделения. Как обсуждается далее, для сохранения биологической функции отделяемых частиц необходимо в предварительных экспериментах изучить влияние pH, концентрации солей, стабилизирующих кофакторов и некоторых добавок, таких как ингибиторы протеаз. Центрифуги друг от друга отличаются главным образом по своим техническим характеристиам:

- максимальная скорость, при которой достигается наилучшее осаждение биологического материала;
- возможность создания вакуума или отсутствие такой возможности;
- возможность изменения температуры в процессе центрифугирования;
- максимальный возможный объем обрабатываемого образца и емкость отдельной пробирки.

Производятся несколько типов центрифуг:

- **низкоскоростные препаративные центрифуги** для больших объемов жидкости;
- высокоскоростные препаративные центрифуги с охлаждением;
- **аналитические ультрацентрифуги**;
- **препаративные ультрацентрифуги**;
- **клинические центрифуги** для больших объемов;
- лабораторные **микроцентрифуги**.

Некоторые модели центрифуг, предназначенных для разделения больших объемов жидкости, занимают довольно много места, сильно нагреваются и создают высокий уровень шума, поэтому их часто уста-

навливают в специально отведенных помещениях, общих для всего подразделения. Однако появившиеся относительно недавно настольные центрифуги для небольших объемов и даже ультрацентрифуги можно размещать в лаборатории.

Студенты при выполнении практических работ обычно работают на микроцентрифугах, предназначенных для центрифугирования небольших объемов жидкости в пробирках Eppendorf, препаративных центрифугах для больших объемов, скоростных центрифугах с охлаждением и ультрацентрифугах. Простые настольные центрифуги отличаются по своему дизайну, но все они предназначены в основном для осаждения небольших количеств биологического материала, например клеток крови. Для предотвращения денатурации белков при их осаждении центрифуги без охлаждения обычно размещаются в холодном помещении. Современные настольные центрифуги с охлаждением снабжены адапторами, позволяющими использовать стандартные пластиковые пробирки с образцами объемом 0,5–1,5 мл. В таких центрифугах создается ускорение до 10 000 ***g***, что позволяет осаждать биологический материал за считанные минуты, поэтому подобные микроцентрифуги стали незаменимым инструментом во многих биохимических лабораториях. Микроцентрифуги используются также для концентрирования белков. Например, разбавление белковой фракции в результате проведения колоночной хроматографии часто затрудняет дальнейший ход анализа. Для решения этой проблемы можно провести центрифугирование образца в микроцентрифуге в пробирке со специальным пластиковым фильтром при не очень высокой скорости вращения. В зависимости от свойств выделяемого белка, используемого буфера и размеров пор фильтра за несколько минут можно достичь 10–20-кратного концентрирования. В более крупных настольных центрифугах может создаваться центробежное ускорение порядка 3000–7000 ***g***; для работы в таких центрифугах подходят контейнеры различного типа. В зависимости от типа держателей можно центрифугировать образцы в пластиковых пробирках объемом 5–250 мл, и даже в 96-луночные планшеты, используемые для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Простые и относительно недорогие настольные центрифуги получили широкое распространение при проведении многих рутинных биохимических анализов, в которых необходимо быстро и эффективно осуществить осаждение крупных частиц или целых клеток.

А вот высокоскоростные центрифуги с охлаждением абсолютно незаменимы для осаждения белков, крупных клеточных органелл и клеточного дебриса, образующегося при гомогенизации тканей и клеток микроорганизмов. Как обсуждается в разд. 3.4, центрифуги такого типа используются для первичного грубого разделения клеточных компонентов перед проведением ультрацентрифугирования. Максимальное центробежное ускорение, создаваемое в подобных центрифугах, составляет около 100 000 ***g***. Этого мало для осаждения более мелких микросомальных везикул или рибосом, но вполне достаточно для дифференциального осаждения ядер, митохондрий или хлоропластов. Кроме того, на высокоскоростных центрифугах с охлаждением можно осуществлять осаждение

белковых агрегатов. В качестве примера можно привести выделение белков в процессе гомогенизации сократительного аппарата из мышечных волокон, которые состоят главным образом из макромолекул миозина и актина, собранных в филаменты. Для сбора клеток дрожжей или бактерий из большого объема культуральной жидкости также можно использовать высокоскоростные центрифуги **в проточном режиме**, применяя **зональные роторы**. В таком случае жидкость помещают не в центрифужные пробирки, а подают на центрифугу постоянным потоком. По мере поступления жидкости во вращающийся ротор биологические частицы осаждаются по периферии ротора, а избыток жидкости удаляется через специальный отвод.

Ультрацентрифугирование значительно расширило возможности детального биохимического анализа субклеточных структур и отдельных биологических молекул. Препаративное ультрацентрифугирование позволяет работать при значениях относительного центробежного ускорения порядка 600 000 ***g***. Для уменьшения разогрева ротора из-за его трения о воздух из герметичной камеры ротора удаляют воздух и охлаждают ее. В зависимости от типа, времени рабочего цикла и состояния конкретной центрифуги охлаждение до определенной температуры и создание устойчивого вакуума могут занимать некоторое время. Для сокращения потери времени при проведении биохимического анализа систему охлаждения и создания вакуума в старых центрифугах следует включать примерно за час до начала самого центрифугирования. Напротив, современные ультрацентрифуги можно запускать, даже не дождавшись полного установления вакуума, поскольку этот процесс будет продолжаться на начальных стадиях ускорения ротора. Из соображений безопасности ультрацентрифуги заключают в тяжелые армированные корпуса, которые защищают пользователя от негативного воздействия вибраций ротора. Центрифугирование невозможно начать, если камера ротора не закрыта должным образом. Для предотвращения нежелательных флуктуаций температуры, чрезмерной вибрации или ускорения ротора выше предусмотренных параметров последние модели центрифуг снабжены сложной системой регуляции температуры, **гибким ведущим валом** и устройством, не допускающим превышения определенной скорости вращения. В современной ультрацентрифуге незначительные нарушения баланса не влияют на саму операцию центрифугирования, однако в случае неуравновешенных центрифужных пробирок центрифуга останавливается автоматически. Особенно это важно учитывать в случае роторов с качающимися стаканами. Системы безопасности современных ультрацентрифуг обеспечивают их большим запасом прочности, все рассчитано даже на возможное отсутствие навыков работы у исполнителя. Техника безопасности при центрифугировании более подробно рассмотрена в разд. 3.3.3 и 3.3.4. В отличие от препаративных ультрацентрифуг аналитические ультрацентрифуги снабжены цельным ротором, который в простейшем случае содержит одну ячейку для анализируемого раствора и другую — для уравновешивающей жидкости. Оптическая система позволяет следить за осаждением материала в процессе центрифугирования. Измерение оптической плотности образца, использование **шлирен-системы** или **интер-**

ференционной системы Рэлея — эта техника позволяет определять распределение концентраций в биологическом образце в любой момент в ходе ультрацентрифугирования. Соответствующие оптические системы (шлирен-метод и интерференционный метод) позволяют детектировать изменения показателя преломления раствора, вызванные изменениями концентрации, и поэтому могут использоваться в методе равновесной седиментации. Это позволяет использовать аналитическое ультрацентрифугирование в качестве достаточно точного метода определения молекулярных масс макромолекул. Кроме того, метод позволяет получать важную информацию относительно термодинамических свойств белков и других крупных биологических молекул.

3.3.2 Типы роторов

На рис. 3.2 представлены схемы устройства трех основных типов роторов: ротора с фиксированным углом, ротора с вертикальным расположением пробирок и бакет-ротора с качающимися стаканами. В названии ротора производители обычно указывают тип устройства, максимальную скорость вращения и иногда материал, из которого он изготовлен. В простой низкоскоростной центрифуге, высокоскоростной центрифуге или ультрацентрифуге вращающийся ротор испытывает воздействие ускорения, различного по величине. По этой причине различные типы роторов изготавливают из разных материалов. Роторы для низкоскоростных центрифуг делают из стали или латуни, а роторы для высокоскоростных центрифуг — из алюминия, титана или волоконных композитов. Внешняя поверхность ротора может иметь защитное покрытие. Например, роторы для ультрацентрифугирования, изготовленные из титанового сплава, покрывают слоем полиуретана. Алюминиевые роторы защищают от коррозии слоем оксида алюминия, образующимся в результате электрохимической реакции. С роторами следует обращаться бережно, чтобы не повредить защитное покрытие.

Роторы с фиксированным углом наклона пробирок идеально подходят для разделения биологических частиц, чьи скорости седиментации значительно различаются, например для разделения ядер, митохондрий и микросом. Кроме того, этот тип роторов может использоваться для **изопикнического разделения** частиц. Для этого центрифугирование продолжают до тех пор, пока выделяемые частицы не достигнут **изопикнической точки** в градиенте. Это означает, что данная частица достигает положения, в котором скорость седиментации равна нулю, поскольку плотность частицы равна плотности среды в этой точке. В данном типе ротора пробирки все время находятся в фиксированном положении под углом к вертикальной оси от 14° до 40° (рис. 3.2, *а*). Частицы движутся в радиальном направлении, и поскольку центробежная сила действует под углом, им необходимо пройти лишь небольшое расстояние в градиенте плотности для достижения изопикнической точки или до соприкосновения со стенкой центрифужной пробирки (в зависимости от применяемого метода). С вертикальным расположением пробирок (рис. 3.2, *б*) бывают строго вертикальные роторы и роторы, где положение пробирок близко к вертикальному. Герметично за-

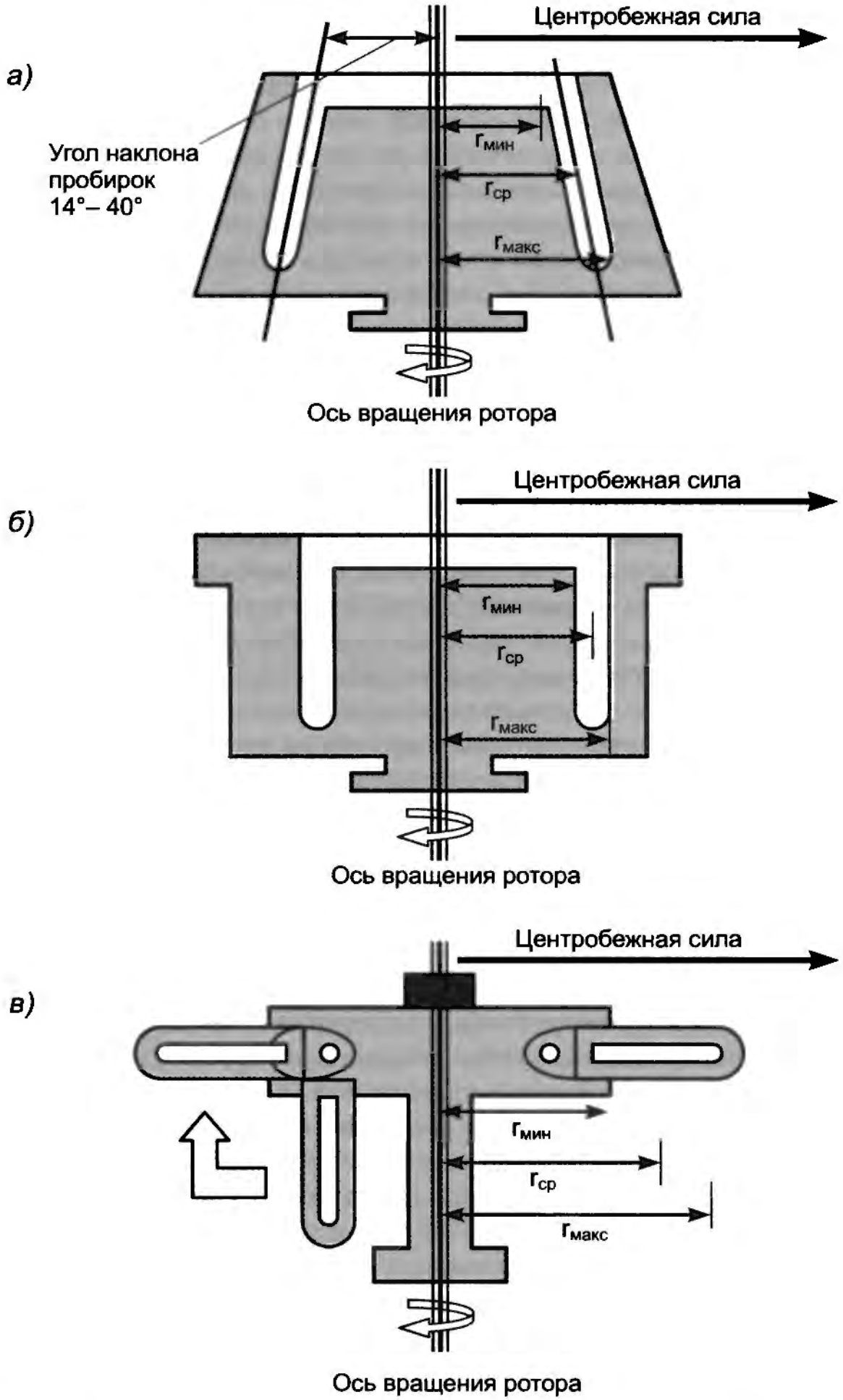


Рис. 3.2. Схема устройства трех основных типов роторов, используемых в рутинных биохимических методах: *а* — ротор с фиксированным углом, *б* — ротор с вертикальным расположением пробирок, *в* — бакет-ротор с качающимися стаканами. Существует четвертый тип роторов, в котором расположение пробирок близко к вертикальному

крытые центрифужные пробирки располагаются параллельно оси вращения и удерживаются в ячейках ротора специальными винтами, шайбами и пробками. Поскольку разделение образцов происходит не по высоте пробирки, а по ее диаметру, время изопикнического разделения весьма невелико по сравнению с тем, что требуется в роторе с качающимися стаканами. В роторах с близким к вертикальному положением пробирок (угол наклона пробирок 7–10°) также используют герметично закрывающиеся пробирки. Небольшой угол наклона пробирок приводит к значительному сокращению времени центрифугирования по сравнению с центрифугами с фиксированным углом наклона. Такие роторы используют для центрифугирования в градиенте плотности таких частиц, которые ведут себя аномально в обычном градиенте. В роторах с качающимися стаканами эти стаканы прикреплены к ротору с помощью ригелей или шарниров (рис. 3.2, *в*). Стаканы заполняют в вертикальном положении; при ускорении ротора они располагаются практически горизонтально, а затем сами устанавливаются в определенном положении в теле ротора.

На рис. 3.3 представлено расположение частиц в трех основных типах роторов в начальной фазе ускорения, в основной фазе разделения, при торможении ротора и по окончании центрифугирования. Для изопикнического центрифугирования в роторе с фиксированным углом наклона в центрифужных пробирках прежде всего создают необходимый градиент, затем осторожно вносят в верхнюю часть пробирки разделяемую смесь и помещают пробирки в ротор. При раскручивании ротора происходит переорганизация образца и градиента в центробежном поле, а затем разделение частиц с различными седиментационными свойствами (рис. 3.3, *а*). При торможении ротора градиент возвращается к своему исходному состоянию. После остановки центрифуги разделившиеся полосы частиц можно отобрать из пробирок. Аналогичная ситуация с переориентацией градиента и образованием полос частиц происходит в роторе с вертикальным расположением пробирок (рис. 3.3, *б*). В последнем случае время центрифугирования меньше, а количество гнезд для пробирок обычно больше, однако разделение полос при изопикническом центрифугировании хуже, чем в роторах с качающимися стаканами. При работе с роторами с качающимися стаканами возможно применение разных градиентов, поэтому этот тип роторов является предпочтительным в тех случаях, когда необходимо достичь максимального разделения полос (рис. 3.3, *в*), например при зональном разделении частиц на основании различия их коэффициентов седиментации.

3.3.3 Поддержание центрифуги в рабочем состоянии

Коррозия и загрязнение роторов в результате протечки буферов, применяемых при центрифугировании образцов, могут значительно сократить срок службы оборудования. Еще один важный момент при работе с центрифугами — правильное уравновешивание центрифужных пробирок или стаканов. Это важно не только для соблюдения техники безопасности, что будет обсуждаться в дальнейшем, но и в связи с тем, что возможно повреждение

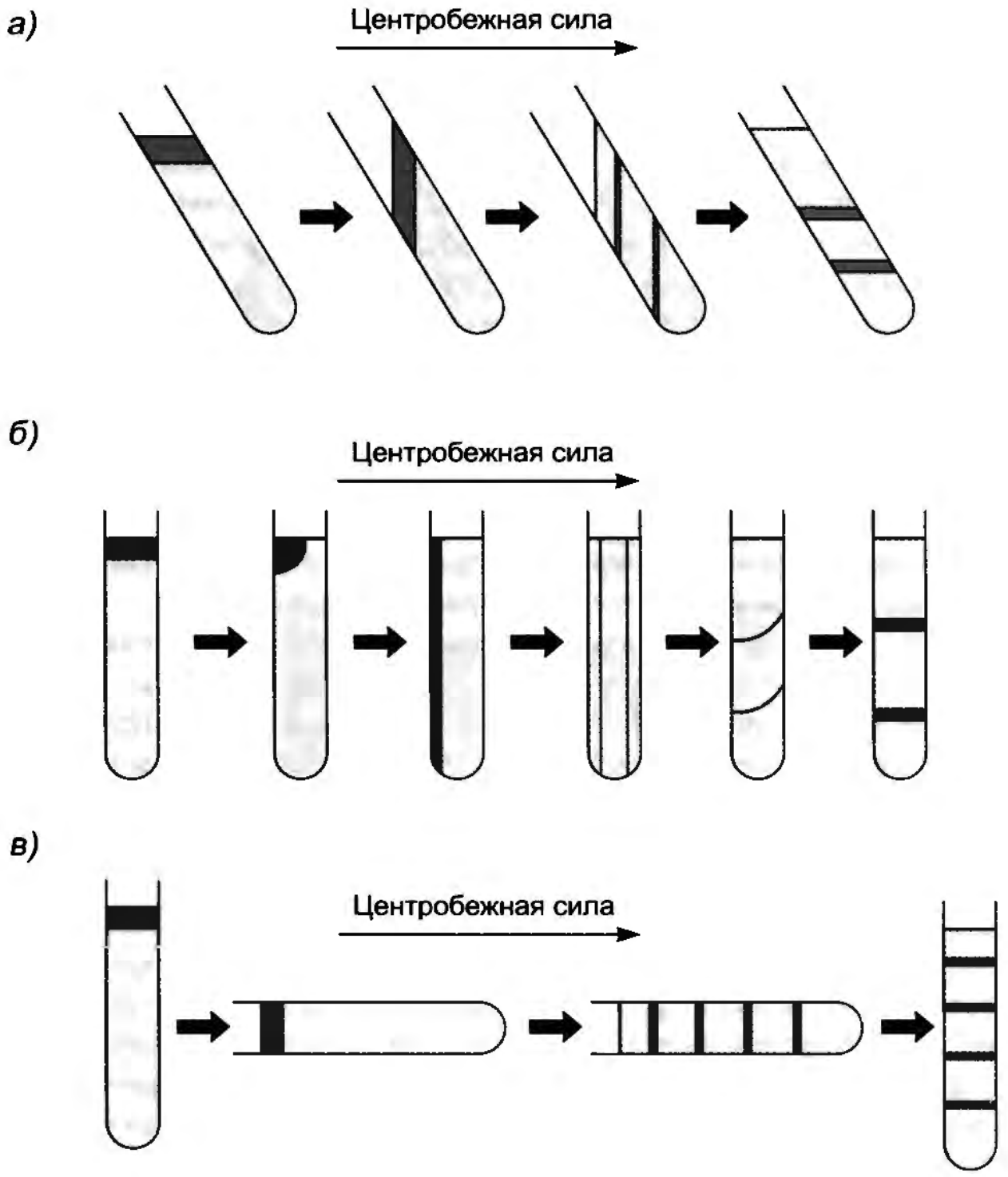


Рис. 3.3. Разделение образца в роторах трех основных типов. Показана центрифужная пробирка в разрезе, помещенная в ротор с фиксированным углом наклона пробирок (*а*), ротор с вертикальным положением пробирок (*б*) и ротор с качающимися стаканами (*в*). Диаграмма отражает перемещение образца в фазе ускорения ротора, в основной фазе разделения, при торможении ротора и после остановки центрифуги. При работе с ротором с фиксированным углом наклона в пробирках предварительно создают градиент среды, затем в верхнюю часть пробирки помещают образец и устанавливают пробирку в гнезде ротора. При ускорении ротора градиент и образец претерпевают переорганизацию под действием центробежного поля, что приводит к разделению частиц с различными седиментационными свойствами. Аналогичные процессы происходят и в роторе с вертикальным расположением пробирок. Система ротора с качающимися стаканами позволяет использовать большое многообразие градиентов, что делает такие роторы методом выбора в тех случаях, когда необходимо достичь максимального разделения полос

ротора и вала центрифуги из-за вибрации. Таким образом, использование метода центрифугирования в лаборатории подразумевает постоянный уход за роторами и центрифугами и поддержание их в рабочем состоянии. Чтобы не повредить защитное покрытие ротора, будь то полиуретан или оксид алюминия, внутреннюю часть ротора нужно мыть с осторожностью. Следует избегать использования грубых царапающих щеток и детергентов, вызывающих коррозию. Коррозию может спровоцировать длительный контакт ротора с щелочными или кислыми растворами, агрессивными детергентами или солями. Поэтому каждый раз после использования ротор следует тщательно ополаскивать дистиллированной или деионизированной водой. В конце рабочего дня ротор следует сначала перевернуть вверх дном, чтобы дать стечь жидкости, а затем оставить в сухом и безопасном месте. Во избежание повреждений шарниров в роторах с качающимися стаканами их следует очищать от биологических буферов, споласкивать водой, а затем протирать бумажным полотенцем. Центрифужные роторы часто хранят неправильно, что может быстро привести к повреждению защитного покрытия. Рекомендуется хранить роторы в специальном чистом помещении, снятыми с центрифуги, причем каждый ротор должен располагаться на отведенном ему месте. Иногда перед проведением центрифугирования ротор охлаждают, помещая его в холодную комнату. Эта практика вполне приемлема и может снижать риск протеолитического расщепления, однако роторы не следует долго держать в холодном и влажном помещении. Регулярный осмотр роторов и центрифуг инженерами-специалистами помогает дольше сохранять оборудование в рабочем состоянии. Для того чтобы правильно оценить необходимость замены ротора или других сменных частей центрифуги, всем сотрудникам, работающим с данным оборудованием, следует вести специальный журнал. Важно записывать время каждого центрифугирования и соответствующую скорость ротора, поскольку постоянное ускорение и торможение ротора в конечном итоге приводит к усталости металла.

3.3.4 Техника безопасности при центрифугировании

Современные центрифуги не только очень сложно устроены, но также весьма прочные и содержат множество элементов, обеспечивающих безопасность работы. В высокоскоростных центрифугах и ультрацентрифугах камера, в которой размещается ротор, всегда армирована. Большинство центрифуг сконструировано с учетом возможной некоторой разбалансировки — в них предусмотрен режим автоматического отключения. Однако даже при правильно уравновешенном роторе повреждение центрифужной пробирки в процессе центрифугирования может вызвать значительную разбалансировку и привести к опасной вибрации. Никогда не следует помещать в ротор нечетное число пробирок. Если предполагается лишь частичная загрузка ротора, то пробирки следует размещать друг напротив друга, чтобы нагрузка распределялась равномерно вокруг оси ротора. Это важно не только для ультрацентрифуг, в которых достигается огромная

центробежная сила, но и для различных настольных центрифуг, в которых роторы обычно закреплены более жестко. При использовании роторов с качающимися стаканами в ротор следует помещать все стаканы и правильно закручивать все крышки. Даже если всего в двух стаканах содержится раствор, в ротор следует поместить все стаканы, поскольку лишь вся система в целом может обеспечить правильный баланс центрифуги. В некоторых роторах с качающимися стаканами все стаканы имеют номера, соответствующие определенным гнездам в роторе; их всегда следует размещать только в предназначенное для них место и не путать между собой. Чтобы не нарушать градиент среды, центрифугирование в роторах с качающимися стаканами обычно начинают лишь после полного установления вакуума, а также начинают и заканчивают очень плавно. Это также позволяет избежать внезапной разбалансировки системы из-за повреждения или растрескивания пробирки или опасной вибрации ротора.

Обычно технике безопасности уделяется большое внимание при выполнении любого исследовательского проекта, кроме того, каждый исследователь должен знать правила обращения с потенциально опасными веществами. Если вам предстоит центрифугировать опасные химические вещества, а также инфекционные или радиоактивные материалы, ознакомьтесь с требованиями правил техники безопасности в вашей лаборатории. Проведите пробный эксперимент, чтобы избежать потерь ценных образцов и дорогих химических реактивов. Как и любой другой биохимический эксперимент, центрифугирование никогда не следует проводить без предварительной подготовки, и никогда не следует забывать о спецодежде. С центрифужными пробирками следует обращаться очень бережно, чтобы не взмутить осадок, не повредить полосы разделившихся веществ или не нарушить градиент. Для правильного выбора центрифужных пробирок следует придерживаться рекомендаций фирм-производителей роторов. С целью обеспечения безопасности работы и успешного проведения эксперимента необходимо удостовериться, что используемые центрифужные пробирки химически устойчивы к выбранному растворителю, имеют необходимую емкость, могут быть использованы с конкретным типом ротора и выдерживают максимальные ускорения и температуру, указанные в методике эксперимента. Большие центробежные ускорения, возникающие в роторах с фиксированным углом наклона, могут приводить к разрушению пробирок, поэтому для роторов такого типа предпочтительнее выбирать пробирки из толстого стекла. Напротив, в роторах с качающимися стаканами пробирки лучше защищены от деформации; чаще всего используют полиалломерные пробирки. Важно также после проведения центрифугирования правильно обращаться с пробирками, где находятся разделенные фракции. Часто для анализа разделенных фракций пробирки приходится прокалывать или разрезать. Например, разделившиеся полосы веществ могут быть отобраны через прокол в донышке пробирки или путем разрезания пробирки после быстрой заморозки. Если образцы предварительно инкубировали с радиоактивными маркерами или токсичными лигандами, следует тщательно следить за отсутствием загрязнения камеры ротора и стаканов. Если же потенциально опасные вещества

центрифугируют регулярно, то для такой работы рекомендуется отвести специальную центрифугу и роторы и тем самым избежать загрязнения остального оборудования.

3.4 ПРЕПАРАТИВНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

3.4.1 Дифференциальное центрифугирование

Фракционирование целых клеток и **субклеточное фракционирование** — это незаменимые методы, используемые в биохимическом анализе. Хотя полное разделение многих субклеточных структур достигается только при ультрацентрифугировании, выделение крупных клеточных компонентов, таких как ядра, митохондрии, хлоропласты или большие белковые агрегаты, возможно при помощи обычной высокоскоростной центрифуги с охлаждением. **Дифференциальное центрифугирование** основано на различии в скоростях седиментации биологических частиц разного размера и плотности. Путем постепенного повышения центробежного ускорения можно разделить на отдельные фракции грубые гомогенаты тканей, содержащие органеллы, мембранные везикулы и другие фрагменты. После предварительного осаждения из гомогената крупных частиц (таких как клеточный дебрис) различные биологические структуры и агрегаты попадают в осадок или супернатант в зависимости от скорости и времени центрифугирования, а также размера и плотности частиц. Для повышения выхода мембранных структур и белковых агрегатов осадок клеточного дебриса часто вновь гомогенизируют и осаждают несколько раз. Это особенно важно в случае прочных биологических структур, таких как мышечная или соединительная ткань, а также при наличии лишь небольших количеств образца, например при биопсии или анализе первичных клеточных культур.

Дифференциальное осаждение суспензии частиц в центробежном поле схематично представлено на рис. 3.4, *а*. Сначала все частицы гомогената равномерно распределены по пробирке, а затем при центрифугировании осаждаются с характерной для каждого вида частиц скоростью. Наиболее крупные частицы образуют осадок на дне пробирки, оставляя более мелкие частицы в супернатанте. Однако на начальных стадиях центрифугирования мелкие частицы также захватываются и попадают в осадок, приводя к определенному загрязнению осадка. После каждой стадии дифференциального центрифугирования осадок и супернатант аккуратно отделяют друг от друга. Для минимизации загрязнения одних фракций другими осадки обычно промывают несколько раз, вновь суспендируя их в буфере и центрифугируя в тех же условиях. Однако многократное промывание может значительно уменьшить конечный выход осадка, поэтому при небольшом количестве исходного материала так не поступают. Образующиеся фракции супернатанта центрифугируют при более высокой скорости и более длительное время, что приводит к разделению мелких и средних частиц. Дифференциальное центрифугирование может быть использовано, например, для выделения интактных митохондрий и микросом.

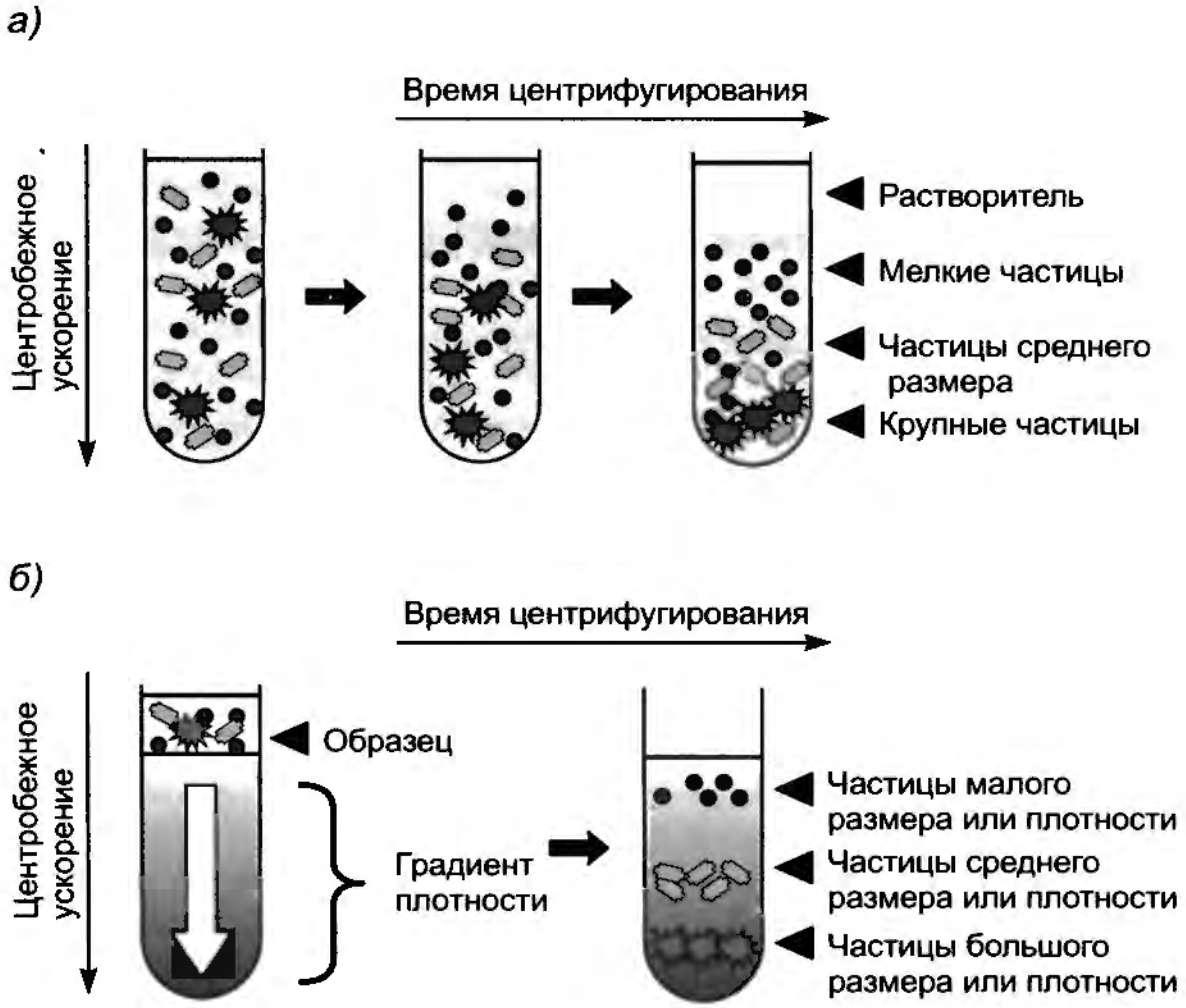


Рис. 3.4. Схема показывает поведение частиц при дифференциальном и изопикническом разделении. При дифференциальном осаждении суспензии частиц под действием центробежной силы (*а*) движение частиц зависит от их плотности, размера и формы. Для разделения биологических частиц в градиенте плотности (*б*) образцы аккуратно наносят в верхнюю часть градиента, сформированного перед проведением центрифугирования. В случае изопикнического разделения центрифугирование продолжают до тех пор, пока выделяемые частицы не достигнут изопикнической точки в градиенте плотности. Напротив, при разделении по скорости седиментации искомая фракция не достигает изопикнической точки при центрифугировании

3.4.2 Центрифугирование в градиенте плотности

Наилучшим методом для дальнейшего разделения биологических частиц одинакового размера, но различной плотности является ультрацентрифугирование в предварительно сформированном или самоустанавливающемся **градиенте плотности**. Центрифугирование в данном случае может быть как скоростным, так и равновесным. На рис. 3.4, *б* изображено поведение частиц различной плотности при препаративном ультрацентрифугировании. Смесь частиц (например, в гетерогенном образце мембран микросом) наносят в верхнюю часть готового градиента плотности. Существует множество материалов для приготовления градиента, и выбор конкретного градиента плотности зависит от конкретной задачи. Хлорид цезия широко используется для дифференциального окрашивания ДНК и выделения плазмид, нуклеопротеидов и вирусов. Бромид и иодид натрия применяют

для фракционирования липопротеинов или дифференциального окрашивания молекул ДНК и РНК. Различные фирмы предлагают целый спектр материалов для приготовления градиента с целью разделения целых клеток и субклеточных элементов, например перколл, фиколл, декстран, Metrizamide или Nycodenz. Стабильный градиент для разделения мембранных везикул из гомогенатов тканей готовят на основе сахарозы очень высокой степени очистки, не содержащей примесей ДНКаз, РНКаз и протеиназ. Если стоит задача разделить все мембранные частицы с широким диапазоном плотностей, максимальная плотность градиента должна превышать плотность самых плотных частиц. Для этой цели используют как **ступенчатый**, так и **непрерывный градиент**. Если прибора для автоматического приготовления градиентов в наличии нет (как это чаще всего бывает в студенческих практикумах), совсем недолго и несложно приготовить ступенчатый градиент с помощью пипетки. А вот стабильный непрерывный градиент плотности вручную приготовить очень сложно, для этого требуется автоматическое оборудование. Приготовленные градиенты для выравнивания температуры обычно выдерживают в холодной комнате, а переносят их с большой осторожностью в специальных держателях, чтобы не произошло перемешивания слоев. При разделении субклеточных компонентов в соответствии со скоростью седиментации искомая фракция не достигает изопикнической точки в градиенте. Для **изопикнического разделения**, напротив, центрифугирование продолжают до тех пор, пока плотность частиц в искомой фракции не сравняется с плотностью градиента.

3.4.3 Практика препаративного центрифугирования

Дифференциальное центрифугирование, ультрацентрифугирование в градиенте плотности и аффинное разделение — эти методы были использованы для выделения микросомальной фракции из гомогената мышц с последующим разделением мембранных везикул различной плотности (рис. 3.5), выделении высокоочищенного препарата везикул сарколеммы (рис. 3.6) и субфракционировании митохондриальных мембран из клеток печени (рис. 3.7). Волокна скелетных мышц — это высокоспециализированные структуры, состоящие из сократительных элементов и мембранных систем, участвующих в сокращении мышц, регуляции процессов возбуждения–сокращения, энергетическом метаболизме и стабилизации клеток (рис. 3.5, *а*). Их поверхностная мембрана состоит из сарколеммы с инвагинациями — системой трансверзальных (поперечных) трубочек (Т-трубочек). В трансверзальных трубочках можно выделить не имеющие контактов области и триады, которые представляют собой зоны контакта с терминальными цистернами саркоплазматического ретикулума. Деполяризация сарколеммы, индуцированная мотонейроном, через систему трубочек активирует потенциалчувствительный рецепторный комплекс, который непосредственно инициирует открытие кальциевого канала. Система мембран, формирующая резервуар ионов для кальциевого обмена, представлена специализированным эндоплазматическим ретикулумом. Эта система образует мембранную оболочку вокруг сократительного аппарата,

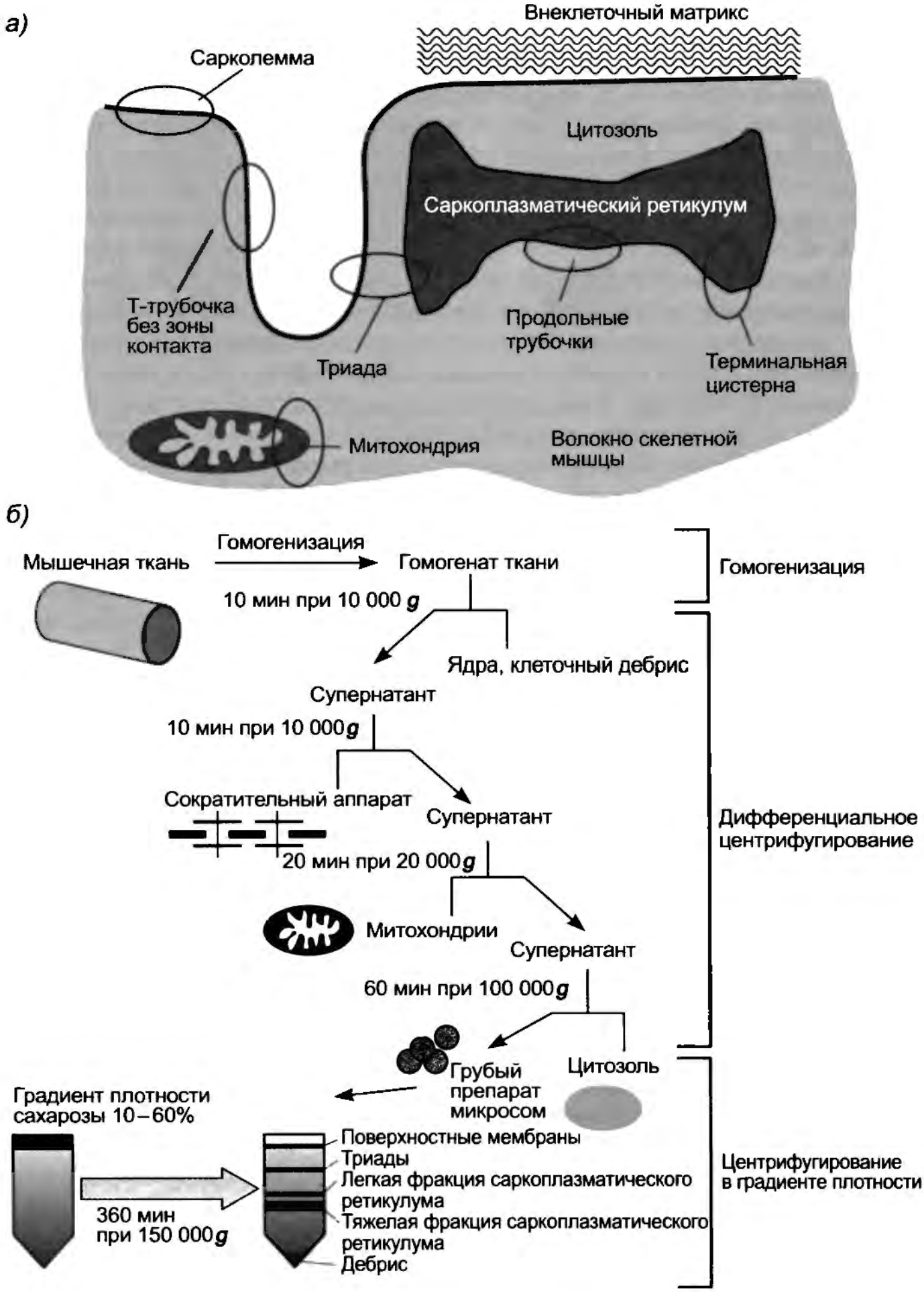


Рис. 3.5. Разделение гомогената скелетных мышц на различные субклеточные фракции: *а* — система мембран волокна скелетной мышцы; *б* — схема выделения этой фракции мембран из гомогената ткани с помощью дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности

в результате действия которого продольные трубочки вовлечены главным образом в захват ионов кальция при расслаблении мышц, а терминальные цистерны обеспечивают быстрое высвобождение кальция, инициирующее сокращение мышц. В митохондриях происходит окислительное фосфорилирование; они обладают сложной системой внешних и внутренних мембран, участвующих в энергетическом метаболизме клетки.

Для лучшей гомогенизации ткани процесс измельчения должен происходить в буфере с оптимальными значением pH, концентрациями соли, стабилизирующих кофакторов и хелатирующих агентов. Для того чтобы свести к минимуму протеолитическое расщепление, важно также соблюсти оптимальное соотношение между массой сырой ткани и объемом буфера, учесть влияние температуры (обычно эксперимент ведут при 4 °C), а также предусмотреть наличие ингибиторов протеаз. До 1970-х гг. ни ингибиторы протеаз, ни хелатирующие агенты не использовались широко в процессе гомогенизации. Это приводило к разрушению многих белков с большой молекулярной массой. С тех пор как при фракционировании субклеточных элементов стали принимать меры против действия эндогенных ферментов, удалось выделить белки с очень большой молекулярной массой: дистрофин (427 кДа), рианодиновый рецептор (565 кДа), небулин (800 кДа) и самый длинный на сегодняшний день полипептид титин (2200 кДа). Готовые наборы ингибиторов протеаз обычно имеют широкую специфичность и действуют против цистеиновых протеиназ, сериновых протеиназ, аспартатных протеиназ, металлопротеиназ и аминопептидаз. Их обычно добавляют в буфер в микромолярных концентрациях до начала гомогенизации ткани. В зависимости от времени полураспада определенного ингибитора протеаз, длительности процесса фракционирования и количества эндогенного фермента в отдельных фракциях иногда в процессе выделения приходится добавлять новую порцию ингибиторов. Существуют также комплекты ингибиторов протеиназ для самостоятельного приготовления наборов необходимого состава, они обычно включают такие вещества как ингибитор трипсина, E-64, аминоэтилбензолсульфонилфторид (AEBSF), антипаин, апротинин, бензамидин, бестатин, химостатин, ε-аминокапроновая кислота, N-этилмалеимид, лейпептин, фосфорамидон и пепстатин. Среди наиболее часто применяемых хелатирующих агентов, которые связывают двухвалентные ионы и тем самым ингибируют действие таких ферментов, как металлопротеиназы, можно назвать ЭДТА и ЭГТА (этиленгликольбис-(аминоэтиловый эфир)тетраацетат).

3.4.4 Субклеточное фракционирование

На рис. 3.5, *б* представлена типичная схема субклеточного фракционирования. В зависимости от количества исходного материала, которое в случае препаратов скелетных мышц обычно колеблется в диапазоне от 1 до 500 г, для каждой стадии выделения используется особый ротор и центрифужные пробирки соответствующего размера. Различные фракции гомогената мышц удается получать в результате последовательного увеличения скорости и времени центрифугирования. Обычно для осаждения ядер

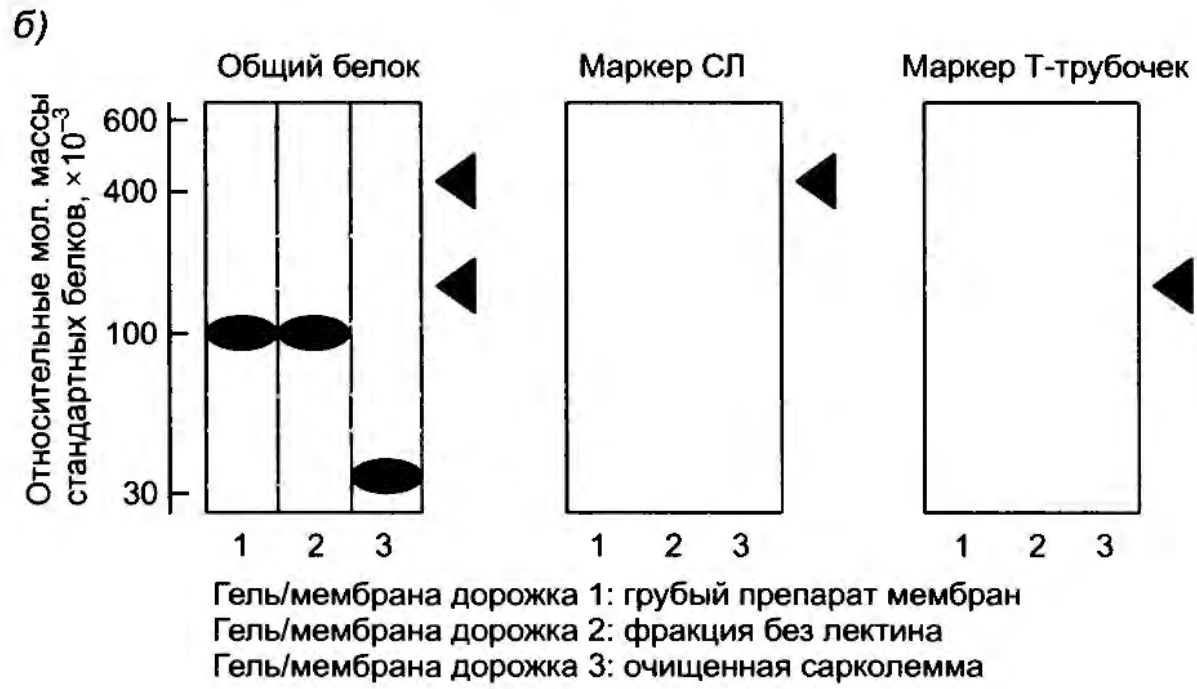


Рис. 3.6. Аффинный метод разделения мембранных везикул из скелетных мышц, основанный на связывании с лектином: *а* — схема препаративного выделения высокоочищенной сарколеммы (СЛ); *б* — иммуноблоттинг после проведения фракционирования. В качестве маркеров фракции сарколеммы и трансверзальных (поперечных) трубочек служили связанный с поверхностью мембраны дистрофин (427 кДа) и α_{1S}-субъединица дигидропиридинового рецептора (170 кДа) соответственно. NAG — N-ацетилглюкозамин, АЗП — агглютинин зародышей пшеницы, СН — супернатант

и клеточного дебриса достаточно центрифугирования в течение 10 мин при 1000 ***g***, для осаждения сократительного аппарата — 10 мин при 10 000 ***g***, для выделения обогащенной митохондриями фракции — 20 мин при 20 000 ***g***, а для разделения микросомальной и цитозольной фракций — 1 ч при 100 000 ***g***. Для удаления примесей миозина из фракции мембран можно использовать промывку раствором с небольшой концентрацией солей. Для более тонкого разделения фракций микросом, полученных из различных мышечных мембран, осуществляют центрифугирование в градиенте сахарозы. Если использовать ротор с вертикальным расположением пробирок или ротор с качающимися стаканами при достаточно высокой скорости вращения, можно отдельно получить фракции поверхностных мембран, триад, продольных трубочек и мембран терминальных цистерн. Отобрать полученные фракции или полосы можно с помощью пипетки, начиная с верхней части пробирки. Если же градиент относительно нестабилен или полосы расположены слишком близко друг к другу, фракции отбирают в автоматическом режиме, начиная от дна пробирки. В таком случае дно пробирки прокалывают, а фракции выходят через отверстие либо под действием силы тяжести, либо выдавливаются в результате добавления в пробирку жидкости большей плотности. Еще один способ отбора фракций из нестабильного градиента — разрезание пробирки после замораживания. Два последних метода приводят к разрушению пробирок, но оба рутинно используются в исследовательских лабораториях.

В процессе субклеточного фракционирования неизбежно происходит загрязнение одних фракций другими. Техническая причина этого заключается в отсутствие адекватного контроля образования различных типов мембранных структур при гомогенизации ткани. Мембранные домены, которые исходно имели близкую субклеточную локализацию, могут образовывать весьма разнообразные структуры, например «вывернутые наизнанку» частицы, частицы с нормальной ориентацией мембраны, слитые структуры, незамкнутые частицы и пласты мембран. Кроме того, частицы маленького размера могут захватываться более крупными частицами. Различные мембранные системы могут агрегировать неспецифическим образом или связываться с имеющимися в большом количестве растворимыми белками. В связи с этим, если для тонкого клеточного или биохимического эксперимента требуются фракции высокоочищенных мембран, следует прибегнуть к аффинному разделению. На рис. 3.6 представлены схемы аналитического и препаративного выделения, основанного на аффинном разделении. В современных методах разделения применяют разные биологические или химические лиганды. Иммуноаффинный метод выделения основан на специфическом связывании антител с соответствующими антигенами.

3.4.5 Аффинные методы очистки мембран

На рис. 3.6, *а* изображен широко применяемый метод очистки, основанный на **агглютинации лектинов**. Лектины — это растительные белки, которые прочно связываются со специфическими углеводными группами. Смысл использования агглютинина зародышей пшеницы (АЗП) для аффинной очистки сарколеммы состоит в том, что плазмалемма мышечных

клеток при гомогенизации образует в основном частицы с нормальной ориентацией мембраны. Напротив, частицы, образующиеся из поперечных трубочек, в основном вывернуты наизнанку и, следовательно, их углеводы спрятаны внутрь. Гликопротеины имеющегося в большом количестве саркоплазматического ретикулума не имеют углеводных остатков, которые узнавались бы этим конкретным видом лектина. Следовательно, только частицы сарколеммы связываются с лектином зародышей пшеницы. Эти агрегаты можно отделить от фракции поперечных трубочек путем центрифугирования (2 мин, 15 000 ***g***). Под электронным микроскопом видно, что слипшиеся мембраны представлены крупными гладкими частицами сарколеммы с электроннoплотными включениями. Для удаления этой примеси, происходящей из саркоплазматического ретикулума, иммобилизованные частицы обрабатывают неионным детергентом тритоном X-100 в небольшой концентрации. При этой процедуре не происходит солюбилизации интегральных мембранных белков, но в частицах сарколеммы образуются отверстия, через которые могут выходить гораздо более мелкие частицы саркоплазматического ретикулума. Для отделения агрегатов сарколеммы от примесей используют центрифугирование на небольшой скорости. Для отделения связанного лектина фракцию инкубируют с сахаром N-ацетилглюкозамином, который вытесняет лектин из связей с поверхностными гликопротеинами. Заключительное центрифугирование (20 мин, 150 000 ***g***) приводит к образованию осадка высокоочищенных частиц сарколеммы. Быстрым аналитическим методом, с помощью которого можно подтвердить выделение именно фракции плазмалеммы мышечных клеток, является электрофорез в миникамере и иммуноблоттинг. На рис. 3.6, *б* изображены результаты иммуноблоттинга грубого препарата поверхностных мембран, «безлектиновой» фракции и высокоочищенной фракции сарколеммы с окрашиванием по белку и с помощью специфических антител. Для контроля разделения двух фракций мембран можно использовать антитела к маркерным белкам поперечных трубочек и сарколеммы, таким как α_{1S}-субъединица дигидропиридинового рецептора (170 кДа) и дистрофин (427 кДа) соответственно. Такой метод анализа особенно полезен для характеристики мембранных везикул, поскольку в этом случае не существует простого и быстрого метода, основанного на определении активности маркерных ферментов.

При разделении митохондриальных мембран в градиенте плотности для выявления полос, соответствующих внутренней мембране, зонам контакта и внешней мембране, обычно осуществляют не иммуноблоттинг, а анализ распределения ферментов. Более традиционный путь состоит в анализе связывания или ферментативной активности субклеточных фракций после центрифугирования. На рис. 3.7, *а* схематично изображены отделы митохондрий печени и связанные с ними маркерные ферменты. Видно, что моноаминоксидаза (МАО) преобладает во внешней мембране, сукцинатдегидрогеназа (СДГ) связана с внутренней мембраной, а хорошим маркером зон контакта двух мембран является глутатионтрансфераза (ГТ). Мембранные везикулы из интактных митохондрий можно получить, если суспензии органелл дать сначала набухнуть, затем сжать митохондрии и

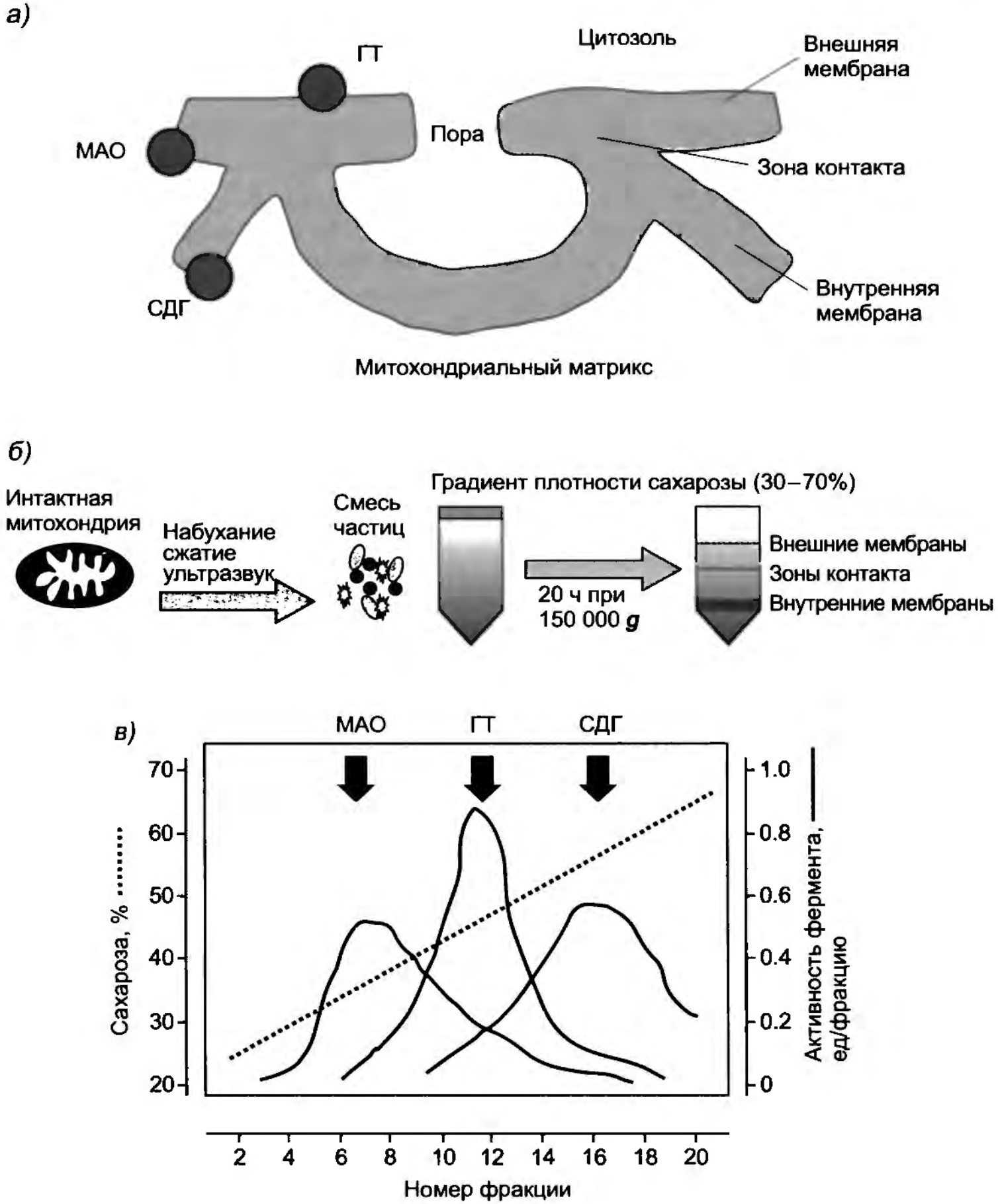


Рис. 3.7. Схема фракционирования мембран из митохондрий печени: *а* — распределение маркерных ферментов в отделах митохондрий печени (МАО — моноаминоксидаза, СДГ — сукцинатдегидрогеназа, ГТ — глутатионтрансфераза); *б* — выделение фракций, обогащенных складчатой внутренней мембраной, зонами контакта и внешней мембраной; *в* — распределение митохондриальных мембран после центрифугирования в градиенте плотности

подействовать ультразвуком. Далее смесь частиц разделяют на три типа мембран путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 3.7, *б*). Из распределения активностей маркерных ферментов следует, что внешняя мембрана имеет меньшую плотность, чем внутренняя. Зоны контакта расположены посредине и, кроме ГТ, содержат также ферменты, характерные для внутренней и внешней мембран (рис. 3.7, *в*). При выделении отдельных субклеточных структур в качестве маркерных ферментов обычно используют: Na/K-АТФазу для плазмалеммы, глюкозо-6-фосфатазу для эндоплазматического ретикулума, галактозилтрансферазу для аппарата Гольджи, СДГ для митохондрий, кислую фосфатазу для лизосом, каталазу для пероксисом и лактатдегидрогеназу для цитозоля.

3.5 АНАЛИТИЧЕСКОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

3.5.1 Применение аналитического ультрацентрифугирования

Поскольку биологические макромолекулы постоянно перемещаются случайным образом, гравитационное поле Земли практически не оказывает влияния на их относительно равномерное распределение в водной среде. Отдельные биомолекулы в растворе начинают осаждаться только при значительных ускорениях, например в ультрацентрифуге. В типичной аналитической ультрацентрифуге создается ускорение до 250 000 ***g***. Центрифужная ячейка устроена таким образом, чтобы при таком высоком ускорении свет мог проходить сквозь биологические частицы, что необходимо для анализа распределения их концентрации. На рис. 3.8 представлена схема оптической системы современной аналитической ультрацентрифуги. Благодаря использованию импульсных ксеноновых ламп высокой интенсивности, а также благодаря повышению чувствительности приборов и расширению диапазона длин волн теперь можно проводить точные измерения сильноразбавленных растворов белка при длине волны ниже 230 нм. На аналитических ультрацентрифугах, например Beckman Optima XL-A, предусмотрена возможность работы в диапазоне длин волн от 190 до 800 нм. Осаждение выделенных белков или нуклеиновых кислот осуществляют при определении относительных молекулярных масс, чистоты образцов и формы этих молекул. Аналитическое ультрацентрифугирование с целью определения относительных молекулярных масс макромолекул может быть основано на **скорости седиментации** или на достижении **седиментационного равновесия**. Гидродинамические свойства макромолекул описываются коэффициентами седиментации; их можно определить по скорости перемещения полосы конкретного типа биомолекул в гравитационном поле. Подобный анализ поведения макромолекул в растворе может дать полезную информацию о наличии крупных агрегатов, подтвердив тем самым биохимические данные об образовании комплексов. Коэффициент седиментации можно использовать для анализа изменения размера и формы макромолекул при изменении внешних условий, таких как pH среды, температура или присутствие кофакторов.

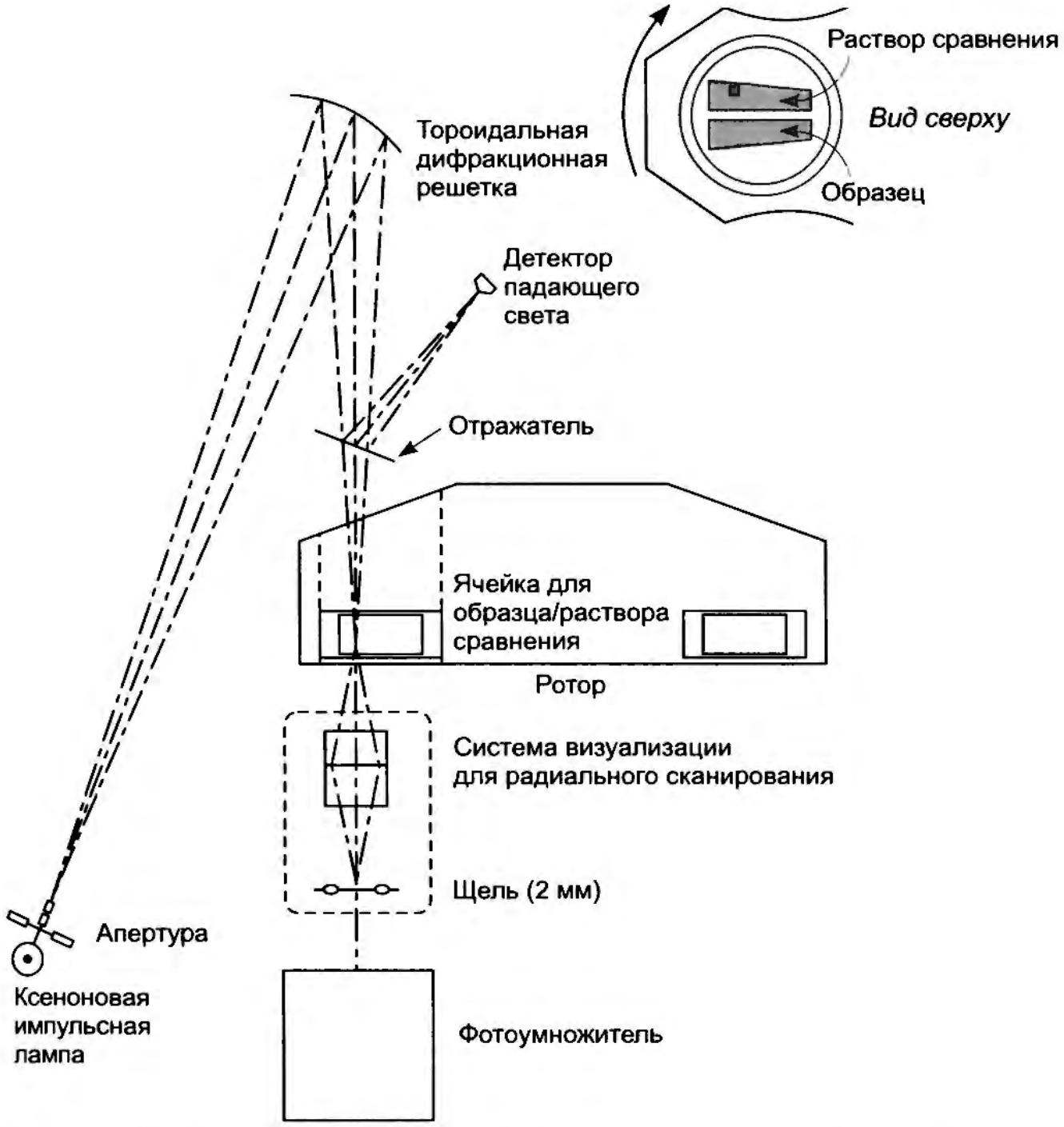


Рис. 3.8. Схема оптической системы аналитической ультрацентрифуги. Ксеноновая импульсная лампа высокой интенсивности установлена в аналитических ультрацентрифугах Beckman Optima XL-A и дает возможность проводить измерения в диапазоне длин волн от 190 до 800 нм. Высокая чувствительность оптической системы позволяет анализировать сильноразбавленные растворы белка при длине волны ниже 230 нм. Печатается с любезного разрешения Beckman–Coulter

Чаще всего аналитическое центрифугирование проводят в следующих ситуациях:

- для определения чистоты образцов макромолекул;
- для определения относительных молекулярных масс молекул в нативном состоянии;

- для анализа изменений относительных молекулярных масс надмолекулярных комплексов;
- для анализа конформационных изменений;
- для изучения процесса связывания лигандов (разд. 16.4.1).

Разделение, основанное на скорости седиментации частиц (скоростное центрифугирование), может быть использовано для определения чистоты препарата. При этом пользуются оптической системой Шлирена. В данном методе измеряют градиент показателей преломления в каждой точке центрифужной ячейки через определенные интервалы времени. При скоростном центрифугировании гомогенные препараты образуют единственную, симметричную, четко различимую полосу. Это говорит о том, что анализируемые макромолекулы имеют одинаковую молекулярную массу, форму и размер. Однако нельзя однозначно утверждать, что они обладают одинаковым электрическим зарядом и биологической активностью. Для выявления таких различий между молекулами с одинаковой молекулярной массой следует прибегнуть к другим аналитическим методам, таким как электрофорез и ферментативный или другой биохимический метод. Достоинством скоростного метода центрифугирования является возможность четко уловить наличие более легких или более тяжелых примесей, что выражается в появлении плеча у основного пика, асимметрии пика или дополнительного пика. Более подробную информацию можно почерпнуть из литературы, приведенной в разд. 3.6. Кроме того, производители аналитических центрифуг издают множество прекрасных брошюр, посвященных теоретическим основам и практическому применению данного метода. Эти руководства обычно написаны биохимиками и их очень полезно прочесть, чтобы ближе познакомиться с данной областью анализа.

3.5.2 Определение относительных молекулярных масс

Если надо точно определить относительную молекулярную массу растворенного вещества в нативном состоянии, метод аналитического ультрацентрифугирования не имеет себе равных. Для анализа требуется совсем немного вещества (20–120 мм^3) в небольшой концентрации (0,01–1 г/дм^3). Кроме того, метод позволяет определять молекулярные массы веществ в очень широком диапазоне. В сочетании с другими методами — электрофорез, хроматография, кристаллографические методы, а также метод секвенирования, биохимические свойства биологических молекул могут быть изучены весьма детально. Если поглощение исследуемых частиц (белков, углеводов, нуклеиновых кислот) отличается от поглощения растворителя, можно использовать метод аналитического ультрацентрифугирования.

В одном из вариантов метода (так называемое boundary sedimentation) биологические частицы в исходном растворе, помещенном в аналитическую ячейку, распределены равномерно. Под действием центробежного ускорения молекулы начинают передвигаться в радиальном направлении от центра вращения. Появляется четкая граница между освободившимся от частиц растворителем и раствором, который все еще содержит частицы.

Движение этой границы во времени является мерой скорости седиментации частиц. Коэффициент седиментации напрямую зависит от массы частиц. Можно измерить скорость перемещения частиц в центробежном поле и построить график зависимости натурального логарифма концентрации растворенного вещества от квадрата расстояния от оси вращения ($\ln c$ от r^2), который представляет собой прямую с углом наклона, пропорциональным молекулярной массе мономерной частицы.

Альтернативным методом определения относительных молекулярных масс биомакромолекул является зональное центрифугирование (band sedimentation). В этом методе образец наслаивают на растворитель, имеющий более высокую полность. При центрифугировании растворитель образует градиент плотности, а за перемещением полосы образца в этом градиенте наблюдают в аналитической ячейке.

Аналитическое центрифугирование позволяет определять относительные молекулярные массы в диапазоне от нескольких сотен до нескольких миллионов. Метод применяют при изучении небольших углеводов, белков, нуклеиновых кислот, вирусов и субклеточных частиц, таких как митохондрии.

3.5.3 Коэффициент седиментации

Биохимические исследования убедительно показали, что отдельно взятые биомакромолекулы не могут осуществлять своих биохимических или физиологических функций. Многие белки являются полифункциональными, и их активность регулируется сложными взаимодействиями в гомогенных и гетерогенных комплексах. Сегодня уже известно, что кинетика кооперативного взаимодействия и влияние микродоменов играют важнейшую роль в регуляции биохимических процессов. Поскольку конформационные изменения в макромолекулах могут приводить к изменению их скоростей седиментации, аналитическое ультрацентрифугирование является идеальным методом анализа подобных структурных модификаций. Например, если при изменении конформации макромолекула принимает более компактную форму, сопротивление трению в растворе снижается, противоположный эффект наблюдается, если структура молекулярного комплекса становится менее организованной. Связывание лигандов (ингибиторов, активаторов, субстратов), изменение температуры или буферных свойств среды могут вызвать конформационные изменения в субъединицах молекулы, что, в свою очередь, может привести к серьезным изменениям надмолекулярной структуры комплексов. Подобные модификации отражаются на величинах скоростей седиментации частиц. Метод равновесного центрифугирования может быть использован для определения относительных размеров отдельных субъединиц, участвующих в образовании комплекса, стехиометрии и размера комплекса при различных физиологических условиях, а также прочности связывания субъединиц.

При изучении нового белка, который, как предполагается, в нативных условиях существует в форме крупного комплекса, используют несколько

методов, позволяющих установить олигомерную структуру такой макромолекулы. Типичные методы исследования — гель-фильтрация, иммуноблоттинг, аффинная хроматография, иммунопреципитация и метод поперечных сшивок. Идеальным методом для получения биохимических данных является седиментационный анализ в градиенте плотности. Для первичного определения размера комплекса параметры седиментации комплекса сравнивают с известными данными для маркерных белков. Биологические частицы с разными молекулярными массами, формой и размером в центробежном поле двигаются с разными скоростями (разд. 3.1). Как следует из уравнения 3.7, коэффициент седиментации измеряется в секундах. В единицах Сведберга (1 S = 10^{-13} с) коэффициент седиментации для многих биомакромолекул лежит в диапазоне от 1 до 20, а для крупных частиц — рибосомы, микросомы и митохондрии — от 80 до нескольких тысяч. Типичный растворимый белок сывороточный альбумин с молекулярной массой 66 000 имеет коэффициент седиментации 4,5 S. На рис. 3.9 представлены результаты седиментационного анализа недавно открытого дистрофин-гликопротеинового комплекса (ДГК). Размер этого комплекса оценивается примерно как 18 S по его расположению между маркерными белками β-галактозидазой (16 S) и тиреоглобулином (19 S). Когда дистрофин был впервые выделен как мембранный элемент цитоскелета, оказалось, что он связывается с лектинами, хотя не имеет углеводных цепей. Это свидетельствует о том, что дистрофин может существовать в комплексе с поверх-

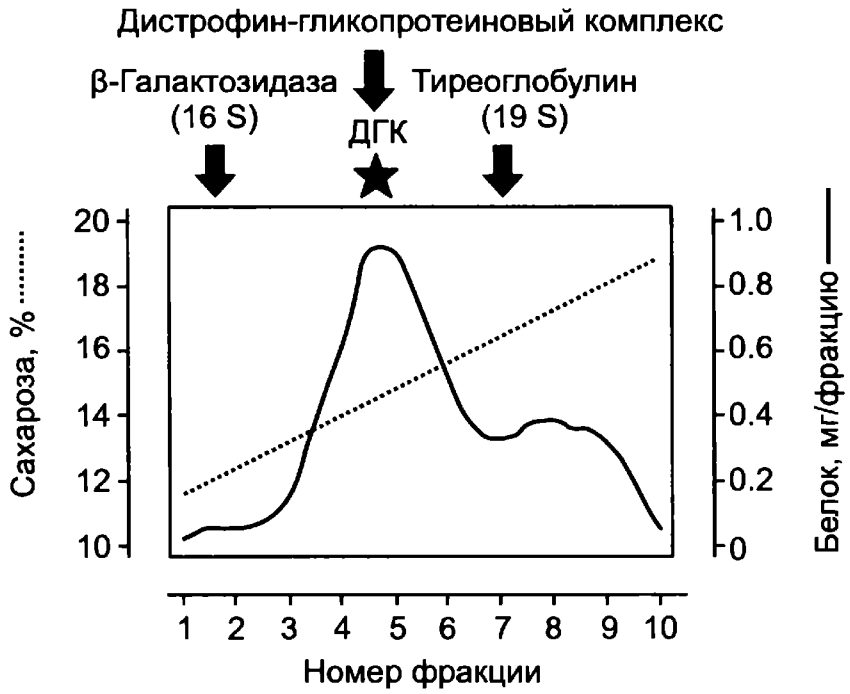


Рис. 3.9. Седиментационный анализ сложного белкового комплекса. Представлены результаты седиментации дистрофин-гликопротеинового комплекса (ДГК). Размер комплекса оценивается примерно как 18 S по его расположению между маркерными белками β-галактозидазой (16 S) и тиреоглобулином (19 S). Поскольку коэффициенты седиментации биомакромолекул относительно малы, их выражают в единицах Сведберга (S): 1 S = 10^{-13} с

ностными гликопротеинами. Седиментационный анализ подтвердил существование ДГК, а методы центрифугирования и различные биохимические модификации позволили детально изучить его состав. Сегодня известно, что дистрофин связан по крайней мере с 10 различными поверхностными белками, участвующими в стабилизации мембраны, связывании рецепторов и проведении сигнала в клетке. Успешное исследование ДГК методом седиментационного анализа служит примером того, как с помощью центрифугирования можно быстро получить информацию о новом белке.

3.6 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

FINDLAY, J.B.C. and EVANS, W.H. (1987) *Biological Membranes*. In: Practical Approaches in Biochemistry Series, IRL Press, Oxford/Washington, DC. В тексте имеются две обширные главы, посвященные методу дифференциального центрифугирования для субклеточного фракционирования животных и растительных клеток.

FISHER, D., FRANCIS, G.E. and RICKWOOD, D. (eds.) (1998). *Cell Separation*. In: Practical Approaches in Biochemistry Series, IRL Press, Oxford/Washington, DC. Об использовании метода седиментации для фракционирования клеток.

GRAHAM, J.M. and RICKWOOD, D. (eds.) (1997). *Subcellular Fractionation*. In: Practical Approaches in Biochemistry Series, IRL Press, Oxford/Washington, DC. Дается описание важнейших методов субклеточного фракционирования.

LAUE, T.M. (2001) Biophysical studies by ultracentrifugation. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 579–583. О применении ультрацентрифугирования для характеристики поведения макромолекул в сложных смесях.

LAUE, T.M. and STAFFORD, W.F. III (1999) Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structures* **28**, 75–100. Обзор имеющейся информации по аналитическому ультрацентрифугированию и ее современным приложениям.

MURRAY, B.E. and OHLENDIECK, K. (2000) Chemical cross-linking analysis of Ca-ATPase from rabbit skeletal muscle. *Biochemical Education* **28**, 41–46. Описание эксперимента для студенческого практикума — фракционирование гомогената скелетных мышц.

RALSTON, G. (1993) *Introduction to Analytical Ultracentrifugation*. Beckman Instruments, Fullerton, CA. Описание различных типов экспериментов, которые можно выполнить с помощью аналитической центрифуги.

Глава 4
Микроскопия

4.1 ВВЕДЕНИЕ

При биохимических исследованиях препараты тканей, клеток или органелл часто изучают с помощью микроскопа. Ситуации, которые требуют такого изучения, могут быть очень разные, например необходимость оценить сохранность образца в процессе эксперимента, рассмотреть в тонких деталях пространственное распределение макромолекул внутри клетки или же прямые измерения в живых тканях.

Существует два принципиально различных типа микроскопов — **световой микроскоп** и **электронный микроскоп** (рис. 4.1). В световых микроскопах свет фокусируется на изучаемом объекте с помощью набора стеклянных линз, а в электронном микроскопе пучок электронов создается с помощью электромагнитных линз. В световом микроскопе максимальное увеличение, которое может быть достигнуто, составляет около 1500 раз, в то время как электронный микроскоп может увеличивать объект до 200 000 раз.

Однако увеличивающая способность не главная характеристика микроскопа. Гораздо более важный параметр для оценки качества микроскопа — его **разрешение**, т. е. способность различать две близкорасположенные точки в образце. Максимальное разрешение обычных световых микроскопов составляет около 0,5 мкм, электронного микроскопа — 1 нм. С помощью светового микроскопа можно изучать как живые, так и мертвые клетки и ткани, причем часто с сохранением их натуральной окраски. С помощью электронного микроскопа анализируют только мертвые обрзцы, и всегда только при искусственном окрашивании. Благодаря последним достижениям оптики разрешение некоторых световых микроскопов достигает уже 0,2 мкм (разд. 4.8).

В биохимии микроскоп применяют для самых простых исследований и серийных анализов, например для быстрого определения состояния препарата клеток или клеток в растущей культуре тканей. Для этого вполне достаточного обычного настольного светового микроскопа. Однако с помощью микроскопа можно решать и гораздо более интересные задачи, например измерять изменения концентрации кальция в живом эмбрионе во времени — в течение всего нескольких миллисекунд. Для такого экспери-

мента потребуется более сложный световой микроскоп (такие приборы часто называют **системами визуализации**). Другой задачей может быть определение локализации макромолекул в связанных с мембраной отделах клетки. В данном случае задача решается с помощью электронного микроскопа, поскольку только этот прибор способен обеспечить разрешение на уровне нескольких нанометров.

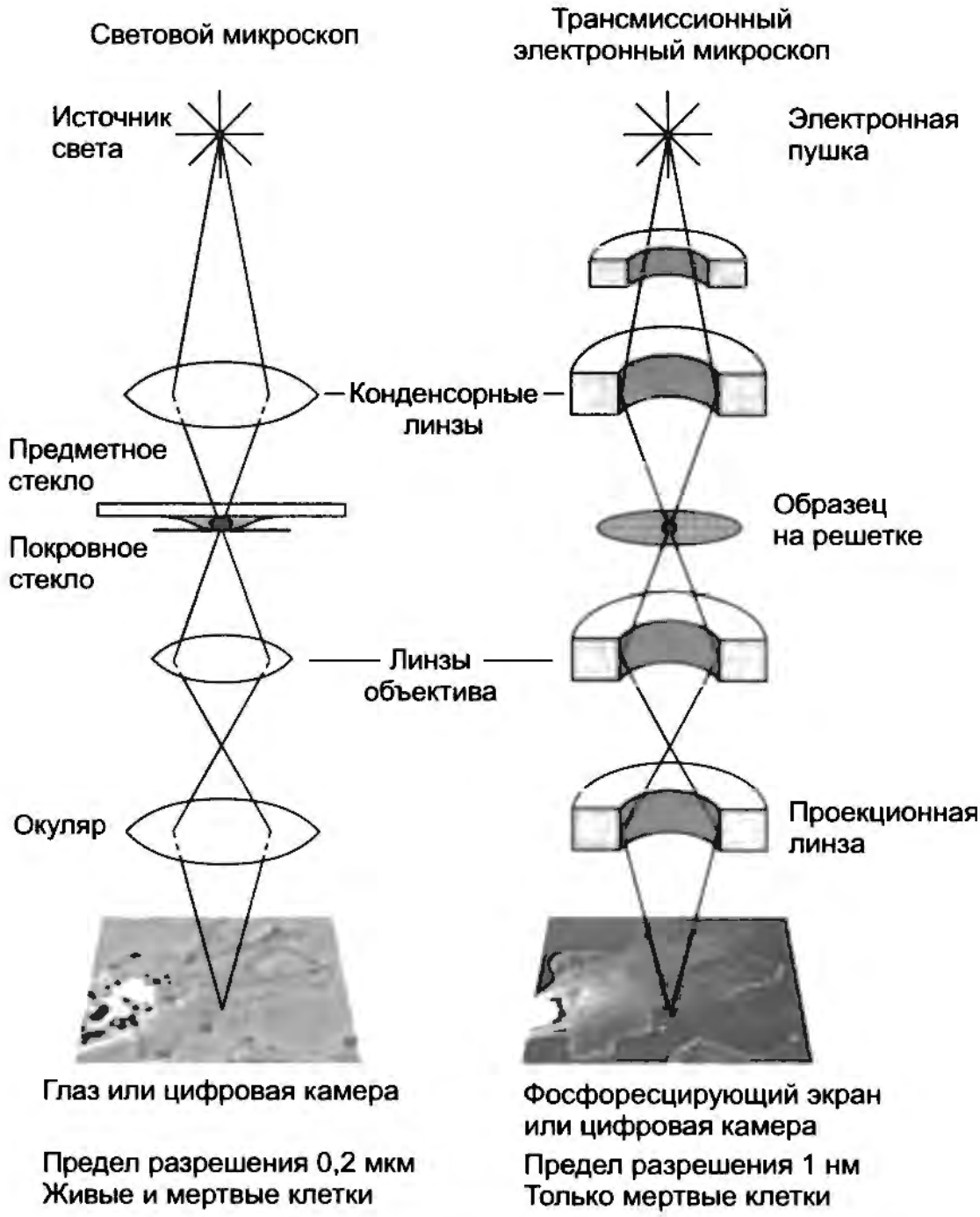


Рис. 4.1. Световой и электронный микроскопы. Путь лучей света в сложном световом микроскопе (СМ) и путь электронов в трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ). Свет от источника (СМ) фокусируется на образце с помощью стеклянной конденсорной линзы (СМ), а пучок электронов из пушки с помощью электромагнитных линз (ТЭМ). В СМ образец помещают на стеклянное предметное стекло и накрывают сверху покровным стеклом, в ТЭМ образец находится на специальной медной решетке. Изображение увеличивается с помощью линз объектива — стеклянных в СМ и электромагнитных в ТЭМ — и проецируется на детектор с помощью окуляра в СМ или линз в ТЭМ. Детектором в СМ может быть глаз или цифровая камера, а в ТЭМ — фосфоресцирующий экран или цифровая камера. (Изображения в СМ и ТЭМ любезно предоставлены Татьяной Свиткиной)

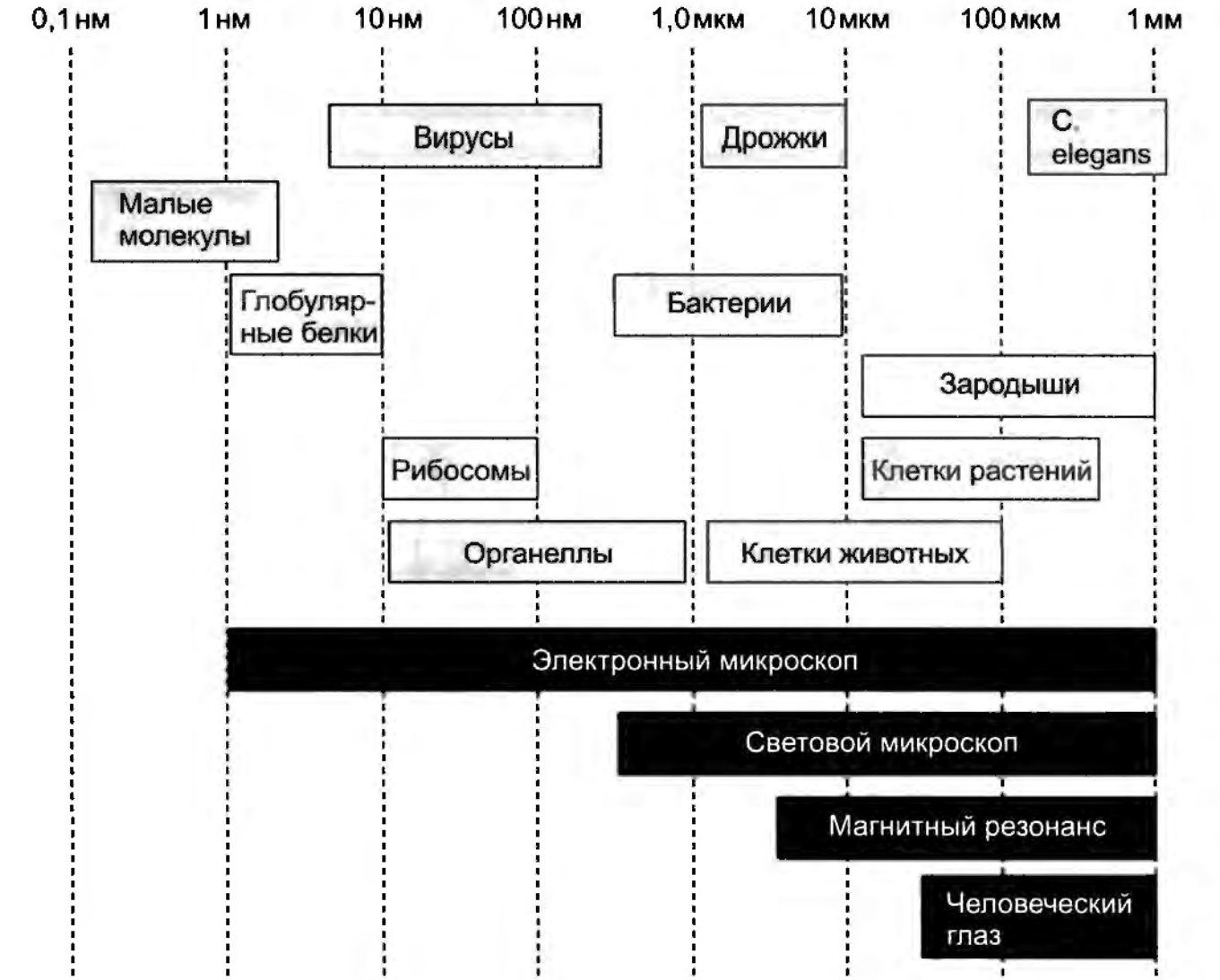


Рис. 4.2. Относительные размеры биологических объектов и некоторые приборы для их визуализации. Темные полосы внизу полосы соответствуют диапазону разрешения прибора

Микроскоп выбирают для решения конкретной задачи. Ведь при исследовании могут понадобиться изображения образцов разного размера и в разных увеличениях (рис. 4.2), от целых животных (метры), тканей и зародышей (микрометры) до отдельных клеток, белков и ДНК (нанометры). Изучение живых клеток под микроскопом может продолжаться от нескольких дней, например, когда изучается развитие нейрона или прогрессирование заболевания, до миллисекунд, например при отслеживании отдельных событий при передаче сигнала в клетке.

Благодаря техническим усовершенствованиям оборудования за последние десятилетия метод микроскопии стал вновь широко затребован в исследовательской практике. Большинство изображений, получаемых с помощью микроскопа, теперь записываются с помощью цифровых камер с программным обеспечением, цифровых принтеров и дисплеев. Расширился и круг биохимических задач, которые можно решить с помощью микроскопа, начиная от рутинных наблюдений за клетками и клеточными экстрактами и заканчивая специализированными методиками для прямой регистрации биохимических событий в клетке.

4.2 СВЕТОВОЙ МИКРОСКОП

4.2.1 Устройство светового микроскопа

Простейший световой микроскоп — это стеклянная линза в металлической оправе, т. е. простое увеличительное стекло, или лупа (рис. 4.3). Для изучения объекта под лупой его не подготавливают каким-либо особым образом, а просто держат рукой недалеко от глаза. Чтобы сфокусироваться на конкретной точке, линзу и образец перемешают друг относительно друга. Источником света обычно является солнечный свет или электрическая лампа. Детектором служит глаз человека, а регистрацию увиденного осуществляют либо на словах, либо путем изображения вручную на бумаге.

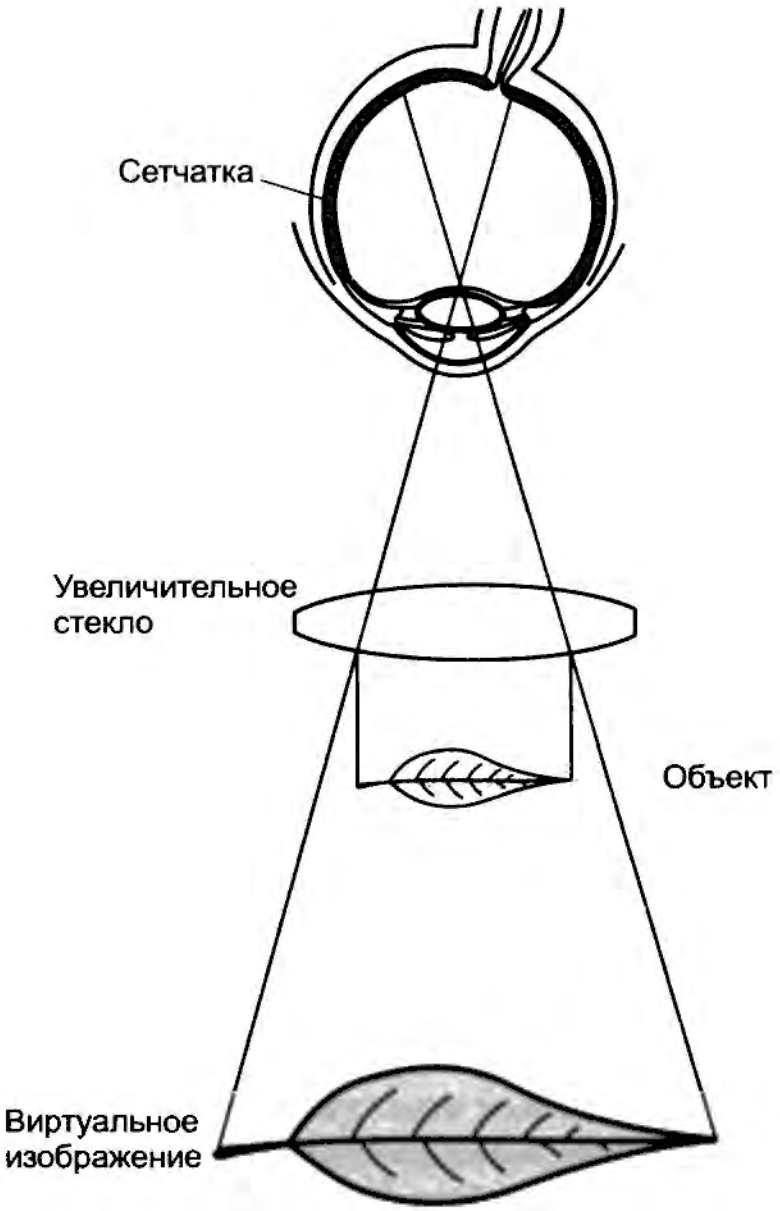


Рис. 4.3. Получение увеличенного изображения с помощью простейшего микроскопа — увеличительного стекла. Хрусталик глаза фокусирует свет на сетчатке, которая содержит светочувствительные клетки. Изображение объекта получают путем размещения между ним и глазом выпуклой линзы. Увеличение объекта достигается благодаря тому, что с помощью линзы увеличивается угол зрения. Изображение находится по ту же сторону от линзы, что и сам образец; такое изображение называют **виртуальным**

Сложные микроскопы

В основе строения всех современных микроскопов лежит комбинация нескольких линз: **конденсорной линзы**, **линзы объектива** и **линзы окуляра**. Поэтому такие инструменты называют сложными микроскопами (рис. 4.1). Каждый из этих элементов, в свою очередь, также представляет собой комбинацию линз, необходимых для создания определенного увеличения с минимальным количеством артефактов и аберраций. Например, **хроматическая аберрация** возникает из-за того, что лучи света с разной длиной волны проходят сквозь линзу под разными углами. В результате вокруг изображения появляются радужные круги. Эта проблема возникала, например, в самых первых микроскопах, созданных Антонием ван Левенгуком и Робертом Хуком. Чтобы избежать этой проблемы, все современные линзы до некоторой степени **корректируются**.

Одним из основных элементов сложного светового микроскопа является **источник света**, излучение от которого фокусируется на образце с помощью конденсорной линзы. Свет либо проходит сквозь образец (**проходящий свет**), либо отражается обратно (**отраженный свет**), а затем фокусируется с помощью линзы объектива на линзу окуляра. Изображение либо непосредственно воспринимается глазом, либо, что чаще, проецируется на **детектор**, например фотопленку или цифровую камеру. Изображение передается на дисплей на экране компьютера, сохраняется в цифровом формате и при необходимости воспроизводится.

Все элементы микроскопа закреплены на специальном **штативе**. По типу штатива световые микроскопы бывают **прямыми** и **инвертированными** (рис. 4.4). В прямом микроскопе источник света расположен под конденсорной линзой, а линзы объектива — над образцом. Чаще всего для получения изображений пользуются именно такими микроскопами. Инвертированный микроскоп сконструирован таким образом, что источник света и конденсорная линза располагаются над образцом, а линзы объектива — под ним. Это создает дополнительное пространство для манипуляций с образцом прямо на предметном столике, например можно выполнять микроинъекции в клетки культуры тканей, проводить оплодотворение яйцеклеток *in vitro* или наблюдать за развитием зародыша во времени.

Для получения и регистрации изображения хорошего качества чрезвычайно важную роль играет правильное освещение образца. Освещение осуществляется с помощью источника света: ртутной лампы, ксеноновой лампы или лазера. Свет от источника попадает на конденсорную линзу, расположенную за предметным столиком в прямом микроскопе (над столиком в инвертированном микроскопе) на держателе, который можно опускать и поднимать, чтобы добиться фокуса изображения (рис. 4.4). Конденсорная линза фокусирует свет от источника и направляет параллельные пучки света на образец. Правильно размещенная линза создает свет равномерной яркости без отблесков от образца (принцип освещения Келера). Неправильная регулировка конденсора и апертурной диафрагмы конденсора — основные причины плохого качества изображения в световом микроскопе.

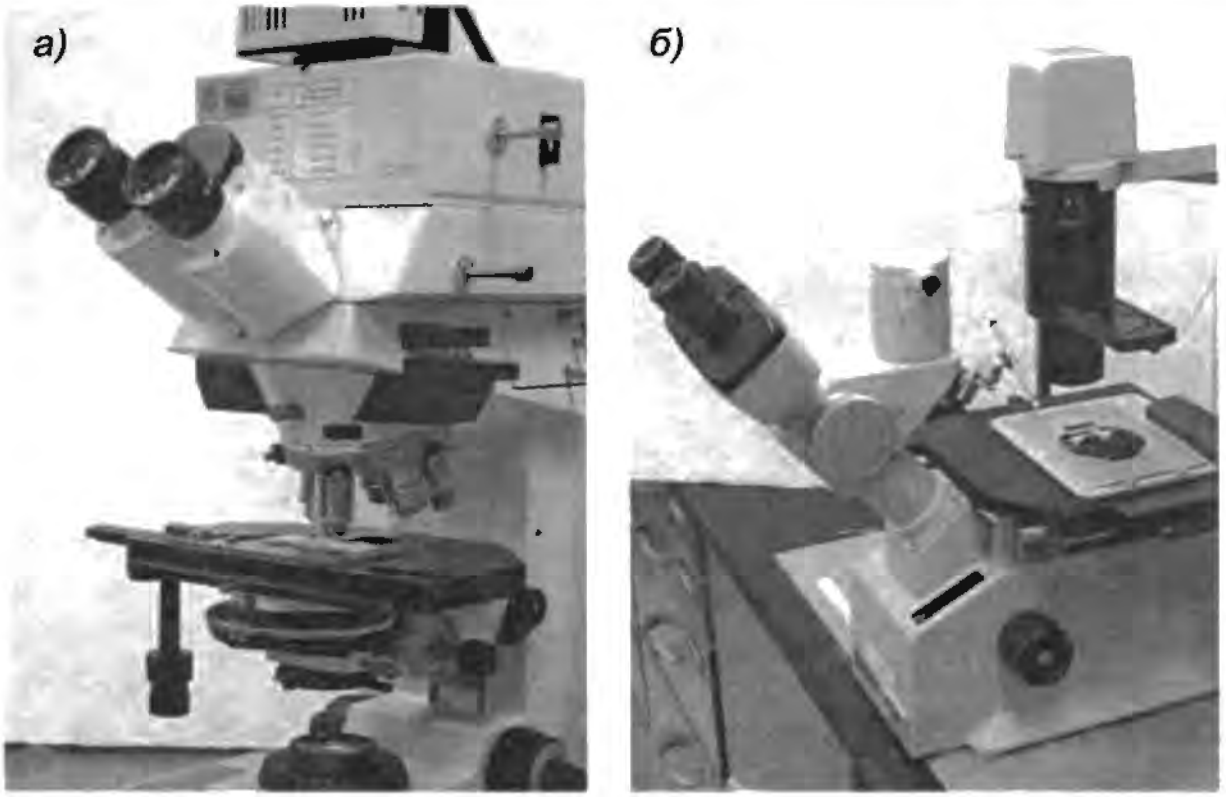


Рис. 4.4. Внешний вид светового микроскопа: *а* — прямой микроскоп и *б* — инвертированный микроскоп. Обратите внимание, что в инвертированном микроскопе на предметном столике гораздо больше места для работы. В данном случае прибор снабжен держателем игл для микроинъекций (слева от предметного столика)

Предметный столик — это механическое устройство, позволяющее прочно удерживать образец (рис. 4.5), что совершенно необходимо, поскольку любое движение или вибрация отражаются на качестве изображения. Зажимы столика позволяют плавно перемещать образец в горизонтальной плоскости вдоль осей X и Y, чтобы найти целевой участок. Для фокусировки столик можно перемещать вертикально вдоль оси Z; в инвертированных микроскопах для этой цели перемещают линзы объектива, а столик остается неподвижным. Обычно микроскопы снабжены системой грубой и тонкой настройки для малого и большого увеличения. В самых лучших микроскопах тонкая настройка фокусировки достигается путем плавных перемещений на расстояния порядка 1 мкм и менее. Предметный столик либо двигают рукой, либо более точно — через компьютер с помощью шаговых моторов, связанных с системой тонкой настройки микроскопа.

Линзы объектива нужны для получения увеличенного изображения и могут быть самым дорогим элементом светового микроскопа (рис. 4.5). Существует множество видов линз объектива, и к каждой линзе прилагается весьма детальное описание, где указаны фирма-производитель, увеличение (4×, 10×, 20×, 40×, 60×, 100×), иммерсия (воздушная, масляная или водная), толщина покровного стекла (обычно 0,17 мм) и много другой более специфической информации (разд. 4.2.3). Кроме того, описание линзы может содержать информацию о коррекции таких артефактов, как

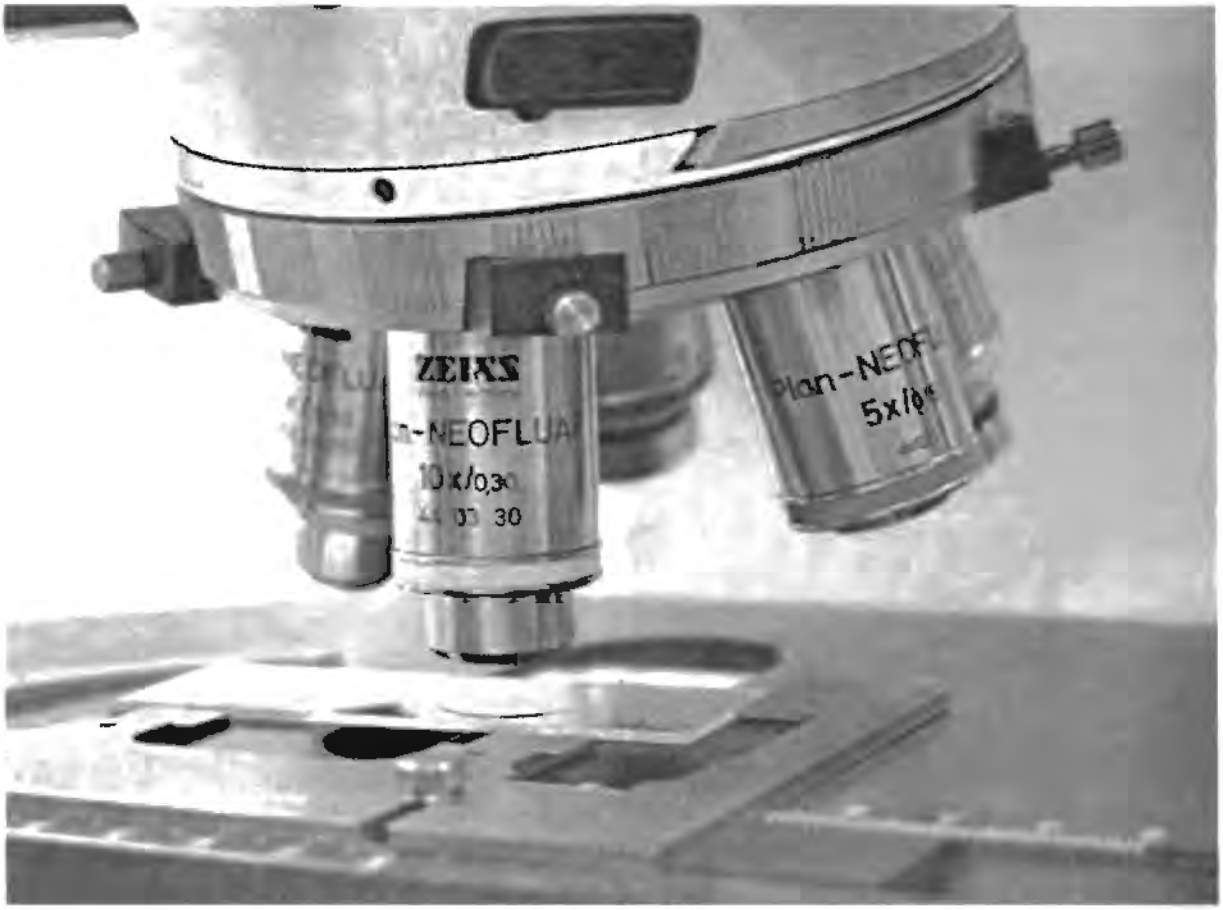


Рис. 4.5. Линзы объектива. Изображен набор объективов прямого сложного светового микроскопа. Как можно прочесть на двух объективах, они имеют сравнительно небольшое увеличение (10× и 5×) и цифровую апертуру соответственно 0,3 и 0,16. Обе линзы имеют маркировку Plan Neofluar, что означает, что они достаточно хорошо корректируют изображение. Объектив с 10-кратным увеличением расположен прямо над образцом, размещенном на столике между предметным и покровным стеклами

хроматическая аберрация и **плоское изображение**. Например, на слабокорректирующей линзе может быть написано «fluorite» (часто сокращаемое до «fluo»), а на наиболее сильнокорректирующей — «plan apochromat» (сокращаемое до «plan» или «plan apo»).

Линзы могут быть сухими или иммерсионными и, как правило, большинство линз с увеличением до 40× являются сухими, а с увеличением 40× и выше — иммерсионными (масляными, глицериновыми или водяными). Если линза предназначена для работы в масляной среде, на ней стоит маркировка «OIL» или «OEL». К другим иммерсионным средам относятся вода и глицерин, и на предназначенных для работы в этих средах линзах должна быть соответствующая маркировка. Многие производители линз используют цветовую маркировку.

На линзе всегда указана цифровая апертура (NA). Это число, обычно в диапазоне от 0,04 и 1,4, которое отражает способность линзы пропускать свет от образца. Линзы с низким NA пропускают от образца меньше света, чем линзы с высоким NA. Разрешение связано с апертурой прямой зависимостью. Это означает, что объективы с высоким NA имеют лучшее разрешение. Вообще, более мощные объективы имеют более высокое значе-

ние NA и лучшее разрешение, чем менее мощные. Например, разрешение 0,2 мкм может быть достигнуто только с использованием масляной иммерсионной линзы «plan apochromat» с увеличением 60× или 100× и с NA 1,4. Если нужно сделать выбор между двумя линзами с одинаковым увеличением, всегда следует выбрать ту, у которой выше NA.

Линзы объектива — это именно те детали микроскопа, которые легче всего повреждаются при неправильном пользовании. Многие линзы имеют защитное покрытие, но все же любая царапина на поверхности линзы может привести к значительному ухудшению изображения. Поэтому пользоваться объективом нужно с большой осторожностью. Мыть линзы объектива следует так, как требует этого фирма-изготовитель, причем делать это должен только опытный сотрудник. Грязная линза объектива — основная причина плохого изображения.

Разрешение линзы является мерой способности различать две точки внутри образца. Чем меньше длина волны света, тем выше разрешающая способность микроскопа (рис. 4.6). Предельное разрешение микроскопа, работающего на видимом свете, составляет около 300 нм с сухой линзой (в воздухе) и 200 нм с масляной иммерсионной линзой. Если в качестве источника света используют УФ излучение, может быть достигнуто разрешение 100 нм, поскольку длина волны уменьшилась до 200–300 нм. На практике это трудно достижимые характеристики из-за аберрации линз и плохих оптических свойств у многих биологических образцов. Для решения некоторых особых задач сегодня существуют специальные микроскопы с разрешением около 20 нм (разд. 4.8).

Окуляр служит для дополнительного увеличения изображения и, кроме того, позволяет увидеть его глазом или, что чаще, спроецировать его на цифровую камеру для сохранения информации. Обычно окуляр обеспечивает 10-кратное увеличение, поскольку при большем увеличении не достигается хорошего разрешения. Существует верхний предел увеличения изо-

Рис. 4.6. Видимая область спектра — спектр белого света, видимого для человеческого глаза. Наш глаз способен различать цвета в видимом диапазоне спектра, обычно от 400 нм (фиолетовый) до 750 нм (красный). Большинство современных электронных детекторных устройств работают в более широком диапазоне. УФ — ультрафиолетовый диапазон, ИК — инфракрасная область, Ф — фиолетовый, С — синий, З — зеленый, Ж — желтый, К — красный

бражения с помощью всей системы линз микроскопа. Для каждой линзы объектива увеличивать изображение можно до тех пор, пока не станет невозможным различать детали структуры образца. Дальнейшее увеличение часто называют **пустым увеличением**. Лучший способ достичь большего увеличения — использовать линзу с большим увеличением и большим NA. Если с помощью светового микроскопа желаемого увеличения достичь не удается, следует воспользоваться электронным микроскопом (разд. 4.6).

Кроме человеческого глаза и фотопленки, в современных световых микроскопах используют два типа электронных детекторных устройств. Существуют детекторы, непосредственно воспроизводящие изображение, такие как **видеокамеры** или **приборы с зарядовой связью** (CCD, charge-coupled device). Другой тип — точечные детекторы, измеряющие интенсивность изображения, например, **фотоумножительные трубки** и **фотодиоды**. Точечные детекторы используются в сканирующей микроскопии (разд. 4.3).

4.2.2 Подготовка образца

Образцами для микроскопического исследования могут быть целые организмы, отдельные органы (**гистологические срезы**), отобранные при выполнении биохимического протокола аликвоты растворов — для быстрой проверки препарата, биоптаты, мазки крови или сперматозоиды. Для получения изображения с помощью микроскопа образец должен находиться в соответствующей форме, что достигается путем реализации определенного **протокола**. В результате выполнения протокола должен получаться относительно тонкий и практически прозрачный фрагмент ткани, который располагают на **предметном стекле** в соответствующей **среде для заливки** (вода, культуральная среда или глицерин) и накрывают тонким **покровным стеклом**.

Покровные стекла бывают разной толщины. Самые тонкие имеют номер 1, что соответствует толщине около 0,17 мм. Покровное стекло всегда расположено со стороны линзы объектива. Для достижения оптимального разрешения важно использовать покровные стекла, соответствующие конкретной линзе. Это особенно важно для сильного увеличения, поскольку в случае слишком толстого покровного стекла получить хорошее изображение с помощью объектива с большим увеличением не представляется возможным.

Протоколы подготовки образца бывают довольно простыми, но могут быть и сложными, так что их реализация занимает несколько дней (табл. 4.1). Простой протокол может быть таким: взять аликвоту биологического образца, например живых сперматозоидов, поместить каплю жидкости на предметное стекло и накрыть сверху покровным стеклом. Покровное стекло герметично соединяют с предметным, например, с помощью лака для ногтей или пчелиного воска, так что оно не может сдвинуться. Сила сдвига, возникающая при перемещении покровного стекла по предметному стеклу, может повредить образец или линзу объектива.

Таблица 4.1. **Общий протокол проведения непрямого иммунофлуоресцентного анализа**

1 Фиксировать в 1%-м формальдегиде 30 мин
2 Промыть холодным буфером
3 Блокирующий буфер
4 Инкубировать с первичными антителами, например мышиными Ат против тубулина
5 Промыть 4 раза буфером
6 Инкубировать с вторичными антителами, например мечеными флуоресцеином Ат кролика против мыши
7 Промыть 4 раза буфером
8 Инкубировать с реагентом против выцветания, например Vectashield[a]
9 Поместить на предметное стекло и накрыть покровным стеклом
10 Визуализировать с помощью эпифлуоресцентного микроскопа

[a] Время инкубации зависит от типа ткани — от 30 мин для клеточных культур ткани (тонкие образцы) до 12 ч для целых эмбрионов (толстые образцы).

Некоторые образцы слишком толстые, чтобы их непосредственно наносить на предметное стекло, поэтому их разрезают, используя прибор **микротом**. Ткань обычно заливают парафином и отрезают от нее ножом микротома тонкие срезы (толщиной от 100 до 500 мкм). Затем срезы помещают на предметное стекло, окрашивают, накрывают покровным стеклом и склеивают парафином. Некоторые образцы замораживают и режут в **криостате**, который представляет собой микротом, способный сохранять образец в замороженном состоянии и делать замороженные срезы, которые более удобны для мечения с помощью антител (разд. 4.2.3).

Прежде чем получить срезы, ткань обычно обрабатывают химическим агентом, называемым **фиксатором**. К наиболее часто используемым фиксаторам относятся формальдегид и глутаровый альдегид, которые осуществляют перекрестную сшивку белков, а также спирты, которые вызывают осаждение белков. Все фиксаторы предназначены для поддержания структурной целостности клетки. После фиксации образец обычно подвергают **пермеабилизации**, чтобы позволить красителю как следует проникнуть в ткань. Время и условия проведения этой процедуры зависят от ряда факторов, например типа красителя или плотности ткани. Эти условия для каждого нового образца определяют экспериментальным путем, а стандартные условия описаны в протоколах. Цель этой процедуры — равномерно пропитать ткань красителем.

4.2.3 Контрастность в световом микроскопе

Большинство клеток и тканей бесцветны и почти прозрачны, а при разглядывании в световой микроскоп — практически неконтрастны. В связи с этим для визуализации компонентов клетки образец нужно сделать контрастным. Это достигается либо оптическими средствами — путем измене-

ния конфигурации элементов микроскопа, либо путем окрашивания образца, либо комбинацией этих двух методов. Различные красители позволяют производить дифференциальное окрашивание разных отделов клетки.

Оптический контраст

С помощью оптических средств контрастность можно улучшить путем размещения на пути светового луча в микроскопе различных элементов, а также путем использования линз и фильтров, изменяющих характеристики света, проходящего через образец и оптическую систему. Для этого на пути света от источника можно поместить простое цветное стекло или фильтр нейтральной плотности, изменить интенсивность света или скорректировать диаметр диафрагмы конденсорной линзы. Обычно для достижения приемлемой контрастности применяют все эти меры.

Стандартный режим работы светового микроскопа — работа по методу **светлого поля** (светлый фон), для реализации которого нужен самый минимум оптических средств. Контрастность в светлом поле обычно достигается окраской самого образца. Поэтому такой режим работы чаще всего используют для получения изображения пигментированных тканей или гистологических срезов, а также культур клеток тканей после окрашивания (рис. 4.7, *а* и 4.8, *б*).

Некоторые конфигурации светового микроскопа были разработаны специально с целью получения наиболее контрастного изображения. При работе по методу **темного поля** получается ярко освещенный объект на темном фоне (рис. 4.7, *б* и 4.8, *а*). Такой метод традиционно используется для визуализации контуров предмета в жидкой среде (живых сперматозоидов, микроорганизмов, клеточных культур), а также для быстрой оценки состояния биохимических препаратов. Для небольшого увеличения достаточно установить конденсор темного поля, а для получения хорошего изображения с большим увеличением потребуются и конденсор темного поля, и линза объектива для работы по методу темного поля.

Режим **фазового контраста** используется для визуализации неокрашенных клеток, растущих в культуре ткани, а также для проверки наличия лизиса клеток и органелл (рис. 4.7, *в* и *г*). Метод основан на коэффициентах преломления различных клеточных структур. Свет, проходящий через более толстые фрагменты клетки, задерживается по сравнению с тем, что проходит сквозь тонкие участки цитоплазмы. Для реализации этого режима нужны специальный конденсор и линза объектива (оба элемента имеют маркировку «ph»). Каждое положение конденсорной линзы маркировано в соответствии с соответствующим положением линзы объектива (обычно они пронумерованы как фаза 1, фаза 2 и фаза 3).

Дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) — это вариант метода **интерференционной микроскопии**, дающий изображение с тенью (рис. 4.7, *д* и *е*). Его используют для визуализации неокрашенных клеток в культуре ткани, яйцеклеток и эмбрионов, а также в сочетании с некоторыми методами окрашивания. В таком случае изображение общей формы и рельефа структуры объекта получают с помощью ДИК, а отдельные структурные элементы окрашивают красителем (рис. 4.8, *в*).

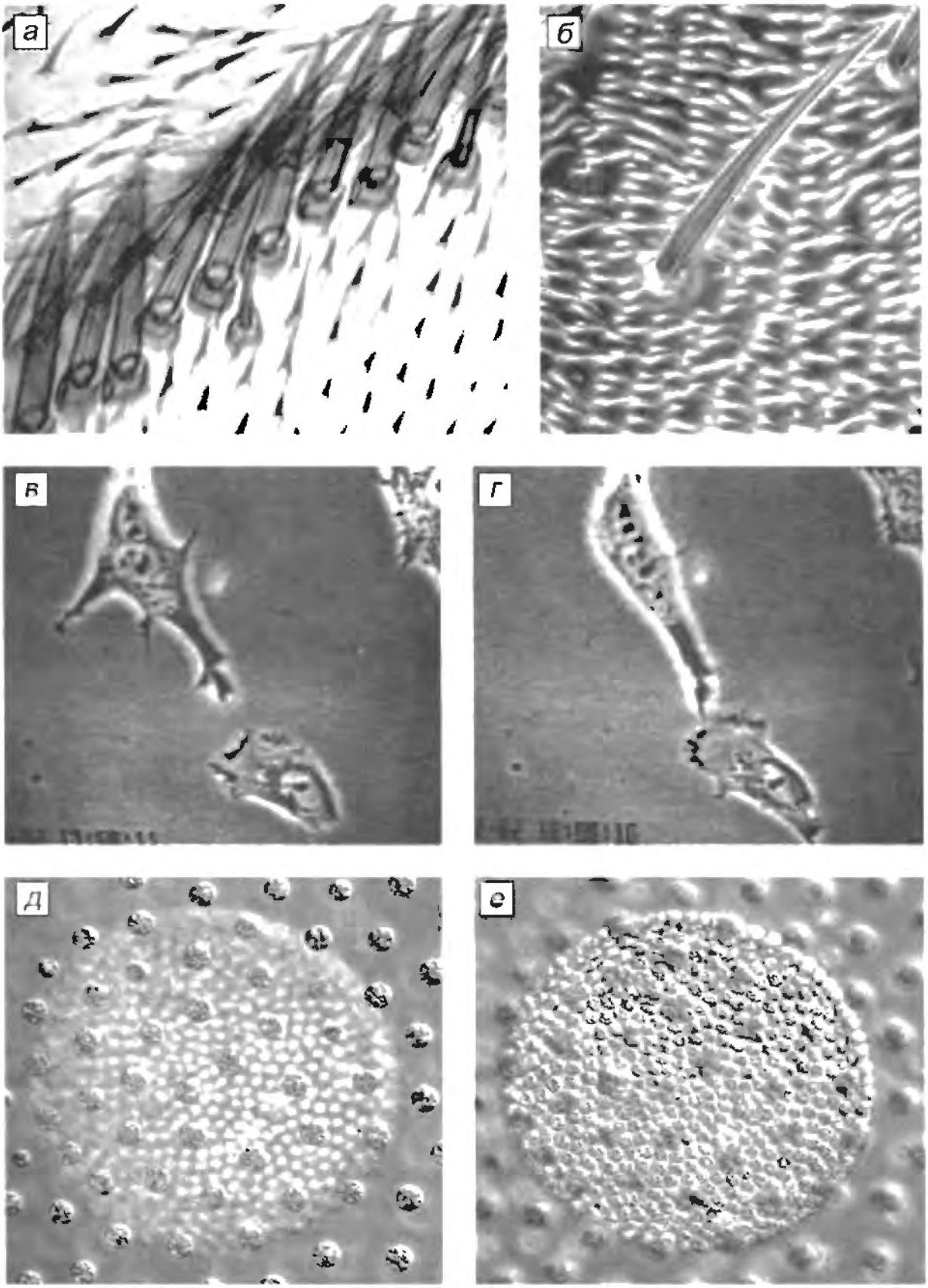


Рис. 4.7. Методы создания контрастного изображения в световом микроскопе. Сравнение изображения, полученного по методу светлого (*а*) и темного поля (*б*). Сенсорные волоски на теле мухи выглядят темными на светлом фоне (*а*) или светлыми на темном фоне (*б*). Темное окрашивание более крупных волосков (*а*) связано с наличием пигмента. Растущие клетки в культуре ткани, снятые в фазовом режиме (*в* и *г*). Два кадра при интервальной съемке, сделанные с разницей в 5 мин. Видно перемещение клеток мышиной саркомы линии 3Т3 и фибробласта сердца цыпленка. Обратите внимание на светлый ореол вокруг клеток. Многоклеточная водоросль *Volvox* в двух фокальных плоскостях, снятая в режиме дифференциального интерференционного контраста (*д* и *е*, воспроизводится с любезного разрешения Майкла Дэвидсона)

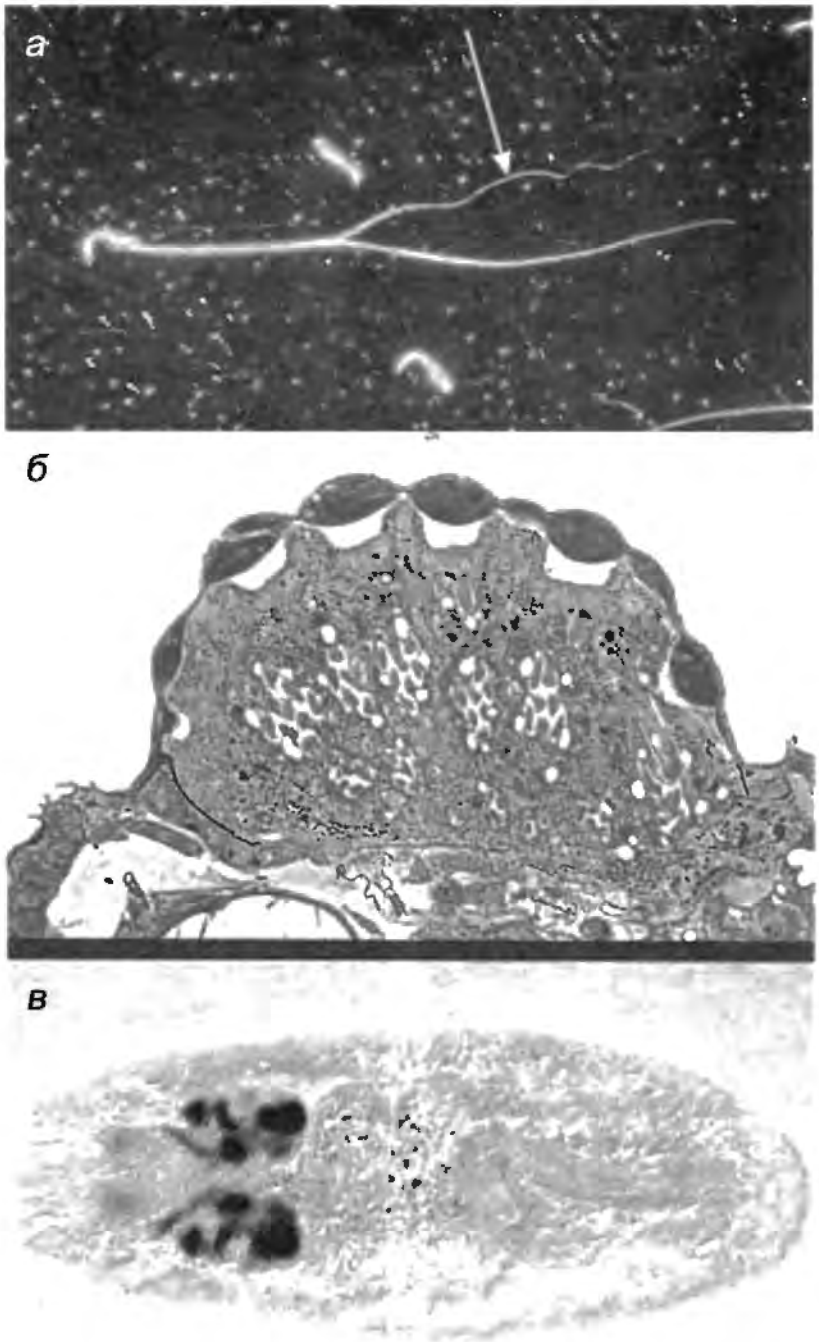


Рис. 4.8. Примеры изображения различных объектов в световом микроскопе. *а* — препарат спермы крысы в режиме темного поля. Образец отобран в процессе выполнения экспериментального протокола с целью оценить уровень повреждений в популяции сперматозоидов, полученных при обработке ультразвуком. Обнаружено много свободных головок сперматозоидов и начало процесса разрушения хвостов сперматозоидов (стрелка). *б* — срез глаза мухи, полученный с помощью микротома и окрашенный по белку с помощью красителя кумасси бриллиантового синего; изображение получено по методу светлого поля. *в* — изображение окрашенного зародыша дрозофилы (ДИК); видны контуры зародыша, а более темные окрашенные области соответствуют расположению нервных клеток. Изображение целого зародыша в режиме ДИК позволяет понять, в какой именно области зародыша сконцентрирован специфический краситель нервных клеток

Для получения контрастного изображения чаще всего используется **флуоресцентная микроскопия** (рис. 4.9), а еще лучше **эпифлуоресцентная световая микроскопия** (приставка «эпи» означает сверху). В последнем методе свет падает на образец сверху, а линза объектива выступает одновременно и в роли линзы конденсора (рис. 4.10).

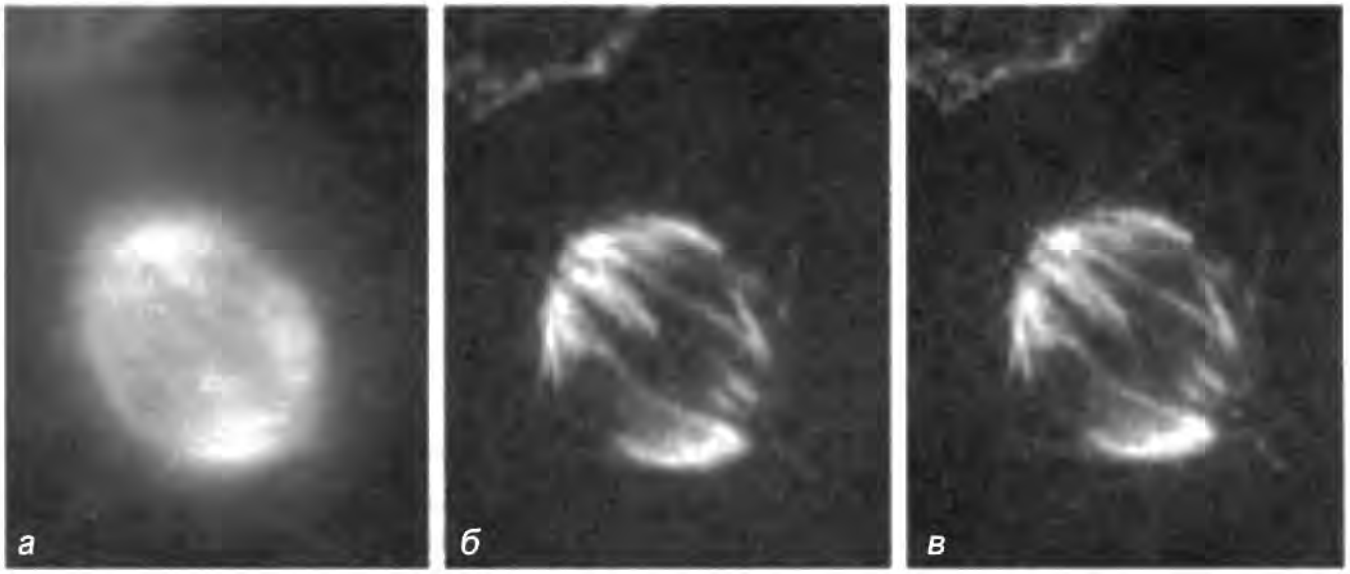


Рис. 4.9. Флуоресцентная микроскопия. Сравнение изображения митотического веретена, полученного методами эпифлуоресценции и конфокальной микроскопии (с помощью первичных антител против тубулина и вторичных антител с флуоресцентной меткой): *а* — обычная эпифлуоресцентная световая микроскопия; *б* и *в* — лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Обратите внимание, что во втором и третьем случаях разрешение изображения микротрубочек гораздо лучше. Варианты *б* и *в* отличаются разрешением конфокального микроскопа. Вариант *б* получен с точечной диафрагмой при более широкой апертуре, чем в случае *в*. Фотографии любезно предоставлены Бредом Амосом

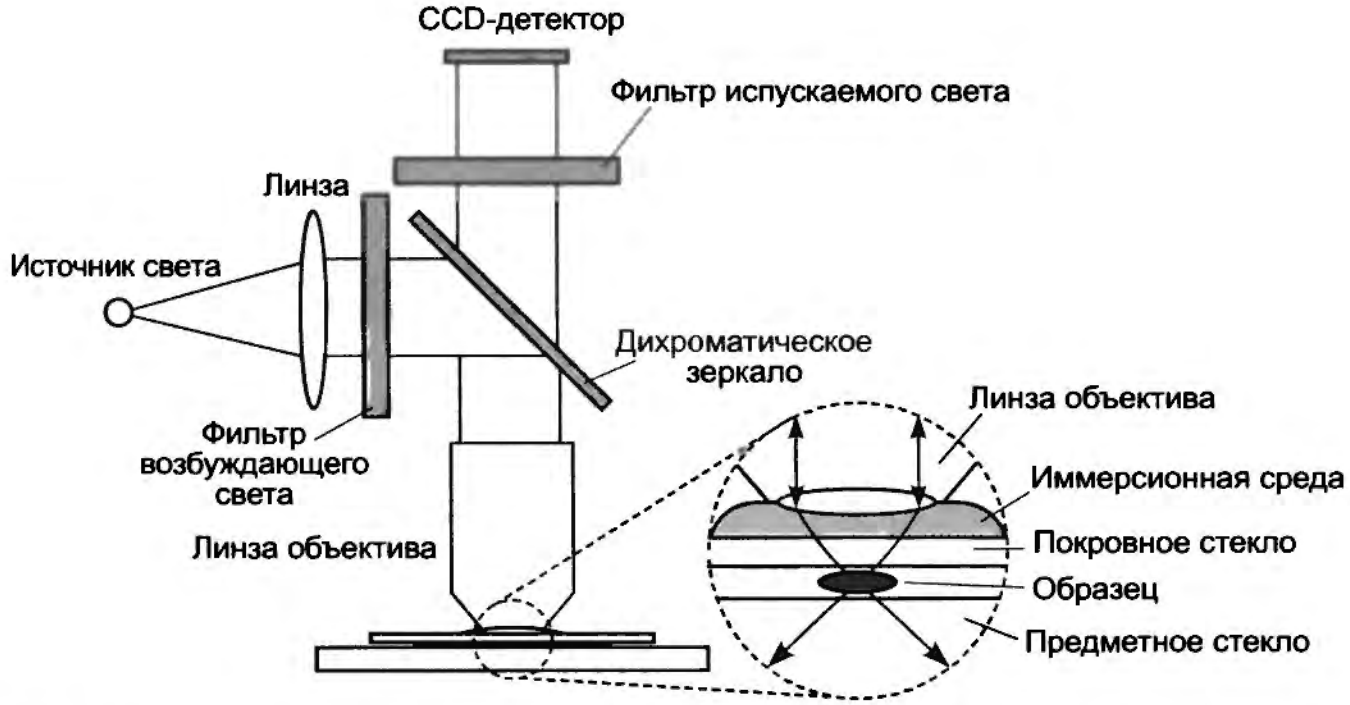


Рис. 4.10. Эпифлуоресцентная микроскопия. Свет от ксеноновой или ртутной дуговой лампы (источник света) проходит через линзу и фильтр возбуждающего света и отражается дихроматическим зеркалом на линзу объектива. Линзы объектива фокусируют свет на образце сквозь иммерсионную среду (обычно масло) и покровное стекло (см. схему справа). Свет от флуоресценции образца возвращается обратно через линзу объектива и, поскольку его длина волны больше, чем у возбуждающего света, проходит сквозь дихроматическое зеркало. Фильтр испускаемого света пропускает только свет определенной длины волны, соответствующей флуоресценции конкретного флуорофора. Этот свет попадает на детектор (в данном случае CCD-детектор), где и формируется изображение

Флуоресцентный метод очень широко используется, поскольку с его помощью можно довольно специфично идентифицировать отдельные элементы клетки. Изображение обычно выглядит как хорошо различимые флуоресцирующие (белые) участки на темном фоне, что дает прекрасное соотношение сигнал/фон.

Источником света обычно служит ртутная или ксеноновая паросветная лампа высокого давления, которая излучает в диапазоне от УФ-области до красного видимого света (рис. 4.6). Для возбуждения флуоресценции молекул **флуорофора** в образце используют свет определенной длины волны (рис. 4.10). Испускаемый флуорофором свет большей длины волны дает видимое изображение. Для регистрации этого излучения используют комбинацию фильтров, специфических для длин волн возбуждения и испускания конкретного флуорофора. Обычно в флуоресцентных микроскопах используют три типа фильтров: **фильтр возбуждающего света**, **дихроматическое зеркало** (часто называемое дихроичным зеркалом) и **барьерный фильтр**, размещаемые в едином блоке над объективом. Например, для часто используемого флуорофора флуоресцеина оптимальное возбуждение достигается на длине волны 488 нм, а максимум испускания соответствует 518 нм (табл. 4.2).

Для наблюдения за флуоресценцией флуоресцеина необходим набор фильтров, блокирующих все длины волн от лампы, за исключением длины волны 488 нм. Существуют фильтры, позволяющие проходить максимальному количеству света с этой длиной волны (фильтры возбуждающего света). Далее свет направляется на образец через дихроичное зеркало. Происходит возбуждение всех молекул флуоресцеина в образце, а возникающее излучение с длиной волны 518 нм направляется обратно от образца через дихроичное зеркало и барьерный фильтр к детектору. Эмиссионные фильтры позволяют проходить к детектору только свету с длиной волны 518 нм, так до детектора доходит только сигнал от конкретного флуорофора. Для более детального ознакомления с методами флуоресцентного анализа обратитесь к разд. 12.5 и 16.3.2.

Специальные зеркала и фильтры могут пропускать свет двух или трех длин волн для регистрации излучения двух или нескольких флуорофоров (в случае нескольких меток). Излучение образца часто бывает слишком слабым, чтобы его можно было заметить человеческим глазом, а также может находиться за пределами видимого диапазона, например в дальней инфракрасной области (рис. 4.6). Такие сигналы детектируются на чувствительных цифровых камерах, например на CCD или фотоумножительных трубках.

Окрашивание образца

Контрастности изображения можно достичь, если ввести в образец один или несколько красителей. Это могут быть неспецифические красители, такие как используются для окраски белка (кумасси бриллиантовый синий, рис. 4.8) или специфические красители для отдельных органелл — ядер, митохондрий и т. д. Комбинация красителей может быть использована для одновременного окрашивания разных органелл. Многие из этих

Таблица 4.2. **Примеры флуорофоров**

Краситель	Максимум возбуждения, нм	Максимум испускания, нм
Часто используемые флуорофоры		
Флуоресцеин (FITC)	496	518
Bodipy	503	511
CY3	554	568
Тетраметилродамин	554	576
Лиссаминродамин	572	590
Техасский красный	592	610
CY5	652	672
Красители для окраски ядра		
Hoechst 33342	346	460
DAPI	359	461
Акридиновый оранжевый	502	526
Иодистый пропидий	536	617
TOTO3	642	661
Бромистый этидий	510	595
Этидий гомодимер	528	617
Feulgen	570	625
Индикаторы кальция		
Fluo-3	506	526
Calcium Green	506	533
Репортерные молекулы		
Зеленый флуоресцентный белок (GFP)	395/489	509
DsRed	558	583
Митохондрии		
JC-1	514	529
Родамин 123	507	529

DAPI — 4',6'-диамидино-2-фенилиндол.

гистологических красителей обычно хорошо видны при работе в светлом поле. Одновременно с окрашиванием тканей можно использовать и другие приемы световой микроскопии. Например, с помощью метода ДИК можно наблюдать за морфологическим развитием целого эмбриона, а красители позволяют визуализировать в нем пространственное распределение определенных белков (рис. 4.8).

В флуоресцентной микроскопии обычно используют более специфичные красители. Метод **иммунофлуоресцентной микроскопии** применяется для визуализации пространственного распределения макромолекул в клетках и тканях. Метод основан на чрезвычайно высокой специфичности связывания антител с белками. Сначала получают антитела к исследуемому белку и метят их с помощью флуоресцентной метки. Затем полученный зонд связывается с данным белком внутри клетки, что можно зафиксировать методом флуоресцентной микроскопии. На практике обычно применяют метод **непрямой иммунофлуоресценции**. В данном методе

антитела к исследуемому белку (**первичные антитела**) связываются со **вторичными антителами**, несущими флуоресцентную метку. При этом интенсивность флуоресцентного сигнала выше, чем при использовании одного типа меченых антител (табл. 4.1).

Близкий по сути метод **флуоресцентной гибридизации *in situ*** (FISH) основан на специфичности меченных флуоресцентной меткой последовательностей ДНК и РНК. В качестве зондов используют меченые фрагменты нуклеиновых кислот, которые гибридизуют с хромосомами, ядрами или препаратами клеток. Участки связывания визуализируют с помощью флуоресцентной микроскопии. С одним и тем же препаратом могут связываться различные зонды, меченные различными флуорофорами. **Многоцветный FISH** широко применяют в клинической диагностике наследственных генетических болезней. Этот метод позволяет осуществлять быстрый скрининг характерных аномалий хромосом и ядер, таких как синдром Дауна.

В качестве меток для антител, ДНК и РНК используются разные типы флуоресцирующих молекул (табл. 4.2). Все подобные реагенты, включая и первичные антитела, есть в продаже. В настоящее время ведется активное создание ярких флуоресцентных маркеров, которые возбуждаются светом в узком диапазоне длин волн и не выгорают под действием света (**фотообесцвечивание**). Известными примерами таких меток являются флуоресцеин и родамин. Среди более новых реагентов можно назвать красители серии Alexa и цианиновые красители. Не так давно список флуорофоров был неожиданно дополнен; в флуоресцентном анализе стали использовать так называемые **квантовые точки** — нанокристаллы, которые не флуоресцируют, а светятся разными цветами под действием лазера, причем цвет зависит от размера точки. Преимуществом квантовых точек является то, что они не выцветают.

4.3 ОПТИЧЕСКИЕ СРЕЗЫ

Часто изображения толстых образцов, полученные с помощью эпифлуоресцентной микроскопии, бывают недостаточно четкими. Это связано с тем, что в конечное изображение вносит вклад не только флуоресценция от исследуемой поверхности, но и от параллельных оптических поверхностей под ней и над ней. Поскольку обычный эпифлуоресцентный микроскоп воспринимает всю информацию от образца, его часто называют **широкопольным микроскопом**. Чтобы избавиться от флуоресценции участков образца, находящихся «не в фокусе», применяют различные оптические электронные устройства, создающие **оптические срезы** (рис. 4.9).

Под термином «оптический срез» понимают способность микроскопа создавать более отчетливые изображения образца, чем те, что получаются с помощью обычного широкопольного микроскопа. Это достигается путем устранения постороннего излучения, причем в большинстве случаев без физического рассечения образца. Подобные методы совершили настоящую революцию в получении изображений толстых объектов, меченных флуоресцентной меткой, таких как яйцеклетка, эмбрион и ткани организма.

Оптические срезы могут быть получены также с помощью метода ДИК при высоком разрешении (рис. 4.7, *д* и *е*).

4.3.1 Лазерные сканирующие конфокальные микроскопы

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (ЛСКМ) способен создавать оптические срезы путем сканирования образца по точкам с помощью лазерного луча, сфокусированного на образце, и пространственного фильтра (обычно точечного или щелевого типа), который отсекает флуоресцентное излучение от плоскостей, расположенных ниже и выше анализируемой плоскости (рис. 4.11). Достоинством конфокального микроскопа является возможность получения четких изображений отдельных структур внутри интактного биологического образца.

У ЛСКМ по сравнению с обычным эпифлуоресцентным световым микроскопом есть два основных преимущества. Во-первых, уменьшается свечение структур образца, находящихся не в фокусе, во-вторых, улучшается разрешение как по осям X и Y (0,14 мкм), так и по оси Z (0,23 мкм). Качество изображения некоторых относительно тонких образцов, таких как хромосомы или ведущие ламеллы клеток в культуре тканей (толщиной < 0,2 мкм), незначительно улучшается при применении ЛКСМ, однако более толстые образцы типа меченных флуоресцентной меткой многоклеточных эмбрионов удается анализировать только таким методом. Хорошее изображение в конфокальном микроскопе получается при возбуждении меченого образца минимальным количеством фотонов и поступлении максимального числа фотонов флуоресцентного излучения от флуорофора к детектору.

В биохимии ЛСКМ находит множество применений. Некоторые из них стали возможны благодаря способности прибора производить серию оптических срезов образца (рис. 4.12). Серия таких **Z-срезов** регистрируется прибором и при их наложении можно получить соответствующую **Z-проекцию** или трехмерное (**3D**) изображение образца.

Используя для возбуждения несколько лазерных источников света, можно получить цветное изображение образца с несколькими флуоресцентными зондами (рис. 4.13; цветная вклейка). Поскольку прибор регистрирует излучение на разных длинах волн, довольно просто составить из них одно общее цветное изображение. В данном случае любое наложение красителей выражается в дополнительном изменении окраски. Большинство конфокальных микроскопов способны воспринимать одновременно свет на трех или четырех длинах волн, а некоторые новые версии приборов детектируют и различают до 32 длин волн.

4.3.2 Сканирующие дисковые конфокальные микроскопы

Сканирующие дисковые конфокальные микроскопы используют сканирующую систему, отличную от той, что используется в ЛСКМ. Сканирование производится с помощью не одного луча, а нескольких лучей одновременно, а изображение оптических срезов можно наблюдать в реальном времени. Современные микроскопы с вращающимися дисками значитель-

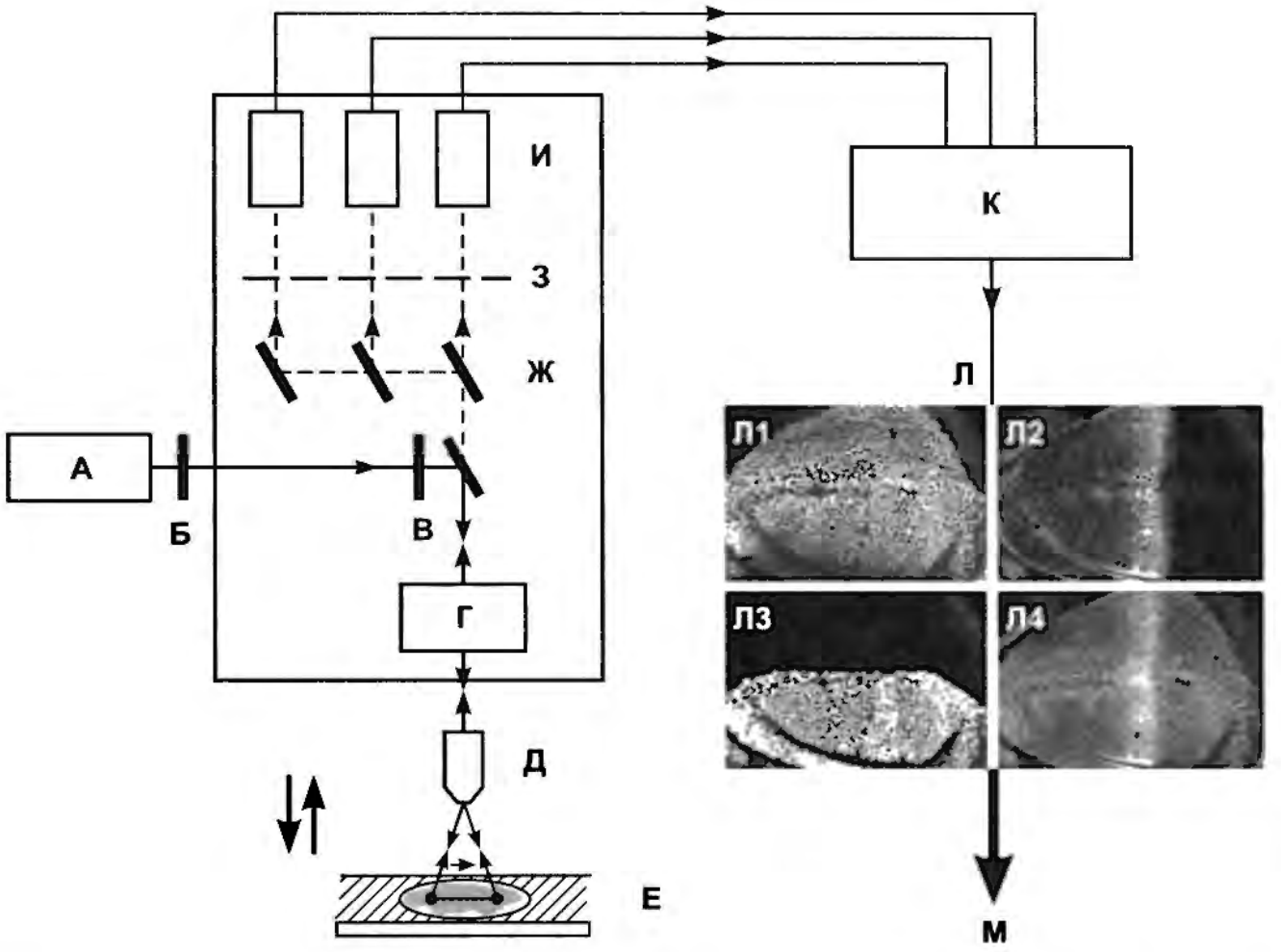


Рис. 4.11. Схема потока информации в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе (ЛКСМ). Свет от лазера (А) проходит сквозь фильтр нейтральной плотности (Б) и фильтр возбуждающего света (В) на сканирующее устройство (Г). Сканирующее устройство производит сканирующий луч и направляет его на фокальную плоскость линзы объектива (Д), которая фокусирует свет на образце (Е). Образец сканируют вдоль осей *X* и *Y* и регистрируют в растровом формате, а также вдоль оси *Z* путем осуществления тонкой настройки (стрелки указывают перемещение объектива Д). Все флуоресцентное излучение от образца проходит обратно через объектив и сканирующее устройство, а затем направляется дихроматическими зеркалами (Ж) на три точечных отверстия (З). Эти отверстия действуют как пространственные фильтры, блокирующие свет от всех участков образца, которые находятся выше или ниже плоскости фокусировки. Освещенный участок образца лежит в одной оптической плоскости с точечной апертурой. Это означает, что производится регистрация сигнала только от конкретного участка образца. Проходящий через точечные отверстия свет попадает на детекторы (И, здесь — фотоумножительные трубки), а оттуда передается на компьютер (К), где создается изображение. Изображение выводится на экран компьютера (Л) часто в виде трех рисунков в цветах серой шкалы (Л1, Л2 и Л3) и суммарного цветного изображения (Л4) (см. также рис. 4.13, *а*). Компьютер синхронизирует работу сканирующей системы с созданием изображения. Он также контролирует работу некоторых периферических устройств. Например, он регулирует работу шаговых моторов, соединенных с блоком тонкой настройки микроскопа для создания серии *Z*-срезов. Кроме того, он контролирует сканируемую область образца таким образом, что при сканировании небольшого участка легко создается необходимое увеличение. Для этой цели используется линза объектива, способная осуществлять увеличение в определенном диапазоне, так что при изменении увеличения нет необходимости двигать образец. Изображения записываются на жестком диске компьютера или передаются на другие устройства для наблюдения, копирования или хранения информации (М)

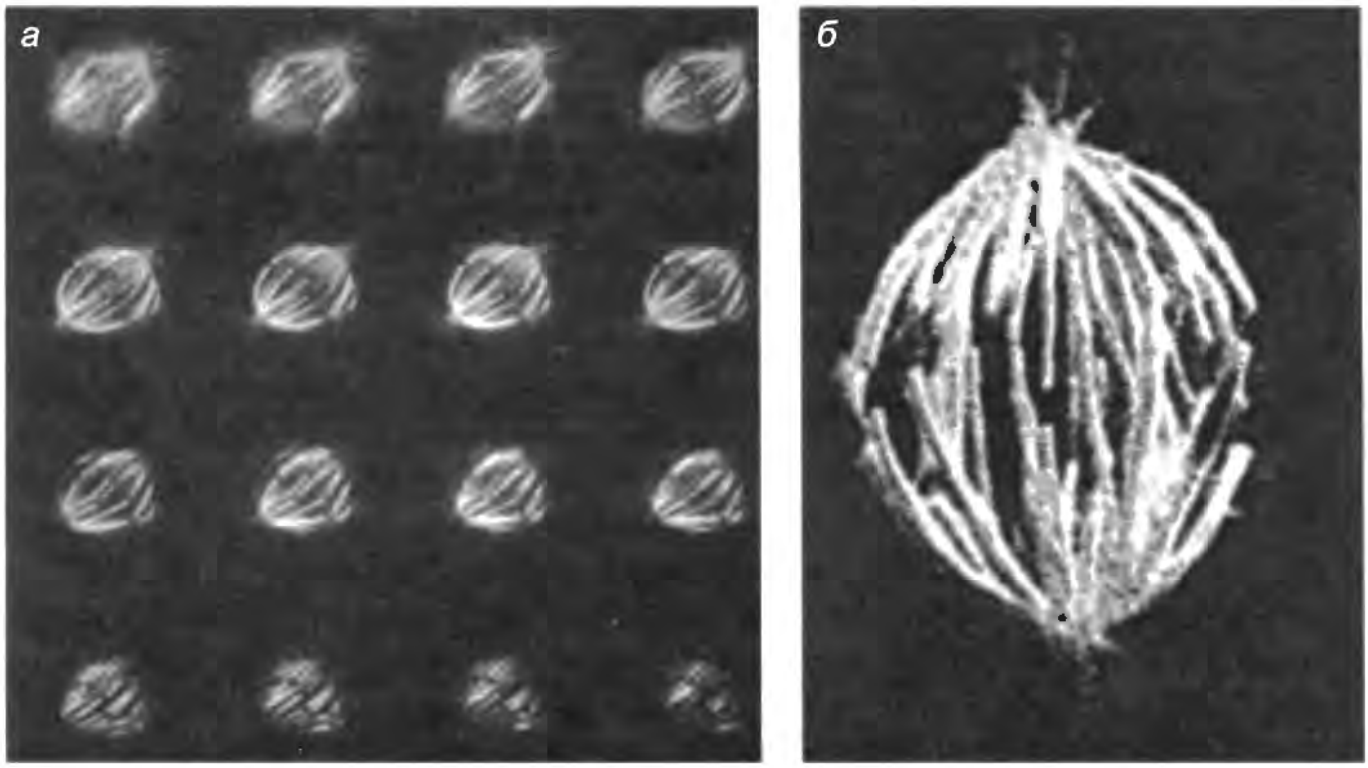


Рис. 4.12. Восстановленное трехмерное изображение, полученное с помощью конфокального микроскопа. *а* — митотическое веретено клетки PtK1, окрашенной с помощью антител против тубулина и вторичных антител, меченных родамином; 16 оптических срезов сделаны с интервалом 0,3 мкм. Использование компьютерной программы позволяет суммировать изображения и записать в виде файла на жестком диске компьютера. Шаговый мотор перемещает элемент тонкой настройки микроскопа на заданное расстояние. *б* — восстановленное трехмерное изображение, полученное с помощью компьютерной программы. Программа позволяет анализировать изображение под любым углом или создавать видеоизображение вращающейся трехмерной структуры

но усовершенствованы путем введения лазерного источника света и высококачественного CCD-детектора. Системы с вращающимися дисками обычно применяются в тех случаях, когда необходимо быстро получать изображения с хорошим разрешением (высокое разрешение в пространстве и во времени), например, для анализа динамики меченных флуоресцентной меткой белков в клетке.

4.3.3 Многофотонное изображение

Многофотонный микроскоп возник как продукт усовершенствования конфокального микроскопа. На самом деле многие приборы имеют такую же сканирующую систему, как ЛСКМ или микроскопы с вращающимися дисками. Различие в том, что источником света является пульсирующий лазер с высокой энергией излучения с легко настраиваемой длиной волны, а возбуждение флуорофоров происходит под действием не одного, а нескольких фотонов. Оптические срезы получаются просто в результате фокусировки лазерного пучка на образце, поскольку возбуждение флуорофора несколькими фотонами происходит только в области с высоким уровнем энергии, которая статистически ограничена фокусом линзы объектива (рис. 4.14).

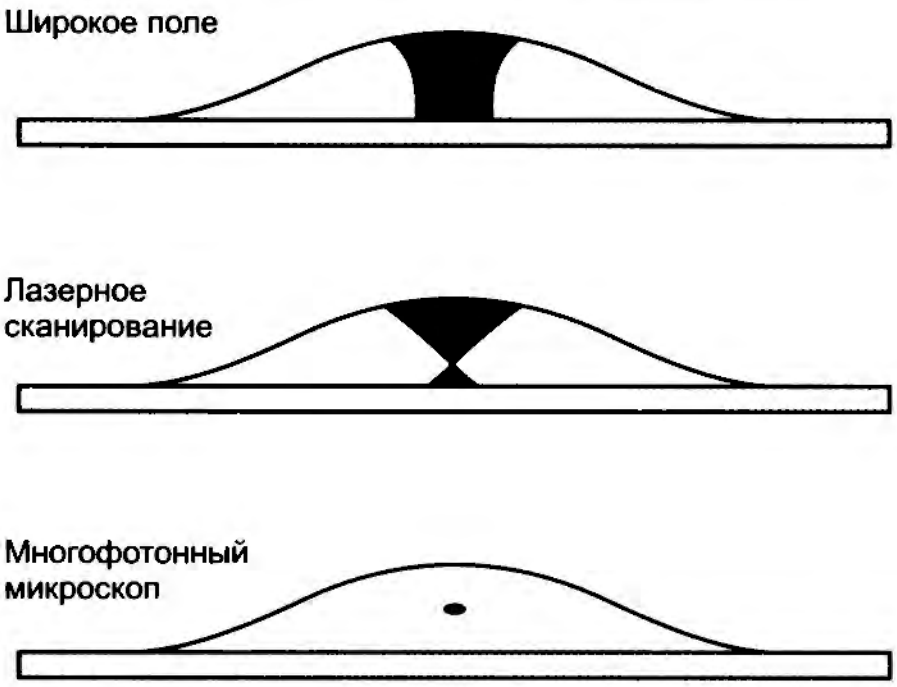


Рис. 4.14. Флуоресценция в широкопольном, конфокальном и многофотонном микроскопах. Представлено изображение меченной флуоресцентной меткой клетки на предметном стекле (*вид сбоку*). Темные области соответствуют области флуоресцентного возбуждения в клетке. Обычный эпифлуоресцентный микроскоп вызывает свечение во всей клетке. В ЛСКМ также происходит возбуждение флуорофора во всей клетке, но находящиеся перед детектором точечные фильтры отсекают свет, идущий не из плоскости фокусировки. В многофотонном микроскопе возбуждение флуоресценции происходит только в фокусе, где уровень энергии света высокий

Поскольку в многофотонных микроскопах используется свет красной области спектра, с их помощью можно получить более глубокие оптические срезы, чем с помощью ЛСКМ. Такие микроскопы обычно применяют для визуализации меченных флуоресцентной меткой живых клеток, поскольку красный цвет менее губителен для живых клеток, чем свет с меньшей длиной волны, который обычно используется в конфокальных микроскопах. Кроме того, поскольку зона возбуждения флуорофора в образце ограничена областью фокуса, имеется меньшая вероятность **фотообесцвечивания** флуоресцентного зонда и повреждения самого образца.

4.3.4 Деконволюция

Оптические срезы можно получить с помощью метода обработки изображения, называемого **деконволюцией**, который состоит в удалении из цифрового изображения «нефокусной» информации. Этого можно достичь с помощью компьютерной обработки изображений, полученных в обычном широкопольном микроскопе. Существует два основных алгоритма деконволюции: **устранение размытости** и **восстановление**. Данный подход основан на знании функции рассеяния точки для данной системы визуализации. Для определения этой функции осуществляют визуализацию точечного источника, например маленькой флуоресцентной бусины (0,1 мкм), и выясняют, насколько ее изображение в микроскопе размывается.

Поскольку предполагается, что реальное изображение бусины должно выглядеть точкой, можно рассчитать степень искажения изображения бусины, вносимое системой визуализации. Реальное изображение точки затем восстанавливают с помощью математической функции, которую можно применить и ко всем последующим изображениям, полученным при тех же установках на данном микроскопе.

Ранние версии метода деконволюции работали довольно медленно, например для получения одного оптического среза по некоторым алгоритмам могли понадобиться часы. Сегодня с использованием современных компьютеров и усовершенствованных программ эта процедура занимает намного меньше времени, так что для получения оптических срезов данный метод вполне конкурирует с конфокальной микроскопией. Метод деконволюции удобен для получения изображений с несколькими метками как в случае фиксированных, так и живых клеток, а по качеству получаемых результатов превосходит методы сканирования в случае тусклых и тонких образцов, например клеток дрожжей. Кроме того, деконволюцию применяют для уменьшения интенсивности фона в изображениях, полученных с помощью ЛКСМ, вращающихся дисков или многофотонных микроскопов.

4.4 ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЖИВЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Для визуализации биохимических событий, происходящих во времени, существуют два принципиально различающихся подхода. Один путь состоит в получении серии изображений фиксированных и окрашенных тканей на разных стадиях развития. Каждому моменту времени соответствует отдельное животное. Альтернатива — получение изображения одной и той же живой ткани в процессе ее развития. В данном случае происходящие события регистрируются непосредственно. Второй путь — получение изображений живых клеток и тканей — технически более сложен, чем первый.

4.4.1 Как избежать артефактов

Единственный способ избежать артефактов в изображении образца — анализировать его в живом состоянии. Многие живые образцы чувствительны к свету, особенно те, которые несут флуоресцентную метку, поскольку при возбуждении флуорофора могут выделяться токсичные для клетки свободные радикалы. Кроме того, одни длины волн оказывают более пагубное влияние, чем другие. В общем, чем меньше длина волны, тем более вредное влияние оказывает свет, поэтому для получения изображений предпочтительнее работать в ближней инфракрасной области, чем в ультрафиолетовой (рис. 4.6). Интенсивность света должна быть такой, чтобы не повреждать клетки. В связи с этим используют свет очень низкой интенсивности, относительно яркие флуоресцентные красители и очень чувствительные фотодетекторы. Кроме того, жизнеспособность клетки может зависеть от того, в какой именно отдел клетки был введен флуорофор. Например, по-

лучение изображения ядер с помощью красителя, возбуждаемого светом с малой длиной волны, нанесет клетке больше вреда, чем получение изображения цитоплазмы с помощью красителя, возбуждаемого светом в крайней красной области.

Очень важно соблюдать необходимые условия для поддержания клеток и тканей, находящихся на предметном столике, в живом состоянии. Обычно для этого используют специальные камеры с некоторой модификацией расположения предметного и покровного стекол, открывающую доступ к образцу со стороны линз объектива и конденсора. Кроме того, такие камеры позволяют содержать клетку в постоянном окружении и, в зависимости от типа клеток, создавать постоянную температуру, pH, уровень CO_2 и кислорода. Многие камеры оборудованы устройством для ввода жидкости или перфузии раствором лекарства в экспериментальных целях.

4.4.2 Режим интервальной съемки

Режим интервальной съемки продолжают использовать при исследовании динамики клеточных процессов. Изображения получают с заданными временными интервалами (рис. 4.13, *в–з*). Обычно на пути светового луча ставят шторку, которая открывается только в момент съемки, чтобы снизить количество световой энергии, направляемой на клетку. Видеозапись воспроизводит в режиме реального времени анализируемый процесс, хотя и в ускоренном по времени варианте. Интервальная съемка применяется при изучении поведения клеток в тканях и в зародышах, а также динамики макромолекул в одной клетке. Временной интервал зависит от исследования, а также от количества световой энергии, поглощаемой и выдерживаемой клеткой. Например, в клеточной культуре ткани перемещаются сравнительно медленно, так что интервал между кадрами можно установить на уровне 30 с. Стабильность образца и микроскопа чрезвычайно важны для успешного проведения съемки в данном режиме. Например, в процессе выполнения эксперимента нельзя допускать смещения фокуса.

Для проведения интервальной съемки годится любой световой микроскоп (разд. 4.2.3 и 4.3). Для визуализации перемещения клеток и анализа поведения клеток в растущей культуре ткани традиционно применяют фазовый контраст. Для изучения развития яйцеклетки и эмбриона обычно предпочитают ДИК или флуоресцентную микроскопию. Для повышения разрешения применяют ДИК вместе с компьютерными методами улучшения качества изображения, для чего из каждого кадра, полученного в режиме интервальной съемки, вычитают фон, а контрастность изображения повышают электронным методом. Таким способом можно получить изображение сборки микротрубочек *in vitro* из тубулина в присутствии ассоциированных с микротрубочками белков, причем это изображение находится за пределами разрешения светового микроскопа. Такие эксперименты послужили основой для изучения подвижности моторных белков, таких как кинезин и динеин.

4.4.3 Введение флуоресцентной метки в живые клетки

Совсем небольшое количество клеток обладают собственной флуоресценцией (**автофлуоресценцией**), но некоторые эндогенные молекулы способны флуоресцировать и могут использоваться для получения изображения (например, NAD(P)H). Сравнительно небольшие флуоресцентные молекулы помещают в клетку посредством диффузии, микроинъекций, на частицах или путем электропорации. Более крупные белки с флуоресцентной меткой обычно вводят в клетку путем инъекции, а через некоторое время они включаются в общий белковый состав клетки и могут использоваться для получения изображения.

К настоящему времени создано множество **репортерных молекул**, позволяющих регистрировать экспрессию специфических генов в живых клетках методом флуоресцентной микроскопии (табл. 4.2). Очень удобно с этой целью использовать зеленый флуоресцентный белок (GFP), поскольку за его поведением в клетке можно наблюдать непосредственно с помощью эпифлуоресцентной световой микроскопии со стандартным набором фильтров. Ген GFP можно пришить к анализируемому гену, так что экспрессия этого гена будет сопровождаться флуоресценцией GFP. Флуоресценция GFP очень интенсивная и не обесцвечивается под действием света. Для введения в живые клетки нескольких репортерных молекул в настоящее время используют некоторые варианты GFP и такие молекулы, как DsRed. Создание подобных зондов необычайно расширило возможности получения изображения живых клеток и тканей методом световой микроскопии.

4.4.4 Получение изображений в нескольких измерениях

Набор *Z*-срезов, полученных на протяжении какого-то времени, называют **четырехмерным (4D) изображением**; при этом отдельные оптические срезы (двумерное изображение в плоскости *XY*) соответствуют разной глубине от поверхности образца (третье измерение *Z*) и различным моментам времени (четвертое измерение) — три пространственных и одно временное измерение (рис. 4.15). Более того, одновременно с этим можно получать изображения на разных длинах волн — так называемое **пятимерное (5D) изображение**. Для анализа и визуализации подобных 4D и 5D изображений существуют специальные компьютерные программы. Например, можно проследить за последовательными изменениями какой-либо структуры, проанализировать изменения ее объема и представить набор данных в формате 4D в виде серии *Z*-проекций или в стереоформате. Эксперименты в нескольких измерениях усложняются необходимостью оперировать очень большим количеством данных, поскольку результаты одного эксперимента в формате 4D могут составлять гигабайты информации.

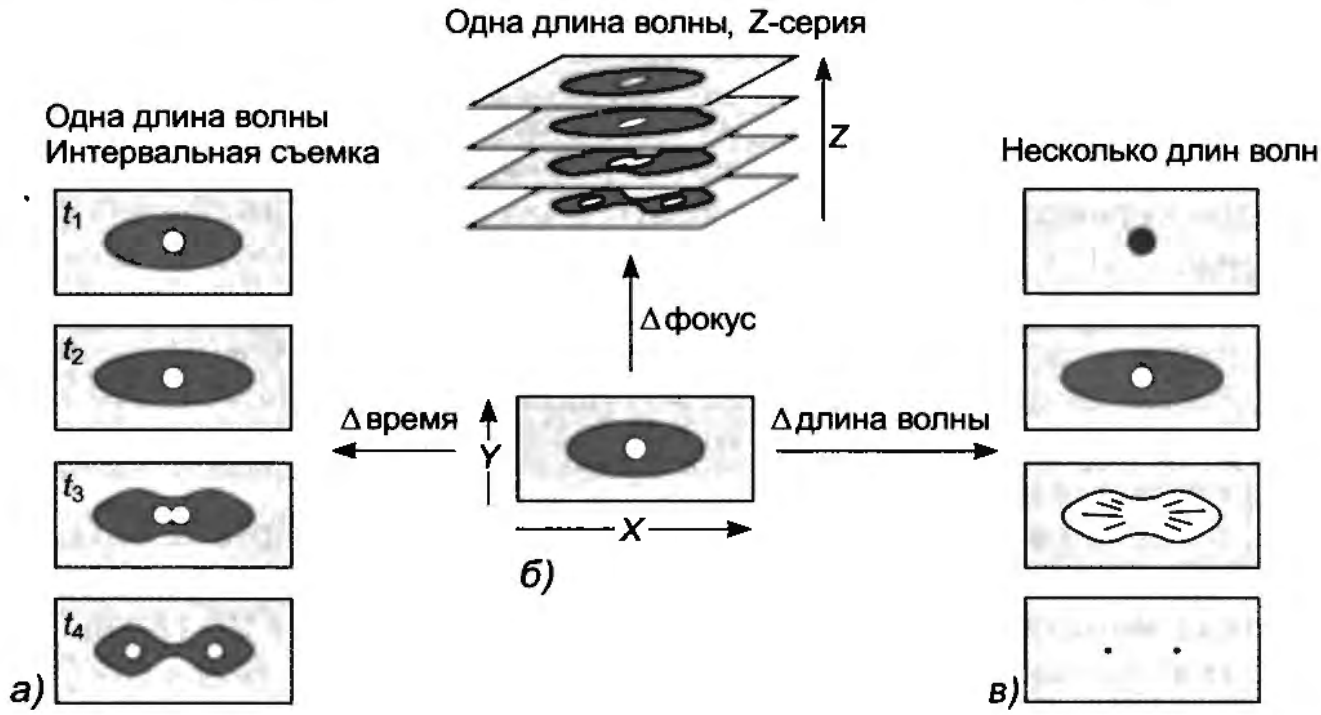


Рис. 4.15. Получение изображения в нескольких измерениях: *а* — возбуждение на одной длине волны во времени или в режиме интервальной съемки (изображение в измерениях *X* и *Y*); *б* — *Z*-серия или изображение в измерениях *X*, *Y*, *Z*. Комбинация *а* и *б* представляет собой 4D-изображение; *в* — изображения на различных длинах волн: комбинация *а*, *б* и *в* дает 5D-изображение

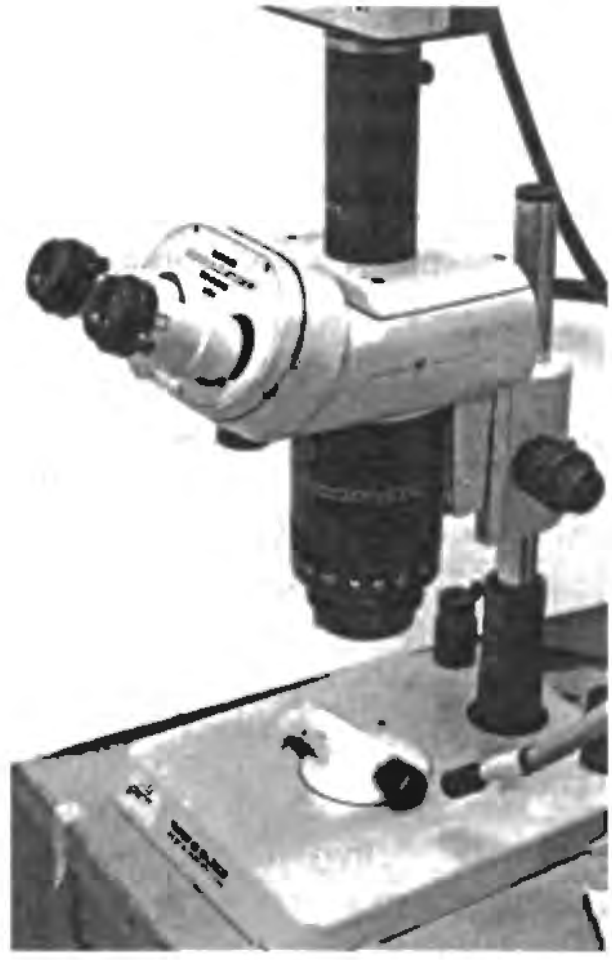


Рис. 4.16. Исследовательский стереомикроскоп. Обратите внимание, что источник света расположен сбоку; это позволяет создать эффект тени от образца (в данном случае — пробирка с мухами). Большой объектив над образцом можно поворачивать, тем самым увеличивая изображение

4.5 СТЕРЕОМИКРОСКОП

Второй тип светового микроскопа — **стереомикроскоп** — применяют для наблюдения за поверхностью крупных образцов (рис. 4.16). Такой микроскоп требуется, когда необходимо получить информацию в формате 3D, например для наблюдения за изменениями целого организма (рис. 4.17; цветная вклейка). Стереомикроскопы позволяют осуществлять микроманипуляции и рассечение образца — процедуры, при которых необходимо иметь широкое поле зрения и возможность приближать и удалять образец. Для различных задач, решаемых с помощью микроскопа данного типа, существует большой набор объективов и окуляров. Источник света может располагаться над образцом, под ним, окружать его кольцом или находиться сбоку, что создает эффект темного поля. Эти возможности позволяют увеличить контрастность или рельефность изображения. Кроме того, существуют флуоресцентные стереомикроскопы, которые применяются для скрининга трансгенных животных, меченных GFP или его вариантами.

4.6 ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП

4.6.1 Принципы действия

Электронный микроскоп (ЭМ) используют в тех случаях, когда необходимо большее разрешение, например при исследовании **ультраструктуры** клетки. Существует два типа электронных микроскопов: **трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп** (ТЭМ) и **сканирующий электронный микроскоп** (СЭМ). В ТЭМ изображение создается электронами, проходящими сквозь образец. В СЭМ для получения изображения поверхности образца собирают отраженные образцом (вторичные) электроны.

Аналогом источника света в электронном микроскопе служит **электронная пушка**. Если между катодом и анодом создается высокое напряжение (от 40 000 до 100 000 В — ускоряющее напряжение), вольфрамовая нить начинает испускать электроны (рис. 4.1). Отрицательно заряженные электроны проходят сквозь отверстие в аноде, в результате чего образуется пучок электронов. Электронный пучок проходит через серию электромагнитных линз (**катушку**). Фокусировка пучка достигается путем изменения напряжения на электромагнитных линзах. При прохождении пучка электронов через образец часть электронов рассеивается, а другие проецируются проектирующей линзой на фосфоресцирующий экран или регистрируются с помощью фотопленки или цифровой камеры. Электроны имеют ограниченную проникающую способность, поэтому для анализа используются сравнительно тонкие образцы (50–100 нм).

Более толстые образцы можно рассматривать при более высоком ускоряющем напряжении, например с помощью **высоковольтного электронного микроскопа**, в котором используется напряжение 1 000 000 В, или

электронного микроскопа промежуточного напряжения, работающего при 400 000 В. В данном случае стереоизображение получают на основании двух изображений, полученных под углом 8° и 10°. Такие изображения, удобные для анализа пространственных соотношений между органеллами внутри клетки, которые можно рассматривать с помощью стереоскопа или цифровой проекционной стереосистемы.

4.6.2 Подготовка образца

Контрастность изображения в ЭМ зависит от атомного номера элемента: чем выше атомный номер, тем сильнее рассеяние и контрастность. Поэтому для улучшения контрастности при работе с ЭМ в краситель принято добавлять тяжелые металлы, такие как уран, свинец или осмий. Изображение меченых структур выглядит черным или соответствует электронноплотной области (рис. 4.18).

Перед исследованием биологических образцов с помощью ЭМ из них должна быть полностью удалена вся вода. Это связано с тем, что электронный пучок образуется и фокусируется только в вакууме. Поэтому самым большим недостатком ЭМ при работе с биологическими образцами являются нефизиологические условия анализа. Тем не менее улучшенное разрешение, которое достигается в ЭМ, позволяет извлекать много дополнительной информации о структуре биологических образцов и событиях, происходящих в клетке, которую не удается получать никакими другими микроскопическими методами.

Для анализа с помощью ЭМ образец подготавливают довольно сложным образом, поэтому чтобы избежать артефактов от подготовки образца, особое внимание следует уделять интерпретации изображений. Например, традиционно образцы для ТЭМ обрабатывали глутаровым альдегидом для образования перекрестных сшивок в белках с последующей обработкой тетраоксидом осмия для фиксации и окрашивания липидных мембран. После этого образец обезвоживали с помощью спирта и заключали в эпоксидную смолу типа Epon для получения тонких срезов (рис. 4.18).

Срезы из небольших фрагментов заключенных в смолу тканей получают на **ультрамикротоме**, используя стеклянный или алмазный нож. Ультратонкие срезы имеют толщину около 60 нм. Края срезов всплывают на поверхность воды, и по их интерференции определяют толщину среза. Интерференция фрагментов желаемой толщины (60 нм) на поверхности воды должна быть серебряной или золотой окраски. Затем срезы помещают на медную или золотую **решетку микроскопа** и окрашивают с помощью красителей на основе тяжелых металлов, например уранилацетата или цитрата свинца.

Для проведения исследования с помощью СЭМ образцы фиксируют в глутаровом альдегиде, обезвоживают несколькими растворителями и окончательно высушивают либо на воздухе, либо методом «**критической точки**». Этот метод позволяет убрать всю воду, не допуская при этом напряжения поверхности, т. е. чтобы избежать артефактов высушивания. Затем образец закрепляют с помощью специального металлического за-

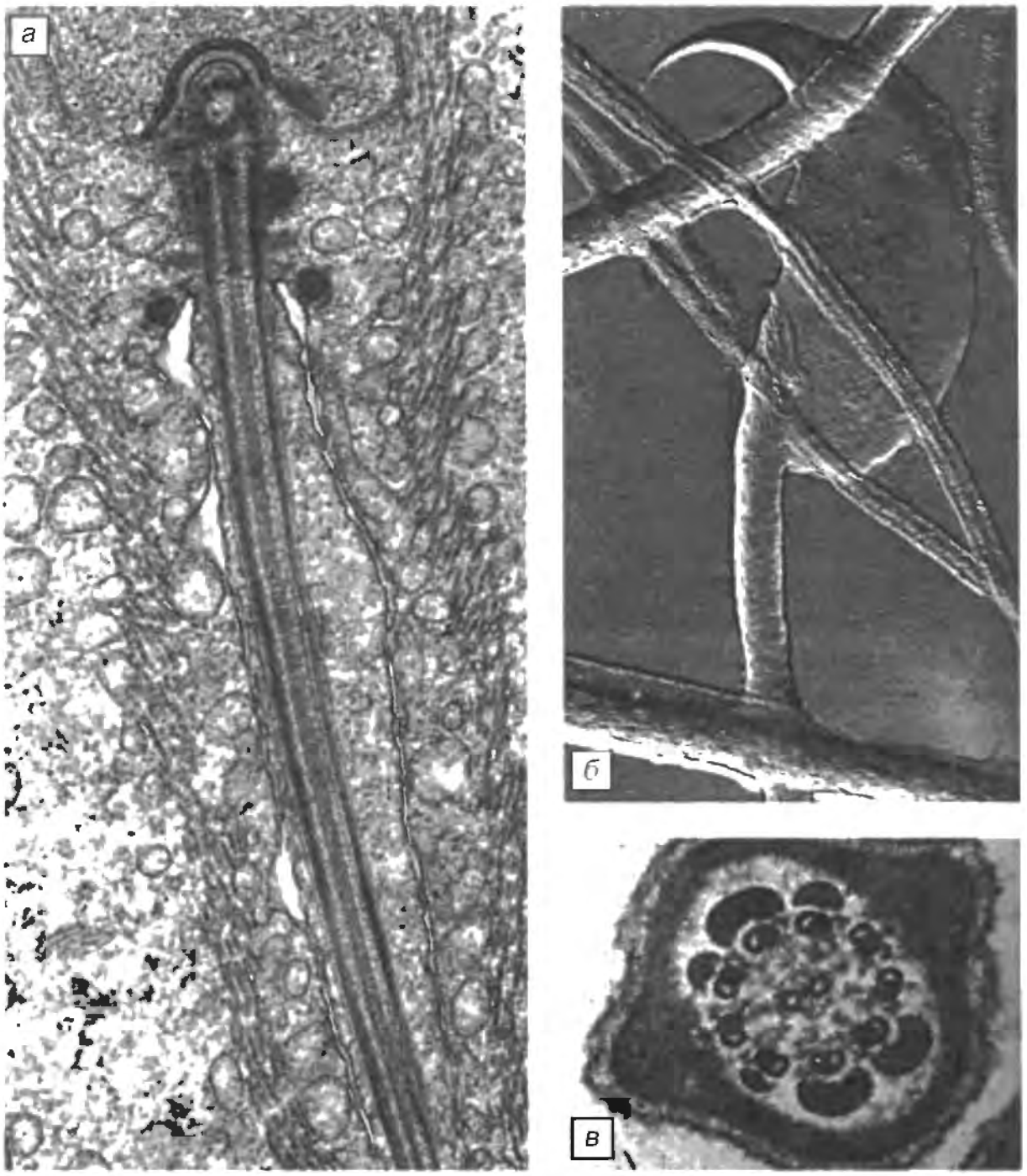


Рис. 4.18. Трансмиссионная электронная микроскопия. *а* и *в* — ультратонкие срезы (60 нм) развивающихся сперматозоидов, полученные в смоле Epon и окрашенные уранилацетатом и цитратом свинца. *б* — угольная реплика поверхности сперматозоидов мыши

жима и покрывают тонким слоем золота (рис. 4.17). Анализ поверхности можно также проводить с помощью ТЭМ, используя либо негативные красители*, либо угольные реплики высушенных на воздухе образцов (рис. 4.18).

* Негативные красители — это реагенты, содержащие атомы тяжелых металлов и не кристаллизующиеся при высушивании; поэтому они обеспечивают окрашивание с равномерной электронной плотностью. Такие красители применяют для визуализации контуров белковых комплексов, макромолекул и клеток в суспензии. В отличие от позитивных красителей типа тетраоксида осмия негативные красители не мешают мечению биологических структур. — *Прим. перев.*

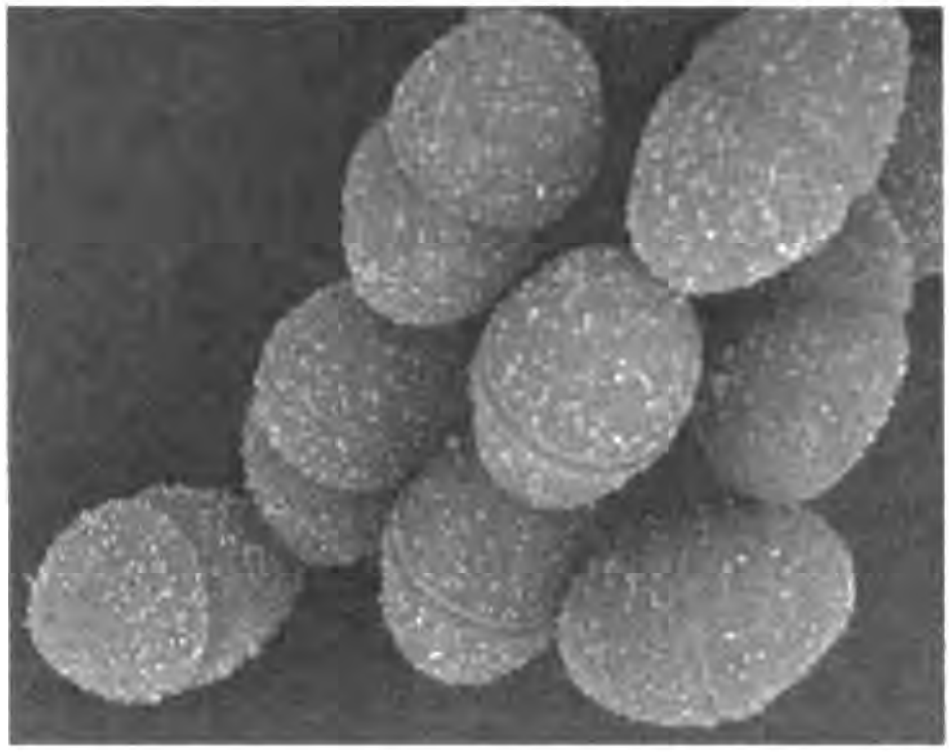


Рис. 4.19. Метод иммуноэлектронной микроскопии (СЭМ). Изображение бактерии *Enterococcus faecalis* с частичками золота размером 10 нм для связывания на поверхности специфического белка адгезии. Этот белок, так называемое «агрегирующее вещество», способствует обмену ДНК при конъюгации. Золотые частички выглядят как белые точки на поверхности бактерий. Фотография любезно предоставлена Стеном Эрландсеном

Метод иммуноэлектронной микроскопии позволяет определять локализацию молекул в клеточном микроокружении (ТЭМ) и на поверхности клетки (СЭМ) (рис. 4.19). Клетки готовят таким же образом, как и для непрямого иммунофлуоресцентного анализа, вместо меченных флуоресцеином вторичных антител используют частицы электроннoплотного коллоидного золота. Введение нескольких меток достигается путем использования частиц золота разного размера (около 10 нм), связанных с антителами к анализируемым белкам. Метод основан на связывании белка А с частицами золота, поскольку, кроме того, белок А связывается с фрагментами антител. Некоторые смолы, такие как Lowicryl или LR White, позволяют антителам и частицам золота связываться с ультратонкими срезами.

4.6.3 Новые достижения электронной микроскопии

В настоящее время продолжают развиваться методы фиксации образца, позволяющие избежать артефактов подготовки образца и наблюдать его в состоянии, которое наиболее близко физиологическим условиям. Например, образцы быстро (за миллисекунды) **замораживают под высоким давлением**. В этих условиях существует большая вероятность сохранения биохимического состояния клетки. Многие из таких образцов можно рассматривать непосредственно с помощью ЭМ или их можно зафиксировать методом **криозамещения**. В данном методе фиксирующий раствор вводят в образец при низкой температуре, а затем образец медленно нагревают до комнатной температуры.

Метод **криоэлектронной томографии** позволяет рассматривать трехмерные структуры клеток и макромолекул с разрешением 5–8 нм. Клетки замораживают и помещают в аппарат, который перемещает образец определенным образом. Под каждом определенном углом наклона получают двумерное цифровое изображение образца, а затем с помощью компьютерных программ воссоздают трехмерное изображение.

4.6.4 Интегральная микроскопия

Один и тот же образец можно рассматривать с помощью светового микроскопа, а затем — с помощью ЭМ. Такой подход был назван **интегральной микроскопией**. Соотношение изображений, полученных с высоким временным разрешением в световом микроскопе и высоким пространственным разрешением в ЭМ, позволяет получить дополнительную информацию об образце (рис. 4.20). Такой комплексный подход также позволяет бороться с артефактами. В настоящее время созданы метки, которые флуоресцируют в световом микроскопе и являются электроннoплотными в ЭМ.

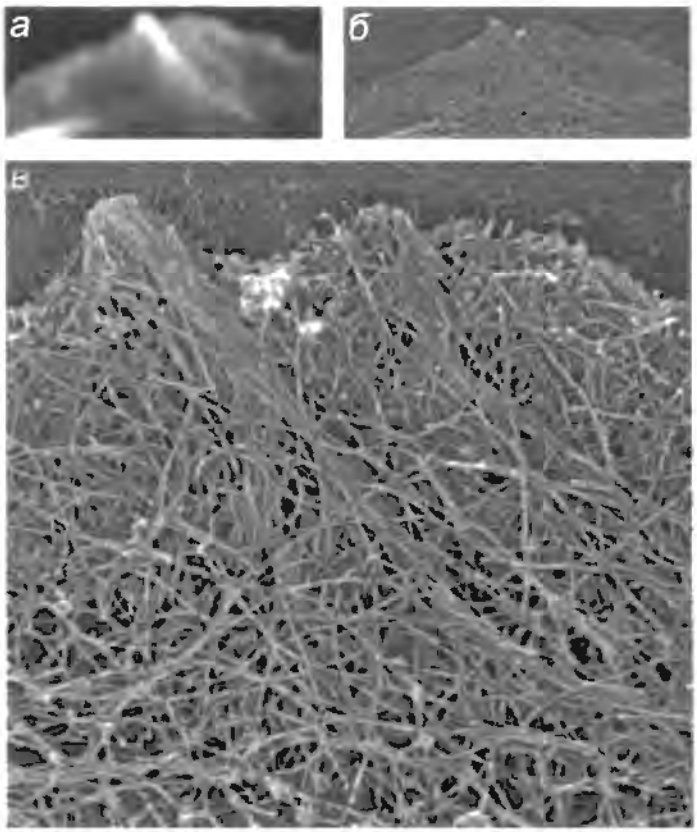


Рис. 4.20. Интегральная микроскопия: *а* — изображение в эпифлуоресцентном микроскопе; *б* и *в* — ТЭМ той же клетки при различных увеличениях. В качестве флуоресцентной метки использовали родамин-фаллоидин, который связывается с полимеризованным актином. Напряженные волокна на поверхности клетки в световом микроскопе (*а*) выглядят как белые линии, а при визуализации с помощью ТЭМ эти волокна соответствуют протяженным актиновым филаментам. Препарат для ТЭМ готовили путем экстракции детергентом, химической фиксации, высушивания по методу критической точки и использовали платиноуглеродное покрытие

4.7 ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ В БИОХИМИИ

Одной из главных задач современных биологических исследований является изучение функционирования белков в живых клетках. Микроскопические методы значительно расширяют возможности изучения тех или иных событий, происходящих в клетке. Микроскоп не только позволяет увидеть происходящее, но и получить количественную информацию. **Цифровые методы обработки изображения** еще больше облегчают процесс сбора необходимой информации. Чувствительные цифровые детекторы позволяют фиксировать слабые изменения интенсивности свечения маркерных молекул. Подобные технические новшества помогают исследовать молекулярные механизмы как пространственные.

К относительно простым задачам относятся анализ двумерных изображений, определение длин или площадей. Измерение глубины и объема можно осуществить с помощью набора данных, полученных в формате 3D, 4D или 5D. Калибровку изображения можно провести путем получения изображения калибровочной решетки в тех же экспериментальных условиях. Многие системы обработки изображения позволяют ввести в программу калибровочный коэффициент, что позволяет сопоставлять различные данные.

Быстрое развитие флуоресцентной микроскопии, цифровых методов и, что важнее всего, появление новых флуоресцентных меток для анализа биологической активности еще более усложнили процесс количественного анализа изображений. Большинство количественных экспериментов основано на способности точно определять интенсивность свечения флуоресцентной метки в образце с помощью цифровых методов. Этот подход также лежит в основе метода **проточной цитометрии** (разд. 16.3.2), который измеряет свечение популяции клеток, проходящих сквозь луч лазера. Клетки можно сортировать на популяции с помощью родственного метода **сортировки активированных флуоресценцией клеток** (fluorescence-activated cell sorting, FACS).

Интенсивность флуоресценции метки может быть отнесена к количеству этой метки в любом конкретном участке клетки. Например, концентрацию кальция в различных отделах живого эмбриона определяют с помощью специфических красителей (таких как fluo-3), интенсивность флуоресценции которых возрастает пропорционально количеству свободного кальция в клетке (рис. 4.21; цветная вклейка). Для проведения подобных измерений в живых клетках и тканях уже создано множество маркеров. Поскольку фотообесцвечивание и другие артефакты, связанные с красителями, могут влиять на результаты анализа, необходимой частью таких исследований является соответствующий контроль. Например, образец можно окрашивать с помощью двух ионочувствительных красителей и сравнивать интенсивность их свечения в ходе эксперимента. Результаты таких экспериментов обычно представляют относительно контролей, что позволяет учесть количество красителя, фотообесцвечивание и различия в показаниях приборов.

Белки с флуоресцентной меткой путем инъекции вводят в клетку, где со временем они встраиваются в определенные клеточные структуры. За этим процессом можно следить с помощью флуоресцентной микроскопии в режиме интервальной съемки. Однако получающиеся изображения могут иметь очень сильный фон красителя и их часто трудно интерпретировать. Кроме получения оптических срезов (разд. 4.3) были разработаны и другие методы анализа биохимических процессов в клетке, позволяющие избежать высокой фоновой флуоресценции.

Метод **восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания** (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) использует интенсивный поток света от лазерного источника для локального разрушения

Рис. 4.22. Метод флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). *Вверху* (нет FRET) — циановый флуоресцентный белок (CFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) расположены недостаточно близко друг к другу, чтобы мог реализоваться механизм FRET (расстояние превышает 6 нм). В этом случае возбуждение синим светом с длиной волны 430 нм приводит только к излучению CFP в зеленой области при 490 нм. *Внизу* (FRET) — белки CFP и YFP расположены настолько близко (ближе 6 нм), что может происходить «перенос энергии», или FRET. В данном случае возбуждение синим светом с длиной волны 430 нм приводит к флуоресценции CFP (зеленый свет) и YFP (красный свет)

флуоресцентной метки в клетке с целью создания обесцвеченной зоны. Последующее перемещение красителя в обесцвеченную область служит мерой подвижности молекул. Это позволяет проводить биохимический анализ в живой клетке (разд. 16.3.2). Родственный метод **фотоактивации** основан на использовании метки, флуоресценция которой индуцируется импульсами света в коротковолновой области. Визуализацию активированной метки осуществляют в диапазоне более длинных волн. Данный метод обеспечивает более высокое отношение сигнал/фон, чем метод фотообесцвечивания.

Третий метод — **флуоресцентная спекл-микроскопия** (fluorescence speckle microscopy, FSM) — был создан на основе частного наблюдения, но сейчас его широко используют для визуализации динамики макромолекул в живых клетках. В клетку путем инъекции вводят небольшое количество меченного флуоресцентной меткой белка, так что не весь анализируемый белок внутри клетки оказывается меченым. В результате под микроскопом меченые таким образом внутриклеточные структуры выглядят пятнистыми. Динамика всех процессов наблюдается относительно темных областей.

Метод **флуоресцентного резонансного переноса энергии** (fluorescent resonance energy transfer, FRET) отодвигает теоретический предел разрешения для светового микроскопа, позволяя наблюдать за белковыми взаимодействиями *in vivo* (рис. 4.22). Явление FRET имеет место в том случае, когда излучение одного флуорофора (донора) служит источником возбуждения для второго (акцептора). Такое явление возможно лишь при очень близком расположении двух маркеров — на расстоянии не более 60 Å (6 нм). Примером применения метода FRET может служить эксперимент со спектральными вариантами зеленого флуоресцентного белка (GFP), когда возбуждение цианового флуоресцентного белка (CFP) стимулирует флуоресценцию желтого флуоресцентного белка (YFP). Флуоресценция YFP наблюдается только в том случае, если белки расположены рядом. Поскольку за этим процессом можно следить во времени, метод FRET используют для прямого измерения связывания белков (разд. 16.3.2).

Более сложный метод **определения длительности флуоресценции** (fluorescence lifetime imaging, FLIM) основан на определении времени, на протяжении которого происходит флуоресценция флуорофора после его возбуждения коротким импульсом (10 нс) лазерного излучения. Метод FLIM применяют для детекции нескольких флуорофоров с разной длительностью излучения и перекрывающимися спектрами испускания.

4.8 СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Методы микроскопии и создания изображений продолжают интенсивно развиваться. Появляются новые приборы, предназначенные для решения специальных, нестандартных биохимических задач. Большинство работ в этой области направлено на усовершенствование технологии визуализации живых клеток и тканей.

Получение изображения с помощью **магнитного резонанса** (magnetic resonance imaging, MRI) первоначально применялось для трехмерного анализа крупных структур, таких как целый организм. Однако в последнее время метод был адаптирован для получения изображений глубоких слоев непрозрачных тканей с высоким разрешением (до 10 мкм), например для анализа строения живых эмбрионов в процессе их развития. Были созданы контрастные вещества, позволяющие анализировать одну и ту же ткань как методом флуоресцентной микроскопии, так и методом MRI. Техника MRI позволяет проникать на всю глубину исследуемой ткани, тогда как флуоресцентный метод дает изображение тканей эмбриона на глубине не более нескольких микрометров (см. также разд. 13.4.3).

Еще одна активно развивающаяся область — создание методов детекции отдельных молекул. Например, **микроскопия полного внутреннего отражения** (total internal reflection microscopy, TIRF) использует свойство быстрого затухания волн на границе раздела двух сред (рис. 4.23), например между образцом и покровным стеклом. Метод основан на том, что интенсивность затухающих волн быстро падает, так что возбуждение любого флуорофора ограничено областью не более 100 нм от поверхности стекла. Этот слой тоньше оптического среза, получаемого с помощью конфокальной микроскопии, так что с помощью данного метода удается получать изображения отдельных молекул на поверхности раздела.

Действие **атомного силового микроскопа** основано не на свойствах линз, а на использовании специального зонда, анализирующего поверхность образца с помощью тонкой иглы, длина которой составляет

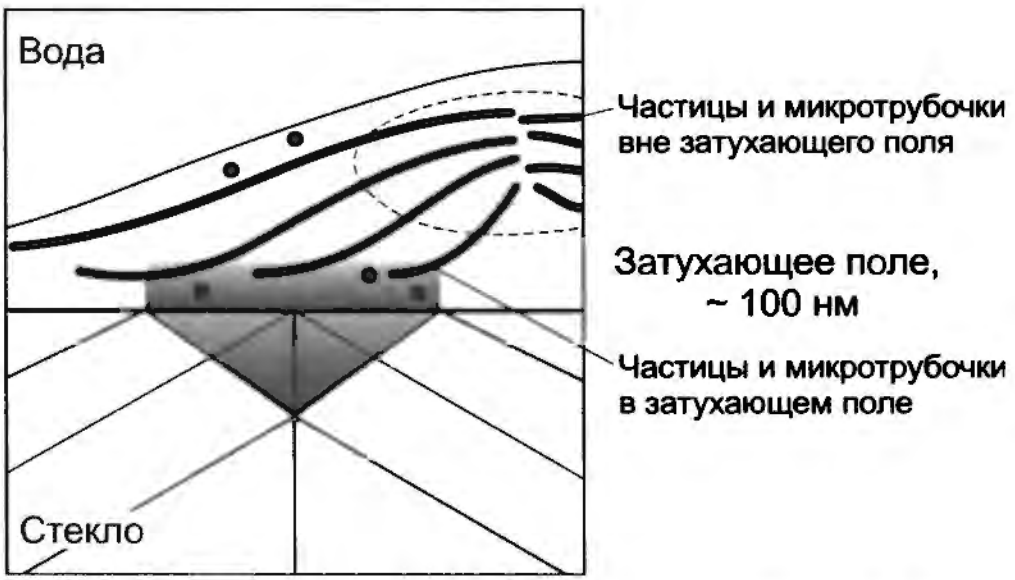


Рис. 4.23. Микроскопия полного внутреннего отражения (TIRF). В области толщиной 100 нм на границе раздела фаз стекло/вода возбуждение возникает в том случае, если создаются условия для внутреннего отражения света. В данном примере вклад во флуоресценцию дают только те частицы и микротрубочки, которые расположены в затухающем поле (100 нм по оси Z)

Таблица 4.3. **Разрешение при создании изображения**

	XY	*Z*
Обычный микроскоп	0,5 мкм	1,6 мкм
Конфокальный/многофотонный	0,25 мкм	0,7 мкм
TIRF — затухающая волна[a]	0,5 мкм	0,3 мкм
Атомный силовой — ближнее поле	0,05 мкм	0,01 мкм

[a] TIRF — микроскопия полного внутреннего отражения

несколько микрометров, а диаметр на конце — менее 10 нм (**изображение в ближнем поле**). Игла расположена на конце рычага длиной 100–200 мкм. По мере продвижения иглы по поверхности образца возникающие между ними силы заставляют рычаг изгибаться. Движения рычага регистрируются компьютером и на этой основе создается изображение поверхности образца. Метод позволяет воссоздавать изображение поверхности с очень высоким разрешением (табл. 4.3).

4.9 СОХРАНЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ИХ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ И ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Большинство изображений, получаемых с помощью любых современных микроскопов, сохраняются в цифровом формате. Такой способ регистрации данных не только значительно ускоряет процесс получения информации, но и открывает доступ к различным базам данных и позволяет осуществлять обмен информацией между различными лабораториями через интернет. При обмене такой информацией между лабораториями и при размещении информации в электронных журналах не происходит потери разрешения или искажения цветов.

Международные базы данных, хранящие полученные с помощью микроскопов изображения, продолжают развиваться. Современная тенденция в микроскопии заключается в получении все большего количества данных, особенно это касается многомерных изображений. Эта тенденция, в частности, связана с необходимостью развития автоматизированных методов анализа изображений, например относящихся к экспрессии генов при изучении геномов.

Более детально ознакомиться с действием всех видов микроскопов и их применением в биохимии можно с помощью интернет-сайтов. Некоторые сайты указаны в разделе дополнительной литературы (см. разд. 4.10). Обращайте внимание на то, чтобы изучаемые вами сайты были обновлены. Область микроскопии развивается чрезвычайно быстро, хотя основы методов световой и электронной микроскопии остаются неизменными.

ПРИМЕР 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ НОВОГО БЕЛКА

Вопрос Из биологического образца выделен и очищен новый белок. Как определить его внутриклеточную локализацию и возможные функции в клетке?

Ответ Существует множество маркеров для различных отделов клетки. Например, TOTO3 позволяет метить ядро, а флуоресцентные фаллоидины — контуры клетки. Следует получить антитела к новому белку и использовать их для иммунофлуоресцентного анализа. С помощью нескольких меток и, возможно, техники получения оптических срезов, таких как лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, можно более точно определить распределение белка в клетке. Для более высокого разрешения используют методы иммуно-ЭМ или FRET.

4.10 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

ABRAMOWITZ, M. (2003) *Microscope Basics and Beyond*. Olympus of America Inc., Melville, NY. Хорошо иллюстрированный материал по всем аспектам световой микроскопии; существует также в виде pdf файла.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., and WALTER, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn. Garland Science, New York. Хорошее введение в микроскопию и методы получения изображения живой клетки. Для клеточных биологов.

ANDREWS, P.D., HARPER, I.S., and SWEDLOW, J.R. (2002) To 5D and beyond: quantitative fluorescence microscopy in the postgenomic era. *Traffic*, **3**, 29–36. Обзор посвящен многомерным изображениям, методам обработки больших наборов данных и международным банкам данных.

BARUCH, A., JEFFERY, D.A., and BOFYO, M. (2004) Enzyme activity — it's all about image. *Trends in Cell Biology*, **14**, 29–35. Новый обзор биохимических экспериментов с флуоресцентной меткой.

BRAGA, P.C. and RICCI, D. (2003) Atomic Force Microscopy — Biomedical Methods and Applications. *Methods in Molecular Biology*, vol. 242. Методики и применение атомной силовой микроскопии.

FRANKEL, F. (2002) *Envisioning Science: The Design and Craft of the Science Image*. MIT Press, Cambridge, MA. Популярное изложение методов получения изображений с особым акцентом на стереомикроскопию.

HAUGLAND, R. (2003) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th edn. Molecular Probes Inc. Eugene, OR. Перечень всех существующих флуоресцентных меток с протоколами и ссылками; постоянно обновляемый интернет-сайт.

HURTLEY, S.M. and HELMUTH, L. (2003) Biological imaging. *Science*, **300**, 75–145. Очень хороший сборник статей по современным методам получения изображений.

INOUE, S. and SPRING, K. (1997) *Video Microscopy, The Fundamentals*, 2nd edn. Plenum Publishing Corp. New York. Прекрасное введение в методы получения изображений живых клеток, видеомикроскопию и общие вопросы микроскопии.

ISHIJIMA, A. and YANAGIDA, T. (2001) Single molecule nanobioscience. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 438–444. Обзор посвящен получению изображения отдельных молекул.

LEWIS, A., TAHA, H., STRINKOVSKI, A., MANEVITCH, A., KHATCHATOURIANTS, A., DEKHTER, R., and AMMANN, E. (2003) Near-field optics: from subwavelength illumination to nanometric shadowing. *Nature Biotechnology*, **21**, 1378–1386. Обзор посвящен оптическим методам в ближнем поле и их развитию.

MCINTOSH, J.R. (2001) Electron microscopy of cells: a new beginning for a new century. *Journal of Cell Biology*, **153**, F25–F32. Хорошее и краткое введение в современные методы ЭМ.

PERIASAMY, A. (2001) *Methods in Cellular Imaging*. Oxford University Press, Oxford. Прекрасный обзор современных методов микроскопии, в том числе конфокальной, многофотонной и FRET.

SCHULDT, A. and SMALLRIDGE, R. (2003) *Imaging in cell biology*. Supplement to Nature Cell Biology, **6**. Новый обзор современных методов получения изображения.

SEDGEWICK, J. (2002) *Quick PhotoShop for Research: A Guide to Digital Imaging for PhotoShop*. Kluwer Academic/Plenum Publishing, New York. Практическое руководство по созданию цифровых изображений на основании микроскопических данных.

SHAPIRO, H.M. (2003) *Practical Flow Citometry*, 4th edn. John Wiley and Sons, New York. Превосходная книга по основам флуоресценции и проточной цитометрии.

SPECTOR, D.L. and GOLDMAN, R.D. (2004) *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Хорошее введение в современные методы визуализации живых клеток.

VAN ROESSEL, P. and BRAND, A.H. (2002) Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interaction with fluorescent proteins. *Nature Cell Biology*, **4**, E15–E20. Хорошее введение в методы, связанные с использованием GFP и FRET.

WALLACE, W., SCHAFFER, L.H., and SWEDLOW, J.R. (2001) Working person's guide to deconvolution in light microscopy. *BioTechniques*, **31**, 1076–1097. Обзор методов деконволюции.

ZHANG, J., CAMPBELL, R.E., TING, A.Y., and TSIEN, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, **3**, 906–918. Обзор флуоресцентных меток для анализа биологической активности, особенно репортерных молекул.

ИНТЕРНЕТ-САЙТЫ

Общие вопросы микроскопии

<http://www.microscopyu.com/>
<http://www.microscopy.fsu.edu/>
<http://www.microscopy-analysis.com/>
<http://www.msa.microscopyu.com/>
<http://www.rms.org.uk/>
<http://www.ou.edu/research/electron/mirror/web-subj.html>
<http://www.ou.edu/research/electron/www-vl/>

Флуоресцентные метки

<http://www.bdbiosciences.com/clontech/>
<http://www.qdots.com/>
<http://www.probes.com>
<http://www.jacksonimmuno.com/>

Обработка изображения

<http://www.apple.com/quicktime/qtvr/>
<http://www.rsb.info.nih.gov/nih-image/>
<http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>
<http://www.uiowa.edu/~dshbwww/>
<http://www.lemkesoft.de/en/index.htm>

Базы данных

<http://www.openmicroscopy.org>

Глава 5

Теоретические основы молекулярной биологии и биоинформатики. Методы

5.1 ВВЕДЕНИЕ

Завершение проекта «Геном человека» — одна из важнейших вех в истории науки. Человеческий геном содержит информацию, необходимую для развития и сохранения человека, и может служить для изучения процессов, происходящих на клеточном или молекулярном уровне как в здоровом организме, так и при различных заболеваниях. Геном представляет собой полный набор ДНК данного организма и несет всю информацию о структуре каждого белка, продуцируемого клеткой. Понимание того, что ДНК лежит в основе жизнедеятельности клетки, привело к развитию области науки, называемой молекулярной биологией. Молекулярная биология сегодня воспринимается не как отдельная область биологической науки, а как очень важное средство для исследования и описания сложнейших биологических процессов. Развитие методов и технологий для изучения процессов на молекулярном уровне привело к появлению новых мощных методов выделения и анализа нуклеиновых кислот, а также их применений. Более того, лавина поступающей биологической информации вызвала появление новой области науки — биоинформатики, которая играет чрезвычайно важную роль в современной биологической науке. Завершение проекта «Геном человека» и многих других проектов привело к развитию новых, очень интересных областей биологии — биотехнологии, геномного картирования, молекулярной медицины и генной терапии.

Прежде чем перейти к их рассмотрению, следует познакомиться с основами структуры нуклеиновых кислот. Ведь именно структура определяет функции нуклеиновых кислот *in vivo* и *in vitro*. Действительно, многие методы молекулярной биологии имитируют в некотором смысле природные функции нуклеиновых кислот, такие как репликация и транскрипция. Эта глава, таким образом, представляет собой обзор особенностей структуры и функций нуклеиновых кислот и описывает некоторые основные методы их выделения и анализа.

5.2 СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.2.1 Первичная структура нуклеиновых кислот

ДНК и РНК представляют собой макромолекулярные структуры, построенные из нуклеотидов по аналогии с регулярными полимерами. Строительные блоки нуклеиновых кислот — нуклеотиды — образованы из **нуклеозидов**, которые состоят из двух остатков: пятичленного сахара пентозы (2-дезоксирибоза в ДНК и рибоза в РНК) и азотистого основания. При нумерации атомов углерода в остатке сахара ставят штрих (1', 2', 3' и т. д.), чтобы отличить их от атомов углерода азотистых оснований (пуринов и пиримидинов). **Нуклеотид**, или фосфат нуклеозида, образуется присоединением фосфата к 5'-положению нуклеозида через эфирную связь (рис. 5.1). Такие нуклеотиды могут быть соединены вместе посредством еще одной эфирной связи в результате реакции между концевой фосфатной группой одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой другого, образуя 5'→3'-фосфодиэфирную связь между соседними сахарами; этот процесс может повторяться многократно, в результате чего возникают длинные полинуклеотидные молекулы (рис. 5.2). ДНК построена из двух таких полинуклеотидных цепей; однако, поскольку каждая цепь имеет свободную 5'-гидроксильную группу на одном конце и свободную 3'-гидроксильную группу на другом, каждая цепь имеет полярность, или направленность. Полярности каждой из двух цепей одной молекулы противоположны, и, таким образом, ДНК представляет собой «**антипараллельную**» структуру (рис. 5.3).

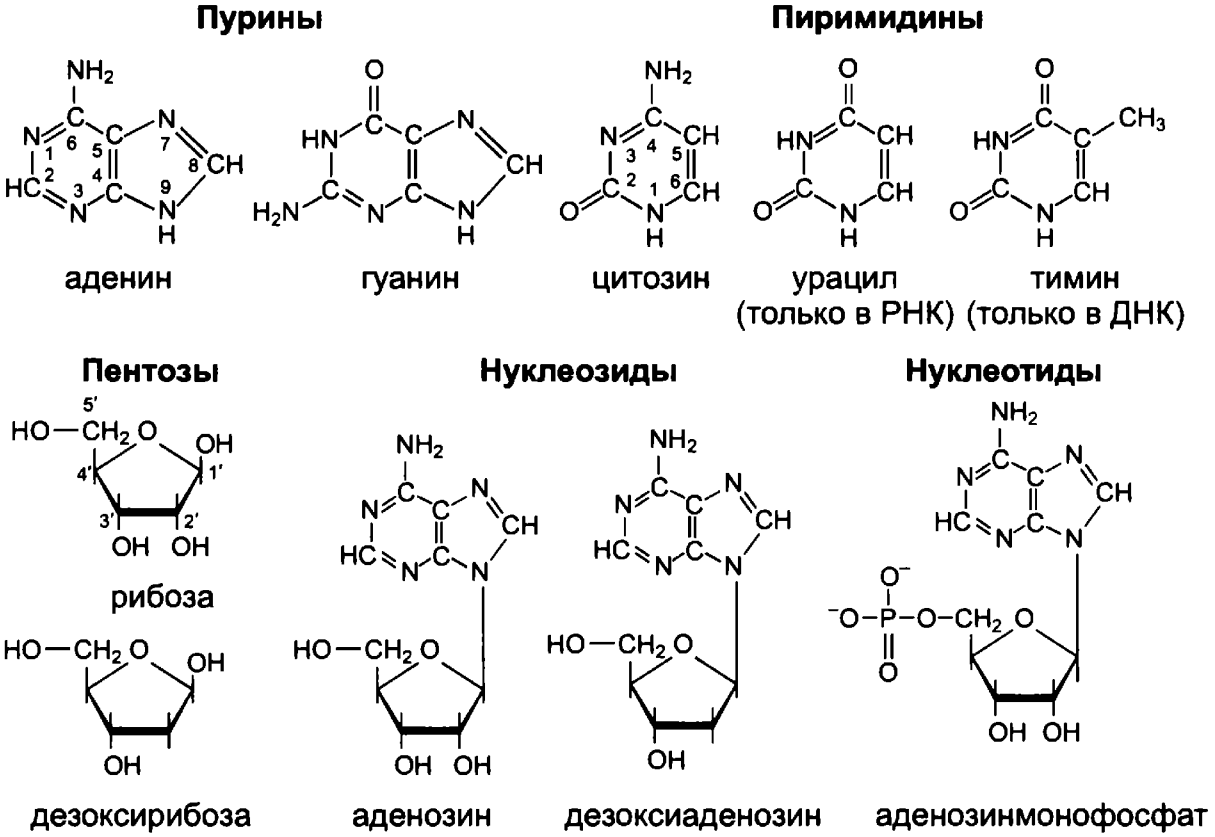


Рис. 5.1. Структура нуклеозидов и нуклеотидов

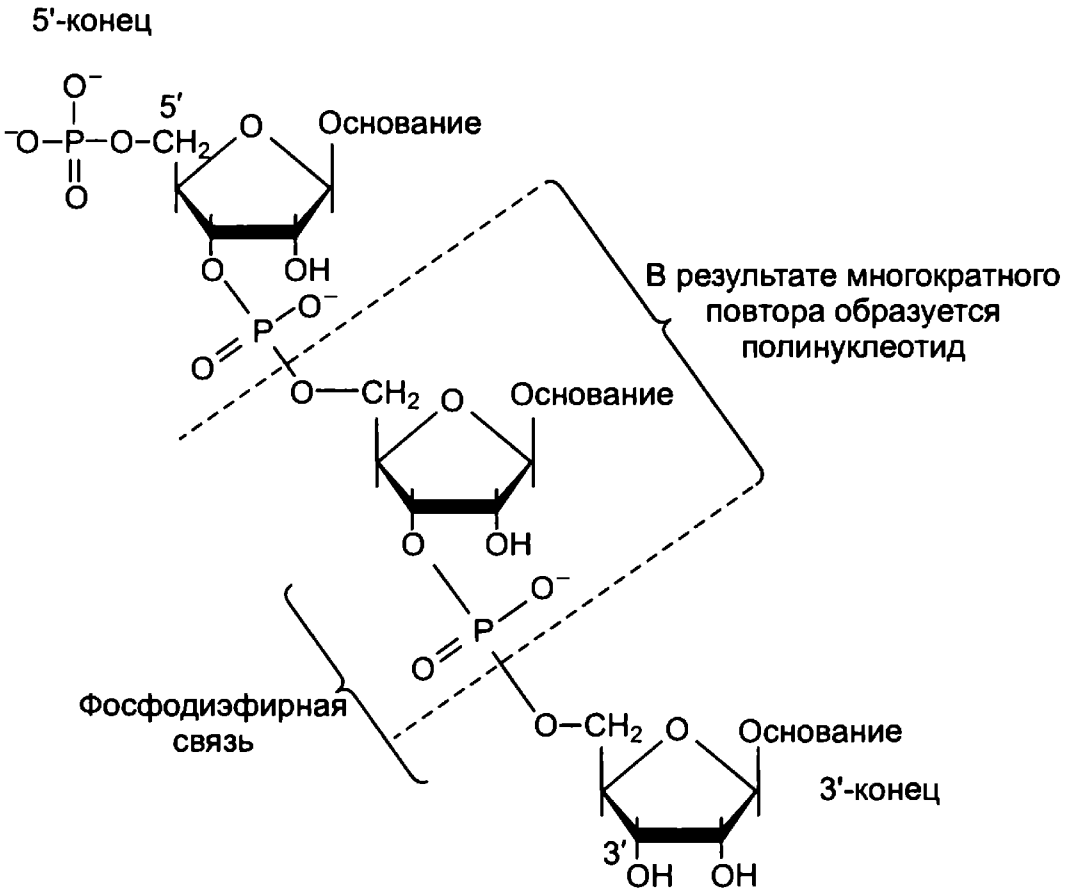


Рис. 5.2. Структура полинуклеотида

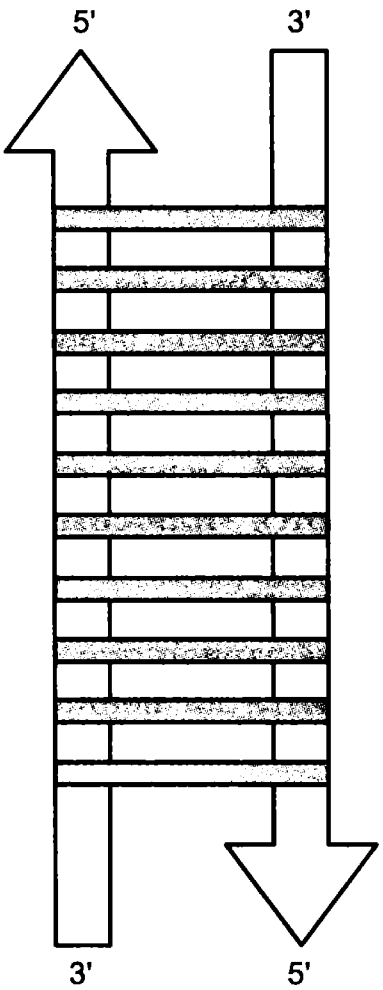


Рис. 5.3. Антипараллельная природа ДНК. Одна цепь в двойной спирали идет в направлении от 5'- к 3'-концу, тогда как другая цепь — в противоположном направлении от 3'- к 5'-концу. Цепи удерживаются вместе водородными связями между основаниями

Пуриновые основания (конденсированная структура из пяти- и шестичленных колец) **аденин** (A) и **гуанин** (G), а также пиримидиновое основание (одно шестичленное кольцо) **цитозин** (C) обнаруживаются как в ДНК, так и в РНК. Другие пиримидины встречаются только в одном типе нуклеиновой кислоты: **урацил** (U) встречается в РНК, тогда как **тимин** (T) — в ДНК. Таким образом, можно отличить РНК от ДНК по присутствию рибозы и урацила в РНК и дезоксирибозы и тимина в ДНК. Однако именно последовательность оснований отличает одну молекулу ДНК (или РНК) от другой. Принято записывать последовательность оснований нуклеиновой кислоты, начиная от 5'-конца молекулы, используя заглавную букву для каждого основания, например CGGATCT. Важно отметить, что нет необходимости указывать сахарные или фосфатные группы, так как они идентичны на протяжении всей молекулы. Концевые фосфатные группы (англ. phosphate) могут, где это необходимо, быть обозначены буквой «p»; таким образом, запись 5'-pCGGATCT-3' указывает на наличие фосфата на 5'-конце молекулы.

5.2.2 Вторичная структура нуклеиновых кислот

Две полинуклеотидные цепи в ДНК обычно свернуты в **правозакрученную двойную спираль**, в которой азотистые основания обеих цепей направлены в центр молекулы, а сахаро-фосфатный остов выставлен наружу. Важной особенностью этой двунитевой (двухцепочечной, двухтяжевой) структуры является то, что последовательности оснований в одной цепи комплементарны к последовательности оснований в другой цепи. Пуриновое основание, присоединенное к сахарному остатку в одной цепи, всегда связано водородной связью с пиримидиновым основанием, присоединенным к сахарному остатку в другой цепи. Более того, всегда аденин (A) находится в паре с тимином (T) (или урацилом (U) в РНК) с помощью двух водородных связей, а гуанин (G) — с цитозином (C) с помощью трех водородных связей (рис. 5.4). Когда эти условия соблюдены, образуется устойчивая двунитевая структура, в которой остовы двух цепей (тяжей) находятся в среднем на одинаковом расстоянии друг от друга. Таким образом, если известна последовательность одной из цепей, можно определить последовательность другой цепи. Цепи обозначаются «**плюсом**» (+) и «**минусом**» (–); в процессе транскрипции происходит синтез молекулы РНК, комплементарной «минус» цепи ДНК (разд. 5.5.3). Последовательность оснований может вызвать значительные локальные вариации в трехмерной структуре молекулы ДНК, и эти вариации являются жизненно важными для специфических взаимодействий между ДНК и различными белками. Хотя трехмерная структура ДНК может изменяться, в целом *in vivo* она сохраняет структуру двойной спирали, именуемую B-формой или **B-ДНК**. Существуют также другие формы правозакрученной ДНК, такие как A и C, которые образуются из нитей ДНК при различном уровне влажности (табл. 5.1).

Основная особенность B-ДНК состоит в том, что один виток двойной спирали содержит 10 оснований; кроме того, в молекуле можно идентифицировать большой и малый желобки (рис. 5.5). В определенных условиях, когда встречаются повторяющиеся последовательности, ДНК может при-

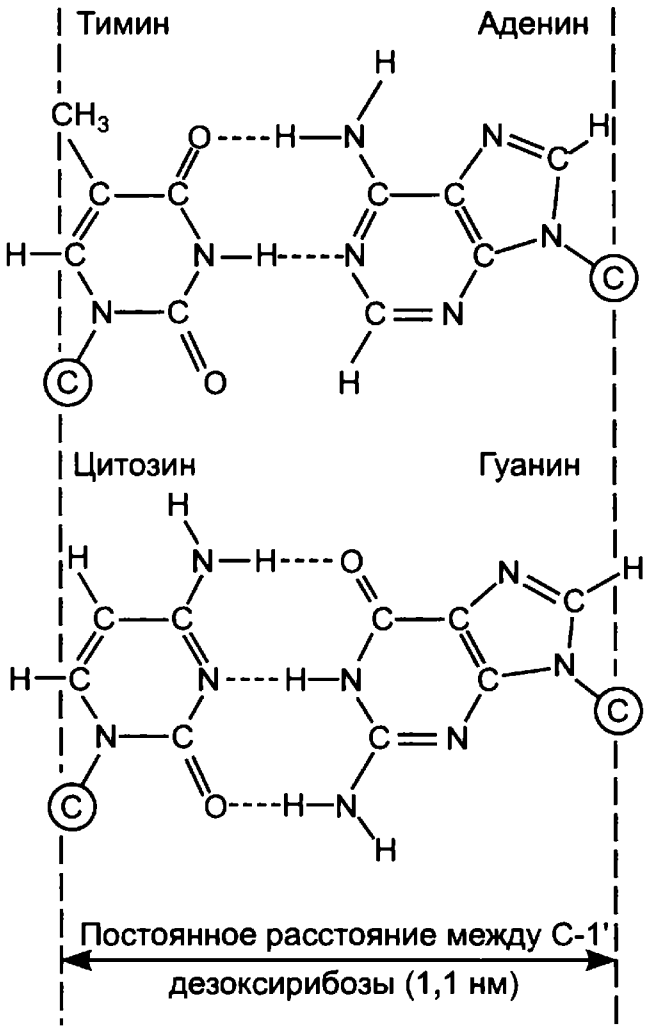


Рис. 5.4. Спаривание оснований в ДНК. Ⓒ — углерод в 1'- положении дезоксирибозы

Таблица 5.1. **Различные формы ДНК**

Форма ДНК	Влажность, %	Направление спирали	Число оснований на виток спирали	Диаметр спирали, Å
B	92	ПЗ	10	19
A	75	ПЗ	11	23
C	66	ПЗ	9,3	19
Z	$(Py\text{-}Pu)_n$	ЛЗ	12	18

ПЗ — правозакрученная спираль; ЛЗ — левозакрученная спираль; Pu — пурин; Py — пиримидин. Различные формы ДНК могут быть получены при разном значении относительной влажности. B-форма является наиболее общей формой ДНК, тогда как A- и C-формы были получены в лабораторных условиях. Z-форма может быть создана последовательностью ДНК, образованной чередующимися пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами.

нимать форму левозакрученной спирали — так называемая **Z-ДНК**. Эта форма была впервые синтезирована в лаборатории и, по всей вероятности, не существует *in vivo*. Наличие различных форм ДНК говорит о том, что это не статичная, а динамичная структура — постоянно изменяющаяся молекула, которая может быть свернута, согнута или искривлена при определенных условиях. Хотя РНК почти всегда существует как одноцепочечная молекула, она часто содержит комплементарные последовательности, ко-

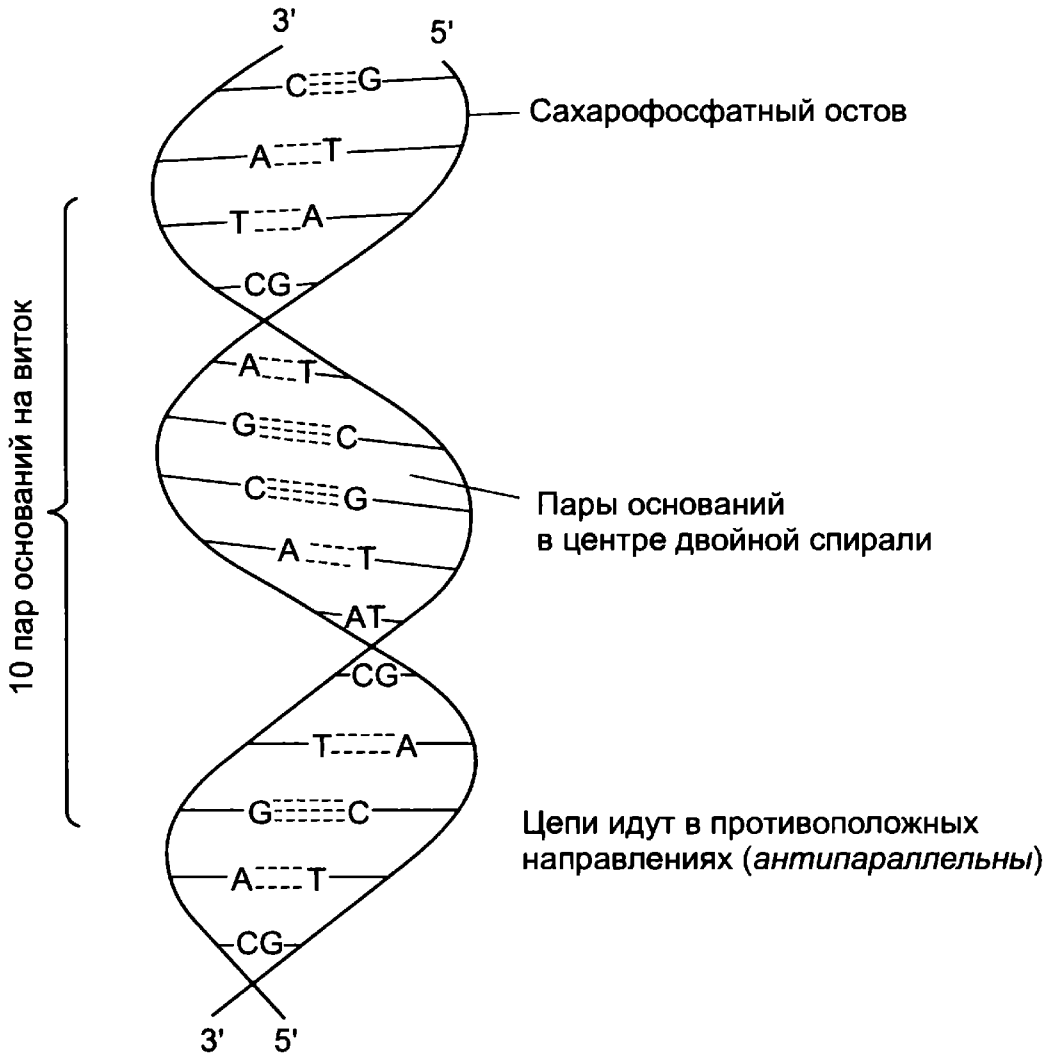


Рис. 5.5. Двойная спираль ДНК

торые при сближении в результате изгиба молекулы могут образовывать шпильки. Известным примером является транспортная РНК (тРНК), которая свернута таким образом, что образует вторичную структуру в виде листа клевера (рис. 5.6).

5.2.3 Денатурация двухцепочечной ДНК

Две антипараллельные цепи ДНК удерживаются вместе только слабыми водородными связями между комплементарными основаниями и частично с помощью гидрофобных взаимодействий между соседними стопками пар оснований (так называемый **стэкинг оснований**). Чтобы разделить несколько пар оснований, необходимо затратить немного энергии, и в этот момент короткие участки ДНК будут существовать в одноцепочечной конформации. Однако при комнатной температуре такие участки немедленно снова образуют пары, так что в целом молекула остается двухнитевой.

Однако, если раствор ДНК нагревать до 90 °С или выше, кинетическая энергия будет достаточной, чтобы полностью денатурировать ДНК, приводя к разделению на одноцепочечные молекулы. За процессом денатурации можно наблюдать спектрофотометрически по поглощению све-

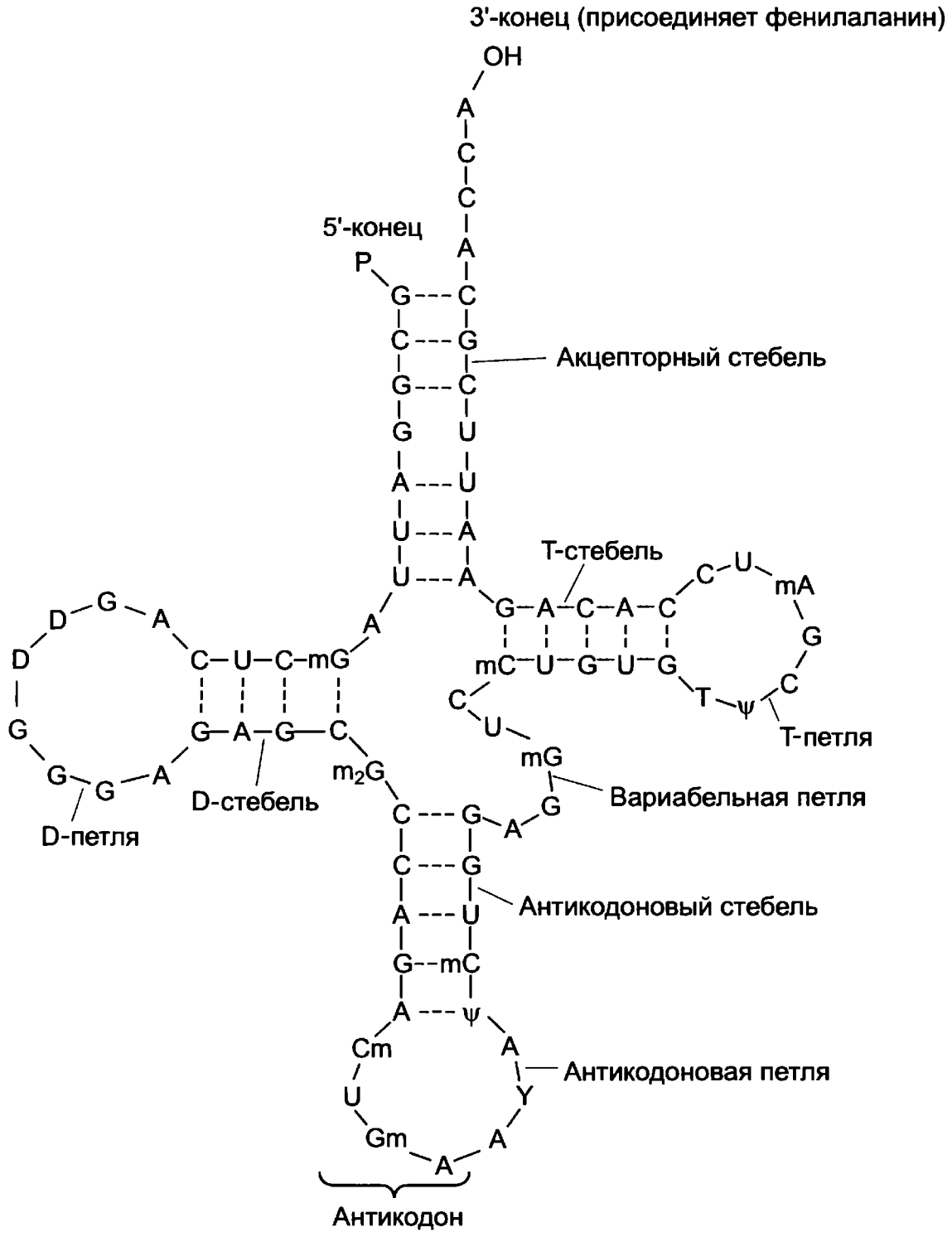


Рис. 5.6. Вторичная структура дрожжевой тРНК^{Phe}. Последовательность из 76 рибонуклеотидов образует четыре двухцепочечные области («стебли») благодаря попарному связыванию оснований между комплементарными последовательностями. Антикодон связывается с UUU или UUC (оба являются кодонами для фенилаланина), фенилаланин присоединяется к 3'-концу с помощью специфической аминоацил-тРНК-синтетазы. Присутствуют некоторые необычные основания: D — дигидроуридин; T — риботимидин; ψ — псевдоуридин; Y — очень сильно модифицированное, непохожее ни на одно «нормальное» основание. mX означает метилирование основания X (m_2X означает диметилирование); Xm означает метилирование рибозы в положении 2'

та при 260 нм. Спаренные основания двухцепочечной ДНК поглощают свет хуже, чем свободные основания в одноцепочечной молекуле, поэтому поглощение при 260 нм увеличивается при денатурации ДНК. Это явление называют **гиперхромным эффектом**.

Можно построить график зависимости поглощения при 260 нм от температуры раствора ДНК (рис. 5.7). Из графика видно, что слабая денатурация начинается уже около 70 °С, но дальнейший подъем температуры приводит к значительной денатурации. В конечном итоге достигается такая температура, при которой образец становится полностью денатурированным, или расплавленным. Температура, при которой расплавлено 50% ДНК, называется **температурой плавления** ($T_{пл}$); $T_{пл}$ зависит от природы ДНК (рис. 5.7). Было обнаружено, что $T_{пл}$ выше для тех молекул ДНК, которые содержат больше цитозина и гуанина, таким образом, $T_{пл}$ может быть использована для определения доли C+G в образце ДНК. Эта связь между $T_{пл}$ и содержанием C+G объясняется тем, что пары цитозин+гуанин образуются за счет трех водородных связей, тогда как тимин+аденин образуют только две общие связи. Из-за различного числа гидрофобных связей в парах AT и CG для денатурации последовательности с преобладанием пар CG требуется больше энергии. Условия, необходимые для денатурации определенной нуклеотидной последовательности, также зависят от внешней среды, например от концентрации солей.

Если охладить расплавленную ДНК, можно вновь соединить разъединенные цепи. Такой процесс называется **ренатурацией**. Однако стабильная двухцепочечная молекула образуется только при абсолютно правильном образовании пар оснований. Такое событие маловероятно, если ДНК длинная и сложная (т. е. содержит много различных генов). Измерение скорости ренатурации может дать информацию о сложности ДНК (разд. 5.3).

Цепи РНК и ДНК могут ассоциировать между собой, если их нуклеотидные последовательности комплементарны, в результате чего образуются двухцепочечные гибридные молекулы. Таким же образом фрагменты радиоактивно меченных РНК или ДНК могут служить зондами для молекул ДНК, которым они комплементарны (разд. 5.7). Эта **гибриди-**

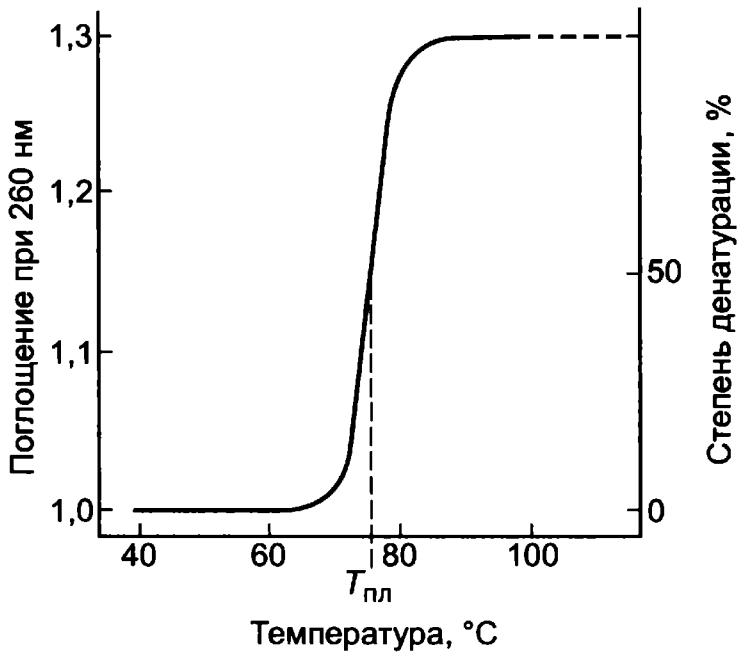


Рис. 5.7. Кривая плавления ДНК

зация комплементарных цепей нуклеиновых кислот очень успешно используется для выделения специфических фрагментов ДНК из сложной смеси (разд. 5.10). Небольшие одноцепочечные фрагменты ДНК (длиной до 40 пар оснований), называемые **олигонуклеотидами**, могут гибридизоваться с денатурированным образцом ДНК. Такой тип гибридизации называется **отжигом** и зависит от последовательности олигонуклеотида и концентрации соли в образце.

5.3 ГЕНЫ И СТРУКТУРА ГЕНОМА

5.3.1 Сложная структура гена

Участок молекулы ДНК, кодирующий единственную молекулу РНК или белка, называется **геном**, а полный набор генов в клетке, органелле или вирусе называется **геномом**. Клетки и органеллы могут содержать более одной копии генома. Геномная ДНК почти всех прокариотических и эукариотических организмов существует в комплексе с белком и называется **хромосомной ДНК**. Каждый ген находится в определенном положении на хромосоме, называемом локусом, тогда как определенная форма гена называется **аллелью**. У млекопитающих ДНК каждого гена представлена двумя аллельными формами, которые могут быть идентичными (**гомозиготы**) или различаться (**гетерозиготы**). Недавние оценки, полученные при выполнении проекта «Геном человека», показали, что в геноме человека ~ 35 000 генов. Однако различные варианты процессинга могут увеличить число существующих в клетке белков по отношению к числу генов. Существование разных аллелей на одном и том же участке в геноме называется **полиморфизмом**. Как правило, чем более сложен организм, тем сложнее геном, хотя это правило не всегда выполняется, поскольку многие высшие организмы имеют некодирующие последовательности, некоторые из них повторяются много раз (**повторы ДНК**). В ДНК млекопитающих повторы можно разделить на низкокопийные и высококопийные. Последние могут быть распределены по всему геному, а могут образовывать кластеры. Повторяющиеся кластерные ДНК подразделяют на так называемые **классические сателлитные ДНК**, **минисателлитные** и **микросателлитные ДНК**; последние состоят в основном из динуклеотидных повторов (табл. 5.2). Эти последовательности называются полиморфными; они определяют полиморфизм и у разных людей различаются; они также служат основой для проведения **генетической дактилоскопии (фингерпринта)** (разд. 6.8.7).

5.3.2 Полиморфизм одного нуклеотида

В геноме существует дополнительный источник полиморфного разнообразия, называемый **полиморфизмом одного нуклеотида** — SNPs* (single nucleotide polymorphism). SNPs возникают при замене одного основания в определенном положении внутри генома. Те из «снипсов», которые встре-

* Произносится «снипсы» — во множественном числе (SNPs). — *Прим. перев.*

Таблица 5.2. **Повторяющиеся сателлитные последовательности ДНК и их характеристики**

Тип повтора ДНК	Размер повтора, п.н.	Характеристики/мотивы
Сателлитная ДНК	5–200	Большие повторы (м.п.н.), обычно встречаются в центромерах
Минисателлитная ДНК		
Теломерная последовательность	6	Найдена на концах хромосом. Повторяющаяся G-богатая последовательность может достигать 20 т.п.н.
Гипервариабельная последовательность	10–60	Повторяющаяся последовательность может достигать 20 т.п.н.
Микросателлитная ДНК	1–4	Часто встречается мононуклеотидный повтор аденинового динуклеотида, обычно обозначаемый VNTR (variable number tandem repeat)

п.н. — пары нуклеотидов, т.п.н. — тысячи пар нуклеотидов, м.п.н. — миллионы пар нуклеотидов.

чаются в кодирующих областях, называются **cSNPs** («си-снипсы», буква «с» (си) *от англ.* codon). По оценкам, SNPs встречаются один раз на каждые 300 п.н., и в человеческом геноме их существует примерно 10 млн. Интерес к SNPs связан с тем, что у разных людей они могут оказывать влияние на подверженность организма заболеваниям, метаболизм лекарств и ответные реакции на внешние факторы. В настоящее время предпринимается множество попыток идентифицировать SNPs и получить геномную карту SNPs. Некоторое количество таких карт частично завершено и создано множество баз данных, например SNPs-консорциум.

5.3.3 Хромосомы и кариотипы

Высшие организмы могут быть идентифицированы на основании размера и формы их генетического материала в определенной точке в цикле клеточного деления, называемой метафазой. В этот момент ДНК конденсируется, образуя набор четко различимых хромосомных структур. На этой стадии могут быть идентифицированы различные морфологические структуры хромосом, включая центромерный и теломерный участки. Хромосомы данного организма можно покрасить красителем Гимза и проанализировать с помощью светового микроскопа. Полный набор хромосом данного организма называется **кариотипом**. При определенных генетических нарушениях могут наблюдаться аномалии размера, формы и числа хромосом, и кариотип может быть использован для идентификации этого нарушения (разд. 6.8.2). Возможно, наилучший пример — синдром Дауна, при котором существуют три копии 21-й хромосомы (трисомия 21) в отличие от двух копий в норме.

5.3.4 Кинетика ренатурации и сложность генома

Если образцы двухнитевой ДНК денатурировать с последующей ренатурацией, то по скорости ренатурации можно оценить сложность ДНК, т. е. содержащееся в ней количество информации, выраженное в парах оснований. Молекула может быть значительно менее сложной, чем это ожидается исходя из ее общей длины, если некоторые последовательности представляют собой повторы, но сложность молекулы вполне соответствует общей длине, если все последовательности уникальны, т. е. встречаются в геноме только один раз. На практике ДНК сначала разрезают случайным образом на фрагменты размером несколько тысяч нуклеотидов (разд. 5.8) и затем полностью денатурируют, нагревая до точки плавления $T_{пл}$ (разд. 5.2.3). Ренатурацию при температуре на 10 °С ниже $T_{пл}$ регистрируют либо по уменьшению поглощения при 260 нм (гиперхромный эффект), либо путем пропускания периодически отбираемых порций образца через колонку с гидроксиапатитом (который связывает двухцепочечную ДНК), измеряя количество связавшегося на колонке образца. Через определенное время степень ренатурации зависит от концентрации ДНК (C_0, число нуклеотидов в единице объема) и времени ренатурации (t, секунды).

Из значений C_0 видно, что препарат ДНК бактериофага λ, размер генома которого составляет 49 т.п.н., содержит намного больше копий одной и той же последовательности в единице объема, чем препарат ДНК человека (размер гаплоидного генома $3 \cdot 10^6$ т.п.н.), и, кроме того, ДНК фага λ ренатурирует гораздо быстрее, поскольку в единице объема существует больше комплементарных между собой молекул и, следовательно, больше шансов для столкновения двух комплементарных цепей. Обычно для сравнения скоростей ренатурации различных образцов ДНК измеряют C_0 и время, необходимое для завершения

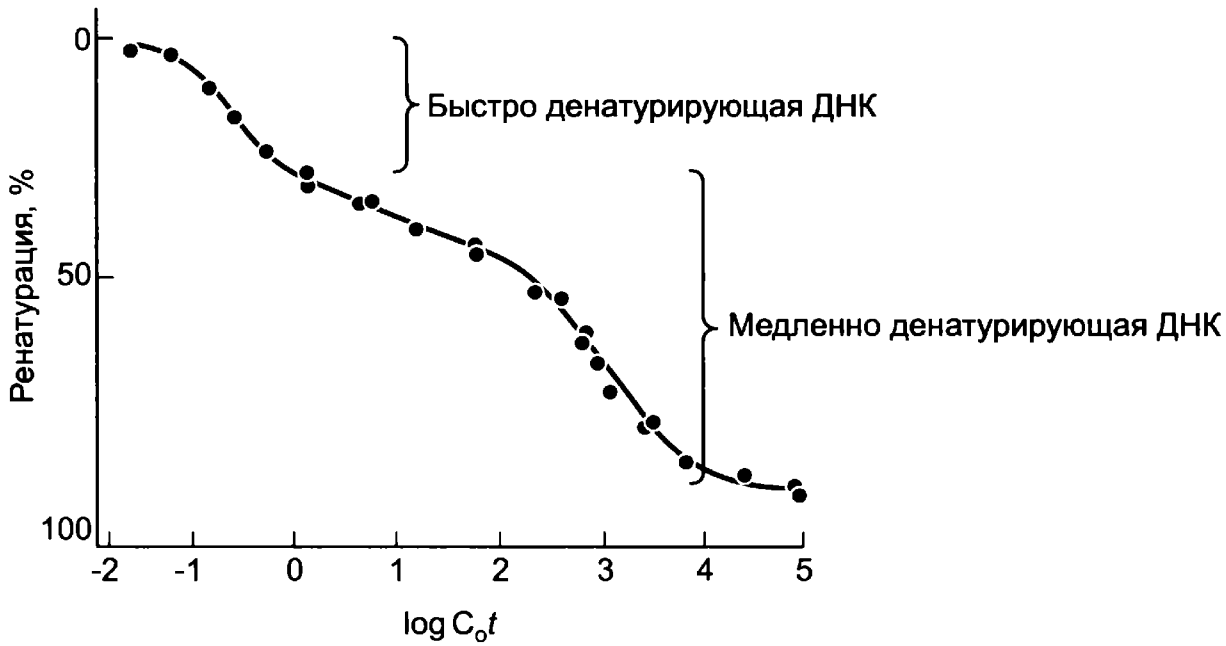


Рис. 5.8. Кривая C_0t для ДНК человека. Кривая отражает ренатурацию ДНК при 60 °С после полного разделения в результате нагревания. Образцы отбирали через определенные интервалы времени и пропускали через колонку с гидроксиапатитом, чтобы определить долю двухспиральной ДНК. Строили график зависимости процентного содержания двухспиральной ДНК от логарифма C_0t (произведение концентрации ДНК до денатурации на время ренатурации)

половины цикла ренатурации ($t_{1/2}$); на графике откладывают произведение $C_0 \cdot t_{1/2}$. Чем больше значение$C_0 \cdot t_{1/2}$, тем сложнее ДНК; следовательно, ДНК фага λ имеет значительно меньшее значение $C_0 \cdot t_{1/2}$, чем ДНК человека.

Действительно, ренатурация генома человека не происходит однородно. Если для ренатурации построить график относительно log C_0t (так называемая **кривая C_0t**), то можно увидеть, что некоторая доля молекул ДНК ренатурирует довольно быстро, а другие молекулы ДНК — очень медленно (рис. 5.8). Этот факт указывает на то, что часть последовательностей существует в более высокой концентрации; другими словами, часть генома состоит из повторяющихся последовательностей. Эти повторяющиеся последовательности могут быть отделены от уникальной ДНК пропусканием ренатурированного образца ДНК через колонку с гидроксиапатитом в начале процесса ренатурации при низком значении C_0t. На этой стадии только быстро ренатурирующие последовательности являются двухцепочечными, и поэтому только они способны связываться с колонкой.

5.3.5 Природа генетического кода

ДНК кодирует первичную последовательность белка с помощью набора из трех нуклеотидов, называемого **кодоном** или **триплетом**, кодирующим

Первое положение (5'-конец)	Второе положение				Третье положение (3'-конец)
	T	**C**	**A**	**G**	
	Phe	Ser	Tyr	Gys	T
T	Phe	Ser	Tyr	Gys	C
	Leu	Ser	**Стоп**	**Стоп**	A
	Leu	Ser	**Стоп**	Trp	G
	Leu	Pro	His	Arg	T
C	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	T
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	T
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Рис. 5.9. Генетический код. Выделенные кодоны соответствуют стартовому кодону (ATG) и трем стоп-кодонам

определенную аминокислоту. Сочетание четырех оснований (A, C, G и T), представленных в ДНК, дает 64 варианта триплетов; однако, поскольку в природе существует только около 20 аминокислот, одна аминокислота может кодироваться несколькими кодонами. Этот феномен называется **вырожденностью генетического кода**. За исключением ограниченного числа различий, обнаруженных в ДНК митохондрий и в одном или двух других видах ДНК, генетический код является универсальным. Кроме кодирования аминокислот, некоторые последовательности триплетов указывают начало (старт) или конец (стоп) отдельного гена. Существует только один стартовый кодон (ATG*), который также кодирует аминокислоту метионин, и три стоп-кодона (TAT, TAG и TGA) (рис. 5.9). Последовательность, ограниченная стартовым кодоном и стоп-кодоном и содержащая кодоны, которые соответствуют непрерывной белковой последовательности, называется **открытой рамкой считывания** (ORF, open reading frame).

5.4 ЛОКАЛИЗАЦИЯ И УПАКОВКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.4.1 Клеточные компартменты

Как правило, ДНК в эукариотических клетках содержится в ядре и таких органеллах, как митохондрии или хлоропласты, которые имеют свой собственный геном. Большинство видов РНК, однако, обычно находится в цитоплазме. Генетическая информация клеток и большинства вирусов хранится в ДНК. Эта информация используется для синтеза молекул РНК, которые подразделяются на три класса. Рисунок 5.10 иллюстрирует локализацию нуклеиновых кислот в эукариотических и прокариотических клетках.

- *Матричная РНК* (мРНК) содержит последовательности рибонуклеотидов, которые кодируют аминокислотную последовательность белков. Одна молекула мРНК кодирует одну полипептидную цепь у эукариот, но может кодировать несколько полипептидов в прокариотах.
- *Рибосомная РНК* (рРНК) образует часть структуры рибосом, являющихся местом синтеза белков. Каждая рибосома содержит только три или четыре типа молекул рРНК, образующих комплексы с 55–75 белками.
- *Транспортная РНК* (тРНК) доставляет аминокислоты к рибосомам и взаимодействует с мРНК таким образом, что аминокислоты выстраиваются в последовательности, определяемой мРНК. Существует по крайней мере один тип тРНК для каждой аминокислоты.

Только в эукариотических клетках существует группа молекул РНК, называемых **малыми ядерными РНК** (мяРНК), которые функционируют

* В термофильных микроорганизмах с высоким содержанием пар GC вместо стартового кодона ATG также используется приплет GTG, который кодирует остаток валина. — *Прим. ред.*

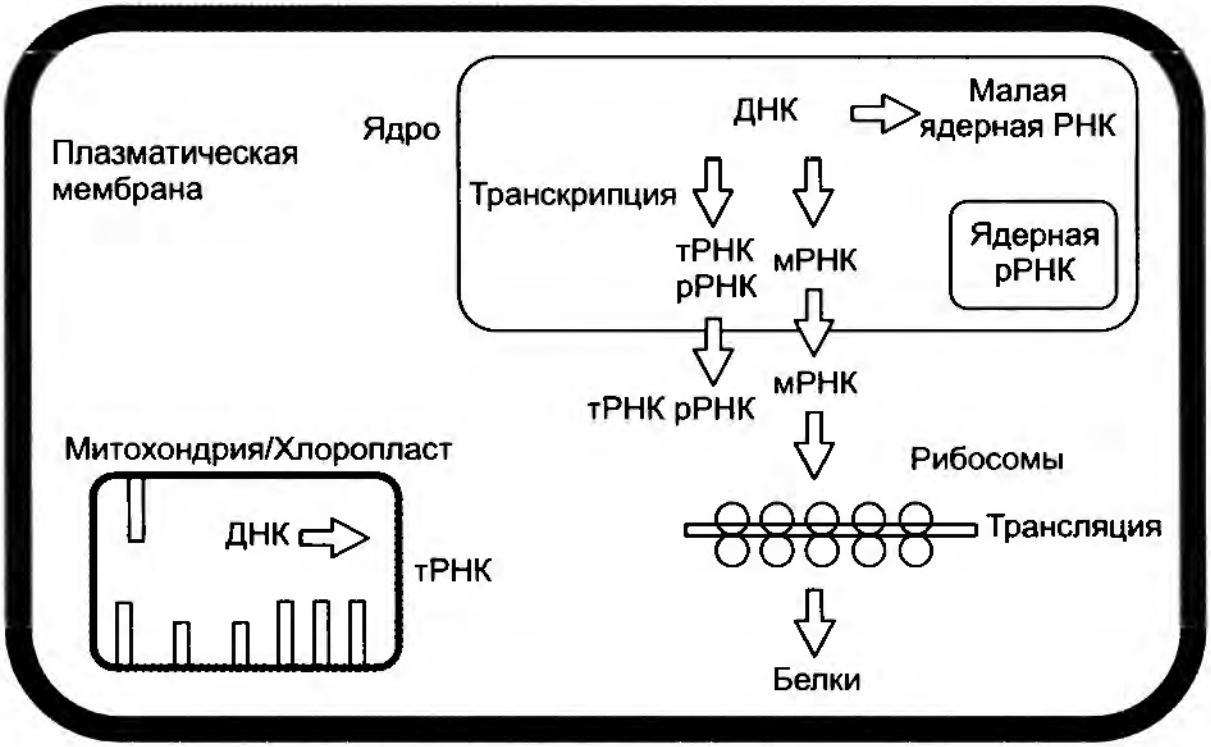


Рис. 5.10. Локализация молекул ДНК и РНК в эукариотических клетках и перенос генетической информации

внутри ядра и содействуют созреванию молекул мРНК. Все молекулы РНК ассоциированы со своими связывающими белками, что существенно для их функций в клетке. Нуклеиновые кислоты в прокариотических клетках менее строго локализованы, хотя выполняют аналогичные функции*.

5.4.2 Упаковка ДНК

ДНК в прокариотических клетках, хотя и связана с ядерными белками, находится в цитоплазме, где она плотно свернута и упакована в суперспираль с помощью фермента топоизомеразы, что позволяет этой макромолекуле разместиться в клетке. Напротив, ДНК в эукариотических клетках имеют много уровней упаковки внутри ядра с участием различных ДНК-связывающих белков.

Первый уровень упаковки образуется в результате наматывания ДНК вокруг комплекса из четырех маленьких белков, каждый из которых представлен двумя копиями и называется **гистоном** (H2A, H2B, H3 и H4). Эти белки богаты основными аминокислотами лизином и аргинином и образуют центральную октамерную структуру в форме бочонка. Последовательность ДНК размером около 180 п.н. делает два оборота вокруг этой структуры, образуя **нуклеосому**. Еще один гистоновый белок — белок H1 — связывается с внешней поверхностью нуклеосомы. В результате такой упаковки длина ДНК уменьшается в 6 раз.

---

* В настоящее время открыто несколько типов других молекул РНК, которые играют очень важную роль в регуляции экспрессии генов (siRNA), завершении неправильного синтеза белка на рибосоме (tmRNA), входят в состав фермента бессмертия теломеразы и др. — *Прим. ред.*

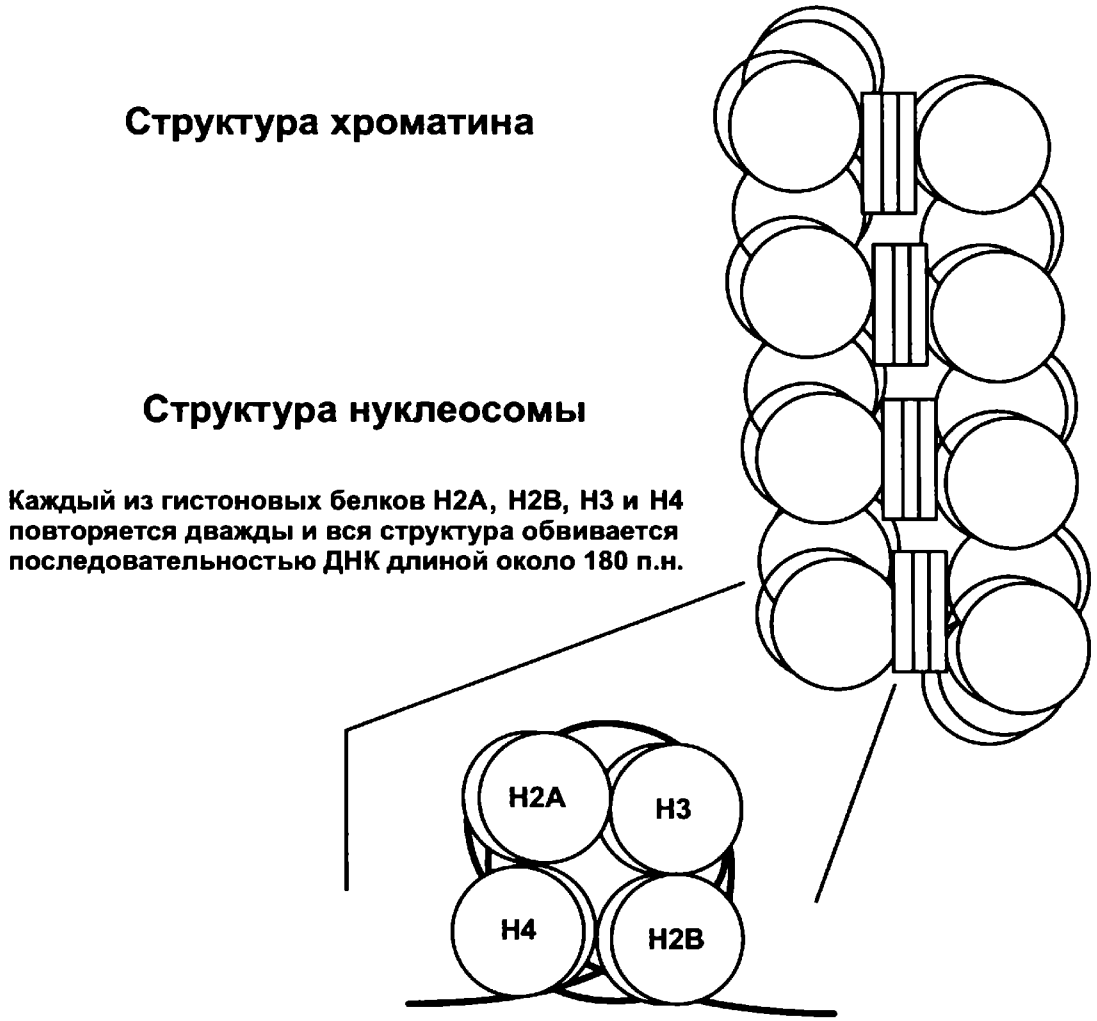


Рис. 5.11. Структура и состав нуклеосомы и хроматина

Далее нуклеосомы ассоциируют, образуя вторичный уровень упаковки — так называемое **хроматиновое волокно** диаметром 30 нм, уменьшая при этом длину ДНК в 7 раз (рис. 5.11). Хроматин может быть далее свернут и сложен в петли посредством взаимодействия с другими негистоновыми белками, образуя в конечном итоге сами хромосомы.

ДНК в ядре тесно связана с тонким слоем ядерного матрикса, который образует белковый остов внутри ядра. ДНК прикреплена к матриксу в определенных положениях, совпадающих обычно с точками начала репликации. Существуют многие другие ДНК-связывающие белки, такие как негистоновые белки с высокой электрофоретической подвижностью (HMG, high mobility group), которые участвуют в создании определенной конформации ДНК во время репликации или активной экспрессии гена.

5.5 ФУНКЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.5.1 Репликация ДНК

Двухспиральная структура ДНК обеспечивает ее репликацию во время клеточного деления, поскольку разделение двух цепей ДНК позволяет происходить синтезу комплементарных цепей на их основе. Множество ферментов и вспомогательных белков требуется для репликации *in vivo*; у прокариот этот процесс начинается в области ДНК, называемой **точкой начала репликации** (Ori, origin of replication).

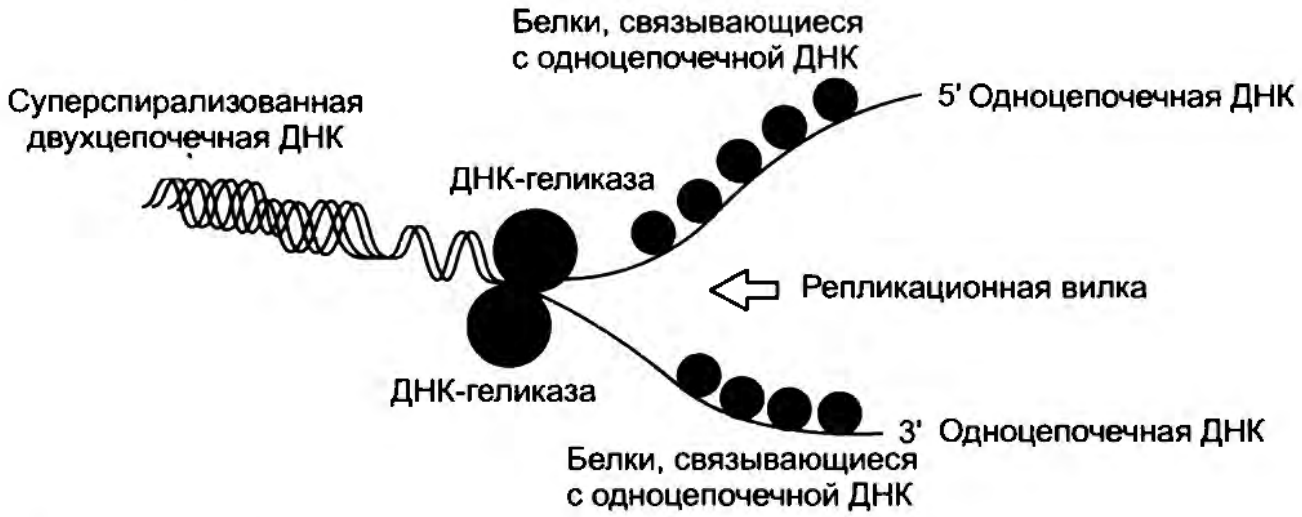


Рис. 5.12. Начальный этап репликации: расплетание ДНК

ДНК должна оставаться нерасплетенной до того, как белки и ферменты, необходимые для репликации, начинают действовать, вызывая разделение двухспиральной ДНК на две цепи. Этот процесс выполняется ферментом ДНК-геликазой. Более того, для предотвращения соединения однонитевых молекул ДНК с ними связываются небольшие белки, называемые **белками, связывающими одноцепочечную ДНК** (SSBs, single-stranded DNA-binding proteins) (рис. 5.12).

Прежде всего на каждом однонитевом участке ДНК синтезируется короткая цепь комплементарной РНК (**праймер**), использующая ДНК в качестве матрицы. Праймер синтезируется с помощью фермента РНК-полимеразы, иначе называемого праймазой, которая использует трифосфаты рибонуклеозидов и сама не нуждается в праймере. Затем ДНК-полимераза III также использует исходную ДНК как матрицу для синтеза, а праймер РНК — как стартовую точку. Наличие праймера является существенным, поскольку он имеет свободную 3'-гидроксильную группу. Это крайне важно, поскольку ДНК-полимераза III может добавлять новые нуклеотиды только к 3'-, но не к 5'-концу нуклеиновой кислоты. Таким образом, синтез цепи ДНК происходит только от РНК-праймера в направлении от 5' к 3'. Эта цепь ДНК обычно называется **лидирующей** и обеспечивает непрерывный синтез ДНК.

Поскольку две цепи двухспиральной ДНК являются антипараллельными, только одна цепь может синтезироваться непрерывным образом. Синтез другой цепи происходит более сложным путем. Точный механизм был открыт Реджи Оказаки в 1960 г. В данном случае цепь, обычно называемая **отстающей**, синтезируется в виде небольших фрагментов длиной 1–2 т.п.н., называемых **фрагментами Оказаки**. Этот процесс происходит в направлении от 5'- к 3'-концу также с использованием множества праймеров РНК для каждого отдельного участка. Таким образом, имеет место прерывистый синтез ДНК, при котором ДНК-полимераза работает в направлении 5'→3'. Праймеры РНК затем удаляются с помощью ДНК-полимеразы I, которая имеет 5'→3'-экзонуклеазную активность, а бреши заполняются тем же самым ферментом, действующим как полимераза. Отдельные фрагменты соединяются вместе с помощью ДНК-лигазы, образуя новую цепь ДНК (рис. 5.13).

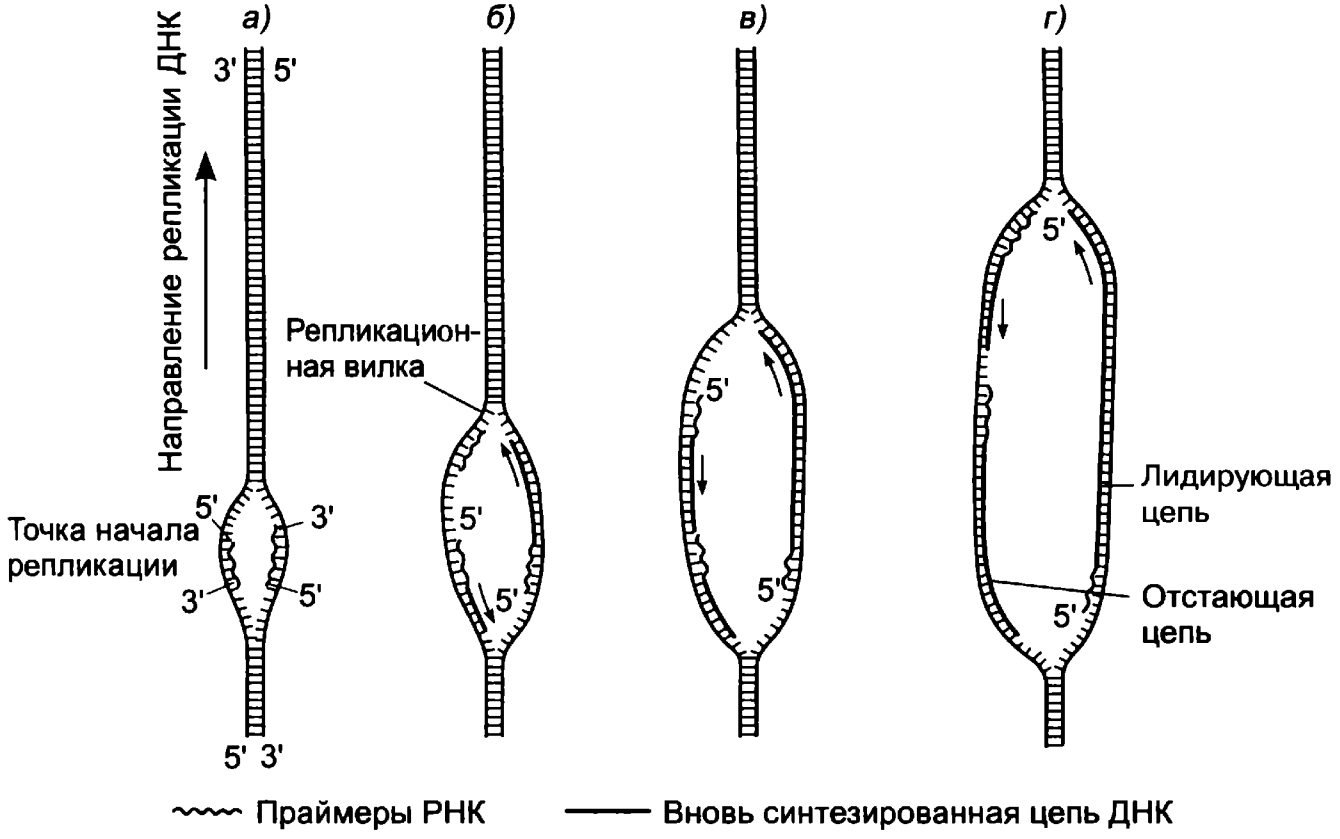


Рис. 5.13. Репликация ДНК. (*а*) Двухцепочечная ДНК разделяется в точке начала репликации. РНК-полимераза синтезирует короткие цепи ДНК-праймеров, комплементарных обеим цепям ДНК. (*б*) ДНК-полимераза III синтезирует в направлении от 5' к 3' новые цепи ДНК, комплементарные старым цепям ДНК от 3'-конца каждого праймера РНК. Следовательно, синтез ДНК идет в том же направлении, что и репликация ДНК, для одной цепи (лидирующая цепь) и в противоположном направлении для другой (отстающая цепь). Синтез праймеров РНК происходит многократно, позволяя синтезироваться фрагментам отстающей цепи. (*в*) По мере того как репликационная вилка продвигается вперед от точки начала репликации, ДНК-полимераза III продолжает синтез лидирующей цепи и синтезирует ДНК между праймерами РНК отстающей цепи. (*г*) ДНК-полимераза I удаляет праймеры РНК отстающей цепи и заполняет образующиеся бреши ДНК. ДНК-лигаза соединяет фрагменты, создавая непрерывную цепь ДНК

Репликация эукариотической ДНК менее изучена, использует множество точек начала репликации и, конечно, более сложна, чем у прокариот; однако в обоих случаях процесс заключается в синтезе новых цепей в направлении 5'→3'. Конечным результатом репликации является то, что вместо исходной ДНК появляются две молекулы, каждая из которых содержит «старую» и «новую» цепь — так называемая **полуконсервативная репликация**. Механизмы синтеза и репликации ДНК, а также участвующие в них ферменты используются во многих методах молекулярной биологии и лежат в основе различных генно-инженерных манипуляций.

5.5.2 Защита ДНК и системы репарации

Рост и деление клетки требуют точной и координированной репликации ДНК. Механизмы, которые корректируют реплицированную последовательность ДНК и сохраняют ее целостность, очень сложные и понимание

их функционирования в прокариотических системах далеко не полное. Защита ДНК у бактерий достигается с помощью системы рестрикции–модификации, основанной на специфическом метилировании хозяйской ДНК, что позволяет отличить ее от чужеродной ДНК, например вирусной. Чаще встречается система рестрикции–модификации II типа, состоящая из хозяйской ДНК-метилазы и эндонуклеазы рестрикции, которая узнает короткие (4–6 п.н.) палиндромные последовательности и разрезает чужеродную неметилированную ДНК в определенных местах. Существование ферментов, ответственных за этот процесс, чрезвычайно полезно для манипуляций с ДНК и анализа ДНК, о чем будет сказано в разд. 5.8.

Система репарации позволяет распознавать измененные, неправильно спаренные или пропущенные основания в двухцепочечной ДНК и инициирует вырезание соответствующего фрагмента. Бактериальные репарационные системы зависят от длины поврежденного фрагмента ДНК и действуют либо во время репликации (dam-система), либо при основной репарации (urr-система). В некоторых случаях повреждение в ДНК активирует белок RecA, что приводит к SOS-репарации, в которой задействовано много ферментов и белков; однако этот процесс еще не полностью изучен. Системы рекомбинации–репарации в эукариотических клетках обладают некоторыми общими свойствами с системами в прокариотических клетках, но точный механизм их действия не установлен. Дефекты системы репарации могут приводить к стабильному включению ошибок в геномные последовательности, что в свою очередь может способствовать появлению определенных генетических заболеваний.

5.5.3 Транскрипция ДНК

Экспрессия генов начинается с процесса транскрипции, посредством которого комплементарная цепь РНК синтезируется с помощью фермента, называемого РНК-полимеразой, на матрице ДНК, кодирующей ген. Большинство прокариотических генов состоят из трех областей. В центре находится последовательность, которая будет копирована в РНК и которая называется структурным геном. К 5'-концу цепи (против хода транскрипции), которая будет копирована ((+)-цепь), лежит область, называемая промотором, и по ходу транскрипции ниже единицы транскрипции находится область терминатора*. Транскрипция начинается, когда ДНК-зависимая РНК-полимераза связывает промоторную область и продвигается вдоль ДНК к единице транскрипции. В стартовой точке единицы транскрипции полимераза начинает синтезировать молекулы РНК, комплементарные (–)-цепи ДНК, двигаясь вдоль этой цепи в направлении от 3'- к 5'-концу и синтезируя РНК в направлении от 5'- к 3'-концу, используя трифосфаты рибонуклеозидов. РНК, таким образом, имеет такую же последовательность, как и (+)-цепь ДНК, отличаясь только заменой урацила на тимин. Достигая

* Правильнее говорить, что в прокариотах последовательность гена фланкирована регуляторными элементами, в том числе промотором и терминатором транскрипции. — *Прим. ред.*

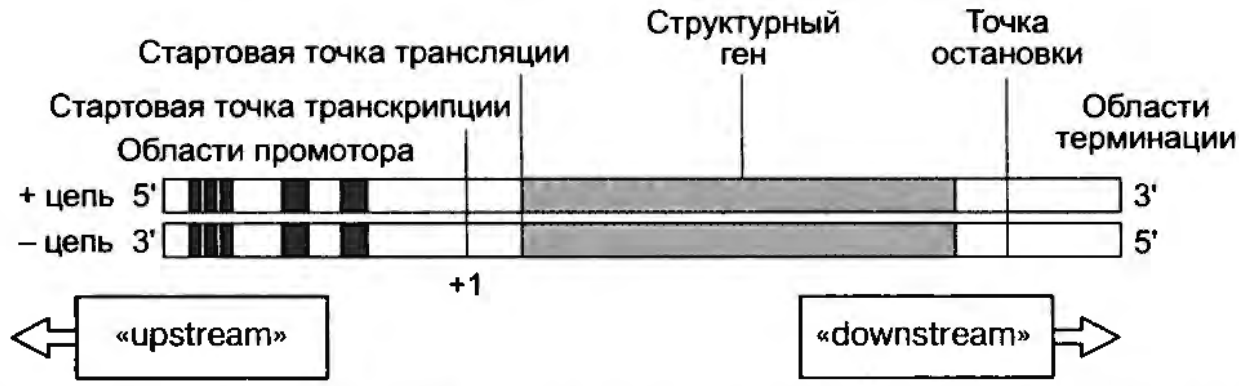


Рис. 5.14. Транскрипция в клетках прокариот. Структурный ген находится под контролем промотора, расположенного в «upstream»-области. Синтез мРНК завершается на терминаторе, расположенном за последовательностью структурного гена (область «downstream»)

точки остановки в области терминатора, транскрипция останавливается, и высвобождается молекула РНК. Для идентификации ключевых элементов генов применяется нумерация оснований. Точка или основание +1 является остатком, находящемся в участке старта транскрипции, положительная нумерация соответствует 3'-области, тогда как отрицательная нумерация соответствует 5'-области (рис. 5.14).

В эукариотических организмах существуют три различные РНК-полимеразы, обозначаемые I, II и III. Матричная РНК синтезируется с помощью РНК-полимеразы II, тогда как РНК-полимеразы I и III катализируют синтез рРНК (I), тРНК и snРНК (III). Как правило, многие неэкспрессирующиеся гены обладают метилированными остатками, обычно С в GC-динуклеотиде, а активные гены имеют тенденцию к гипометилированию. Это свойство наиболее ярко проявляется в 5'-фланкирующих областях и имеет важное значение для открытия и идентификации новых генов.

5.5.4 Промоторные и терминаторные последовательности в ДНК

Промоторы находятся обычно на 5'-концах или выше последовательности структурного гена и наиболее хорошо охарактеризованы для прокариот, например *Escherichia coli*. Они состоят из двух консервативных элементов: последовательности **ТАТА-бокс** (консенсусная последовательность «ТАТААТ»), которая располагается приблизительно на 10 п.н. выше участка инициации транскрипции (–10 в системе нумерации), и «G+C-богатой» последовательности, которая располагается на расстоянии около –25 п.н. ТАТА-бокса. G+C-элемент считается важным в инициации узнавания и связывания ДНК РНК-полимеразой, тогда как последовательность –10 участвует в образовании комплекса инициации транскрипции (рис. 5.15, *а*).

Элементы промотора служат в качестве участков узнавания для ДНК-связывающих белков, которые контролируют экспрессию генов; такие белки называются **транскрипционными факторами**, или *транс*-действующими факторами. Эти белки имеют ДНК-связывающий домен

для взаимодействия с промоторами и домен активации, который позволяет осуществлять взаимодействие с другими факторами транскрипции. Хорошо изученным фактором транскрипции (ФТ) является TFIID, который связывает последовательность –35 п.н. в эукариотических клетках. Регуляция экспрессии гена происходит в большинстве случаев на уровне транскрипции и первоначально контролируется скоростью инициации транскрипции, хотя контроль также может быть модулирован стабильностью РНК или на других уровнях, например при трансляции. Терминаторная последовательность хуже охарактеризована; это нуклеотидная последовательность вблизи конца мРНК, способная образовывать шпильку с петлей. За ней располагается U-богатая область, которая может играть роль сигнала терминации для РНК-полимеразы.

В отличие от прокариотических промоторов длиной не более 100 п.н. в эукариотах в регуляции транскрипции принимает участие множество последовательностей длиной до нескольких сотен оснований. Особенно важной является последовательность ТАТА-бокса, для большинства генов лежащая выше точки инициации транскрипции, приблизительно в области –35 п.н. (рис. 5.15, *б*). Этот бокс является аналогичным последовательности –10 п.н. у прокариот. В зависимости от типа гена в образовании инициирующего комплекса с РНК-полимеразой принимают участие большое количество транскрипционных факторов. Только после образования инициирующего комплекса начинается транскрипция. В дополнение к ТАТА-боксу в положении –80 часто располагается **CAT-бокс** (консенсус GCCAATCT), который важен для эффективности промотора. Были описаны многие элементы промотора, лежащие ближе к 5'-концу (UPEs, upstream promoter elements), которые являются либо общими, либо ткане- (или генно-) специфичными. GC-элементы, которые содержат последовательность GGGCG, могут быть представлены во многих участках и в любой ориентации и часто ассоциируются с **генами «домашнего хозяйства»** (housekeeping genes), кодирующими ферменты, вовлеченные в основной метаболизм. Некоторые элементы промоторной области, такие как ТАТА-бокс, являются общими для большинства генов, тогда как другие могут быть специфичными для определенных генов или классов генов.

Определенный интерес представляет класс промоторов, впервые исследованный у обезьяньего вируса 40 (SV40) и называемый **энхансером** (усилителем). Эти последовательности отличаются от других промоторных последовательностей по их уникальной способности действовать на расстоянии до нескольких тысяч нуклеотидов выше или ниже по хромосоме от определенного гена. Даже на таких огромных дистанциях от стартовой точки транскрипции они могут усиливать транскрипцию в сотни раз. Точные взаимодействия между факторами транскрипции, РНК-полимеразой или другими ДНК-связывающими белками и последовательностью ДНК, с которой они связываются, могут быть идентифицированы и охарактеризованы с помощью метода **футпринтинга ДНК** (разд. 6.8.3.). Для того чтобы в эукариотических клетках происходила транскрипция, необходимо взаимодействие множества факторов транскрипции с промоторами и между собой. Этот каскадный механизм проиллюстрирован на

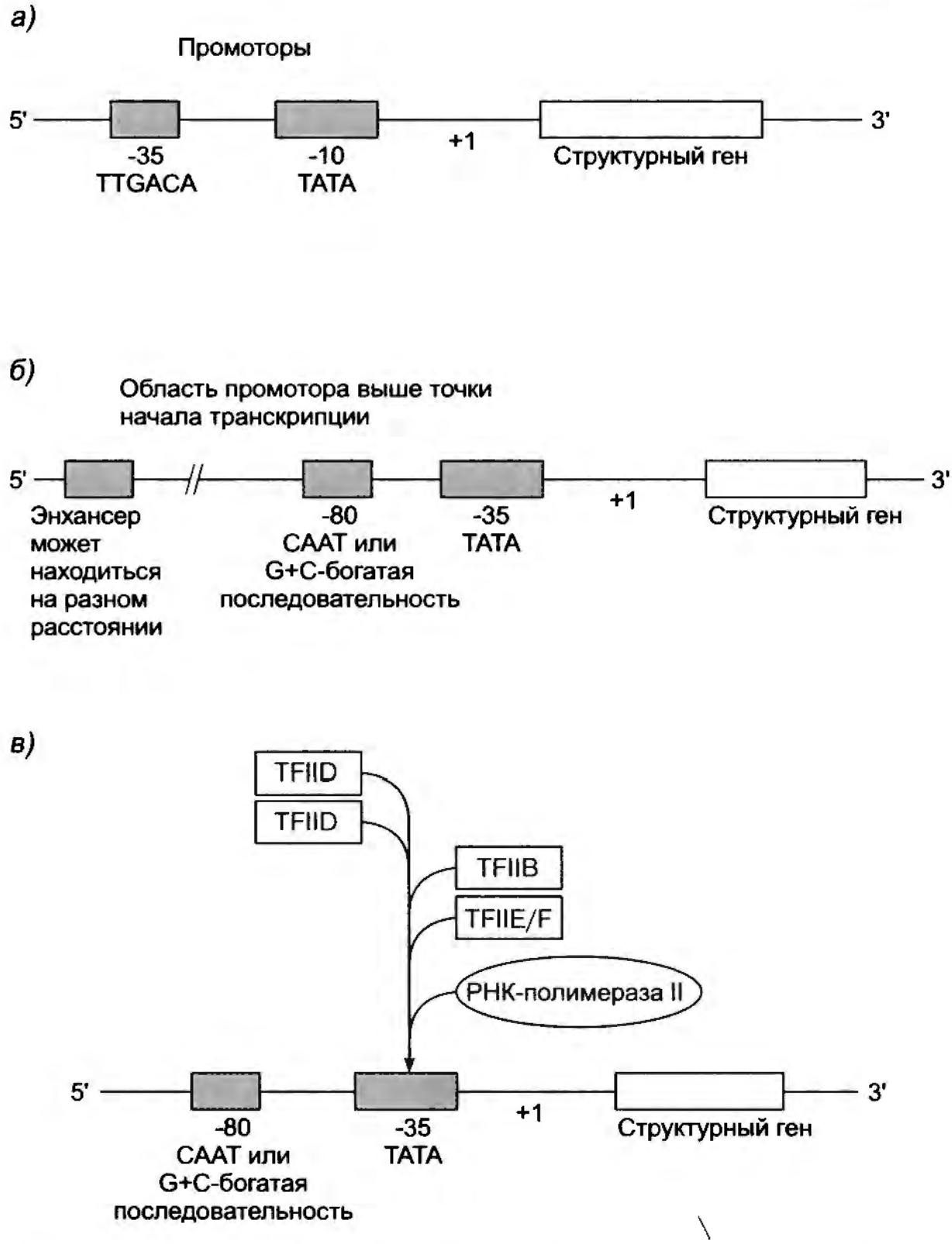


Рис. 5.15. *а*) Элементы типичного промотора, обнаруженные в прокариотической клетке (например, *E. coli*). *б*) Типичные элементы промотора, обнаруженные в эукариотической клетке. *в*) Общая схема связывания факторов транскрипции с областями промотора в эукариотических клетках. Вслед за связыванием факторов транскрипции IID, IIF, IIB, IIE и IIF образуется преинициаторный комплекс. РНК-полимераза II связывается с этим комплексом и начинает транскрипцию от стартовой точки +1

рис. 5.15, *в* и называется **комплексом преинициации**. Как только такой комплекс образуется около –35-последовательности ТАТА, РНК-полимераза способна транскрибировать структурный ген и образовывать комплементарную копию РНК (разд. 5.5.6.).

5.5.5 Транскрипция у прокариот

Организация прокариотических генов во многом отличается от таковой у эукариот. Прокариотические гены в основном образованы в виде непрерывных кодирующих последовательностей. Более того, они часто группируются в **опероны**, которые содержат гены, относящиеся к определенной функции, такой как метаболизм субстрата или синтез продукта. Это особенно наглядно видно на примере хорошо известного оперона, найденного в *E. coli* и называемого лактозным опероном, в котором три гена *lacZ*, *lacY* и *lacA* находятся под контролем одного промотора и, кроме того, включаются и выключаются в одно и то же время. В этой модели отсутствие лактозы приводит к связыванию белка-репрессора с операторной последовательностью, лежащей выше генов Z, Y и A, и мешает РНК-полимеразе транскрибировать гены (рис. 5.16, *а*). Однако в присутствии лактозы происходят транскрипция этих генов и метаболизм лактозы. Лактоза связывается с белком-репрессором и вызывает конформационные изменения в его структуре. Это мешает связыванию с оператором и позволяет РНК-полимеразе связывать и транскрибировать три гена (рис. 5.16, *б*). Транскрипция и трансляция у прокариот являются также тесно связанными (сцепленными), тогда как в эукариотических клетках эти два процесса разделены и происходят в различных отделах клетки.

5.5.6 Посттранскрипционный процессинг

Транскрипция эукариотического гена приводит к образованию **гетерогенной ядерной РНК** (гяРНК), представляющей собой полный структурный ген (рис. 5.17). После этого происходит процесс созревания РНК. Первый этап процессинга включает присоединение остатка метилированного гуанозина (m7Gppp), называемого «кэпом», на 5'-конец гяРНК. «Кэп» может служить сигнальной структурой и помогает стабилизировать молекулу (рис. 5.18). Кроме того, к 3'-концу гяРНК с помощью фермента poly(A)-полимеразы присоединяется от 150 до 300 остатков аденозина, называемых poly(A)-хвостом. Poly(A)-хвост позволяет проводить специфическое выделение эукариотической мРНК из общей РНК клетки с использованием аффинной хроматографии (разд. 5.7.2); кроме того, предполагается, что происутствие poly(A) придает транскрипту стабильность.

В отличие от прокариот эукариотические транскрипты имеют кодирующую последовательность (экспрессирующие области, или **экзоны**), прерывающуюся некодирующими последовательностями (**интроны**). Границы интронов и экзонов, как правило, определяются последовательностью GUAG и должны удаляться в процессе **сплайсинга** для образования зрелой мРНК (рис. 5.18). Процесс сплайсинга интрона опосредуется малыми ядерными РНК (мяРНК), которые существуют в ядре как рибонуклеопротеиновые частицы. Эти частицы часто обнаруживаются в большом ядерном комплексе, называемом **сплайсеосомой**, в котором происходит сплайсинг. Интроны обычно удаляются последовательно от 5'- к 3'-концу, и их число неодинаково в различных генах. Некоторые эукарио-

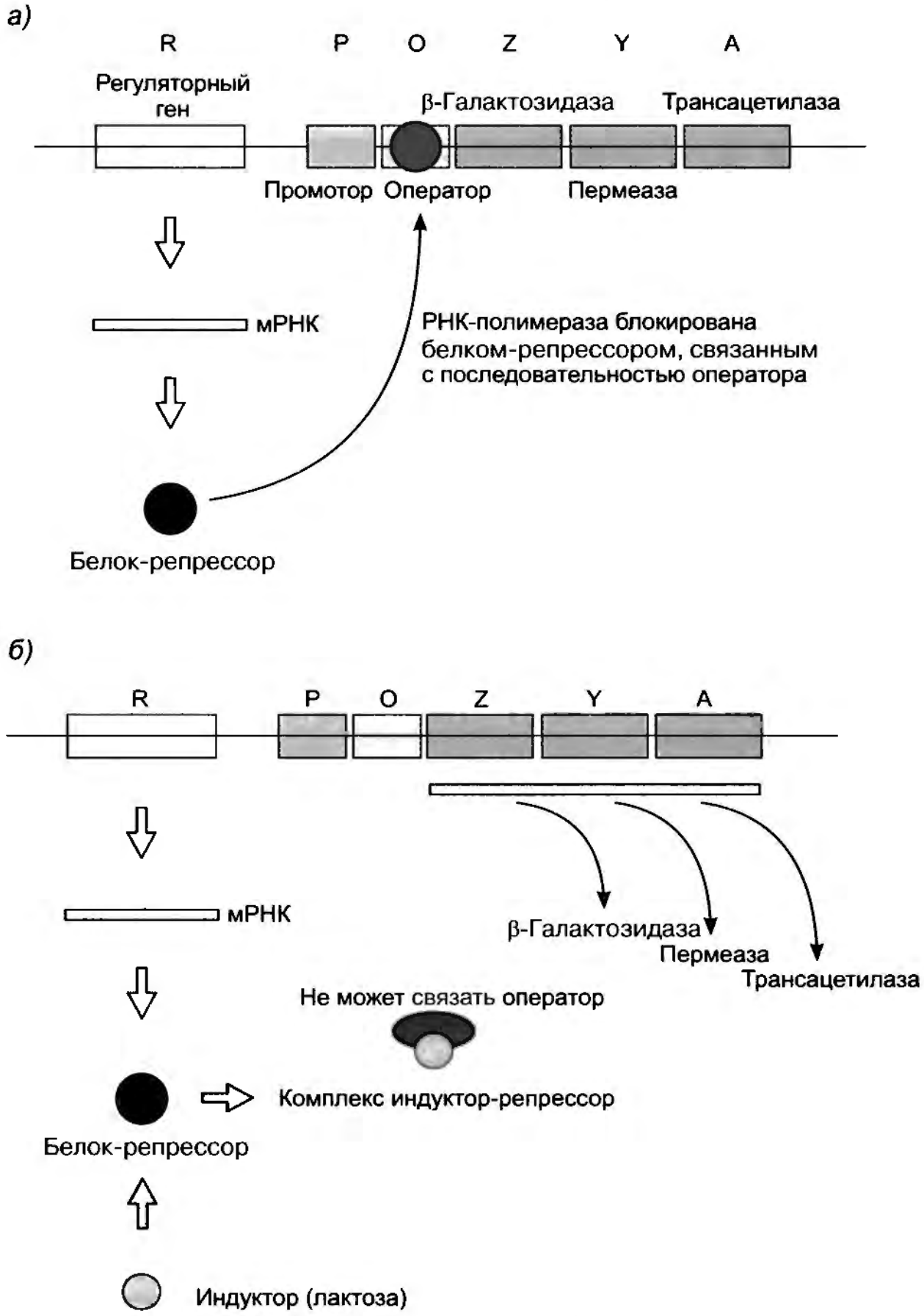


Рис. 5.16. Лактозный оперон в состоянии репрессии (без лактозы) (*а*) и последующая индукция лактозой (*б*)

тические гены, например гены гистонов, не содержат интронов, тогда как ген дистрофина, ответственного за мышечную дистрофию, содержит более 250 интронов. В некоторых случаях, однако, один и тот же транскрипт гяРНК может быть процессирован различными путями, образуя различ-

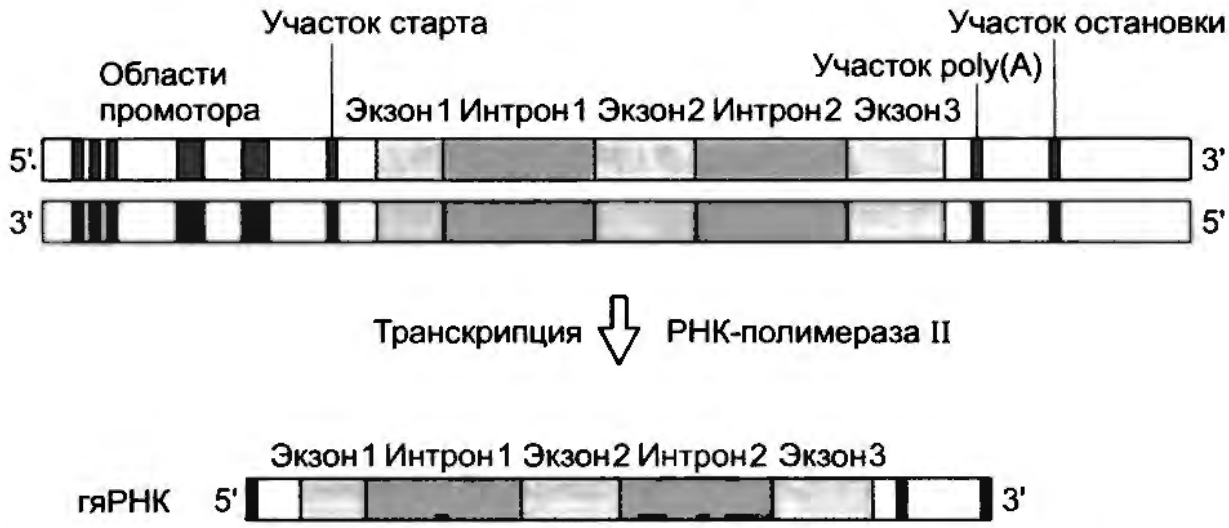


Рис. 5.17. Транскрипция типичного эукариотического гена, приводящая к образованию гетерогенной ядерной РНК

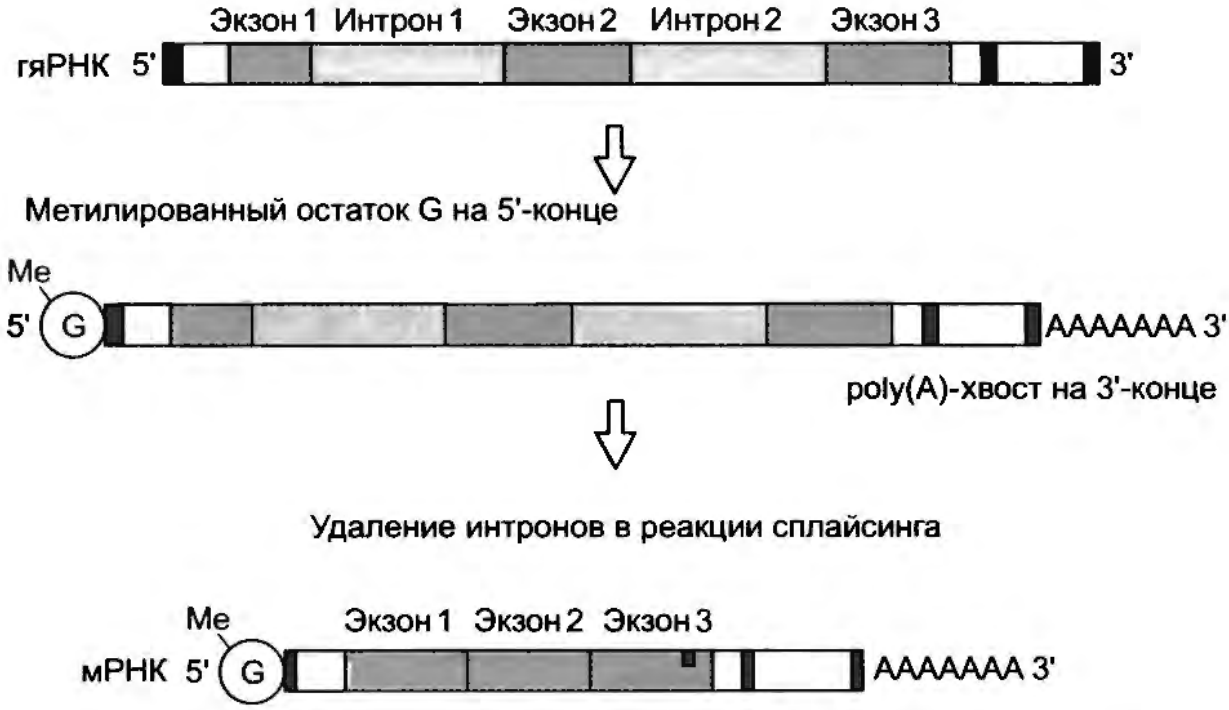


Рис. 5.18. Посттранскрипционные модификации гетерогенной ядерной РНК

ные мРНК, кодирующие различные белки, и такой процесс называется **альтернативным сплайсингом**. Таким образом, последовательность, которая представляет собой экзон для одного вида РНК, может быть частью вырезаемого интрона в другом. Определенный тип или количество мРНК, синтезируемой в клетке или типе клеток, можно проанализировать с помощью различных методов молекулярной биологии (разд. 6.8.1).

5.5.7 Трансляция мРНК

Молекулы матричной РНК считываются и транслируются в белок с помощью комплекса РНК-белковых частиц, называемых **рибосомами**. Рибосомы обозначаются 70S или 80S в зависимости от их коэффициента се-

диментации. Прокариотические клетки имеют 70S-рибосомы, тогда как в эукариотической цитоплазме существуют рибосомы 80S. Рибосомы состоят из двух субъединиц, которые удерживаются порознь специальными рибосомальными белками до тех пор, пока не начнется трансляция. На рибосоме существуют участки для связывания одной молекулы мРНК и двух молекул тРНК; процесс трансляции происходит в три этапа.

- *Инициация* — сборка субъединиц рибосомы и связывание мРНК.
- *Элонгация* — процесс образования полипептидов из специфических аминокислот в зависимости от последовательности кодонов в мРНК.
- *Терминация* — распад рибосомы на субчастицы с последующим высвобождением полипептида.

Молекулы транспортных РНК также необходимы для трансляции. Каждая из них ковалентно связана со специфической аминокислотой, образуя **аминоацил-тРНК**, и имеет триплет оснований, комплементарный кодону данной аминокислоты. Такой «экспонированный» триплет называется **антикодоном** и позволяет тРНК действовать в качестве «адаптерной» молекулы, приносящей одновременно и кодон, и соответствующую аминокислоту. Процесс присоединения аминокислоты к ее специфической тРНК называется загрузкой и выполняется с помощью фермента аминоацил-тРНК-синтетазы.

В прокариотических клетках рибосомы связываются с последовательностью на 5'-конце мРНК, известной как **участок связывания рибосомы** (иногда называют **последовательностью Шайн–Далгарно**, по имени открывателей). У эукариот связывание происходит подобным образом, но с участием так называемой последовательности Козак, расположенной вокруг инициирующего кодона. После инициации трансляции рибосома движется вперед в направлении 3'-конца мРНК, позволяя молекуле аминоацил-тРНК спариваться с каждым последующим кодоном, доставляя аминокислоты для белкового синтеза в правильном порядке. В рибосоме существует два участка для молекул тРНК: участок А и участок Р*. Когда эти участки заняты, рибосома позволяет образование пептидной связи между аминокислотами. Этот процесс находится также под контролем фермента пептидилтрансферазы. Когда рибосома встречает **терминирующий кодон** (UAA, UGA или UAG), останавливающий биосинтез белка, фактор высвобождения связывается с комплексом, трансляция останавливается, полипептиды и соответствующие мРНК высвобождаются и рибосома разделяется на две субъединицы (рис. 5.19). Множество вспомогательных белковых факторов инициации и элонгации вовлечено в этот процесс. В эукариотических клетках полипептид затем может подвергаться **посттрансляционным модификациям**, таким как гликозилирование, и с помощью специфических сигнальных последовательностей аминокислот направлен к специфическим клеточным компартментам или секретирован из клетки.

---

* В настоящее время принята модель с тремя центрами — А, Р, Е. — *Прим. ред.*

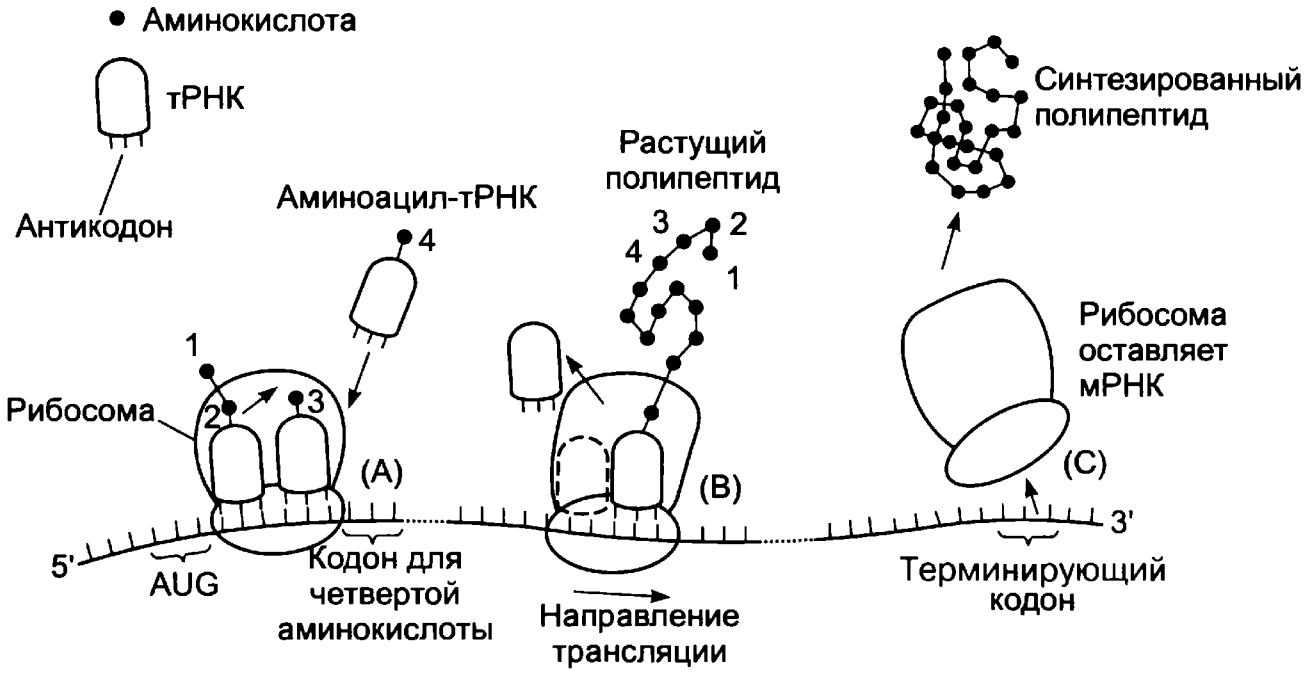


Рис. 5.19. Трансляция. Рибосома А продвигается только на короткое расстояние от 5'-конца мРНК и синтезирует дипептид (с одной тРНК), готовый к переносу на третью аминокислоту (все еще присоединенную к тРНК). Рибосома В продвигается гораздо дальше вдоль мРНК и синтезирует олигопептид, который только что был перенесен на новую аминоацил-тРНК. Свободная тРНК оставляет рибосому и может присоединять другую аминокислоту. Рибосома движется вперед к 3'-концу мРНК на расстояние в три нуклеотида, так что следующий кодон может принять соответствующую аминоацил-тРНК на рибосоме. Рибосома С достигает терминирующего кодона, высвобождает законченный полипептид и отделяется от мРНК

Поскольку последовательность оснований в мРНК читается триплетами, ошибочное положение одного или двух нуклеотидов в рибосоме будет приводить к синтезу аномального полипептида. Таким образом, существенно во время трансляции использовать правильную рамку считывания. У прокариот это достигается с помощью связывания между последовательностью Шайн–Далгарно (последовательность Козак у эукариот) и комплементарной последовательностью одной из рибосомных молекул рРНК, обеспечивая таким образом правильную стартовую точку для продвижения рибосомы вдоль мРНК. Однако, если имеют место мутации, такие как делеция или вставка внутри кодирующей последовательности, они тоже вызывают изменение рамки считывания и приводят к образованию аномального полипептида. Генетические мутации и полиморфизмы рассматриваются более детально в разд. 6.8.5.

5.5.8 Контроль продукции белка: интерференция РНК

Существует множество механизмов, с помощью которых контролируется продукция белка; однако контроль может осуществляться либо на уровне гена, либо на уровне белка. Это может быть контроль уровня

экспрессии мРНК, увеличения или уменьшения скорости транскрипции мРНК или контроль наличия мРНК для трансляции. Одним из недавно обнаруженных механизмов контроля, который был адаптирован как метод молекулярной биологии для изменения содержания мРНК, является **интерференция РНК** (РНКи, RNAi). Этот метод состоит в синтезе коротких двухцепочечных молекул РНК, которые расщепляются на фрагменты размером 21–23 п.н., образуя **индуцированный РНК комплекс-сайленсер** (RISC, RNA-induced silencing complex). Этот комплекс использует короткие молекулы РНК, комплементарные транскриптам мРНК, что в результате последующей гибридизации позволяет РНКазе уничтожать связанную мРНК. Метод имеет важное применение в медицине, например для снижения повышенного уровня специфических молекул мРНК при определенных раковых заболеваниях и вирусных инфекциях.

5.6 МАНИПУЛЯЦИИ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ: ОСНОВНЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И МЕТОДЫ

5.6.1 Ферменты, используемые в молекулярной биологии

Открытие и изучение множества ключевых ферментов обеспечило развитие различных методов для анализа ДНК. В частности, ферменты, называемые эндонуклеазами рестрикции II типа, играют ключевую роль во всех методах молекулярной биологии. Эти ферменты узнают специфические последовательности ДНК, обычно длиной 4–6 п.н., и расщепляют их определенным образом. Узнаваемые последовательности являются палиндромными — имеют природу инвертированных повторов, т. е. они читаются одинаково в обоих направлениях на каждой цепи. После расщепления получается фрагмент со ступенчатыми или выступающими концами (также называемыми **липкими концами**, способными к сцеплению) в зависимости от специфичности данного фермента (рис. 5.20). Важным свойством липких концов является то, что полученные при расщеплении различных молекул ДНК при использовании одного и того же фермента, они комплементарны (т. е. «липкие») и благодаря этому способны хорошо отжигаться друг с другом. Отожженные цепи удерживаются вместе только гидрофобными связями между комплементарными основаниями на противоположных цепях. Ковалентная сшивка («лигирование») каждой из двух цепей может быть выполнена с помощью фермента ДНК-лигазы (разд. 6.2.2). Это свойство широко применяется в молекулярной биологии при конструировании **рекомбинантных ДНК**, т. е. при лигировании фрагментов ДНК из различных источников. Было охарактеризовано около 500 ферментов рестрикции, которые узнают более 100 различных последовательностей-мишеней. Многие из этих ферментов, так называемые **изошизомеры**, узнают различные последовательности-мишени, но образуют одинаковые ступенчатые, или выступающие, концы. Различные манипуляции с ДНК с использованием других ферментов суммированы в табл. 5.3.

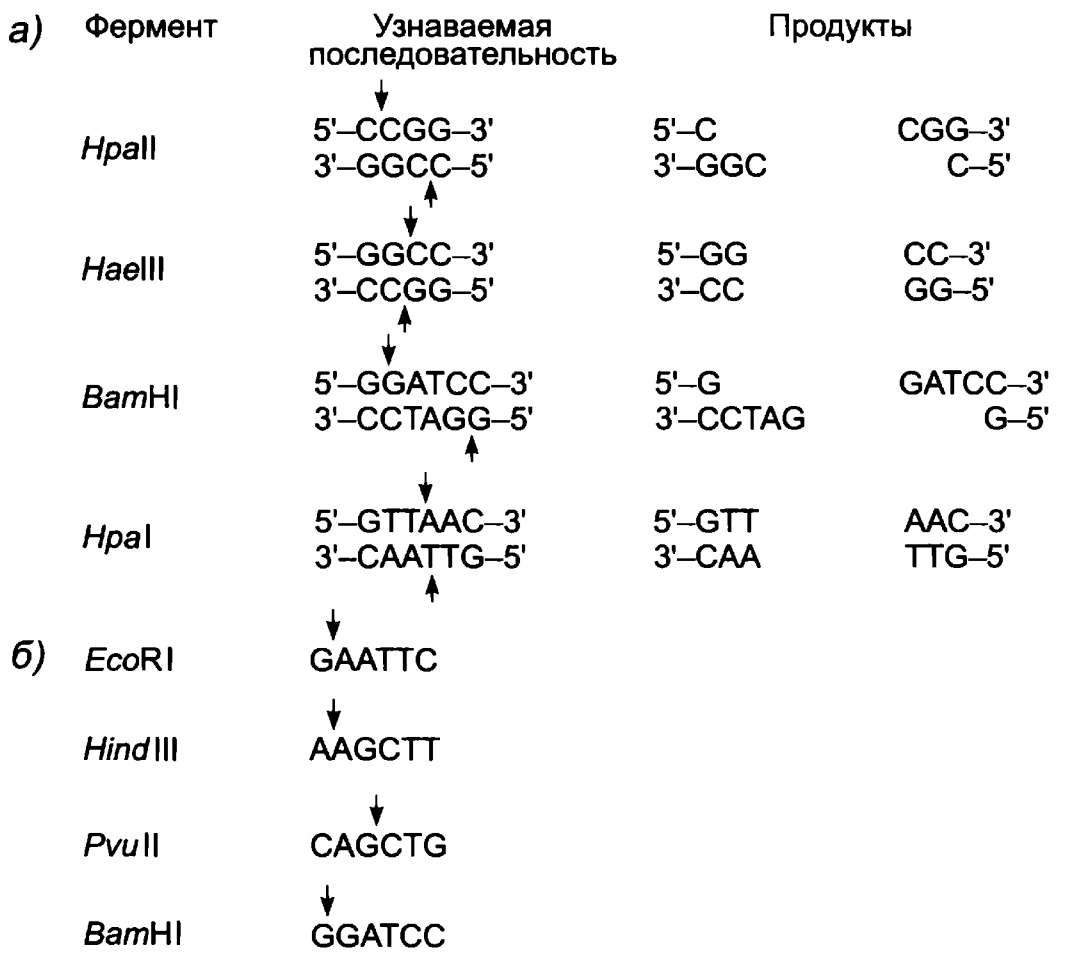


Рис. 5.20. Последовательности, узнаваемые некоторыми ферментами рестрикции. *а* — подробная запись; *б* — условное обозначение. Стрелками показаны сайты рестрикции Заметьте, что вся информация на *а* может быть получена из последовательности одной цепи ДНК; на *б* же изображена только одна цепь в направлении от 5'-конца к 3'. Такая условная запись принята при указании сайтов рестрикции

5.7 ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.7.1 Выделение ДНК

Обычно для анализа или манипуляций ДНК должна иметь определенную степень чистоты. ДНК выделяют из клеток с помощью наиболее мягкого способа разрушения клетки, чтобы предотвратить ее фрагментирование в результате механического повреждения. Обычно эта процедура выполняется в присутствии ЭДТА, которая образует хелатные комплексы с ионами магния, который требуется для фермента, деградирующего ДНК (ДНКаза). В идеальном случае клеточные стенки, если таковые присутствуют, должны быть расщеплены ферментативно (т. е. с помощью обработки лизоцимом), а клеточную мембрану растворяют с помощью детергента. Если же применяется механическое разрушение, то оно должно быть сведено к минимуму и представлять собой скорее разрезание или раздавливание клеток, чем силу сдвига. Разрушение клетки (и последующие этапы)

Таблица 5.3. **Примеры ферментов, часто используемых в манипуляциях с нуклеиновыми кислотами**

Фермент	Пример	Использование в манипуляциях с нуклеиновой кислотой
	ДНК-полимераза I	ДНК-зависимая ДНК-полимераза 5'→3'/ 3'→5'-экзонуклеазная активность
ДНК-полимеразы	Фрагмент Клёнова	ДНК-полимераза I без 5'→3'-экзонуклеазной активности
	ДНК-полимераза T4	Нет 5'→3'-экзонуклеазной активности
	Taq ДНК-полимераза	Термостабильная ДНК-полимераза, используемая в ПЦР
	Tth ДНК-полимераза	Термостабильная ДНК-полимераза с активностью RT
	ДНК-полимераза T7	Используется в секвенировании ДНК
РНК-полимеразы	РНК-полимераза T7	ДНК-зависимая РНК-полимераза
	РНК-полимераза T3	ДНК-зависимая РНК-полимераза
	Репликаза Qβ	РНК-зависимая РНК-полимераза, используемая в амплификации РНК
Нуклеазы	ДНКаза I	Неспецифическая эндонуклеаза, расщепляющая ДНК
	Экзонуклеаза III	ДНК-зависимая, последовательное удаление нуклеотидов 3'→5'
	РНКаза A	РНКаза для картирования
	РНКаза H	Используется в синтезе второй цепи кДНК
	Нуклеаза S1	Специфична для одноцепочечных последовательностей
Обратная AMV транскриптаза	RT	РНК-зависимая ДНК-полимераза, используемая в синтезе кДНК
Трансфераза	Терминальная трансфераза (TdT)	Добавляет гомополимерные хвосты к 3'-концу ДНК
Лигазы	ДНК-лигаза T4	Соединяет 5'-фосфат и 3'-гидроксильные концы фосфодиэфирной связью
Киназы	Полинуклеотид-киназа T4 (PNK)	Переносит концевые фосфатные группы от ATP к 5'-OH группам
Фосфатазы	Щелочная фосфатаза	Удаляет 5'-фосфаты в ДНК и РНК
Метилазы	Метилаза *EcoRI*	Метилирует специфические остатки и защищает от расщепления ферментами рестрикции

ПЦР — полимеразная цепная реакция; RT — обратная транскриптаза; кДНК — комплементарная ДНК; AMV — вирус миелобластомы птиц (avian myeloblastosis virus)

должны выполняться при 4 °С в стеклянной посуде, а все растворы автоклавируют, чтобы уничтожить ДНКазную активность.

После высвобождения нуклеиновой кислоты из клетки РНК может быть удалена с помощью расщепления рибонуклеазой (РНКазой), обработанной нагреванием, чтобы инактивировать любую примесь ДНКазы; РНКаза относительно устойчива к нагреванию благодаря дисульфидным связям, которые обеспечивают быструю ренатурацию молекулы при охлаждении. Другие примеси, такие как белки, удаляются при осторожном перемешивании с раствором фенола или со смесью фенол/хлороформ, которые денатурируют белки, но не нуклеиновые кислоты. Центрифугирование образовавшейся эмульсии приводит к образованию нижней органической фазы, отделенной от верхней водной фазы промежуточной фазой, содержащей денатурированный белок. Водный раствор извлекают и депротеинизируют повторно до тех пор, пока промежуточная фаза более не содержит белка. В завершение депротеинизированный препарат ДНК смешивают с двумя объемами абсолютного этилового спирта, что позволяет высадить ДНК из раствора при сильном

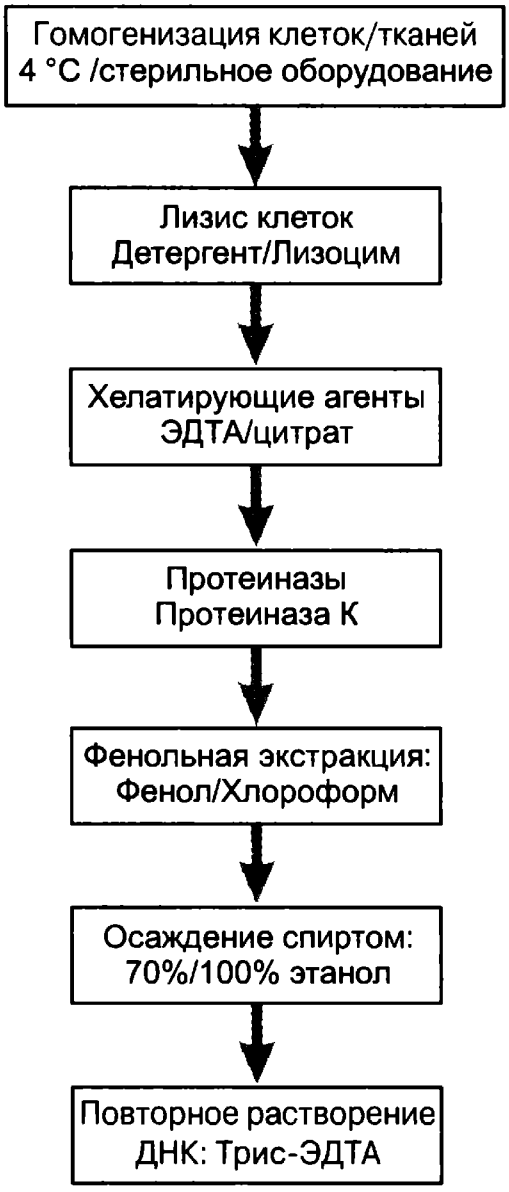


Рис. 5.21. Основные этапы экстракции ДНК из клеток или тканей

охлаждении. После центрифугирования осадок ДНК перерастворяют в буферном растворе, содержащем ЭДТА, чтобы инактивировать любую присутствующую ДНКазу. Этот раствор может храниться при 4 °С не менее месяца. Растворы ДНК могут храниться замороженными, хотя повторное оттаивание и замораживание повреждает длинные молекулы ДНК. Процедура, описанная выше, подходит для выделения общей клеточной ДНК. Если же требуется ДНК из специфической органеллы или вируса, лучше всего экстрагировать эти органеллу или вирус до выделения ДНК, поскольку получить ДНК определенного вида из смеси достаточно сложно. Когда необходима высокая степень очистки ДНК, можно применить ультрацентрифугирование в градиенте плотности хлорида цезия, что особенно успешно применяется в приготовлении плазмидной ДНК. Схема экстракции ДНК представлена на рис. 5.21. Целостность ДНК можно проверить с помощью электрофореза в агарозном геле и также определить ее концентрацию, учитывая тот факт, что одна единица поглощения соответствует 50 мкг · см$^{-3}$ ДНК, т. е.:

$$50 \cdot A_{260} = \text{концентрация ДНК (мкг} \cdot \text{см}^{-3}).$$

Примеси можно идентифицировать с помощью сканирующей УФ-спектрофотометрии в интервале от 200 до 300 нм. Отношение поглощений раствора при 260 и 280 нм, равное ~ 1,8, указывает на то, что образец свободен от примеси белков, которые очень сильно поглощают при 280 нм.

5.7.2 Выделение РНК

Методы, используемые для выделения РНК, очень похожи на описанные выше для ДНК, однако молекулы РНК короче и поэтому меньше повреждаются механически, так что разрушение клетки может быть более энергичным. В то же время РНК является более чувствительной к расщеплению РНКазой, которая присутствует в различных концентрациях в определенных типах клеток и, кроме того, всегда есть на пальцах экспериментатора. Чтобы предотвратить действие РНКазы, следует надевать перчатки и использовать сильные детергенты в среде для выделения. Последующая депротеинизация должна быть особенно жесткой, поскольку РНК часто тесно ассоциирована с белками. Обработка ДНКазой может быть использована для удаления ДНК, а РНК затем переосаждают с помощью этанола. Одним из реагентов, который обычно применяют для экстракции РНК, является гуанидинтиоцианат, который, с одной стороны, представляет собой сильный ингибитор РНКазы, а с другой стороны, денатурирует белки. Схема экстракции РНК представлена на рис. 5.22. Целостность экстракта РНК можно проверить с помощью электрофореза в агарозном геле. Преобладающими видами РНК являются рРНК 23S и 16S в прокариотах и 18S и 28S в эукариотах. Они образуют отдельные полосы в агрозном геле и указывают на то, что другие компоненты РНК, скорее всего, являются интактными. Обычно такой электрофорез проводят в денатурирующих условиях, чтобы предотвратить образование вторичных структур РНК. Концентрация РНК может быть оценена

с помощью УФ-спектрофотометрии. При 260 нм одна единица поглощения соответствует 40 мкг · см$^{-3}$ РНК, т. е.:

$40 \cdot A_{260}$= концентрация РНК, мкг · см$^{-3}$.

Примеси могут быть идентифицированы таким же образом, как и в случае ДНК, сканирующей УФ-спектрофотометрией; однако для образца РНК, не содержащего белка, отношение поглощений при 260 нм и 280 нм равно ~ 2 (разд. 5.7.1).

Во многих случаях из смеси всех молекул РНК желательно выделить эукариотическую мРНК, которая составляет только 2–5% клеточной РНК. Это может быть сделано с помощью аффинной хроматографии на колонках с олиго-(dT)-целлюлозой. При высоких концентрациях соли мРНК, содержащая poly(A)-концы, связывается с комплементарными молекулами на колонке с олиго-(dT) и благодаря этому удерживается; все остальные молекулы РНК смываются с колонки с помощью раствора

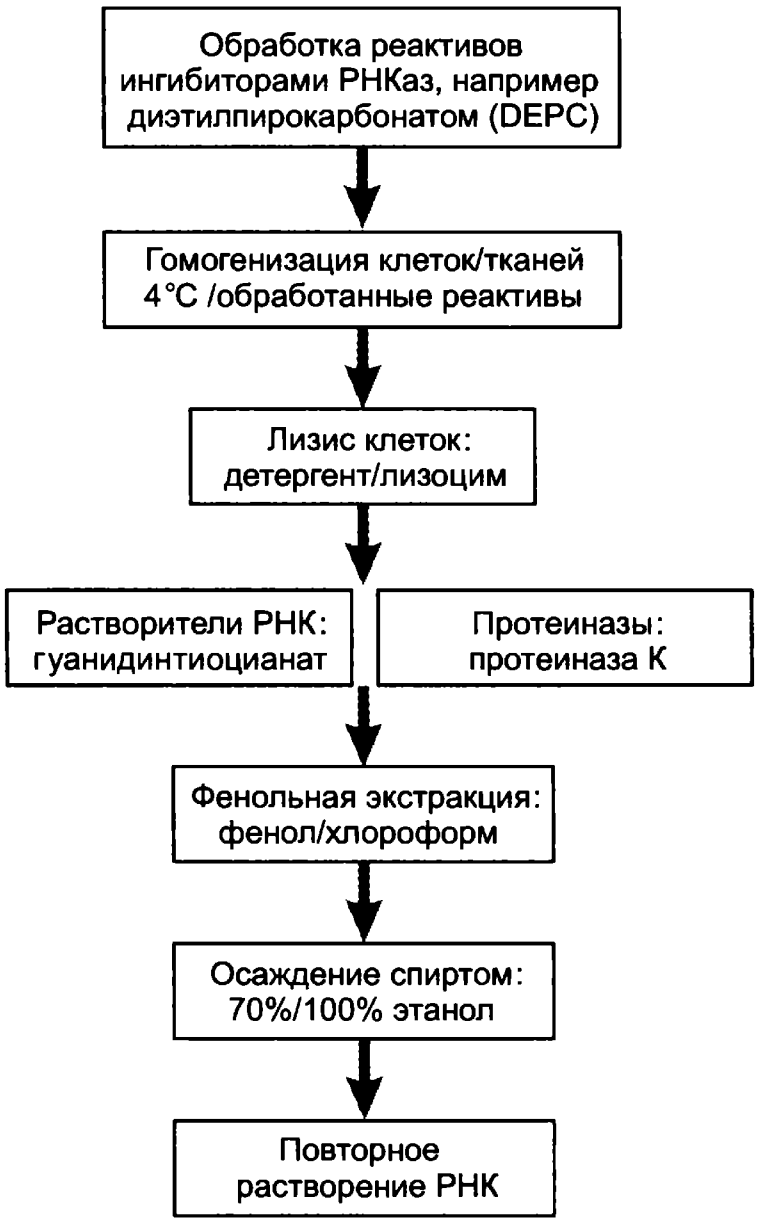


Рис. 5.22. Основные этапы экстракции РНК из клеток или тканей

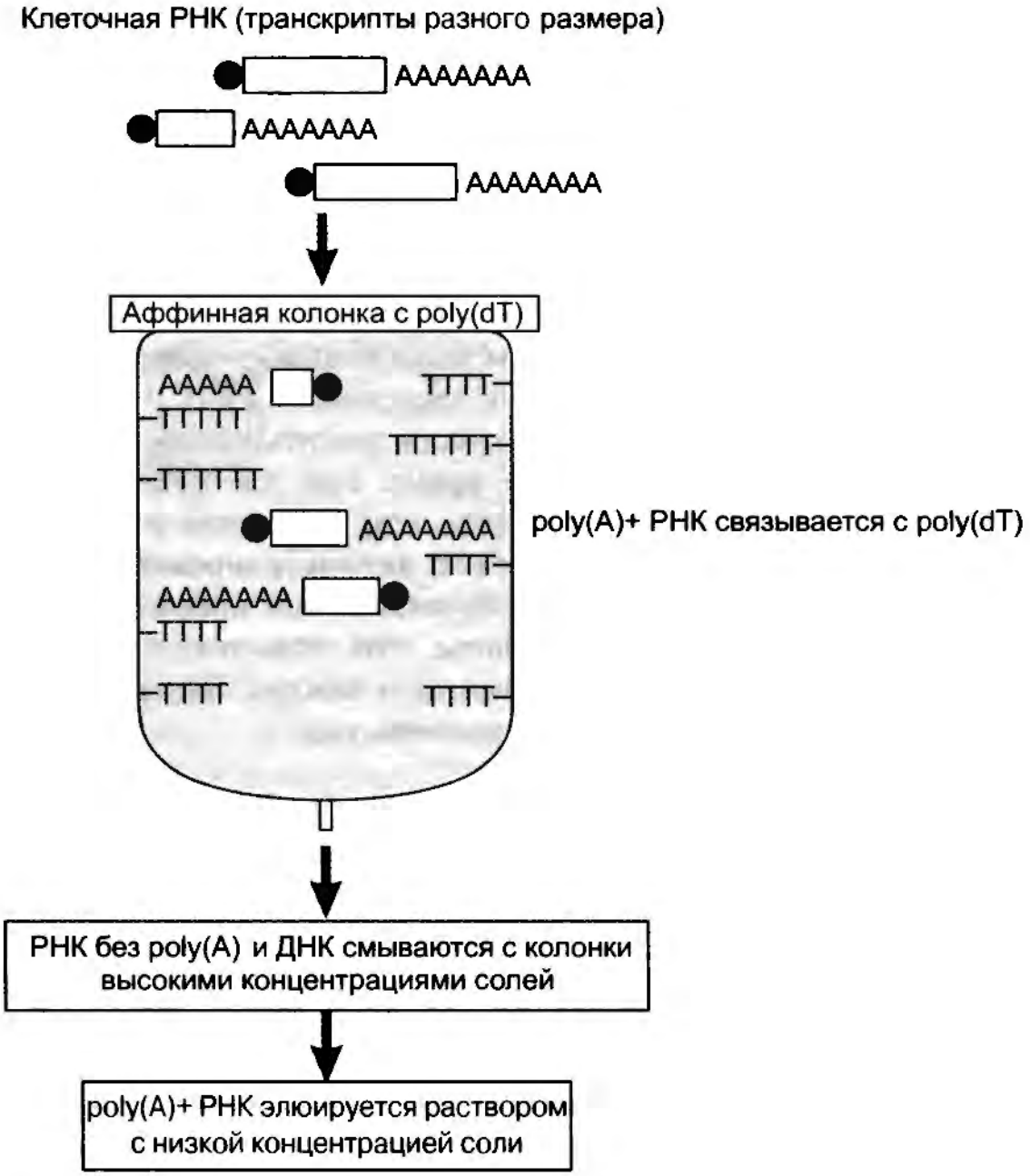


Рис. 5.23. Аффинная хроматография poly(A)$^+$ РНК

с высокой концентрацией солей. Затем связанную РНК смывают с колонки, используя низкую концентрацию соли (рис. 5.23). Фракции РНК можно также разделить с помощью физических методов, таких как электрофорез или хроматография, которые основаны на разном размере фрагментов нуклеиновых кислот или разных физико-химических свойствах разделяемых компонентов.

5.7.3 Экстракция нуклеиновых кислот с помощью автоматического оборудования или «китов»

Использование автоматического оборудования или манипуляции с помощью «китов» (наборов) широко распространено в молекулярной биологии, в том числе для выделения нуклеиновых кислот. Выпускается множество наборов для экстракции нуклеиновых кислот, и хотя многие из них основаны

на методах, описанных в разд. 5.8.1 и 5.8.2, их преимущество заключается в том, что реагенты стандартизированы и проверены тестами качества, что обеспечивает высокую степень надежности. Примером является использование стеклянных шариков для очистки ДНК. Небольшие компактные колонки, например колонки QUIAGEN, также широко используются в исследованиях и рутинном анализе ДНК. При этом для экстракции нескольких нуклеиновых кислот могут применяться одни и те же реагенты, но в автоматическом режиме происходит их надежное разделение. Такой подход имеет особый успех, когда требуется большое количество экстракций ДНК. Существует много методов экстракции РНК с использованием готовых наборов, что дало возможность решить такие проблемы, как загрязнение РНКазой. В настоящее время там, где требуется высокая производительность, например в клинических диагностических лабораториях, используется множество полностью автоматизированных приборов для выделения нуклеиновых кислот. Образцы крови, например, помещают в 96- или 384-луночные микропланшеты, что позволяет проводить автоматический и контролируемый компьютером анализ. Экстракция требует ~45 мин и происходит без ручного вмешательства.

5.7.4 Электрофорез нуклеиновых кислот

Электрофорез в агарозном или акриламидном геле — удобный метод разделения молекул ДНК согласно их размерам. Метод может быть использован для анализа или в препаративных целях и быть количественным или качественным. Большие фрагменты ДНК, такие как хромосомы, также могут быть разделены с помощью модифицированного электрофореза, называемого **электрофорезом в пульсирующем поле** (PFGE, pulsed field gel electrophoresis). Наиболее простым и широко применяемым методом является электрофорез в горизонтальном агарозном геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия. Этот краситель связывается с ДНК путем встраивания между основаниями (процесс **интеркаляции**), что проявляется в сильной красной или оранжевой флуоресценции в УФ-области (рис. 5.24). Очень часто электрофорез используют, чтобы оценить чистоту и целостность препарата ДНК или степень протекания ферментативной реакции, например во время этапов клонирования ДНК. Для таких целей особенно удобны минигели, поскольку для их приготовления требуется немного времени, применяются небольшие объемы образцов, а результаты получаются быстро. Агарозные гели могут быть использованы для разделения молекул размером больше 100 п.н. Для более чувствительных разделений молекул или для эффективного разделения коротких ДНК предпочтительным является электрофорез в полиакриламидном геле.

Когда электрофорез используется для препаративных целей, кусочек геля, содержащий выделяемый фрагмент ДНК, вырезают с помощью скальпеля. ДНК из фрагмента геля выделяют различными путями: разрушением геля с помощью стеклянной палочки в небольшом объеме буфера, с помощью расщепления агарозы (при этом ДНК остается в растворе) или с помощью электроэлюирования. В последнем случае кусочек геля запечатывают вну-

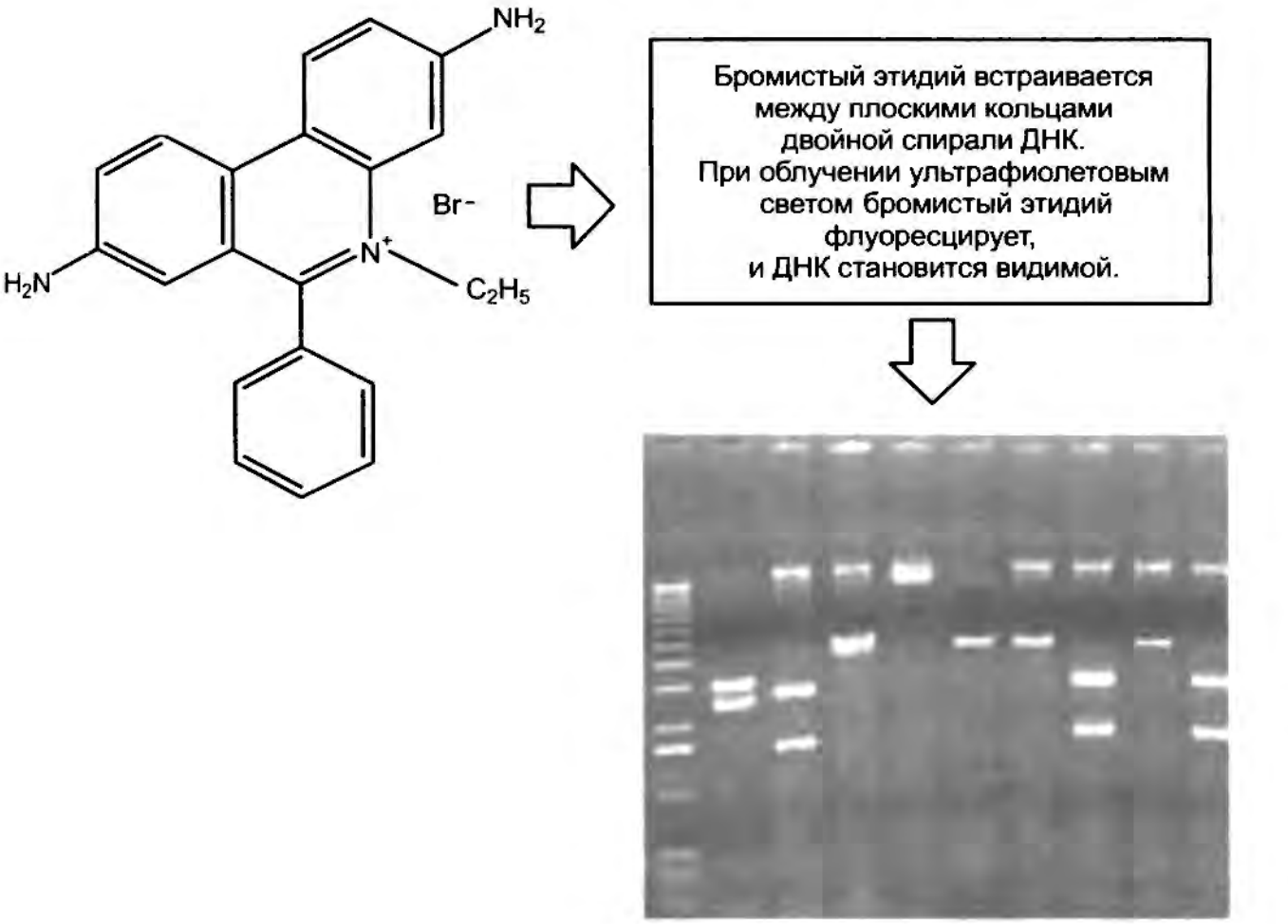


Рис. 5.24. Использование бромистого этидия для определения ДНК

три диализной трубки, содержащей буфер, а затем помещают между двумя электродами в камере с большем количеством буфера. Пропускание электрического тока между электродами вызывает миграцию ДНК из геля, но затем ДНК задерживается в диализной трубке, что упрощает ее извлечение.

5.7.5 Автоматизированный анализ фрагментов нуклеиновых кислот

Гель-электрофорез является основным методом для разделения и анализа нуклеиновых кислот. Однако все возрастающую популярность приобретают автоматизированные системы с гелями заводского изготовления. Они особенно удобны в ситуациях, когда требуется анализировать большое количество образцов или провести анализ с высокой производительностью. Кроме того, чтобы избежать операции по приготовлению геля, были разработаны новые технологии, такие как Lab-on-a-chip. Эти системы применяют микрожидкостные контуры, в которых используется маленькая кассета, содержащая сообщающиеся между собой резервуары. Образец наносят в определенное место и пропускают через микроканалы с помощью электрофореза, контролируемого компьютером. Каналы ведут к резервуарам, например, для инку-

бации в течение определенного времени с другими реагентами, такими как красители*. Электрофоретическое разделение, таким образом, происходит в микромасштабе. Небольшие размеры ячейки позволяют свести к минимуму расход образца и реагентов, что очень выгодно в анализе образцов ДНК или РНК. Кроме того, благодаря компьютерной обработки результатов можно собирать данные за очень короткий промежуток времени. В последнее время возросла популярность альтернативных методов анализа, основанных на высокоэффективной жидкостной хроматографии, особенно в мутационном анализе (разд. 6.8.6). В анализе нуклеиновых кислот стали больше использоваться возможности масс-спектрометрии (разд. 9.2.4).

5.8 МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОИНФОРМАТИКА

5.8.1 Основы биоинформатики**

Биоинформатика стала жизненно важным источником для исследований в области молекулярной биологии, в частности в рутинной детекции мутаций ДНК. Такая важная роль биоинформатики связана с накоплением генетической информации о первичной последовательности ДНК и необходимостью ее хранения и анализа. В настоящее время в генетических базах данных хранится большое количество последовательностей ДНК из различных организмов, включая геном человека. Действительно, генетическая информация из различных организмов является совершенно необходимой отправной точкой в молекулярно-биологических исследованиях. Среди наиболее крупных из так называемых **первичных баз данных** можно назвать GenBank при Национальном институте здоровья в США, EMBL в Европейском институте биоинформатики в Кембридже, Великобритания, и базу данных ДНК в Японии (DDBJ), в Мишима. Эти базы данных содержат аннотированные нуклеотидные последовательности, что позволяет легко осуществлять идентификацию. Существует много **вторичных баз данных**, содержащих информацию, относящуюся к мотивам последовательностей, таких как коровая последовательность, представляющая P450 домены цитохрома, или ДНК-связывающие домены. Существенно, что все эти базы данных доступны через Интернет. Список важных баз данных и источников в Интернете представлен в табл. 5.4.

Базы данных ДНК и последовательности других нуклеиновых кислот и программы анализа белков могут быть доступны через Интернет, предоставляя соответствующие программное обеспечение и ссылки на авторитетные источники. В настоящее время прямое использование Интернета обеспечивает пользователю удобный графический интерфейс для анализа и использования данных. Поэтому появились и ширятся такие области биологических наук, которые анализируют базы данных геномных и кДНК

---

* Это метод капиллярного электрофореза. — *Прим. ред.*

** См. Леск А. Введение в биоинформатику/ Пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. — 2009. — *Прим. ред.*

Таблица 5.4. **Базы данных нуклеиновых кислот и белков, доступных в World Wide Web**

База данных или источник		Унифицированный указатель информационного ресурса (URL, uniform resource locator)
Основные базы данных последовательностей ДНК		
EMBL	Европейский институт биоинформатики	<http://www.ebi.ac.uk>
GenBank	Генетическая база данных США	<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
DDBJ	База данных Японии	<http://www.ddbj.nig.ac.jp>
Базы данных последовательностей белков		
Swiss-Prot	Европейская база данных белковых последовательностей	<http://www.expasy.org>
UniProt TREMBL	Европейская база данных белковых последовательностей	<http://www.ebi.ac.uk/trembl>
Базы данных структуры белков		
PDB	База данных белковых структур	<http://www.rcsb.org>
Базы данных Проекта Генома		
Базы данных по геному человека, США		<http://www.gdbwww.gdb.org>
dbEST (кДНК и частичные последовательности)		<http://www.ncbi.nih.gov/dbEST/index.html>
Généthon (генетические карты, построенные на основе маркерных последовательностей)		<http://www.genethon.fr>

последовательностей (**геномика**) и соответствующие им белки (**протеомика**). Иногда их относят к так называемым компьютерным (*in silico*) исследованиям.

5.8.2 Анализ информации с использованием биоинформатики

Один из наиболее полезных методов биоинформатики — BLAST (basic local alignment search tool), который описан на сайте NCBI (<www.ncbi.nlm.nih.gov>). Он позволяет сравнивать последовательности ДНК со всеми последовательностями ДНК в этой базе. Это очень удобно, поскольку, как только нуклеотидная последовательность определена, например с помощью секвенирования по Сенгеру, можно идентифицировать сходные последовательности. Действительно, если речь идет о картированной последовательности ДНК человека, можно определить ее положение на хромосоме, пользуясь NCBI GenomeMap. Следующая программа, такая как программа поиска открытой рамки считывания, позволяет, например, находить последовательности, начинающиеся со стартового кодона ATG и содержащие значительное число кодирующих триплетов до стоп кодона. Существует множество других последовательностей ДНК, которые могут быть использованы для определения кодирующих последовательностей: например, участки связывания с рибосомой, участки сплайсинга, poly(A)-последовательности полимеразы и промоторные последовательности,

лежащие вне кодирующих областей. Такие участки также можно идентифицировать с помощью системы нуклеотидной идентификации (NIX, nucleotide identification system). При этом запрашивают вторичную базу данных .и получают ответ, указывающий возможный промотор, экзон-интронные последовательности и т. д.

5.9 МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.9.1 Рестрикционное картирование фрагментов ДНК

Рестрикционное картирование заключается в анализе фрагментов рестрикции, полученных расщеплением ДНК несколькими ферментами индивидуально и в комбинации (разд. 5.6). Принцип картирования иллюстрируется на рис. 5.25, где показано картирование с помощью двух ферментов, А и Б. Расщепление ферментом А исходной молекулы размером 9 т.п.н. дает фрагменты размером 2 и 7 т.п.н. Следовательно, можно расположить единственный сайт А на расстоянии 2 т.п.н. от конца. Точно так же, фермент Б дает фрагменты 3 и 6 т.п.н., значит, он имеет

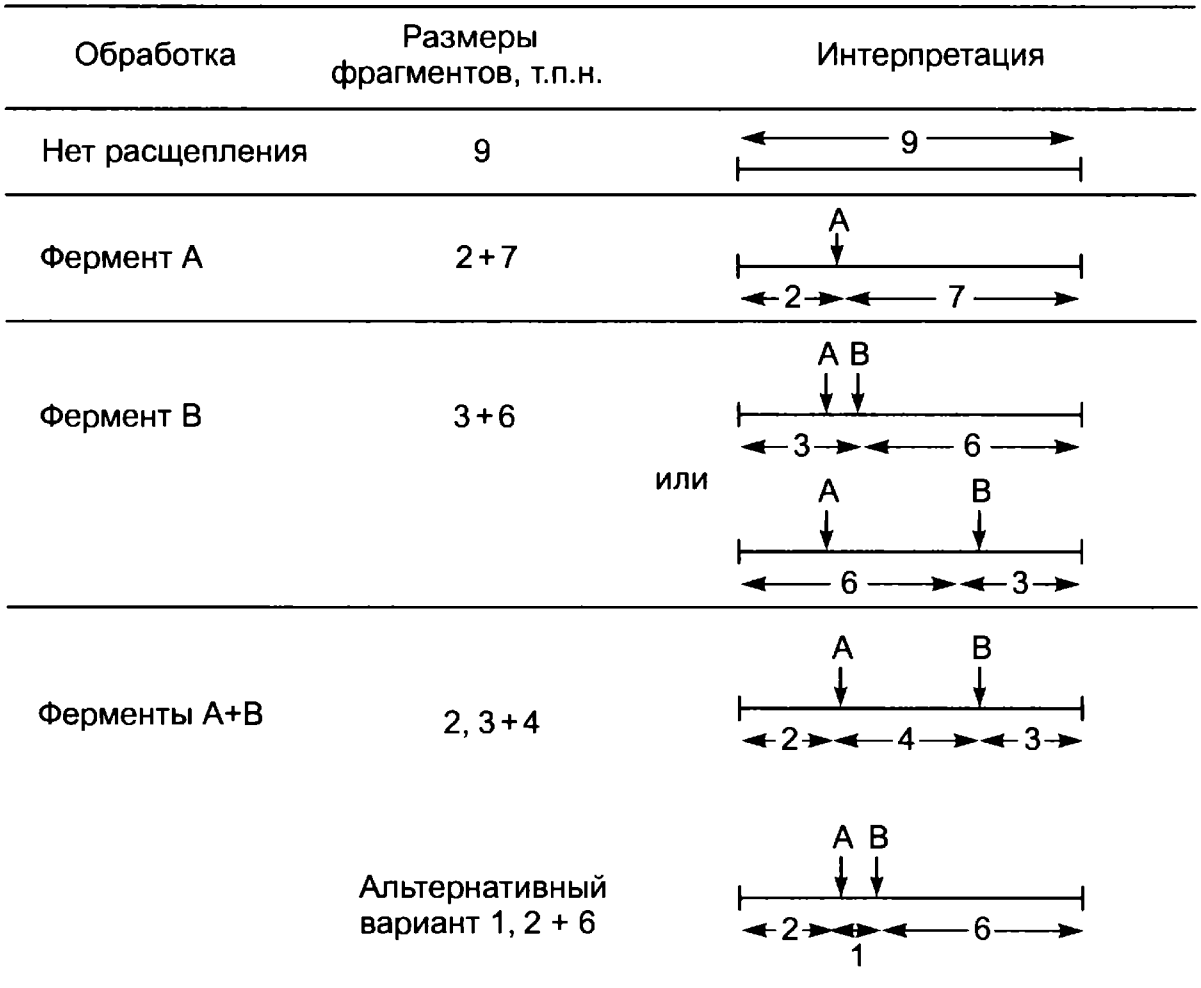


Рис. 5.25. Рестрикционное картирование ДНК. Обратите внимание на то, чтобы каждый экспериментальный результат рассматривается в контексте всей последовательности, что важно для правильного построения карты

единственный участок узнавания на расстоянии 3 т.п.н. от одного из концов; но на этой стадии невозможно сказать, находится ли он вблизи сайта А или на противоположном конце ДНК. Этот вопрос можно разрешить, используя два фермента одновременно. Если результирующие фрагменты составляют 2, 3 и 4 т.п.н., тогда А и Б разрезают противоположные концы молекулы; если полученные фрагменты имеют размеры 1, 2 и 6 т.п.н., то сайты расположены рядом. Понятно, что картирование реальной молекулы не так просто, как этот пример, и обычно для составления рестрикционной карты требуется биоинформационный анализ длины фрагментов рестрикции.

5.9.2 Блоттинг-методы анализа нуклеиновых кислот

Электрофорез рестрикционных фрагментов ДНК позволяет осуществлять их разделение в зависимости от размеров; однако он не указывает на присутствие специфических искомых фрагментов в сложных образцах. Это может быть сделано с помощью переноса ДНК из геля на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану, помещенную в контакте с гелем. Сначала гель замачивают в кислоте для получения одноцепочечной ДНК. Затем ДНК переносят на мембрану, при этом расположение фрагментов ДНК совершенно такое же, как в исходном геле. Этот перенос, называемый **саузерн-блотом** по имени предложившего его Эда Саузерна, может быть проделан либо с помощью электрического тока, либо путем пропускания больших объемов буфера через гель и мембрану (т. е. за счет капиллярных сил) (рис. 5.26). Смысл этой операции состоит в том, что мембрана может быть обработана с помощью меченой молекулы ДНК, например **ДНК-зондом** (разд. 5.9.3). Эта одноцепочечная молекула ДНК будет гибридизоваться с комплементарным фрагментом, иммобилизованным на мембране. Условия гибридизации, включая температуру и концентрацию солей, определяют эффективность процесса. Они обычно диктуются строгостью гибридизации и являются специфическими для каждого зонда и для каждого образца ДНК. После гибридизации проводят несколько этапов отмывки с

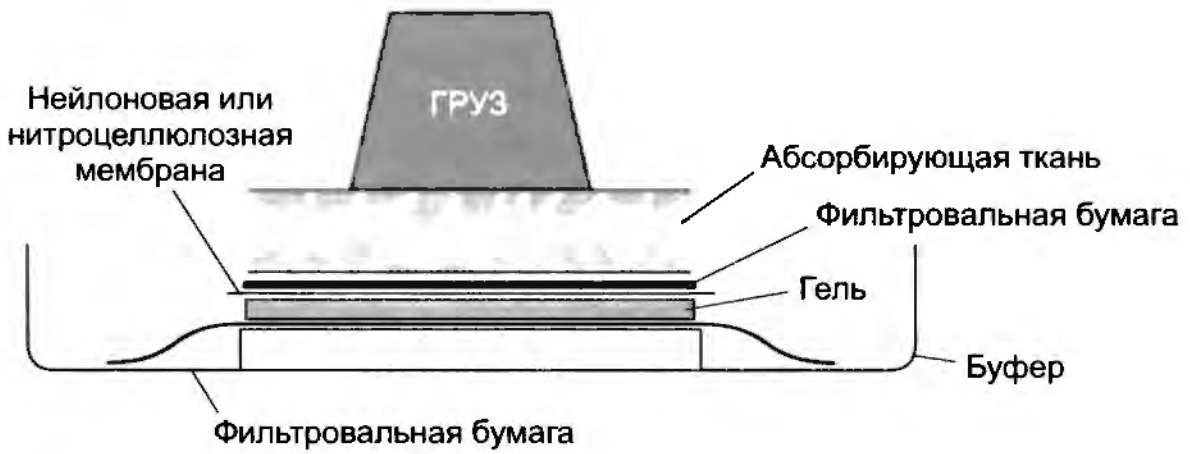


Рис. 5.26. Проведение саузерн-блоттинга

помощью буфера, чтобы удалить любую несвязавшуюся ДНК-пробу, а мембрану проявляют, как фотографию, после чего можно определить точное расположение зонда и его мишени. Можно анализировать также ДНК из различных видов или организмов с помощью блоттинга, используя зонд, кодирующий белок или фермент одного из этих организмов. Таким путем можно искать родственные гены в различных видах. Этот метод называют зоо-блот-скринингом.

Такой же процесс блоттинга нуклеиновой кислоты может быть использован для переноса РНК из геля на мембраны. Это позволяет идентифицировать последовательность определенной длины с помощью гибридизации меченого ДНК-зонда, и такой процесс известен под названием **норзерн-блоттинга**. С помощью этого метода можно не только детектировать специфические молекулы РНК, но также определять относительное количество специфической мРНК. Обычно транскрипты РНК разделяют гель-электрофорезом в денатурирующих условиях, поскольку это улучшает разрешение и позволяет более точно определять размеры транскриптов (разд. 5.7.2). Формат блоттинга можно изменить, используя вместо переноса из геля прямое нанесение пробы в специальный аппарат, содержащий нейлоновую мембрану. Такой способ называется «слот-» или «дот-блоттингом»; он дает возможность оценивать относительное содержание специфических транскриптов мРНК без необходимости проведения гель-электрофореза; однако метод не дает информации относительно размеров фрагментов.

5.9.3 Дизайн и получение ДНК-зондов

Наличие ДНК-зонда является обязательным во многих методах молекулярной биологии, и все же во многих случаях это один из наиболее трудных этапов. Информация, необходимая для получения ДНК-зонда, может быть получена из многих источников. Имеющиеся в распоряжении источники биоинформатики и генетические базы данных предоставляют такую информацию. Поэтому этот этап является обычной исходной точкой для дизайна ДНК-зонда.

В некоторых случаях можно использовать родственные гены, т. е. гены из одного и того же семейства, чтобы получить информацию о наиболее подходящей последовательности, применяемой в качестве зонда. Сходные белки или последовательности ДНК из различных видов могут также являться стартовой точкой для получения так называемого **гетерогенного зонда**. В некоторых случаях, когда целевые последовательности уже получены и клонированы, возможно, используя последовательность ДНК из базы данных, химически синтезировать одноцепочечный **олигонуклеотидный зонд**. Обычно это делают с помощью управляемых компьютером синтезаторов генов, которые соединяют дезоксирибонуклеотидтрифосфаты в желаемую последовательность. Важно предпринять определенные тесты, чтобы выявить уникальность зонда, способен или нет он к самоотжигу и не является ли самокомплементарным, поскольку все это может помешать его использованию.

Полипептид		Phe	Met	Pro	Trp	His	
Соответствующая нуклеотидная последовательность	5'	T TTC	ATC	T CCC A G	TGG	T CAC	3'

Рис. 5.27. Олигонуклеотидные зонды. Отметьте, что только метионин и триптофан имеют уникальные кодоны. Невозможно предсказать, какой из указанных кодонов для фенилаланина, пролина и гистидина присутствует в ДНК-зонде, поэтому нужно синтезировать все возможные комбинации (16 в приведенном примере)

В тех случаях, когда имеется очень мало информации о ДНК, при приготовлении зонда можно использовать данные анализа соответствующих белков. Таким образом, можно выделить и очистить белки и определить часть последовательности N-конца или внутренней области белка. Зная генетический код, можно предсказать различные последовательности ДНК, которые могли бы кодировать белок, и затем химически синтезировать подходящую олигонуклеотидную последовательность. Поскольку генетический код вырожден, большинство аминокислот кодируется не одним кодоном, поэтому данный полипептид может быть закодирован несколькими нуклеотидными последовательностями (рис. 5.27). Чем длиннее полипептид, тем больше число возможных олигонуклеотидов, которые должны быть синтезированы. К счастью, нет необходимости синтезировать последовательность длиннее 20 оснований, поскольку она будет эффективно гибридизоваться с любыми комплементарными последовательностями и должна быть специфичной для одного гена. В идеальном случае должна быть выбрана область белка, которая содержит как можно больше остатков триптофана и метионина, поскольку они имеют уникальные кодоны, что снижает число возможных последовательностей нуклеотидов, которые могли бы кодировать эту часть белка. Синтезированные олигонуклеотиды могут быть затем использованы как зонды во множестве методов молекулярной биологии.

5.9.4 Мечение ДНК-зондов

Существенной особенностью ДНК-зонда является то, что он может быть визуализирован или помечен. Это позволяет идентифицировать любую комплементарную последовательность, с которой связывается зонд.

Имеется два основных типа мечения, применяемых для ДНК-зондов. Традиционно используется радиоактивное мечение, но увеличивается популярность и нерадиоактивных зондов.

Наиболее широко распространенной радиоактивной меткой является фосфор-32 (^{32}P), хотя в некоторых случаях используется сера-35 (^{35}S) и тритий (^{3}H). Они могут быть детектированы посредством радиографии (разд. 14.2.3), где меченая молекула зонда, связанная с образцом ДНК, расположенной, например, на нейлоновой мембране, помещается в контакт с

чувствительной к рентгеновским лучам пленке. После экспозиции пленку проявляют и фиксируют как черно-белый негатив. Эта пленка выявляет точное расположение меченого зонда и, соответственно, ДНК, с которой он был гибридизован.

. Возрастает использование нерадиоактивного мечения ДНК-зондов. До недавнего времени радиоактивные метки были более чувствительны, чем нерадиоактивные. Однако в настоящее время созданы нерадиоактивные метки с близкой чувствительностью, что в сочетании с большей безопасностью привело к расширению их применения.

Системы мечения бывают либо прямыми, либо непрямыми. Прямое мечение позволяет напрямую привязать к ДНК фермент-репортер, такой как щелочная фосфатаза. Хотя это может изменить характеристики ДНК-зонда, в то же время имеется преимущество быстроты анализа, поскольку нет необходимости в промежуточных этапах. Однако непрямое мечение в настоящее время более популярно. Оно состоит во встраивании нуклеотида с присоединенной меткой. В последнее время используются такие метки, как биотин, флуоресцеин и дигоксигенин. Эти молекулы ковалентно привязаны к нуклеотиду с помощью углеродной «ножки» из 7, 14 или 21 атомов. Специфические связывающие белки могут затем быть использованы как мостик между нуклеотидом и репортерным белком, таким как фермент. Например, биотин, встроенный во фрагмент ДНК, с высокой специфичностью связывается с белком стрептавидином. Последний может быть либо состыкован, либо соединен с молекулой фермента-репортера, такого как щелочная фосфатаза. Это дает возможность превращения бесцветного субстрата *n*-нитрофенилфосфата (PNPP) в желтый *n*-нитрофенол (PNP), что также усиливает сигнал. С другой стороны, такие метки, как дигоксигенин, встроенные в последовательности ДНК, могут быть детектированы с помощью моноклональных антител, связанных с репортерными молекулами, такими как щелочная фосфатаза. Таким образом, в отличие от систем детекции, основанных на авторадиографии, которая необходима при радиоактивном мечении, в этом случае имеет место серия реакций, приводящих к продукции цвета, света или хемилюминесценции. Это имеет важное практическое значение, поскольку авторадиография может занимать 1–3 дня, в то время как цветные реакции и реакции хемилюминесценции продолжаются несколько минут.

5.9.5 Концевое мечение молекул ДНК

Простейшим способом мечения ДНК является 5'- или 3'-концевое мечение. 5'-Концевое мечение состоит в переносе фосфата или реакции обмена, при которых 5'-фосфат ДНК, используемой в качестве зонда, удаляется и на его место добавляется меченый фосфат, обычно ^{32}P. Это выполняется с помощью двух ферментов: щелочная фосфатаза служит для удаления существующей фосфатной группы из ДНК, а полинуклеотидкиназа катализирует перенос фосфатной группы (меченной ^{32}P) на 5'-конец ДНК. После этого меченый зонд очищают, обычно с помощью хромато-

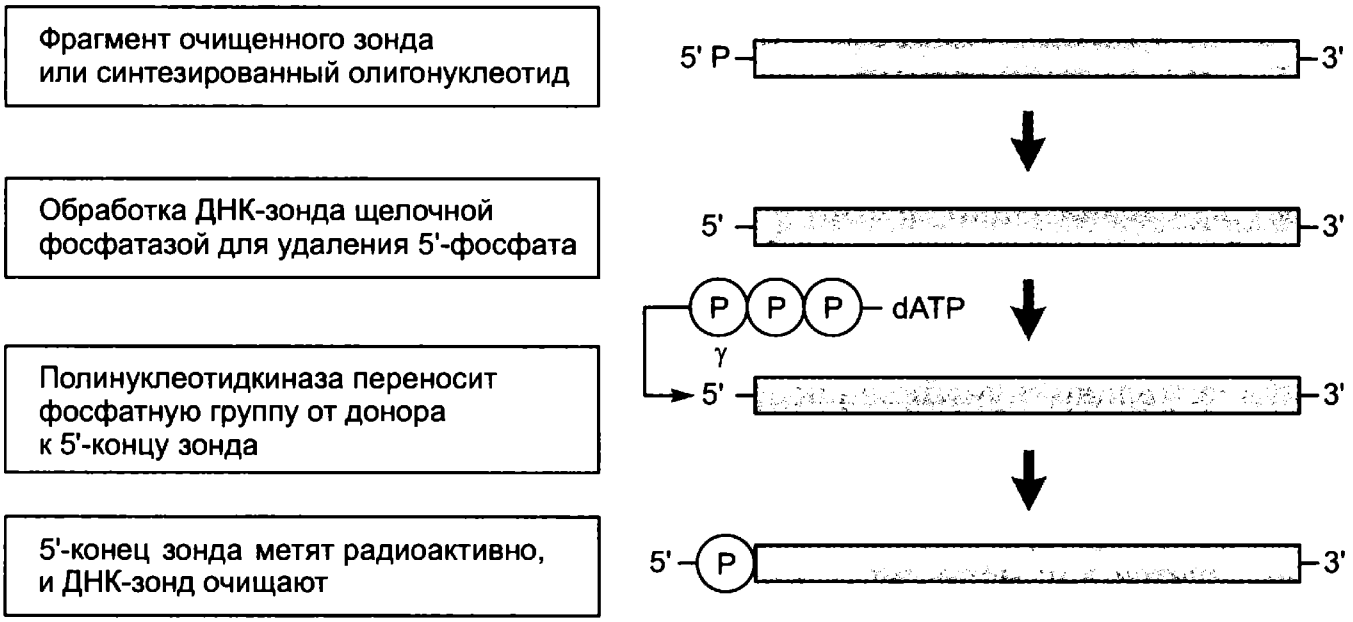


Рис. 5.28. Мечение 5'-конца ДНК-зонда с помощью щелочной фосфатазы и полинуклеотидкиназы

графии на колонке с сефадексом, и затем быть непосредственно используют (рис. 5.28).

Использование другого конца молекулы ДНК, 3'-конца, представляется немного менее сложным. Новый меченый dNTP (т. е. ^{32}P-αdATP или меченный биотином dNTP) добавляется к 3'-концу ДНК с помощью фермента терминальной трансферазы. Хотя эта реакция простаz, возможны проблемы, так как новый нуклеотид добавляется к существующей последовательности и при этом она изменяется, что может влиять на ее гибридизацию с последовательностью-мишенью. Методы концевого мечения имеют также тот недостаток, что только одна метка добавляется к ДНК, поэтому такие зонды имеют низкую активность по сравнению с зондами, в которых метка включается по всей длине ДНК (рис. 5.29).

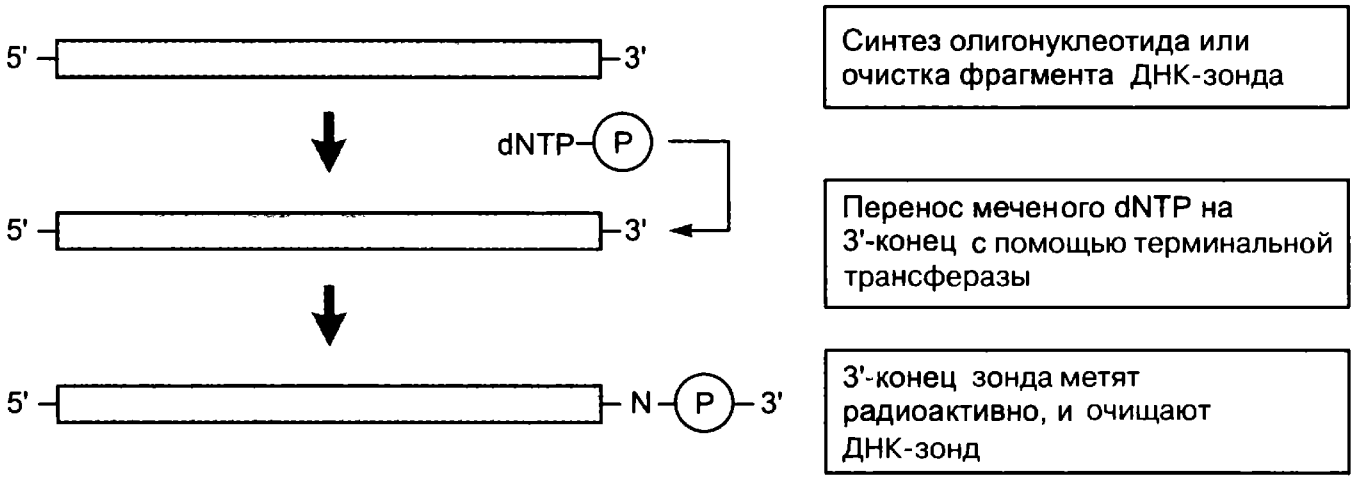


Рис. 5.29. Мечение 3'-конца ДНК-зонда с помощью терминальной трансферазы. Отметьте, что добавление меченого dNTP к 3'-концу изменяет последовательность ДНК-зонда

5.9.6 Мечение с помощью случайного праймера и ник-трансляция

Для того чтобы пометить ДНК, ее сначала денатурируют и затем помещают в условия ренатурации в присутствии смеси множества различных случайных последовательностей гексануклеотидов. Эти гексануклеотиды будут случайным образом связываться с ДНК, где бы они не встретили комплементарную последовательность, и ДНК будет быстро приобретать приблизительно случайное распределение гексануклеотидов, отожженных с ней. Каждый из гексамеров может действовать как праймер для синтеза новой цепи ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой, поскольку он имеет свободную 3'-гидроксильную группу. Фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы используется для мечения с помощью случайного праймера, поскольку он не имеет 5'→3'-экзонуклеазной активности. Это достигается расщеплением ДНК-полимеразы с помощью субтилизина, в результате чего образуется большой фрагмент фермента, который не имеет 5'→3'-экзонуклеазной ак-

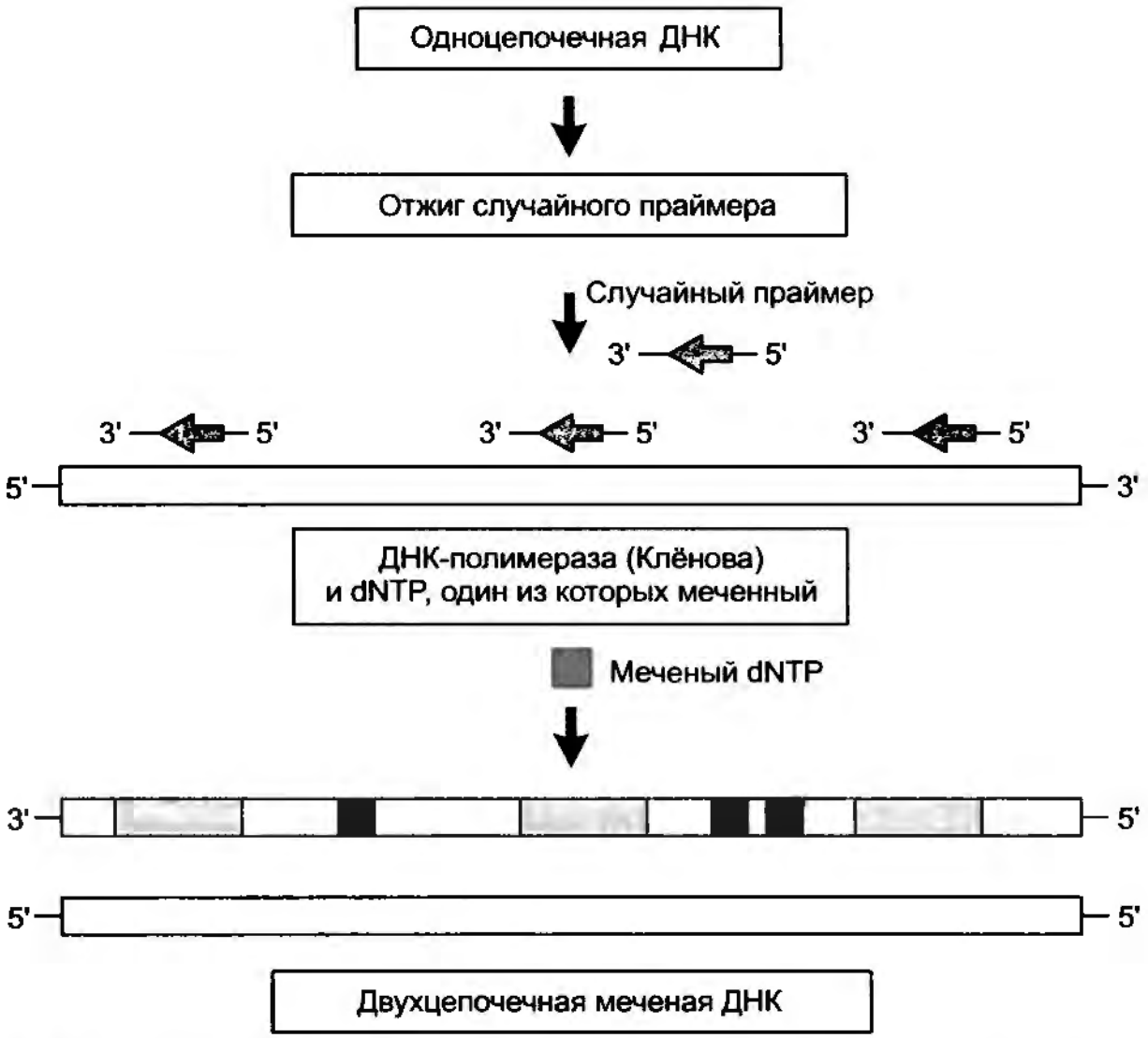


Рис. 5.30. Мечение ДНК-зонда с помощью случайного праймера. Праймеры встраиваются и используются как стартовая точка для ДНК-полимеразы Клёнова, чтобы синтезировать комплементарную цепь ДНК, включая меченый dNTP в комплементарных участках

тивности, но который все еще действует как 5' → 3'-полимераза. Таким образом, когда фрагмент Клёнова смешивают с образцом отожженной ДНК в присутствии dNTP, включая по крайней мере один меченый нуклеотид, будет продуцироваться множество коротких последовательностей меченой ДНК (рис. 5.30). Для мечения случайного праймера радиоактивной или нерадиоактивной меткой может также использоваться полимеразная цепная реакция (разд. 5.10.5).

Следующим традиционным методом мечения ДНК является процесс ник-трансляции. Используют низкие концентрации ДНКазы I, чтобы сделать случайные одноцепочечные разрывы (ники) в двухцепочечной ДНК, применяемой как ДНК-зонд. ДНК-полимераза затем заполняет ники, используя подходящие dNTP, одновременно делая новый разрыв на 3'-стороне предыдущего (рис. 5.31). Таким образом разрыв переносится вдоль ДНК. Если в реакционную смесь добавляют меченые dNTP, они используются для заполнения разрывов, и таким образом может быть получена меченая ДНК с очень высокой специфической активностью.

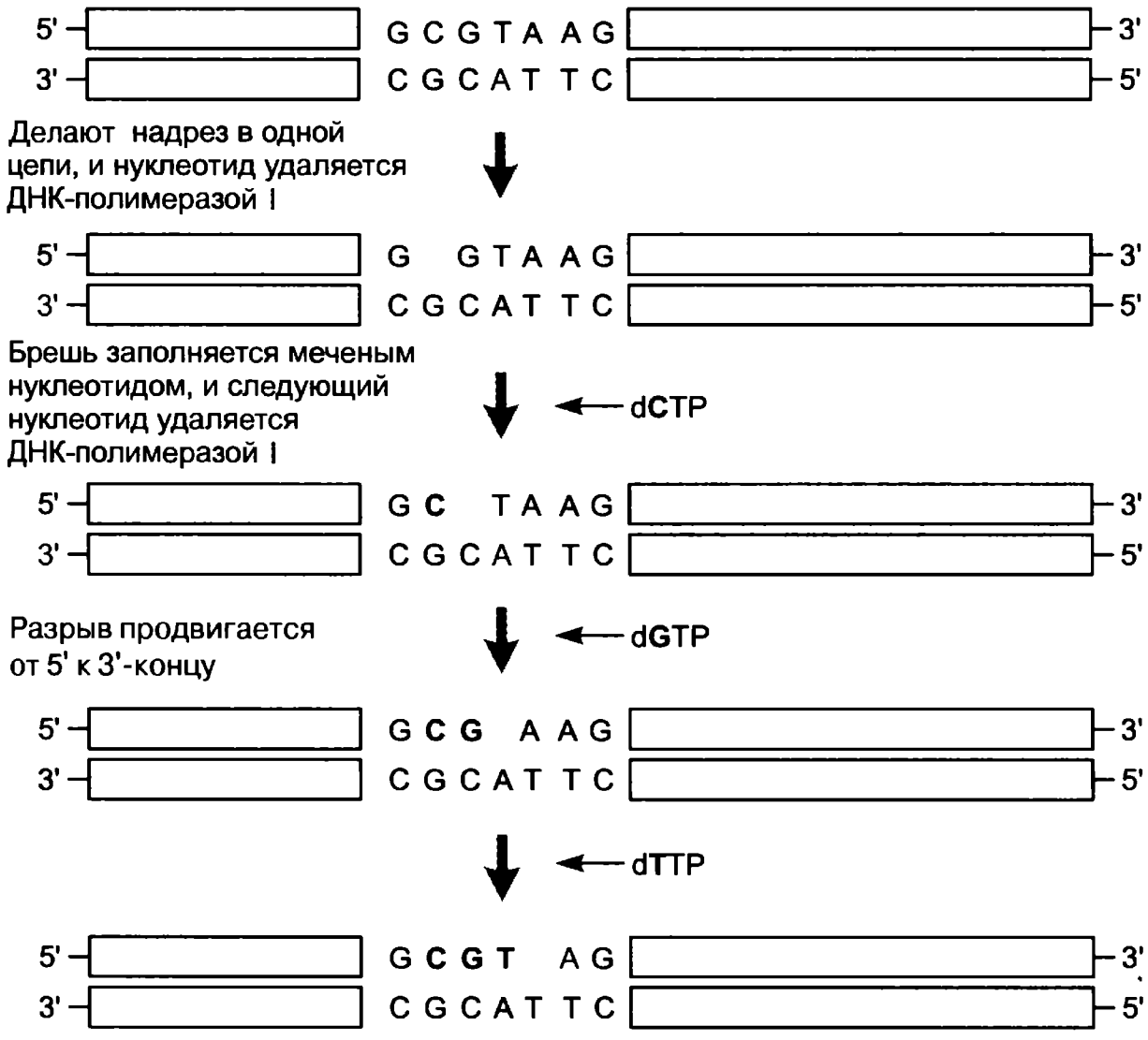


Рис. 5.31. Ник-трансляция. Удаление нуклеотидов и их замещение мечеными нуклеотидами с помощью ДНК-полимеразы I усиливает мечение ДНК-зонда по мере продолжения ник-трансляции

5.9.7 Молекулярные зонды-маяки

Новым достижением в дизайне меченых олигонуклеотидных зондов для гибридизации являются **молекулярные маяки** (beacon-based probes). Эти зонды содержат флуорофор на одном конце и молекулу тушителя на другом. Олигонуклеотид имеет шпилечную структуру, в которой флуорофор и тушитель находятся в тесной близости. Структура петли должна быть комплементарной последовательности-мишени. Когда образуется шпилечная структура, флуорофор тушится за счет резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET, fluorescence resonance energy transfer), т. е. энергия переносится от флуорофора к тушителю и выделяется в виде тепла. Изюминка таких зондов заключается в том, что при гибридизации с последовательностью-мишенью петля и стебель расходятся, тушение исчезает и происходит выделение света от флуорофора при возбуждении. Такие типы зондов также были использованы для детекции продуктов амплификации нуклеиновых кислот, например в полимеразной цепной реакции (ПЦР), и обладают тем преимуществом, что позволяют избежать этапа удаления негибридизованных зондов.

5.10 ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ*

5.10.1 Теоретические основы

Полимеразная цепная реакция, или ПЦР, является одним из основных методов молекулярной биологии. Одна из причин такого широкого внедрения ПЦР состоит в элегантной простоте реакции и относительной легкости практического исполнения. Действительно, в комбинации с подходящими биоинформатическими источниками для дизайна и определения необходимых экспериментальных условий, этот метод позволяет быстро идентифицировать и анализировать ДНК. Он сделал доступными исследования клеточных и молекулярных процессов для тех, кто не работает в области молекулярной биологии.

ПЦР используют для амплификации определенного фрагмента ДНК из сложной смеси исходного материала, обычно называемого **ДНК-матрицей**, и во многих случаях для ПЦР нет нужды в высокой степени очистки ДНК. С другой стороны, метод требует знания последовательностей, фланкирующих фрагмент ДНК, который необходимо амплифицировать (**ДНК-мишень**). Исходя из этой информации могут быть химически синтезированы два **олигонуклеотидных праймера**, каждый из которых комплементарен последовательности ДНК на 3'-конце ДНК-мишени, один олигонуклеотид для каждой из двух цепей ДНК (рис. 5.32). Этот метод в некотором смысле аналогичен процессу репликации ДНК в клетках, поскольку имеет такой же результат — получение новых комплементарных фрагментов ДНК на основе уже существующих. ПЦР часто заменяет

---

* См. примечание на с. 5.

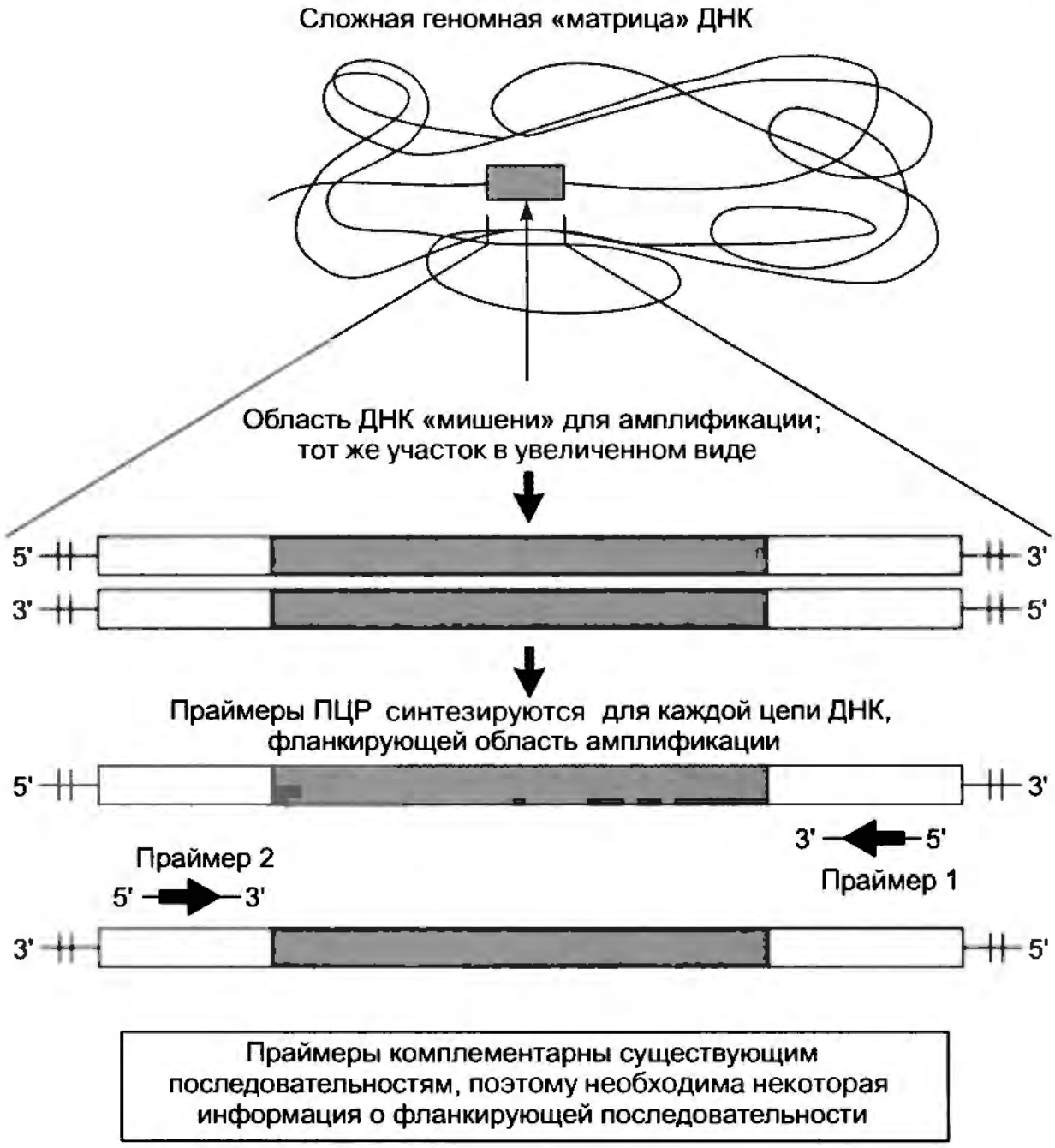


Рис. 5.32. Расположение праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Праймеры для ПЦР разрабатываются для последовательностей, соседних с областью, которую необходимо амплифицировать из сложного исходного материала геномной матрицы ДНК

традиционные методы клонирования ДНК, поскольку при этом достигается тот же результат — синтез больших количеств ДНК из ограниченного исходного материала, но за гораздо меньшее время, чем требуется для клонирования фрагмента ДНК (гл. 6). Метод ПЦР не лишен недостатков, но все же это выдающееся достижение, изменившее подход многих ученых к анализу нуклеиновых кислот; этот метод продолжает оказывать глубокое влияние на развитие биологических наук и биотехнологии.

5.10.2 **Стадии ПЦР**

ПЦР включает три стадии: (1) **денатурация**, (2) **отжиг** и (3) **достраивание цепи**. Каждая из этих стадий повторяется 30–40 раз, образуя

циклы ЦПР (рис. 5.33). На первой стадии двухцепочечную матрицу ДНК денатурируют с помощью нагревания до 90 °С. В результате внутри сложной ДНК становится доступной область, которая должна быть специфично амплифицирована (мишень). Затем температуру понижают до 40–60 °С. Точная температура является критичной и должна быть определена и оптимизирована для конкретной системы ПЦР. Одним из методов оптимизации является **тачдаун** (touchdown) **ПЦР**, для чего используется программируемый термостат, чтобы постепенно уменьшать температуру отжига до тех пор, пока не достигается оптимум. Неоптимальные условия реакции могут привести к образованию побочных продуктов в дополнение к специфическим, либо могут полностью воспрепятствовать образованию амплифицированных продуктов. Стадия отжига состоит в гибридизации двух олигонуклеотидных праймеров, которые присутствуют в избытке, чтобы связаться с комплементарными участками, фланкирующими ДНК-мишень. Отожженные олигонуклеотиды действуют как праймеры для синтеза ДНК, поскольку они имеют свободную 3'-гидроксильную группу для ДНК-полимеразы. Стадия синтеза ДНК завершается удлинением цепи и выполняется термостабильной ДНК-полимеразой, в большинстве случаев *Taq* ДНК-полимеразой.

Синтез ДНК происходит с обоих праймеров до тех пор, пока новая цепь не вытягивается вдоль амплифицируемой ДНК-мишени и за ее пределы.

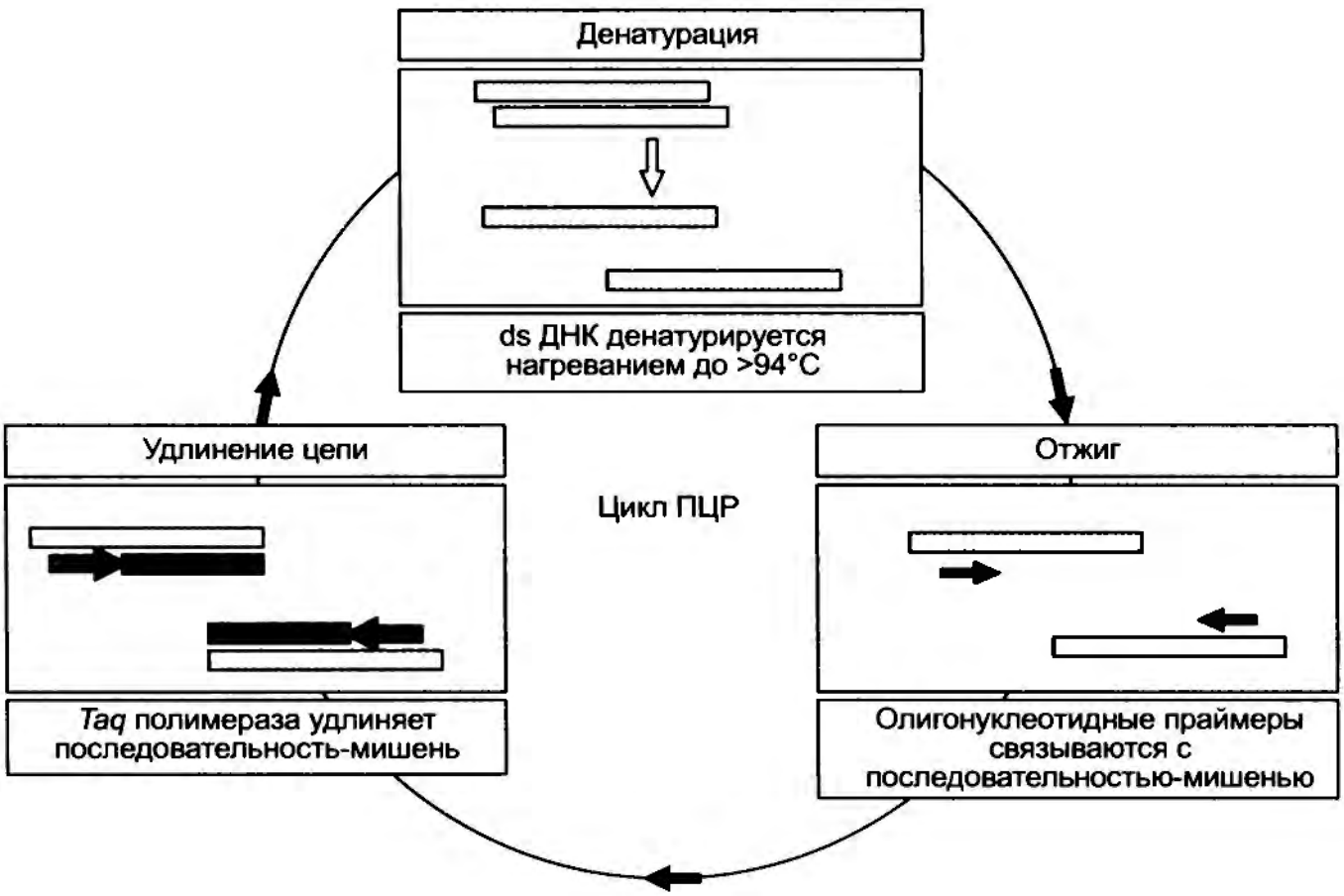


Рис. 5.33. Упрощенная схема одного цикла ПЦР, состоящего из денатурации, отжига и достраивания цепи. ds (double stranded) — двухцепочечная ДНК

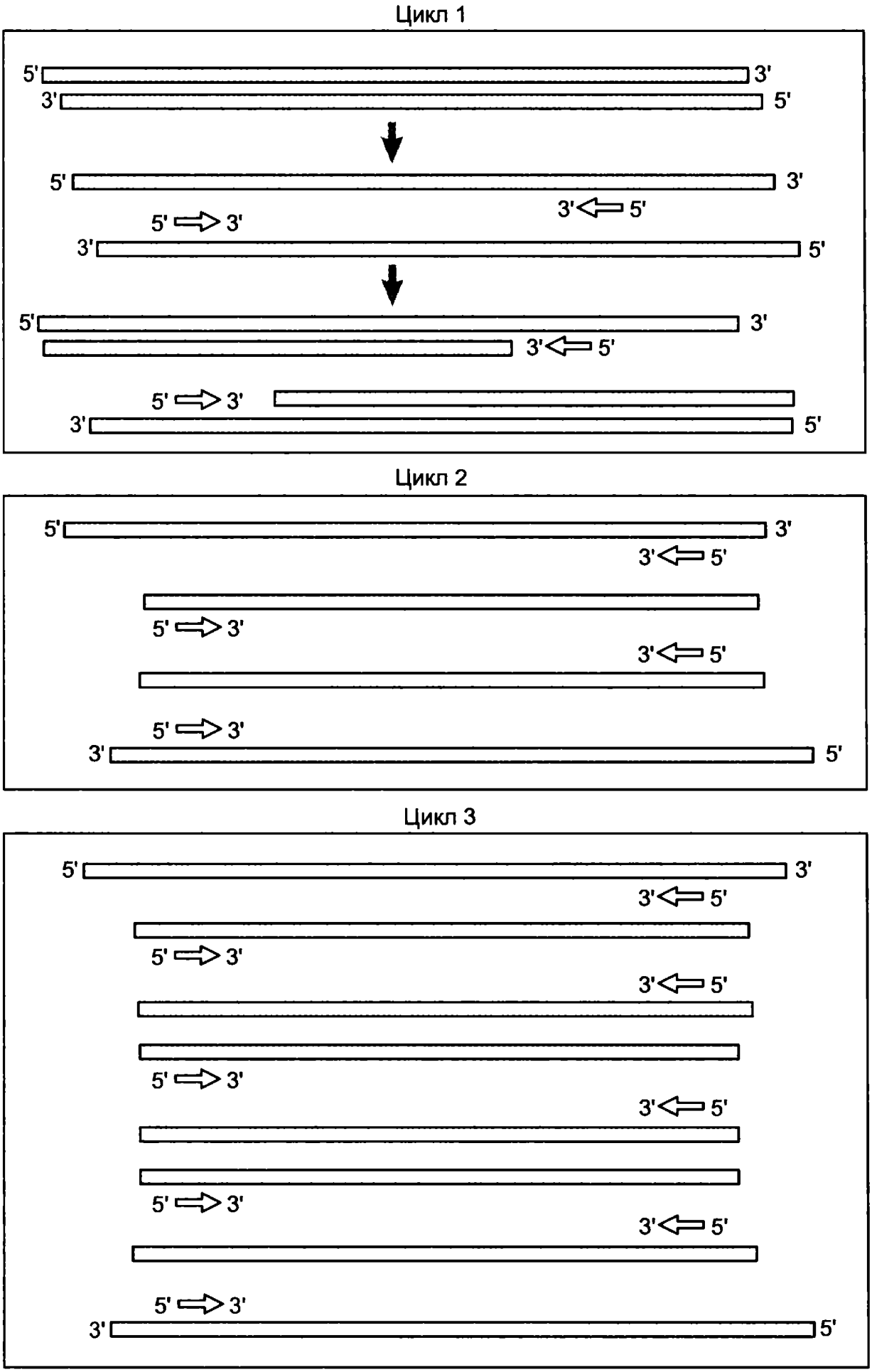


Рис. 5.34. Три цикла ПЦР. По мере увеличения числа циклов цепи ДНК, которые синтезируются и становятся доступными в качестве матриц, разграничиваются концами праймеров. Таким образом, достигается амплификация желаемой последовательности-мишени, фланкируемой праймерами. Праймеры отмечены как 5' и 3'

Важно отметить, что поскольку новые цепи вытягиваются за пределы ДНК-мишени, они будут содержать вблизи 3'-концов область, комплементарную другому праймеру. Таким образом, если происходит другой цикл амплификации, то в качестве матрицы будет использоваться не только исходная цепь, но и новые цепи. Интересно, что продукты, полученные при использовании новой цепи, имеют длину, точно ограниченную двумя областями, комплементарными праймерам. По мере того, как система проходит стадии денатурции, отжига и удлинения, все новые цепи будут действовать как матрицы, и таким образом происходит экспоненциальное увеличение количества продуцируемой ДНК. Результатом является селективное амплифицирование ДНК-мишени и фланкирующих ее праймеров (рис. 5.34).

Одной из проблем ранних реакций ПЦР было то, что при температуре, необходимой для денатурации ДНК, также происходила денатурация ДНК-полимеразы. Однако выделение термостабильной ДНК-полимеразы из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, обнаруженной в горячих источниках, обеспечило возможность автоматизации реакции. *Taq* ДНК-полимераза имеет оптимум активности при температуре 72 °C и не инактивируется при продолжительном выдерживании выше 96 °C, т. е. этот фермент активен после каждой стадии денатурации. Широкое распространение метода произошло также благодаря возможности автоматизировать реакцию, и были разработаны различные термоциклеры, которые позволяют программировать циклы для самых разнообразных условий.

5.10.3 Дизайн праймеров для ПЦР и биоинформатика

Специфичность ПЦР заключается в дизайне двух олигонуклеотидных праймеров. Они должны быть не только комплементарны последовательности ДНК-мишени, но не быть самокомплементарными или не связываться друг с другом, образуя димеры, поскольку это препятствует амплификации ДНК. Они также должны быть подобраны по G+C-содержанию и иметь сходные темературы отжига. Все более широкое использование таких программ, как Oligo, Generunner и Genefisher, в дизайне праймеров делает выбор условий реакции гораздо более простым. Эти программы позволяют выбрать последовательности, задавать длину праймера, размер продукта, G+C-содержание и т. д., а последующий анализ обеспечивает выбор соответствующих последовательностей праймеров. Без помощи биоинформатики сегодня выбор и дизайн праймеров отнимает неоправданно много времени.

Возможно также создавать праймеры с дополнительными последовательностями на 5'-конце, такими как участки-мишени для эндонуклеаз рестрикции или промоторные последовательности. Однако подобные модификации требуют, чтобы условия отжига были изменены. Было разработано несколько методов ПЦР, где один или оба праймера возникают случайно. Это повышает произвольность встраивания праймеров

в геномные матрицы, но может увеличивать дискретность полос при анализе в гель-электрофорезе. Во многих случаях этот метод может быть воспроизводимо использован для идентификации определенных организмов или видов. Иногда его называют **методом быстрой амплификации полиморфной ДНК** (RAPD, rapid amplification of polymorphic DNA), и он был успешно использован для детекции и выделения множества патогенных штаммов бактерий. Кроме того, в настоящее время могут быть синтезированы праймеры с пришитыми метками, такими как флуорофоры, что позволяет упростить детекцию и количественный анализ (разд. 5.9.4).

5.10.4 Матрицы для ПЦР

ДНК из различных источников может быть использована как матрица для амплификации. Метод является высокочувствительным, и для успешной амплификации достаточно одной или двух молекул. Экстрация из многих прокариотических и эукариотических клеток может осуществляться просто нагреванием. Действительно, компоненты многих растворов для экстракции, такие как додецилсульфат натрия и протеинкиназа К, могут неблагоприятно повлиять на ход ПЦР. ПЦР может также быть использована, чтобы амплифицировать РНК; такой процесс называется **ПЦР с обратной транскриптазой** (ОТ-ПЦР). Сначала выполняется реакция обратной транскрипции, которая превращает РНК в комплементарную ДНК (разд. 6.2.5). В этой реакции обычно участвует фермент обратная транскриптаза, хотя некоторые термостабильные ДНК-полимеразы, используемые в ПЦР, такие как *Tth* из *Thermus thermophilus*, имеют активность обратной транскриптазы в определенных буферных условиях. Это позволяет проводить эффективный анализ продуктов транскрипции мРНК. Кроме того, метод может применяться для обнаружения латентных вирусов (определяемых стандартным ПЦР) и активных вирусов, которые реплицируются и образуют продукты транскрипции, и поэтому детектируются методом ОТ-ПЦР (рис. 5.35). Кроме того, реакция ПЦР может быть использована для определения относительных количеств продукта транскрипции.

5.10.5 Чувствительность ПЦР

Высокая чувствительность системы ПЦР является также одним из ее основных недостатков, поскольку очень большая степень амплификации делает систему уязвимой к наличию примесей. Даже следы чужеродной ДНК, например, содержащейся в частицах пыли, могут быть амплифицированы и давать ложные результаты. Следовательно, когда выполняется ПЦР, чистота является первостепенным требованием, и для этого используется специальное оборудование и в некоторых случаях — отдельные лаборатории. Иногда ранее амплифицированный продукт может также загрязнять систему ПЦР, хотя этого можно избежать с помощью ультрафиолетового облучения, чтобы повредить уже

Рис. 5.35. ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). мРНК превращается в комплементарную ДНК (кДНК) с помощью фермента обратной транскриптазы; кДНК затем используется непосредственно для ПЦР

амплифицированные продукты, так что они не могут служить в качестве матриц. Следующим интересным решением является встраивание урацила в систему ПЦР с последующей обработкой продуктов ферментом урацил-N-гликозилазой (UNG), который разрушает любые амплифицированные продукты ДНК, или **ампликоны**, со встроенным урацилом, превращая их в негодные для использования в качестве матриц. Кроме того, в большинстве методов ПЦР в настоящее время применяют «**горячий старт**» (hotstart). При этом реакционная смесь физически отделяется от матрицы или фермента. Когда начинается реакция, происходит смешивание, и таким образом удается избежать неправильного связывания праймеров.

5.10.6 Применение ПЦР

Многие традиционные методы молекулярной биологии сегодня заменены ПЦР, и возможности применения этого метода практически неограничены. Некоторые из основных методов, созданных на основе ПЦР, рассмотрены в гл. 6, а основные применения ПЦР суммированы в табл. 5.5. Успех ПЦР дал толчок к развитию других технологий амплификации, основан-

ных на применении либо термального цикла, либо нетермального цикла (изотермическая амплификация). Наиболее популярной альтернативой ПЦР является лигазная цепная реакция (LCR, ligase chain reaction). Эта реакция протекает подобно ПЦР, но термостабильная ДНК-лигаза соединяет вместе наборы праймеров, комплементарных ДНК-мишени. Далее имеет место такая же реакция экспоненциальной амплификации с выходом таких же количеств ДНК, как при ПЦР. Некоторые альтернативные методы амплификации перечислены в табл. 5.6.

Таблица 5.5. **Применения ПЦР (методы см. в гл. 5 и 6)**

Область исследований	Применение	Специфические примеры или назначение
Общая молекулярная биология	Амплификация ДНК	Скрининг генных библиотек
Получение ДНК-зондов	Продукция/мечение	Использование для гибридизаций
Анализ РНК	ОТ-ПЦР	Латентные вирусные инфекции
Судебная экспертиза	Место преступления	Анализ ДНК из крови
Выявление инфекции/ заболевания	Детекция микробов	Типирование штамма/ анализ RAPD
Анализ последовательности	Секвенирование ДНК	Возможно быстрое секвенирование
Картирование геномов	Точки ориентира в геноме	Меченые участки (STS, sequence-tagged sites)
Открытие генов	Анализ мРНК	Экспрессирующаяся маркерная последовательность (EST, expressed sequence tags)
Анализ генетических мутаций	Детекция известных мутаций	Скрининг кистозного фиброза
Количественный анализ	Количественный ПЦР	5'-Нуклеаза (метод TaqMan)
Анализ генетических мутаций	Детекция неизвестных мутаций	Методы ПЦР, основанные на электрофорезе (DGGE)
Белковая инженерия	Получение новых белков	Мутагенез на основе ПЦР
Молекулярная археология	Ретроспективные исследования	Анализ ДНК динозавров
Анализ одной клетки	Определение пола или участков мутаций в клетке	Определение пола плода
Анализ *in situ*	Исследование замороженных срезов	Локализация ДНК/РНК

RAPD — быстрая амплификация полиморфной ДНК; DGGE — денатурирующий градиентный гель-электрофорез

Таблица 5.6. **Некоторые другие методы амплификации. Существует две методологии, которые служат либо для амплификации молекул-мишеней, таких как ДНК или РНК, либо для детекции мишени и амплификации сигнальной молекулы, связанной с ней**

Метод	Вид исследования	Специфические примеры или назначение
Методы амплификации мишени		
Лигазная цепная реакция (LCR)	Неизотермальный, применяет термостабильную ДНК-лигазу	Детекция мутаций
Амплификация на основе полного генома (NASBA, nucleic acid sequence based amplification)	Изотермальный, с использованием РНК, РНКазы Н/обратной транскриптазы и ДНК полимеразы Т7	Детекция вируса, например ВИЧ
Методы амплификации сигнала		
Амплификация разветвленной ДНК (b-DNA, branched DNA amplification)	Изотермальный тест в микропланшетах, использует гибридизацию с мишенью и амплификацию сигнала	Детекция мутаций

ВИЧ — вирус иммуннодефицита человека

5.10.7 Количественный метод ПЦР в реальном времени

Одним из наиболее успешных применений ПЦР является **количественный метод ПЦР**, или К-ПЦР (Q-PCR, quantitative PCR). Этот метод позволяет использовать ПЦР для определения начальной концентрации матрицы ДНК и очень успешно применяется для измерений содержания вируса или мРНК, кодирующей белок, экспрессирующийся в аномальных количествах при различных заболеваниях. Ранние методы количественного метода ПЦР состояли в сравнении со стандартной или контрольной матрицей ДНК, амплифицированной с отдельными праймерами одновременно со специфической матрицей ДНК. Такие методы количественного определения основаны на реакциях с экспоненциальной кинетикой, и, таким образом, любые факторы, влияющие на эту реакцию, могут также влиять на результат. Другие методы состоят во встраивании радиоактивной метки посредством праймеров или нуклеотидов и их детекции с последующей очисткой ампликона. Альтернативным автоматизированным методом ПЦР в реальном времени является система детекции 5'-флуорогенной экзонуклеазы или **метод ТакМан** (TaqMan) (рис. 5.36). В простейшем варианте в реакцию добавляется связывающая ДНК краска SYBR Green. По мере накопления ампликонов SYBR Green связывается с двухцепочечной ДНК. Усиление флуоресценции краски детектируется после возбуждения. Связывание SYBR Green является неспецифичным. Кроме того, чтобы детектировать специфические ампликоны, вместо

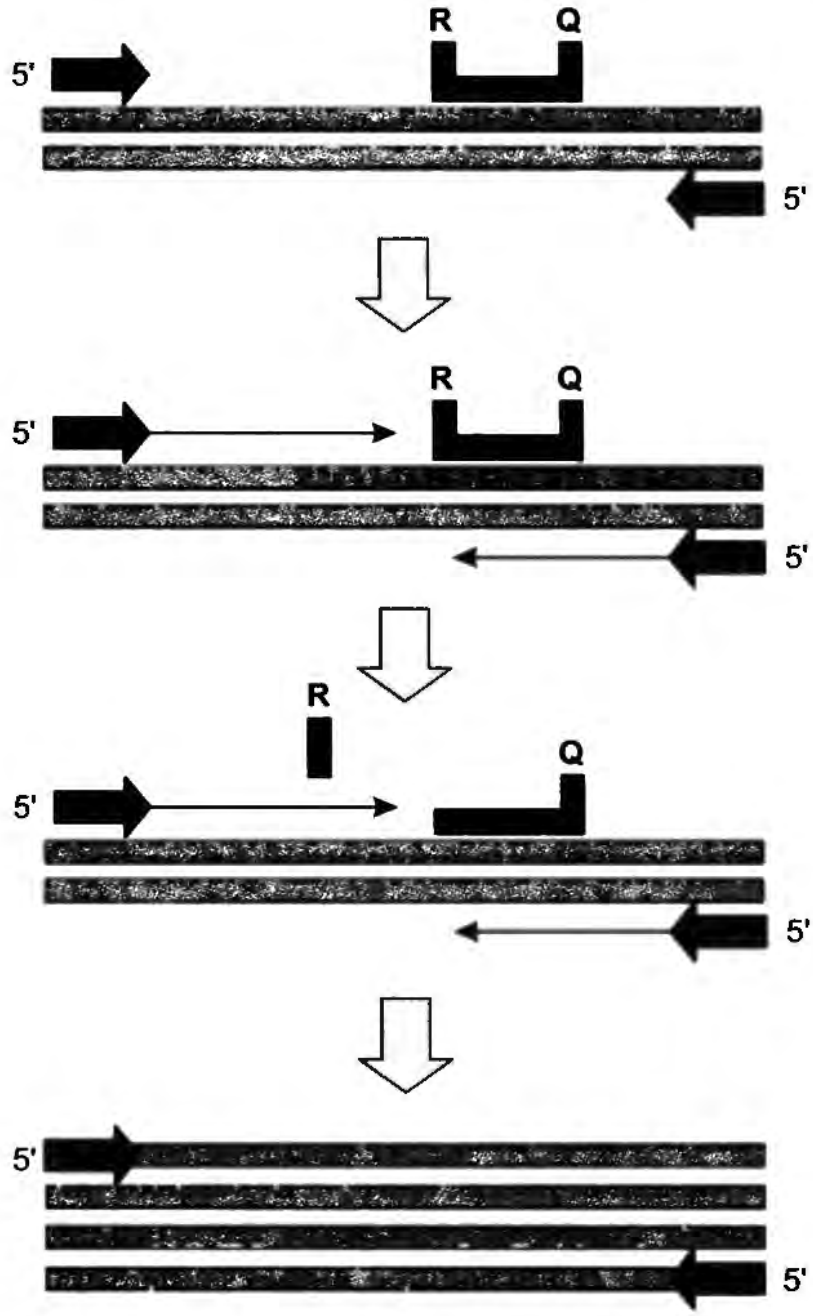


Рис. 5.36. Метод 5'-нуклеазы (метод TaqMan). Выполняют ПЦР с RQ-зондом (reporter/quencher dye, краситель репортер/тушитель). Поскольку R-Q находятся в тесной близости, флуоресценция тушится. Во время достраивания цепи с помощью *Taq* полимеразы зонд расщепляется, поскольку *Taq* обладает 5'-нуклеазной активностью. При расщеплении RQ-зонда высвобождается репортер. Это приводит к значительному усилению флуоресценции и позволяет проводить детекцию в реальном времени

SYBR Green в реакцию включаются олигонуклеотидные зонды, меченные на концах с помощью молекул репортера и тушителя. Когда олигонуклеотидный зонд связывается с последовательностью-мишенью, 5'-экзонуклеазная активность *Taq* полимеразы разрушает ДНК и отделяет репортер от тушителя. Таким образом генерируется сигнал, который увеличивается пропорционально количеству исходных молекул. В итоге система детекции способна индуцировать и детектировать флуоресценцию в реальном времени по мере того, как происходит ПЦР. Для этого используют специальный термальный циклер, например **световой циклер** фирмы Roche для определения уровней экспрессии — простое и надежное

приспособление, дающее быстрый результат. Кроме количественного анализа метод ПЦР в реальном времени может также применяться для генотипирования и для точной детекции температуры плавления ампликона с помощью анализа кривой плавления.

Этот метод позволяет точно идентифицировать ампликон и также предлагает потенциальные возможности для определения мутаций и SNPs. Дальнейшее развитие методов ПЦР привело к появлению таких систем праймеров, как Amplifluor, Scorpion и LUX.

5.11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК (СЕКВЕНИРОВАНИЕ)

5.11.1 Теоретические основы определения нуклеотидной последовательности ДНК

Определение порядка или последовательности оснований в ДНК является одним из центральных методов молекулярной биологии. Хотя в настоящее время можно с достаточной степенью надежности получать информацию о последовательности аминокислот, часто удобнее и бытрее анализировать ДНК. Знание точного использования кодонов, информация относительно мутаций и полиморфизмов, идентификация регуляторных последовательностей, контролирующих ген, — все это возможно также только при анализе последовательности ДНК. Для определения нуклеотидной последовательности разработаны два подхода: один, основанный на ферментативном методе, часто называют **секвенированием по Сенгеру**, и химический метод Максама–Гилберта. В настоящее время секвенирование по Сенгеру является довольно популярным методом — для него в распоряжении имеются многочисленные коммерческие наборы. Однако в определенных случаях, например при секвенировании коротких олигонуклеотидов, наиболее подходящим является метод Максама–Гилберта.

Одним из условий для определения последовательности ДНК по Сенгеру является то, что секвенируемая ДНК должна быть в одноцепочечной форме*. Традиционно это достигалось путем встраивания и клонирования анализируемых фрагментов ДНК в специализированный вектор на основе бактериофага M13, который является одноцепочечным (разд. 6.3.3). Хотя M13 до сих пор широко используется, появление ПЦР обеспечило возможность не только амплификации любой геномной области или кДНК, но также очень быстрое получение соответствующих нуклеотидных последовательностей. Это привело ко взрыву в накоплении информации о последовательностях ДНК и дало сильный толчок для открытия генов и возникновения геномного картирования (разд. 6.9).

* Современные методы секвенирования с использованием термоциклеров прекрасно работают и с двухцепочечной ДНК. — *Прим. ред.*

Метод Сенгера является простым и элегантным и имитирует во многом природную способность ДНК-полимеразы удлинять растущую нуклеотидную цепь, используя исходную матрицу. Сначала ДНК, которую предстоит секвенировать, гибридизуют с олигонуклеотидным праймером, комплементарным последовательности, расположенной рядом с 5'-концом ДНК в векторе M13 или в ампликоне. Олигонуклеотид затем действует как праймер для синтеза второй цепи ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой (рис. 5.37). Поскольку новая цепь синтезируется с использованием ее 3'-конца, первая же полученная молекула будет комплементарна секвенируемой ДНК. Один из dNTP, использующийся для синтеза ДНК, метят ^{32}P или ^{35}S, и таким образом вновь синтезируемая цепь является радиоактивно меченной. Такую реакционную смесь инкубируют несколько минут при комнатной температуре.

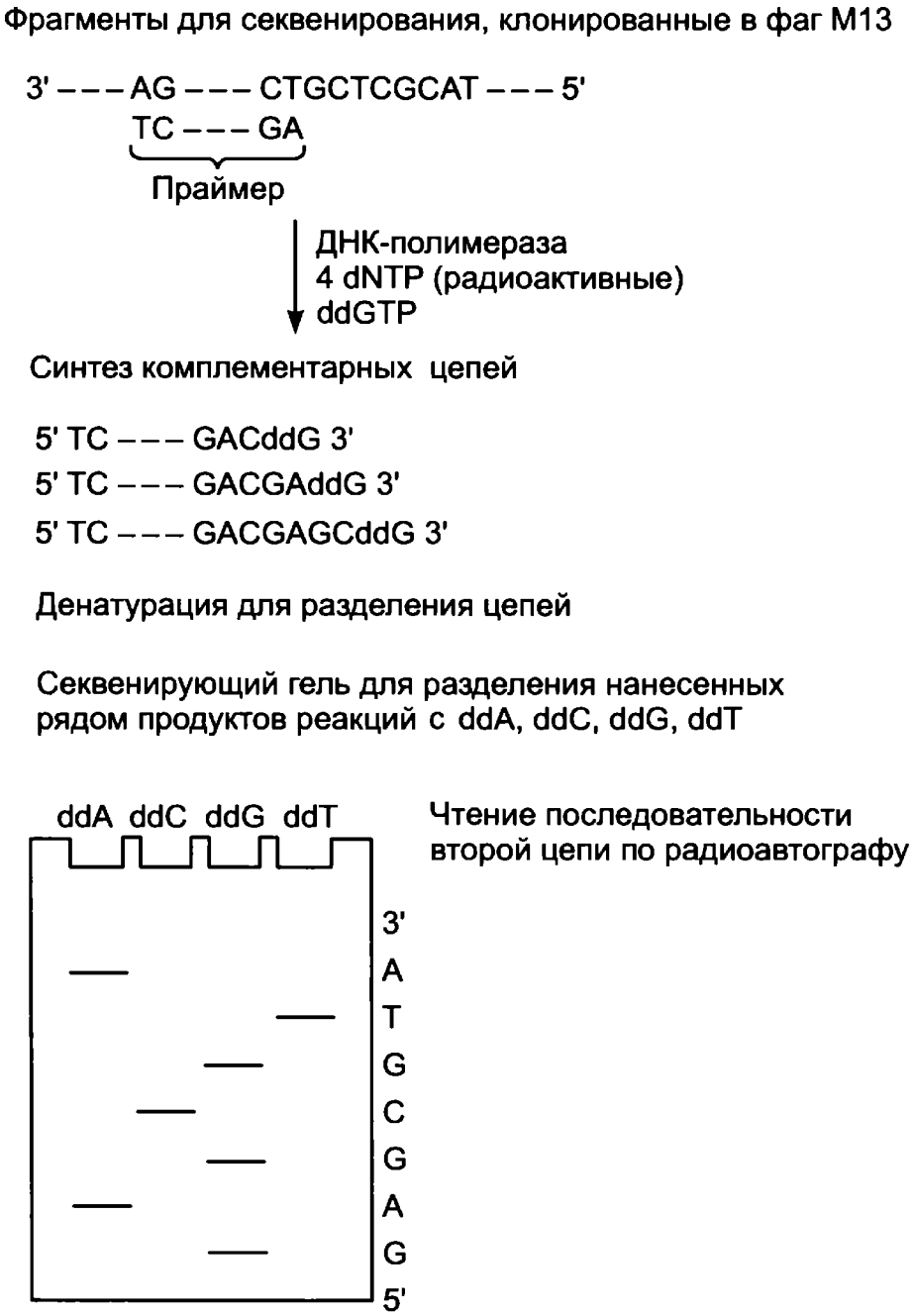


Рис. 5.37. Определение первичной последовательности ДНК по Сенгеру

5.11.2 Терминирующие дидезоксинуклеотиды

Реакционную смесь разделяют на четыре аликвоты, содержащие четыре dNTP: A, C, G и T. Кроме dNTP, находящихся в пробирке A, добавляют аналог ddATP (2'3'дидезоксиаденозинтрифосфат, ddATP), который подобен A, но не имеет 3'-гидроскильной группы и поэтому его встраивание будет останавливать растущую цепь, поскольку 5'→3'-фосфодиэфирная связь не может быть образована без 3'-гидроскильной группы. Идентичной является ситуация для пробирки C, за исключением того, что туда добавляют ddCTP; подобным же образом пробирки G и T содержат соответственно ddGTP и ddTTP.

Поскольку включение ddNTP вместо dNTP является случайным событием, реакция будет приводить к образованию новых молекул разной длины, но заканчивающихся одним и тем же основанием. Таким образом, генерируется четыре набора последовательностей ДНК, заканчивающихся различными основаниями, но имеющих общий 5'-конец (праймер). Четыре меченых и заканчивающихся на определенный нуклеотид образца затем денатурируют нагреванием и наносят рядом на полиакриламидный гель для электрофореза. Электрофорез проводят при ~ 70 °C в присутствии мочевины, чтобы предотвратить ренатурацию ДНК, поскольку даже частичная ренатурация изменяет скорость миграции фрагментов ДНК. Очень тонкие длинные гели используют для максимального разделения разных по длине фрагментов. После электрофореза положение радиоактивных полос ДНК в геле определяют авторадиографией. Поскольку каждая полоса на дорожке с образцом ddATP должна содержать молекулы, которые заканчиваются аденином, на дорожке с ddCTP (цитозин и т. д.) это позволяет читать последовательность вновь синтезированной цепи по авторадиографу, учитывая, что с помощью геля можно определять различия в длине, равные одному нуклеотиду (рис. 5.38). В идеальных условиях с одного геля можно определить последовательности длиной до 300 оснований.

5.11.3 Прямое пиросеквенирование

Быстрое ПЦР-секвенирование стало возможным при использовании **пиросеквенирования**. Это метод определения последовательности посредством синтеза, при котором матрицу ПЦР гибридизуют с олигонуклеотидом и инкубируют с ДНК-полимеразой, ATP-сульфурилазой, люциферазой и апиразой. Во время реакции добавляют первый из четырех dNTP и, если он включается в цепь, то высвобождается пирофосфат (PP_i). Сульфурилаза ATP превращает PP_i в ATP, который используется для катализируемой люциферазой реакции превращения люциферина в гидроксилюциферин, что сопровождается испусканием видимого света. Апираза разрушает неиспользованные dNTP и ATP. Затем вновь добавляют dNTP. Полученная пирограмма используется для определения последовательности. Метод позволяет очень быстро прочитывать короткие последовательности и особенно успешно используется при определении мутаций или SNPs.

Возможно также проводить нуклеотидное секвенирование, используя непосредственно двухцепочечные молекулы, например плазмидные век-

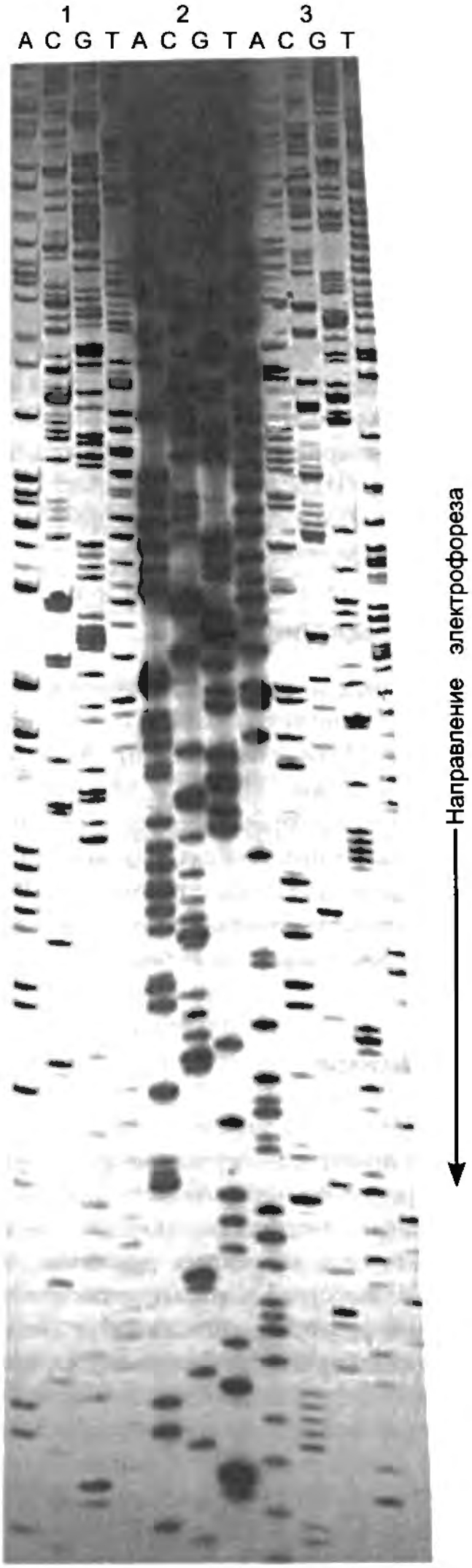


Рис. 5.38. Авторадиограф секвенирующего геля. Образцы были приготовлены по дидезокси-методу Сенгера (метод с обрывом цепи). Каждый набор из четырех образцов был нанесен в соответствующие дорожки, обозначенные A, C, G и T — зависит от дидезоксирибонуклеотида. Два набора образцов содержат метку ^{35}S (1 и 3) и один ^{32}P (2). Видно, что ^{32}P дает более темные, но более размытые полосы, чем ^{35}S, и позволяет четко различать полосы вблизи нижней области геля. Однако широкие полосы, получаемые при использовании ^{32}P, не могут быть разделены в верхней области геля, что делает невозможным чтение последовательности в этой области. Более тонкие полосы, получаемые с использованием ^{35}S, позволяют читать последовательность почти вдоль всего геля и, таким образом, можно определить более длинную последовательность ДНК из одного геля

торы для клонирования и ампликоны ПЦР. Двухцепочечная ДНК должна быть денатурирована до отжига с праймером. В случае плазмид щелочной денатурации бывает достаточно; однако для ампликона это требует больших усилий. В отличие от плазмид последовательности ампликонов короткие и быстро реассоциируют, поэтому предотвращение процесса реассоциации или смещение амплификации в сторону одной цепи при использовании соотношения праймеров 100 : 1 позволяет в некоторой степени преодолеть эту проблему. Чтобы предотвратить реассоциацию цепей ПЦР после их разделения применяют такие вещества, как формамид или DMSO*.

Возможно также выделить одну из цепей ПЦР, включая молекулу биотина в один из праймеров. После ПЦР цепь, содержащая аффинную молекулу, может быть удалена путем аффинной хроматографии со стрептавидином, в результате чего остается комплементарная цепь. Эта аффинная очистка позволяет получить одноцепочечную ДНК из ампликона и, хотя этот процесс достаточно длительный, он позволяет получить высокую степень очистки одноцепочечной ДНК для секвенирования.

5.11.4 Секвенирование с помощью термоциклирования

Одним из наиболее успешных методов секвенирования ампликонов является секвенирование с помощью циклов ПЦР. Это не совсем ПЦР, поскольку метод состоит в линейной амплификации с единственным праймером. Проводят приблизительно 20 циклов денатурации, отжига и удлинения. Затем вносят содержащие радиоактивную или флуоресцентную метку дидезоксинуклеотиды, чтобы получить продукты удлинения с обрывом цепи** (рис. 5.39). Автоматизированное прямое секвенирование с помощью ПЦР постепенно совершенствуется, позволяя анализировать более длинные ДНК за одну реакцию секвенирования, и обеспечивает более быстрые способы анализа последовательностей ДНК.

5.11.5 Автоматизированное флуоресцентное секвенирование ДНК

Успешное использование флуоресцентного красителя-терминатора и развитие химических методов мечения привело к появлению методов автоматизированного секвенирования с высокой производительностью. Большинство систем содержит дидезоксинуклеотиды, меченные различными флуорохромами. Метка включается в ddNTP, который используется, чтобы остановить синтез цепи, как в стандартной реакции, описанной в разд. 5.11.1. Преимущество этой модификации метода заключается в том, что различные метки включаются в каждый ddNTP и нет необходимости проделывать четыре отдельные реакции. Затем четыре продукта с обрывом

---

* Как отмечалось ранее, сейчас быструю денатурацию ДНК и отжиг праймеров проводят в термоциклере. — *Прим. ред.*

** На самом деле ddNTP сразу добавляют в реакционную смесь. — *Прим. ред.*

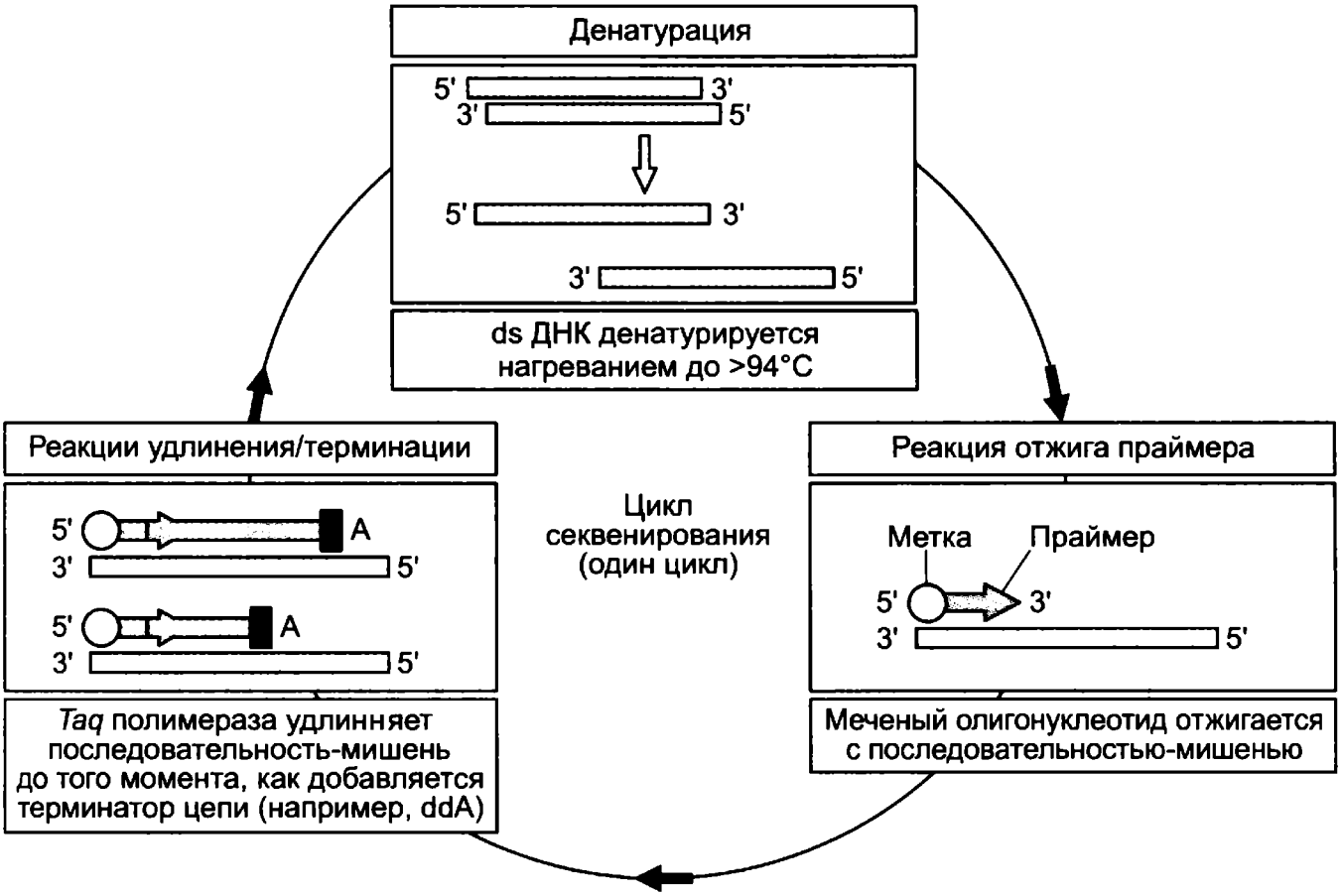


Рис. 5.39. Упрощенная схема циклического секвенирования. Имеет место линейная амплификация с использованием меченых праймеров. Во время удлинения цепи и реакции терминации встраиваются дидезоксинуклеотиды, останавливающие рост цепи. Это происходит в четырех отдельных реакциях (A, C, G и T). Продукты разделяют в полиакриламидном геле, и затем последовательность анализируют. Схема демонстрирует только события, происходящие в реакции A; ds — двухспиральная

цепи наносят в одну и ту же лунку денатурирующего геля*. Каждый продукт, несущий специфический краситель, возбуждается лазером, и краситель испускает свет определенной длины волны. Дифракционная решетка разделяет излучение, которое детектируется с помощью CCD-камеры, и последовательность интерпретируется с помощью компьютера. Преимущество метода состоит в возможности определения последовательности в реальном времени. Кроме того, могут быть анализированы последовательности длиной более 500 п.н. (рис. 5.40). Для определения продуктов секвенирования все шире используется капиллярный электрофорез. При этом применяется жидкий полимер в тонкой капиллярной трубке, поэтому нет необходимости в секвенирующем геле и требуется меньше операций. Это значительно уменьшает время проведения электрофореза и позволяет достигать высокой производительности. Серийное оборудование для секвенирования в настоящее время полностью автоматизировано; используются 96-луночные микропланшеты. Полученные последовательности могут быть автоматически перенесены в базы данных и проанализированы с помощью различных методов биоинформатики. Развитие технологии определения

* Четыре реакции проводятся, если метка находится в праймере. В случае меченых терминаторов реакция проводится в одной пробирке. — *Прим. ред.*

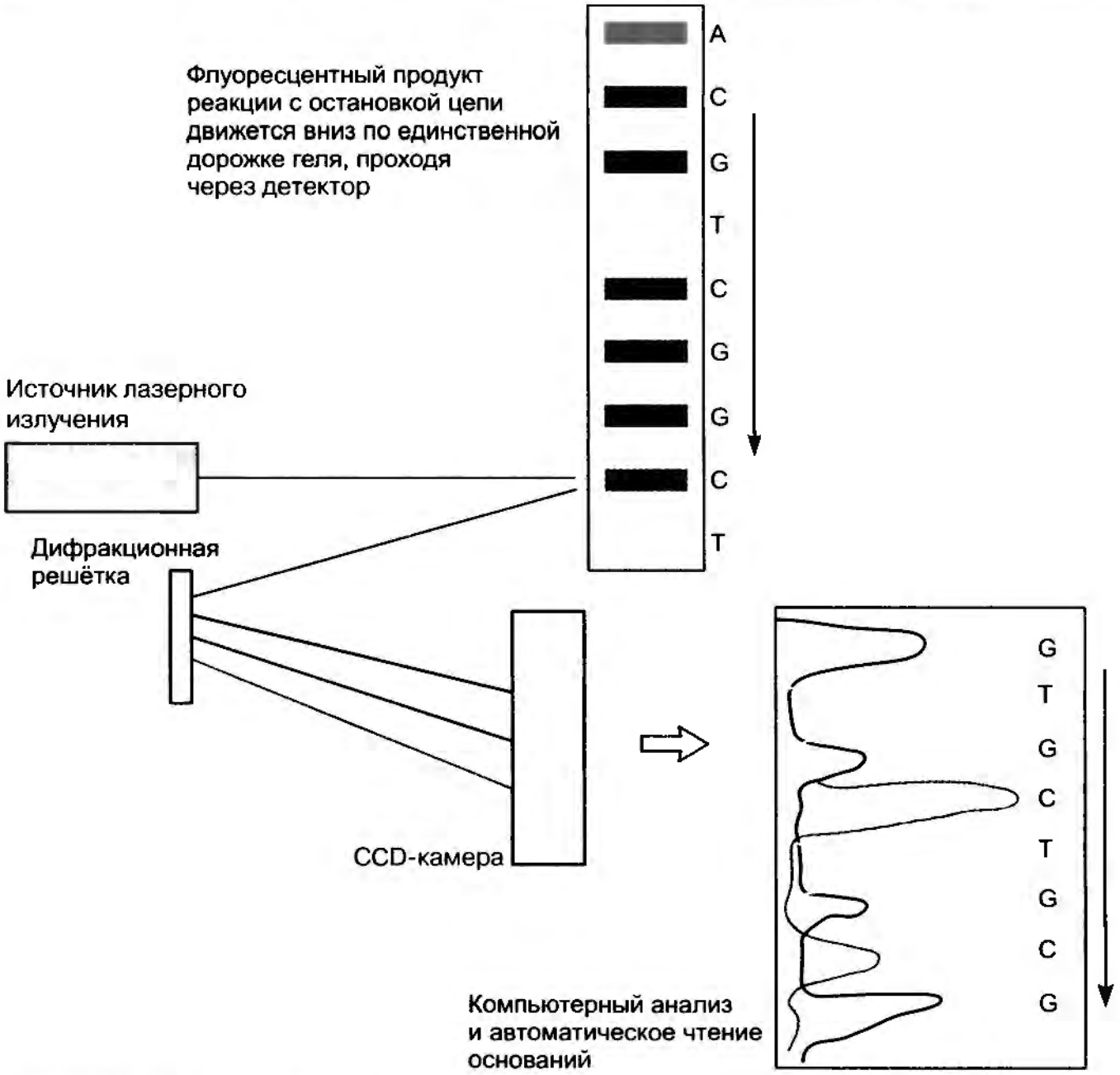


Рис. 5.40. Автоматическое флуоресцентное секвенирование с использованием геля с одной дорожкой и CCD-камерой

последовательности ДНК сделало весь проект геномного секвенирования реальным по времени, затрачиваемому на работу, и многое из намеченного уже было получено или находится в стадии завершения.

5.11.6 Определение последовательности по Максаму–Гилберту

Секвенирование по Сенгеру наиболее популярно при определении последовательности ДНК, однако иногда используется альтернативный метод, разработанный в тот же период времени. Техника химического расщепления для секвенирования ДНК была предложена А.М. Максамом и В. Гилбертом и часто используется для секвенирования малых фрагментов ДНК, таких как олигонуклеотиды, когда секвенирование по Сенгеру является проблематичным. Радиоактивную метку добавляют либо на 3'-, либо на 5'-конец двухцепочечной ДНК (рис. 5.41). Цепи затем разделяют электрофорезом в денатурирующих условиях и анализируют раздельно. Меченную на одном конце

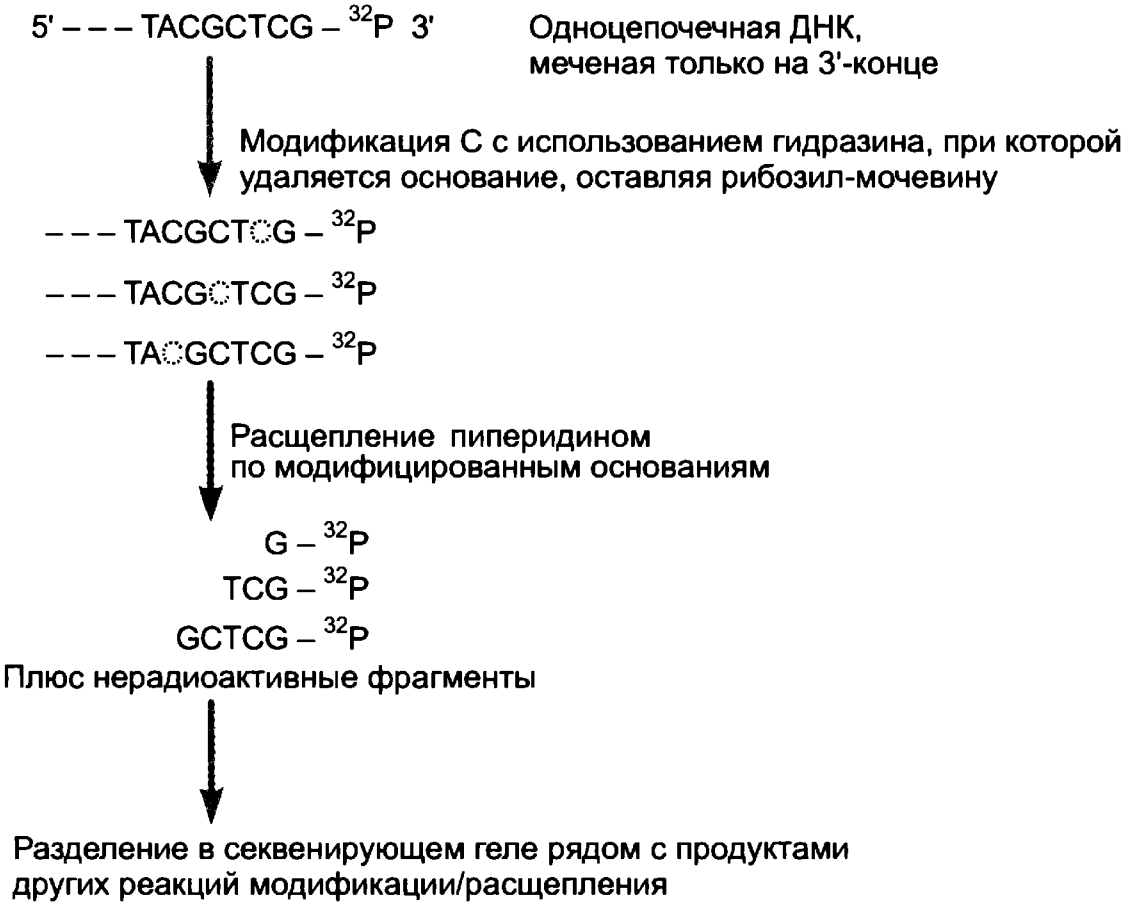


Рис. 5.41. Секвенирование ДНК по методу Максама–Гилберта. Показаны только модификация и расщепление дезоксицитидина, но три других участка меченой ДНК модифицированы и расщеплены по положениям G, G+A и T+C; продукты разделены в секвенирующем геле наряду с продуктами реакций для C

ДНК разделяют на четыре аликвоты, и каждую обрабатывают химическими реагентами, которые действуют на специфические основания путем метилирования или удаления основания. Условия выбираются так, что в среднем каждая молекула модифицируется только в одном положении по всей длине; каждое основание в цепи ДНК может быть модифицировано с равной вероятностью. После реакций модификации разделенные образцы расщепляют пиперидином, который разрушает фосфодиэфирные связи исключительно в 5'-положении нуклеотида, основание которого было модифицировано. Результат подобен тому, что получают в методе Сэнгера, поскольку каждый образец содержит радиоактивно меченные молекулы различной длины, все имеющие один общий конец (меченый конец), и другой конец, «химически» разрезанный по одному и тому же основанию. Анализ продуктов реакции производится с помощью гель-электрофореза, как это описано в методе Сенгера.

Успехи в секвенировании ДНК и метод ПЦР обеспечили возможность быстрой идентификации и анализа биологических молекул. Быстрое развитие биоинформатики в сочетании с усовершенствованием методов предсказания структуры белков привело к внедрению в исследовательскую практику новых подходов (рис. 5.42). Эти новые методы — методы *in silico* — в последующие годы, без сомнения, будут способствовать углублению понимания связей между структурой и функцией молекул и займут центральное место в исследованиях в биологических областях.

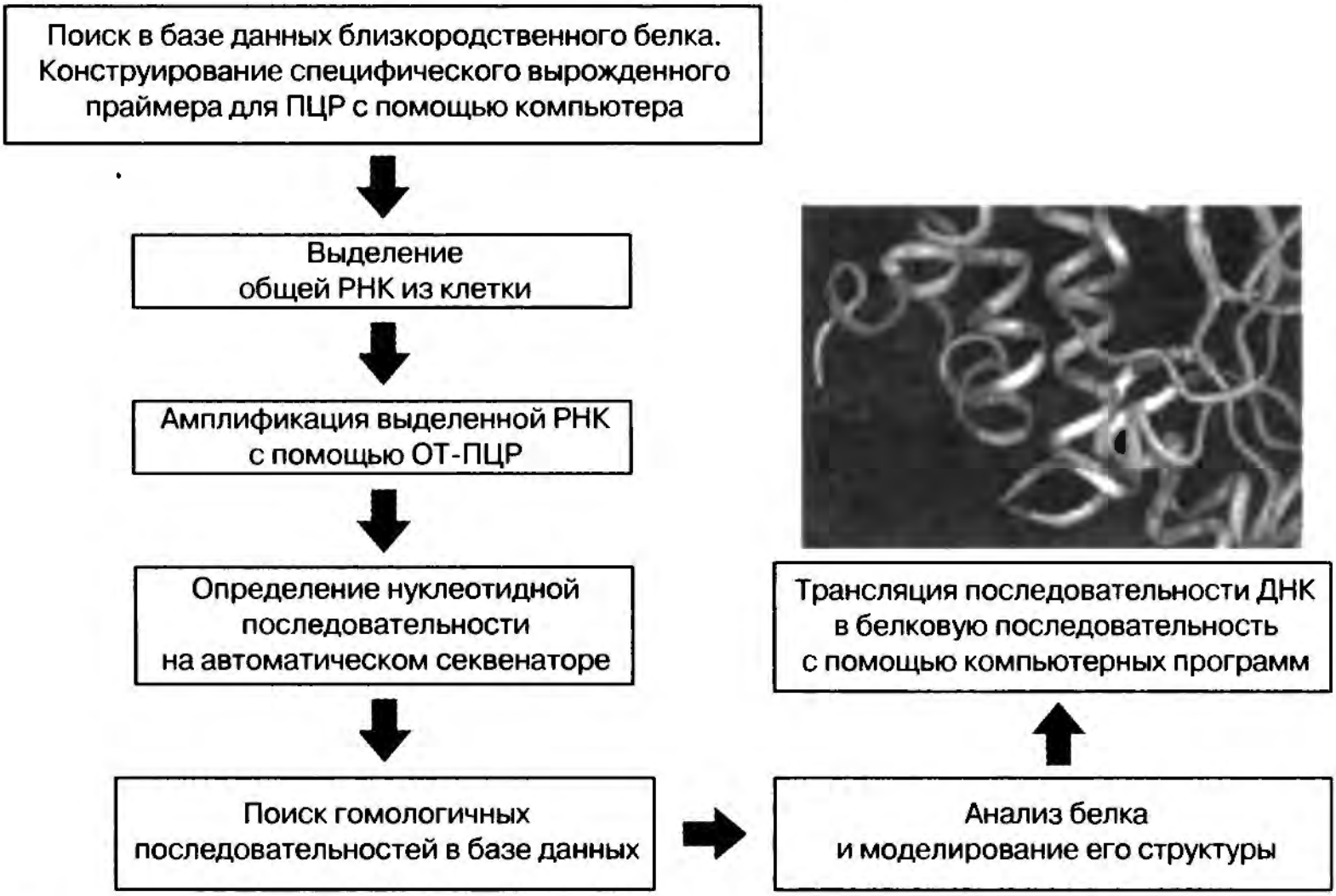


Рис. 5.42. Общая схема сбора информации о белке с помощью методов биоинформатики

5.12 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WALTER, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn. Garland Publishing, New York. Доступное изложение основ молекулярной биологии.

BROWN, T.A. (2001). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Blackwell Science, Oxford. Прекрасное введение в генетику и молекулярную биологию.

CAMPBELL, A.M. and HEYER, L.J. (2002). *Discovering Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Addison Wesley, Boston, MA. Очень полезный источник информации по геномике и биоинформатике.

NEWTON, C.R. and GRAHAM, A. (1997). *PCR*, 2nd edn. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford. Прекрасное введение в суть метода ПЦР и его применение.

RAPLEY, R. and HARBRON, S. (2004). *Molecular Analysis and Genome Discovery*. John Wiley&Sons, Chichester. Современный набор основных методов работы с белками и нуклеиновыми кислотами для создания лекарственных препаратов.

READ, A.P. and STRACHEN, T. (2004). *Human Molecular Genetics*. Garland Science, London. Прекрасный и очень понятно написанный учебник с отличными иллюстрациями.

Глава 6

Рекомбинантная ДНК и генетический анализ

6.1 ВВЕДЕНИЕ

Эпоха геномики обеспечила новый подход к пониманию биологических процессов и открытиям в этой области естествознания. Действительно, многие проекты по картированию или секвенированию генома нуждаются сегодня в новых методах анализа, таких как автоматизированный микроэррей или биоинформатика. Недавно выделились в отдельные научные направления фармакогеномика, метаболомика, системная биология, задача которых заключается в одновременном изучении большого количества образцов. Предполагается, что такой тип массивного параллельного анализа будет служить главной движущей силой в открытиях и исследованиях в ближайшие годы. Однако развивающиеся технологии молекулярной биологии и генетического анализа основываются на методах, предложенных десятилетия тому назад. Одним из краеугольных камней, лежащих в основе методов молекулярной биологии, является открытие в начале 1970-х годов рестрикционных эндонуклеаз, что привело не только к более эффективному исследованию ДНК, но и к возможности разрезать различные молекулы ДНК, чтобы затем соединять их вместе с получением новых рекомбинантных фрагментов ДНК. Возможность создания таких вновь образованных молекул провозгласила новую эру в анализе и использовании биологических молекул. Этот процесс, называемый **клонированием генов**, привел к многочисленным открытиям и проникновению в суть структуры, функционирования и регуляции генов. Методы получения библиотек генов с момента их первоначального использования постоянно совершенствуются и развиваются. Хотя полимеразная цепная реакция (ПЦР; разд. 5.10) обеспечила краткий путь к анализу генов, до сих пор методы клонирования генов не только полезны, но иногда абсолютно необходимы. В следующих главах рассматриваются процесс клонирования генов, а также другие методы, основанные на технологии рекомбинантной ДНК.

6.2 БИБЛИОТЕКИ ГЕНОВ

6.2.1 Расщепление молекул геномных ДНК

После выделения и очистки геномную ДНК можно фрагментировать с помощью ферментов, называемых рестрикционными эндонуклеазами. Эти ферменты играют важную роль в молекулярном клонировании благодаря своей специфичности к определенным последовательностям ДНК. Важно отметить, что каждая копия данной молекулы ДНК определенного организма после разрезания определенным ферментом будет давать один и тот же набор фрагментов. Разрезая сложную геномную ДНК какого-либо организма, можно воспроизводимо разделять его геном на большое количество маленьких фрагментов, каждый из которых примерно соответствует одному гену. Некоторые ферменты разрезают ДНК, давая заполненные или **тупые концы**. Другие рестрикционные ферменты делают зигзагообразные одноцепочечные надрезы, давая короткие одноцепочечные выступающие части на каждом конце разрезанной ДНК. Такие концы не только идентичны, но способны состыковываться между собой; они называются концами, способными к сцеплению, или **липкими концами**. Кроме того, 5'-концевая часть ДНК всегда сохраняет фосфатную группу.

Охарактеризовано более 600 ферментов, узнающих более 200 различных сайтов рестрикции. Выбор фермента зависит от многих факторов. Например, узнаваемая ферментом последовательность длиной 6 п.н. будет в среднем встречаться каждые 4096 (4^6) оснований, учитывая случайную последовательность в положении каждого из четырех оснований. Это означает, что геномная ДНК, разрезанная с помощью *Eco*RI, узнающего последовательность 5'-GAATTC-3', распадается на фрагменты, каждый из которых в среднем составляет лишь немного более 4 т.п.н. Ферменты, узнающие последовательности длиной 8 п.н., дают более длинные фрагменты. Поэтому очень большие геномы, такие как человеческая ДНК, обычно разрезают ферментами, образующими длинные фрагменты. Это делает последующие этапы более управляемыми, поскольку меньшее число таких фрагментов нуждается в клонировании и дальнейшем анализе (табл. 6.1).

Таблица 6.1. **Количество клонов, необходимое для представительства ДНК в геномной библиотеке**

Виды	Размер генома, т.п.н.	Количество требуемых клонов	
		фрагменты 17 т.п.н.	фрагменты 35 т.п.н.
Бактерия (*E. coli*)	4 000	700	340
Дрожжи	20 000	3 500	1 700
Дрозофила	165 000	29 000	14 500
Человек	3 000 000	535 000	258 250
Маис	15 000 000	2 700 000	1 350 000

6.2.2 Лигирование молекул ДНК

Молекулы ДНК, получающиеся после рестрикционного расщепления и образующие липкие концы, могут быть соединены с любыми другими фрагментами ДНК, обработанными таким же рестрикционным ферментом*. Таким образом, смешивание двух наборов фрагментов сцепления с липкими концами будет приводить к отжигу фрагментов, полученных из различных исходных ДНК. Конечно происходит и соединение фрагментов, полученных из одной и той же исходной ДНК, называемое **реассоциированием**. Образующиеся пары удерживаются только слабыми водородными связями между несколькими основаниями в липких концах, но они могут быть стабилизированы в процессе так называемого **лигирования** с помощью фермента, называемого ДНК-лигазой. Этот фермент, обычно выделяемый из бактериофага T4 и называемый ДНК-лигазой T4, образует ковалентную связь между концевой 5'-фосфатной группой одной цепи и 3'-гидроксильной группой противоположной цепи (рис. 6.1). Реакция является ATP-зависимой и ее обычно проводят при температуре 10 °C, чтобы снизить кинетическую энергию молекул, что уменьшает вероятность разделения липких концов до того, как их сцепление стабилизировалось лигированием. Однако необходимо длительное время реакции, чтобы компенсировать низкую ферментативную активность ДНК-лигазы при низкой температуре. Можно соединять также тупые концы молекул ДНК, хотя эффективность этой реакции намного ниже, чем для липких концов.

Поскольку лигирование реконструирует участок расщепления, рекомбинантные молекулы, полученные при лигировании липких концов, могут быть в участках сцепления вновь разрезаны с помощью того же фермента, что и для первоначально полученных фрагментов. Для того чтобы размножить разрезанную ДНК данного организма, необходимо эту ДНК соединить (или лигировать) со специализированной молекулой ДНК, на-

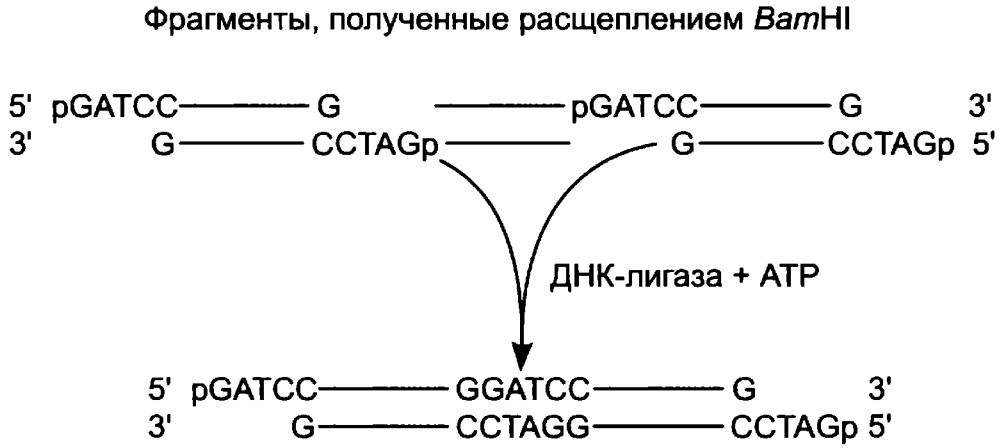


Рис. 6.1. Лигирование молекул с липкими концами. Комплементарные липкие концы сцепляются, образуя временную связь между двумя фрагментами ДНК. Такое соединение стабилизируется образованием 3' → 5'-фосфодиэфирных связей между липкими концами в реакции, катализируемой ДНК-лигазой

* Или ферментом, дающим такие же липкие концы. Правда, при лигировании сайт рестрикции теряется. — *Прим. ред.*

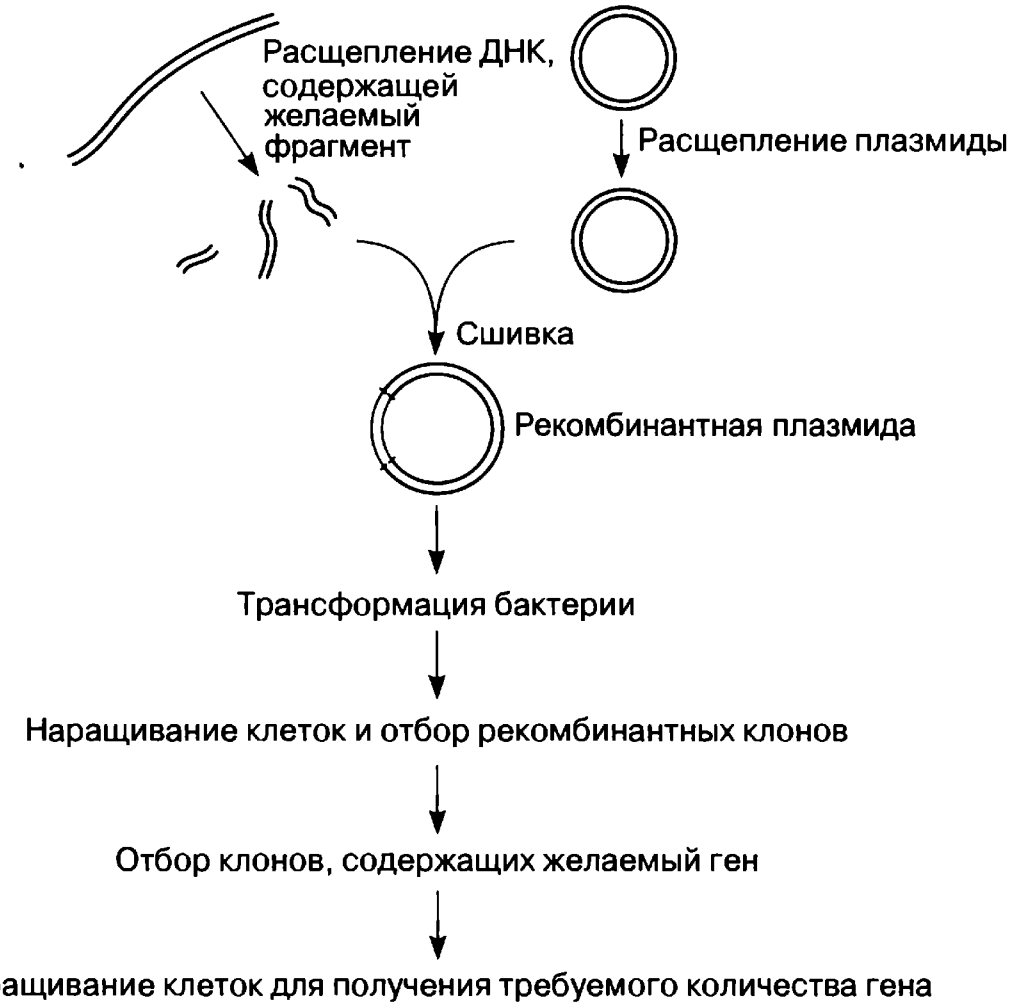


Рис. 6.2. Общая схема клонирования гена

зываемой **вектором** (разд. 6.3). Таким образом, каждый фрагмент ДНК с помощью лигирования встраивается в молекулу векторной ДНК, которая затем позволяет всей рекомбинантной ДНК реплицироваться в бактериальной клетке (рис. 6.2). В этом случае фрагмент ДНК может быть клонирован, обеспечивая значительное количество материала для дальнейшего детального анализа или дальнейших манипуляций. Таким образом, вся ДНК, полученная из данного организма и расщепленная рестрикционным ферментом, будет давать набор клонов. Этот набор клонов называется **библиотекой генов**.

6.2.3 Типы библиотек генов

Существует два основных типа библиотек генов. **Геномная библиотека**, которая состоит из хромосомной ДНК данного организма, и **библиотека кДНК** — набор матричных РНК из клетки или ткани в специфический момент времени (рис. 6.3). Выбор типа библиотеки зависит от многих факторов, наиболее важным из которых является конечное применение фрагмента ДНК, полученного из этой библиотеки. Если целью исследования является контроль продукции белка для отдельного гена или его структуры, следует использовать геномную библиотеку. Однако если задача состоит в получении новых или модифицированных белков, либо в определении тканевой специфичности экспрессии и характера времен-

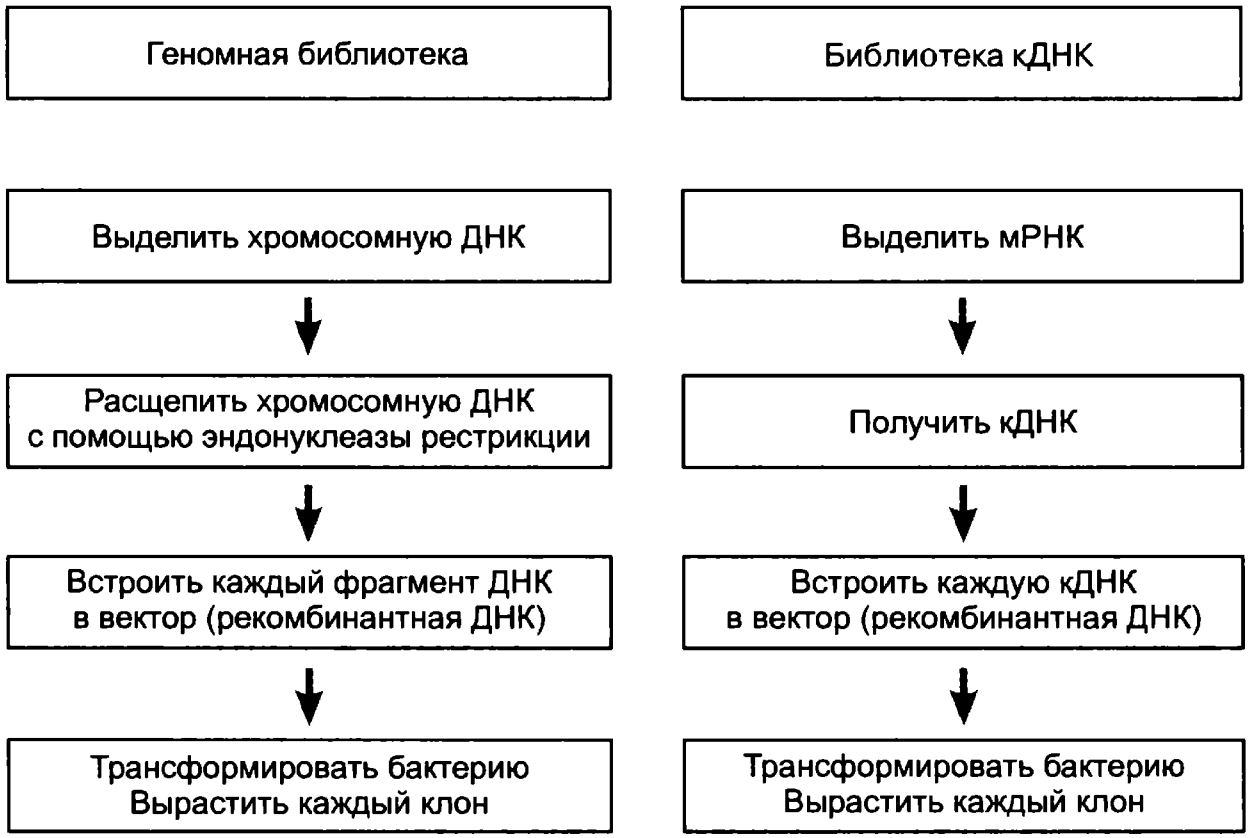


Рис. 6.3. Сравнение основных этапов конструирования геномной библиотеки и библиотеки комплементарных ДНК (кДНК)

ной зависимости, то больше подходят библиотеки кДНК. Главным фактором при выборе направления конструирования библиотеки — геномной или кДНК — является исходный материал, т. е. нуклеиновая кислота. Поскольку геном определенного организма во всех клетках одинаков, для получения геномной библиотеки хромосомную ДНК можно выделить из любой клетки. Напротив, библиотеки кДНК представляют только мРНК, полученную из клеток специфического типа в определенное время клеточного развития. Таким образом, очень важно принимать во внимание тип клеток или ткань, из которых будет получена мРНК для конструирования библиотеки кДНК.

Существует множество векторов для клонирования, многие из которых основаны на природных молекулах, таких как бактериальные плазмиды или вирусы, инфицирующие бактерии. Выбор вектора также зависит от того, какая именно библиотека будет создаваться. Различные типы векторов рассматриваются более детально в разд. 6.3.

6.2.4 Геномные библиотеки

Геномные библиотеки конструируют путем выделения хромосомной ДНК из клетки и разрезания ее на фрагменты желаемой длины рестрикционными эндонуклеазами. Этого можно достичь **частичной рестрикцией** ферментом, который узнает тетрануклеотидные последовательности. Полное расщепление таким ферментом будет давать большое количество очень коротких фрагментов, но, если позволить такому ферменту расщеплять ДНК только в нескольких участках рестрикции, а затем остановить реакцию,

каждая молекула ДНК будет разрезана на относительно крупные фрагменты. Средний размер фрагмента зависит от отношения концентрации ДНК и рестрикционного фермента, а также от условий и времени инкубации (рис. 6.4). Можно также получить фрагменты ДНК с помощью физического разрезания, хотя при этом концы фрагментов могут нуждаться в достраивании. Это достигается с помощью использования модифицированной ДНК-полимеразы, называемой клёновским фрагментом. Такой фермент получают расщеплением ДНК-полимеразы субтилизином, в результате чего образуется большой фрагмент, не обладающий 5' → 3'-экзонуклеазной активностью, но все еще действующий как 5' → 3'-полимераза. Такая полимераза будет заполнять любые выступающие концы разрезанной ДНК, используя подходящие дезоксирибонуклеозидтрифосфаты.

Смесь фрагментов ДНК затем лигируют в вектор и клонируют. Если образуется достаточное количество клонов, то с большой вероятностью любой фрагмент ДНК, например геномная ДНК, будет представлен по крайней мере в одном клоне. Для того чтобы количество клонов было не слишком велико, необходимы фрагменты размером около 10 т.п.н. для библиотек прокариот, тогда как для библиотек млекопитающих длина фрагмента должна быть увеличена до 40 т.п.н. Можно подсчитать количество клонов, которое должно присутствовать в геномной библиотеке, что в свою очередь гарантирует получение определенной последовательности ДНК. Известна формула:

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

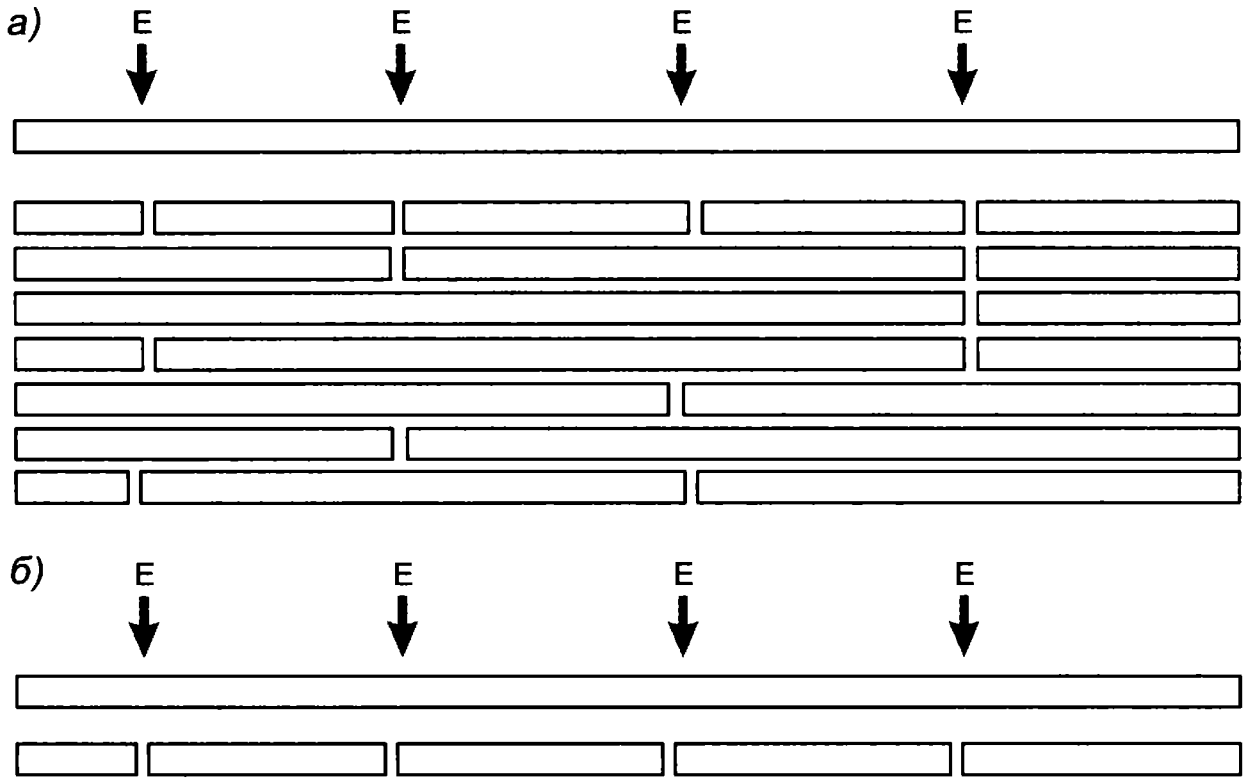


Рис. 6.4. Сравнение частичного (*а*) и полного (*б*) расщепления молекулы ДНК эндонуклеазой рестрикции (E) по специфическим сайтам

где N — число рекомбинантных клонов, P — вероятность и f — фракция генома в одной вставке. Таким образом, для хромосомной ДНК *Escherichia coli* размером $5 \cdot 10^6$ п.н. и при размере вставки 20 т.п.н. число необходимых клонов (N) составляет $1 \cdot 10^3$ с вероятностью 0,99.

6.2.5 Библиотеки кДНК

Предполагается, что в клетке существует несколько тысяч различных белков, продуцируемых одновременно, и всем им соответствуют молекулы мРНК. Чтобы идентифицировать любую из этих молекул мРНК, должны быть синтезированы клоны каждой индивидуальной мРНК. Библиотеки, представляющие мРНК в отдельной клетке или ткани, называются библиотеками кДНК. мРНК не может быть использована в клонировании напрямую, поскольку она очень нестабильна. Однако возможно синтезировать молекулы кДНК для всех мРНК из выбранной ткани. кДНК могут быть встроены в векторы и затем клонированы. Продукция кДНК осуществляется ферментом, называемым обратной транскриптазой, который выделяют из РНК-содержащих ретровирусов.

Обратная транскриптаза является РНК-зависимой ДНК-полимеразой и синтезирует первую цепь ДНК, комплементарную матрице РНК, используя смесь четырех dNTP. При этом требуется (как и для всех полимераз) присутствие короткого олигонуклеотидного праймера (рис. 6.5). Для эукариотической мРНК, обладающей poly(A)-хвостом, может быть использован комплементарный олиго(dT)-праймер. В альтернативном варианте могут применяться **случайные гексамерные праймеры**, которые отжигаются случайным образом в комплексе с мРНК. Такие праймеры обеспечивают свободную 3'-гидроксильную группу, используемую в качестве стартовой точки для обратной транскриптазы. Для того чтобы получить **первую цепь кДНК** независимо от применяемого метода абсолютным требованием является высокое качество недеградированной мРНК (разд. 5.7.2). Обычно целостность РНК проверяют гель-электрофорезом (разд. 5.7.4). Фракция экстракта также может быть использована в бесклеточной системе для трансляции, которая в присутствии неповрежденной мРНК обеспечивает синтез белков, представленных молекулами мРНК в образце (разд. 6.7).

Вслед за синтезом первой цепи ДНК к ее 3'-концу добавляется хвост poly(dC) с помощью терминальной трансферазы и dCTP. При этом также добавляется poly(dC)-хвост на poly(A)-мРНК. Затем, чтобы удалить цепь РНК, используют щелочной гидролиз, в результате чего остается только одноцепочечная ДНК, которая, подобно мРНК, может направлять синтез комплементарной цепи ДНК*. Синтез второй цепи кДНК требует олиго(dG)-праймера в паре с олиго(dC)-хвостом; процесс катализирует фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы I. Конечным продуктом является двухцепочечная ДНК, одна из цепей которой комплементарна мРНК.

* Сейчас для этого также используют специальные РНКазы, которые расщепляют РНК в дуплексе с ДНК. — *Прим. ред.*

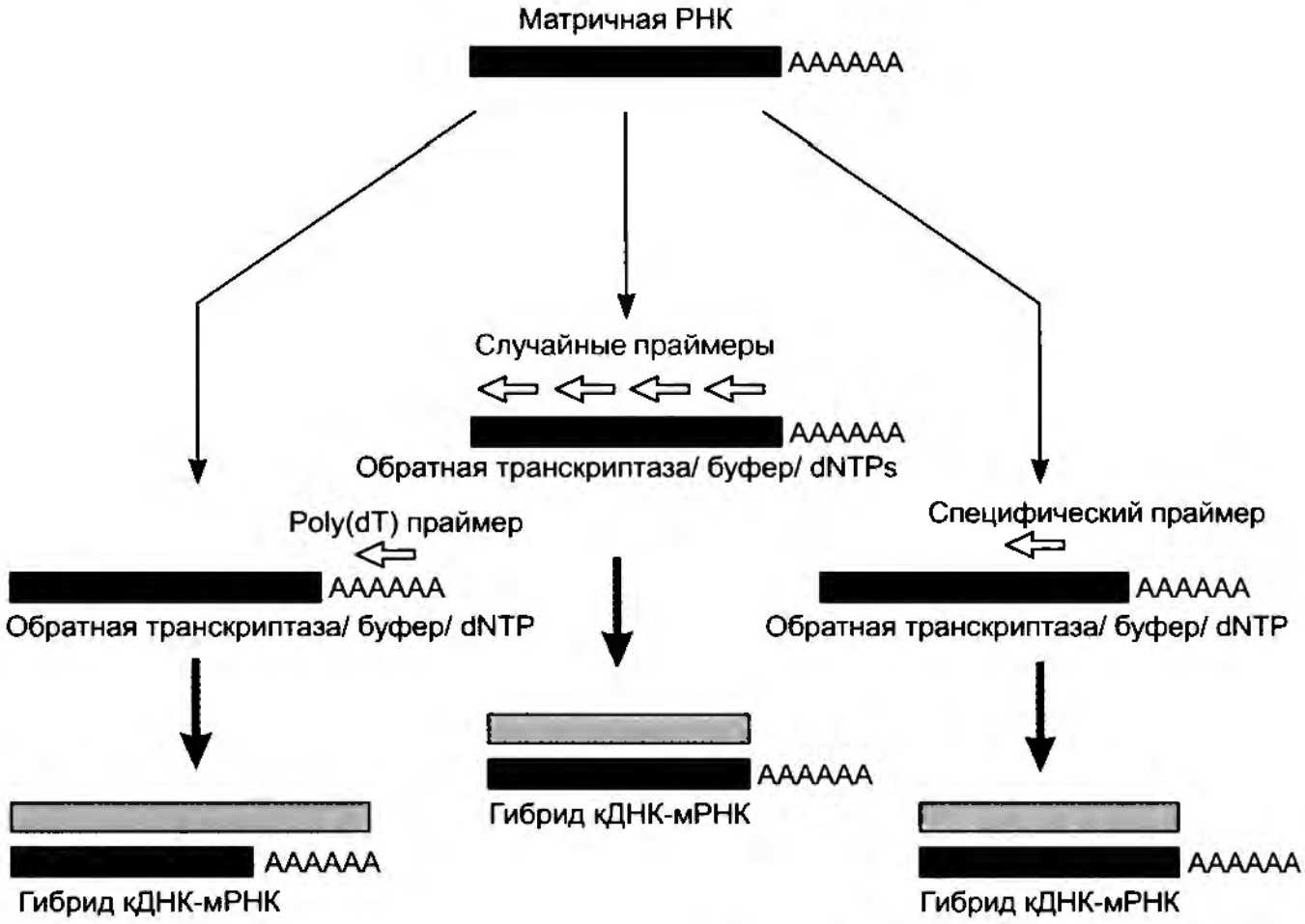


Рис. 6.5. Стратегии получения первой цепи кДНК из мРНК

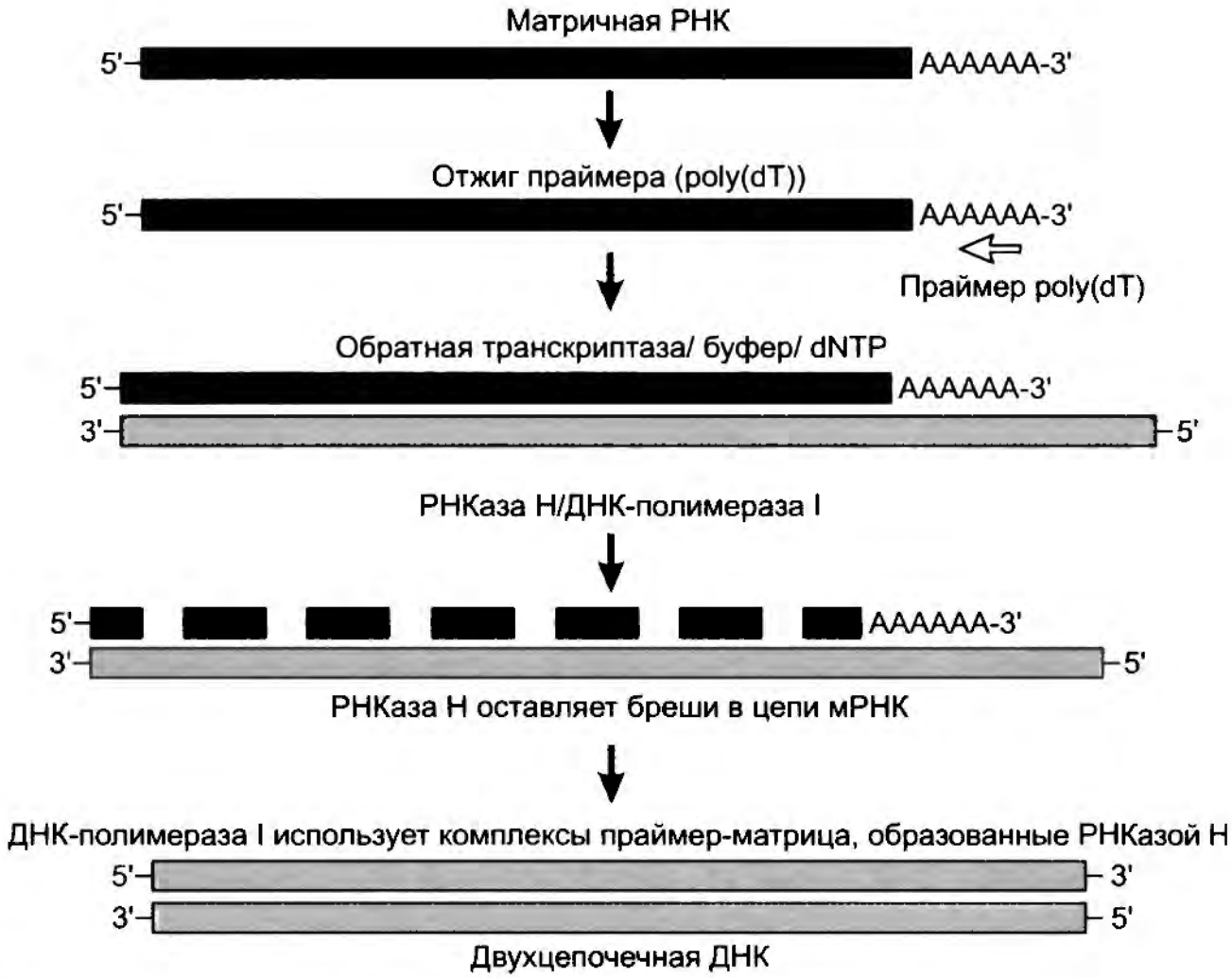


Рис. 6.6. Синтез второй цепи кДНК с использованием РНКазы H

Один из методов синтеза кДНК состоит в использовании РНКазы Н. При этом первая цепь кДНК получается, как описано выше, с помощью обратной транскриптазы, но остается гибрид мРНК-кДНК. Затем используется РНКаза Н в низких концентрациях, чтобы сделать одноцепочечные надрезы (ники) в цепи РНК. Полученные в результате ники имеют 3'-гидроксильные группы, которые служат в качестве праймера для ДНК-полимеразы, чтобы заменить РНК второй цепью кДНК (рис. 6.6).

6.2.6 Обработка тупых концов кДНК

Лигирование фрагментов ДНК с тупыми концами не настолько эффективно, как лигирование липких концов, поэтому до лигирования в клонирующие векторы необходимы дополнительные манипуляции с молеку-

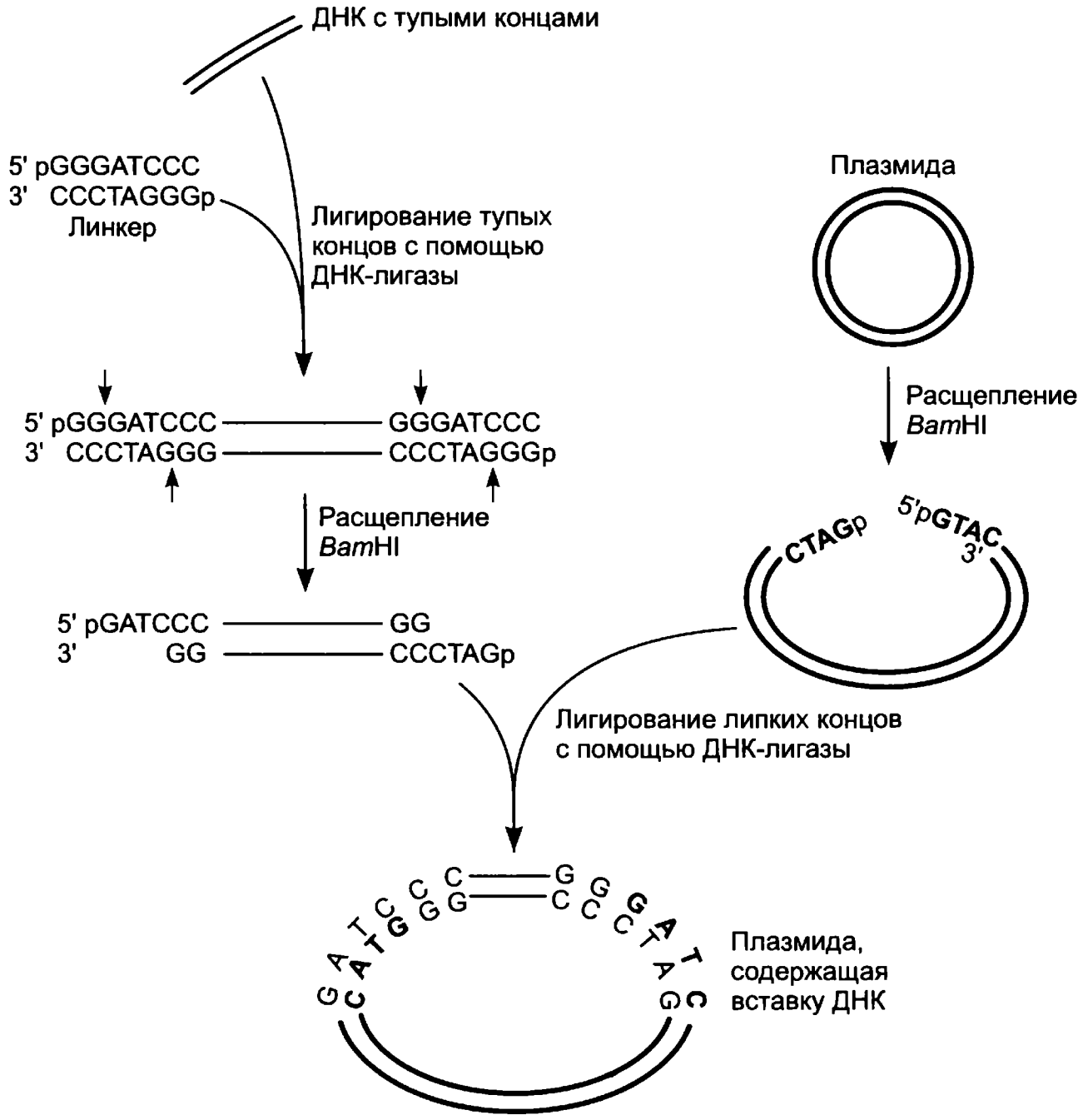


Рис. 6.7. Применение линкеров. В этом примере ДНК с тупыми концами после лигирования с содержащим сайт рестрикции линкером встраивается в такой же специфический сайт рестрикции в плазмиде

лами кДНК. Один из подходов состоит в добавлении к кДНК небольших двухцепочечных молекул, называемых **линкерами**, с одним внутренним участком для рестрикционной эндонуклеазы. Множество линкеров есть в продаже, и они обладают внутренними сайтами рестрикции для многих наиболее широко используемых рестрикционных ферментов. Линкеры по тупым концам лигируют с кДНК, но, поскольку они берутся в избытке, процесс лигирования происходит достаточно эффективно. Линкеры затем разрезают подходящим рестрикционным ферментом, образующим липкие концы для эффективного лигирования с вектором, обработанным тем же ферментом. Этот процесс можно облегчить, добавляя вместо линкеров **адапторы**, имеющие готовые липкие концы, так что при этом нет необходимости в обработке рестрикционными ферментами и в последующем лигировании (рис. 6.7).

6.2.7 Методы обогащения РНК

Часто предпринимаются попытки выделить мРНК после транскрипции желаемого гена в определенных клетках или тканях, которые продуцируют белок в достаточных количествах. Так, если клетка или ткань продуцируют основной белок клетки, большая фракция всей РНК будет кодировать этот белок. Одним из таких примеров являются β-клетки поджелудочной железы, содержащие высокий уровень проинсулиновой мРНК. В таких случаях возможно осадить **полисомы**, активно транслирующие мРНК, используя антитела к рибосомальным белкам; мРНК может быть затем высвобождена из осажденных рибосом. Чаще всего искомая мРНК является только минорным компонентом всей клеточной мРНК. В таких случаях общая мРНК может быть фракционирована по размерам с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Затем каждую фракцию используют для синтеза белков в **системе трансляции *in vitro***.

6.2.8 Вычитательная (субтрактивная) гибридизация

Зачастую гены транскрибированы в специфических типах клеток или активированы только во время определенной стадии клеточного роста, причем иногда на очень низком уровне. Такие транскрипты мРНК можно получить с помощью **вычитательной гибридизации**. При этом молекулы мРНК, общие для различных типов клеток, удаляют, оставляя для анализа мРНК, специфические для данного типа клеток или ткани (рис. 6.8). Это может быть достигнуто выделением мРНК из контрольных клеток и получением первой цепи кДНК (разд. 6.2.5). Исходная мРНК из контрольных клеток подвергается расщеплению, а мРНК из клеток-мишеней выделяют и смешивают с кДНК. Все комплементарные молекулы мРНК-кДНК, общие для обоих типов клеток, будут гибридизоваться, оставляя несвязанную мРНК, которую затем можно выделить и проанализировать. Для изучения дифференциальной экспрессии генов был разработан очень быстрый метод, использующий полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

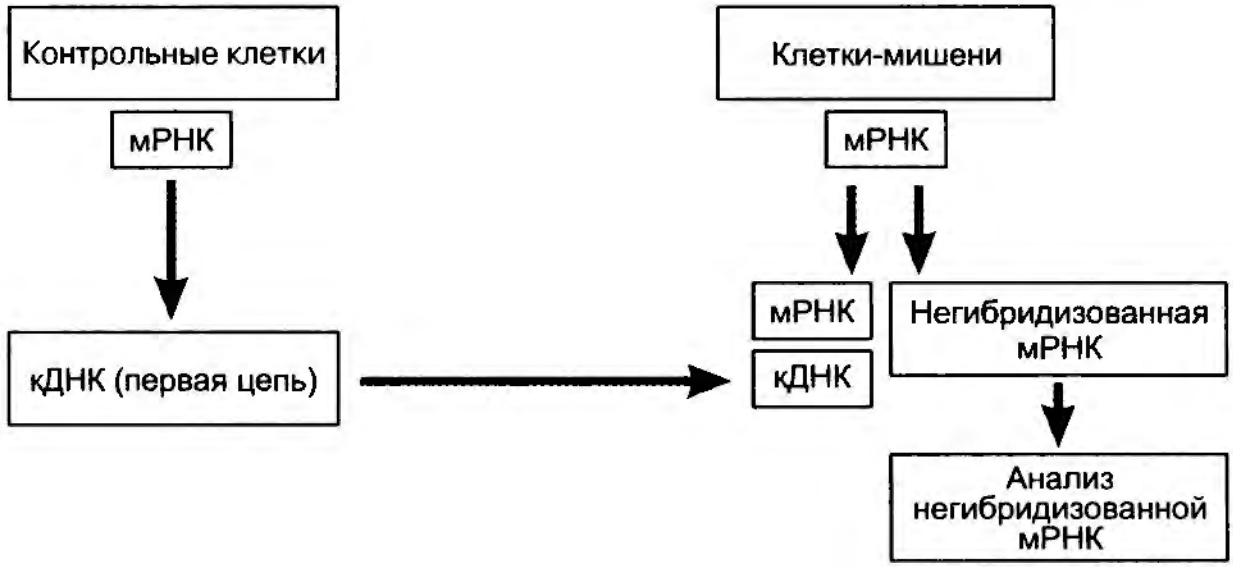


Рис. 6.8. Схема анализа специфических молекул мРНК с помощью метода вычитательной гибридизации

Этот метод, называемый дифференциальным дисплеем, рассматривается детально в разд. 6.8.1.

6.2.9 Клонирование продуктов ПЦР

Несмотря на то что ПЦР в некотором смысле вытеснила клонирование как метод получения больших количеств искомых фрагментов ДНК, иногда возникает необходимость в клонировании ДНК, амплифицированной с помощью ПЦР. Например, некоторые методы, такие как синтез белков

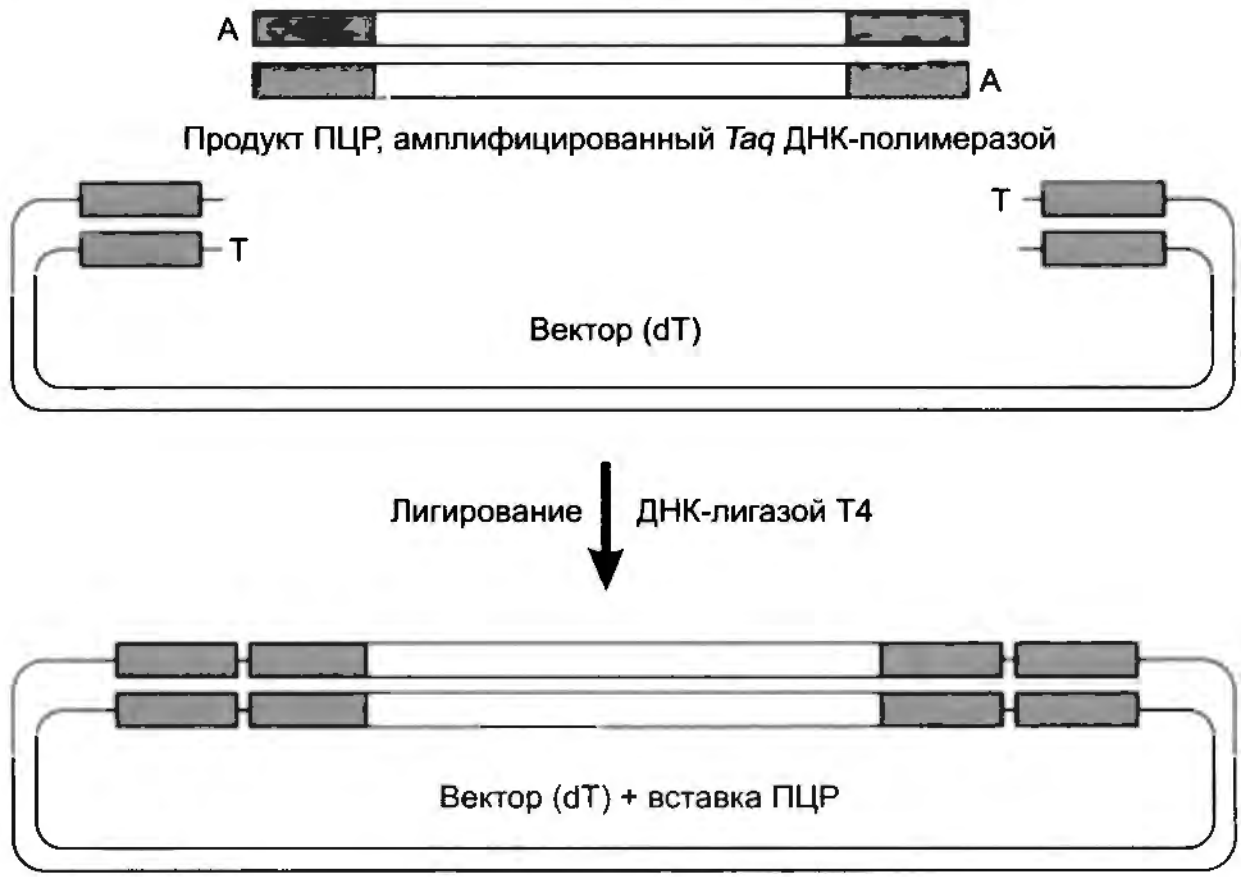


Рис. 6.9. Клонирование продуктов ПЦР с помощью метода dA : dT-клонирования

in vitro, выполняются с фрагментами ДНК, встроенными в подходящий плазмидный или фаговый клонирующий вектор (разд. 6.7.1). Методы клонирования ПЦР-продуктов идентичны таковым для клонирования фрагментов ДНК, полученных обычным путем. Существуют методы клонирования молекул с тупыми или липкими концами. Определенные термостабильные ДНК-полимеразы, такие как *Taq* ДНК-полимераза и *Tth* ДНК-полимераза, дают продукты ПЦР, имеющие 3'-выступающий остаток А. Возможно клонировать продукт ПЦР в векторы dT, это называется **dA : dT-клонированием**. При этом исходят из того факта, что терминальное выступающее основание А может быть успешно лигировано в векторы с выступающим основанием Т, что позволит эффективно лигировать продукты ПЦР (рис. 6.9). Реакция катализируется ДНК-лигазой, как в обычных реакциях лигирования (разд. 6.2.2).

Возможно также выполнять клонирование продуктов ПЦР с липкими концами. В этом случае синтезируют олигонуклеотидные праймеры с внутренними участками для рестрикционных эндонуклеаз на 5'-конце, поскольку требуется абсолютная комплементарность 3'-концов праймеров. При дизайне таких праймеров необходимо быть особо внимательными, так как эффективность расщепления определенными рестриктазами уменьшается, если на 5'-конце отсутствуют дополнительные нуклеотиды, не вовлекаемые в узнавание. В этом случае реакции расщепления и лигирования производятся таким же образом, как и при стандартных реакциях (разд. 6.2.1 и 6.2.2).

6.3 ВЕКТОРЫ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ

Для клонирования любой молекулы ДНК необходимо, чтобы эта ДНК была встроена в клонирующий вектор. Клонирующий вектор — это ДНК, которая может стабильно поддерживаться и размножаться в организме хозяина, в котором она выполняет репликативные функции. Типичный организм хозяина — бактерия *E. coli*, которая быстро растет и быстро размножается. Таким образом, любой вектор, имеющий **точку начала репликации** (ориджин репликации) *E. coli*, будет эффективно реплицироваться вместе с встроенной в него ДНК. Кроме того, клонирование в вектор позволяет проводить амплификацию встроенного фрагмента чужеродной ДНК и его последующий анализ. В этом случае процесс клонирования имеет сходство с ПЦР, хотя между двумя методами и существуют некоторые значительные различия. Так, при клонировании можно не только сохранить копию любого определенного фрагмента ДНК, но также получить его в неограниченном количестве (рис. 6.10).

Векторы, используемые для клонирования, различаются по своей сложности, легкости использования, селективности и длине последовательности ДНК (**емкости**), которую они могут встраивать. Как правило, векторы создаются на основе встречающихся в природе молекул, таких как бактериальные плазмиды, бактериофаги, или путем комбинации элементов (космиды, разд. 6.3.4). При создании библиотеки генов существует выбор

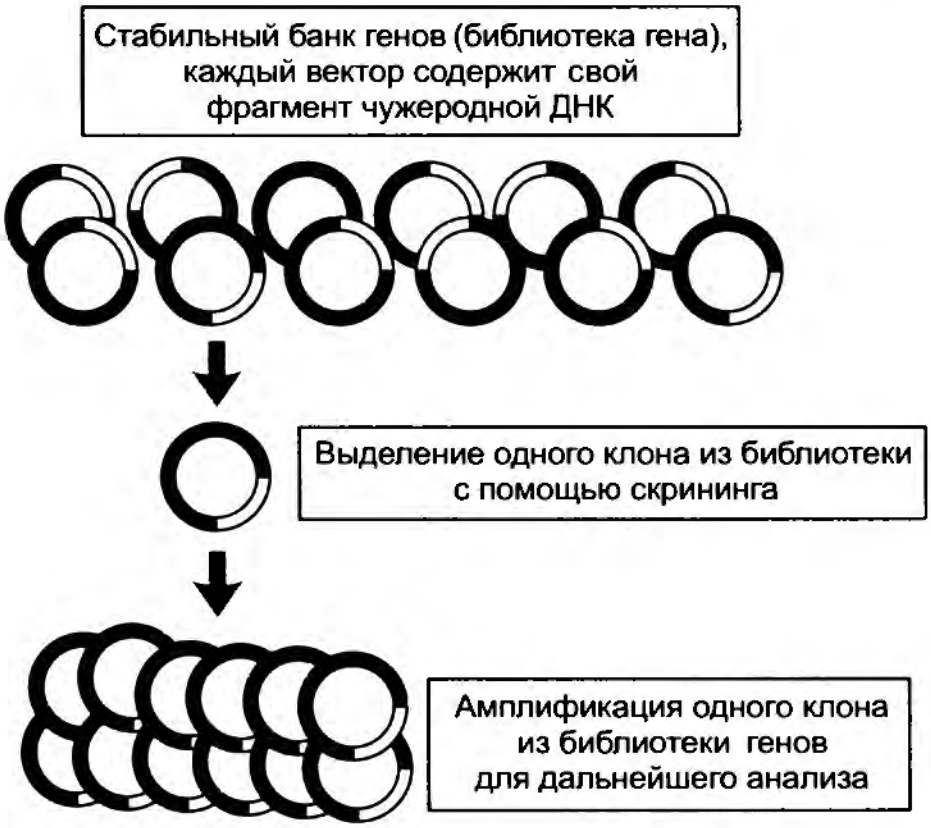


Рис. 6.10. Получение большого числа копий одного клона из стабильного банка генов или библиотеки

Таблица 6.2. **Сравнение некоторых векторов для клонирования фрагментов ДНК**

Вектор	Клетка-хозяин	Структура вектора	Размер вставки, т.п.н.
M13	*E. coli*	Кольцевой вирус	1–4
Плазмида	*E. coli*	Кольцевая плазмида	1–5
Фаг λ	*E. coli*	Линейный вирус	2–25
Космиды	*E. coli*	Кольцевая плазмида	35–45
BAC	*E. coli*	Кольцевая плазмида	50–300
YAC	*S. cerevisiae*	Линейная хромосома	100–2000

BAC, бактериальная искусственная хромосома (bacterial artificial chromosome); YAC, дрожжевая искусственная хромосома (yeast artificial chromosome).

между различными типами векторов в зависимости от легкости манипуляций при конструировании библиотеки и максимального размера вставки чужеродной ДНК (табл. 6.2). Векторами, обладающими способностью вмещать большие вставки, обычно сложнее манипулировать, хотя при использовании векторных систем необходимо учитывать гораздо больше факторов; о некоторых из них мы поговорим ниже.

6.3.1 Плазмиды

Многие бактерии содержат внехромосомную ДНК, называемую **плазмидой** — относительно небольшую, ковалентно замкнутую кольцевую молекулу, несущую гены, ответственные за устойчивость к антибиоти-

ку, конъюгацию или метаболизм «необычных» субстратов. Некоторые плазмиды реплицируются с высокой скоростью в бактериях, например, в *E. coli*, и поэтому являются отличными потенциальными векторами. В начале 1970-х гг. некоторые природные плазмиды были искусственно модифицированы и превращены в клонирующие векторы с помощью комплекса реакций расщепления и лигирования. Одна из наиболее известных и широко используемых плазмид pBR322, названная по имени ее создателей (F. Bolivar и R. Rodriguez), является примером клонирующего вектора с определенным набором элементов, как это показано ниже (рис. 6.11).

- Эта плазмида гораздо меньше по размеру, чем природная плазмида, что делает ее более устойчивой к повреждению и увеличивает эффективность поглощения бактерией в процессе **трансформации**.
- Бактериальный ориджин репликации ДНК обеспечивает репликацию плазмиды в хозяйской клетке. Некоторые ориджины репликации проявляют строгую регуляцию, при которой циклы репликации инициируются с такой же частотой, как и деление клетки. Большинство плазмид, включая pBR322, имеют ориджин репликации под ослабленным контролем, чья активность не так тесно связана с делением клетки, и таким образом репликация плазмиды будет инициироваться гораздо чаще, чем репликация хромосомы. Поэтому в клетке будет продуцироваться большое число копий плазмиды.
- Было встроено два гена, кодирующих устойчивость к антибиотикам. Один из них позволяет осуществлять селекцию клеток, которые содер-

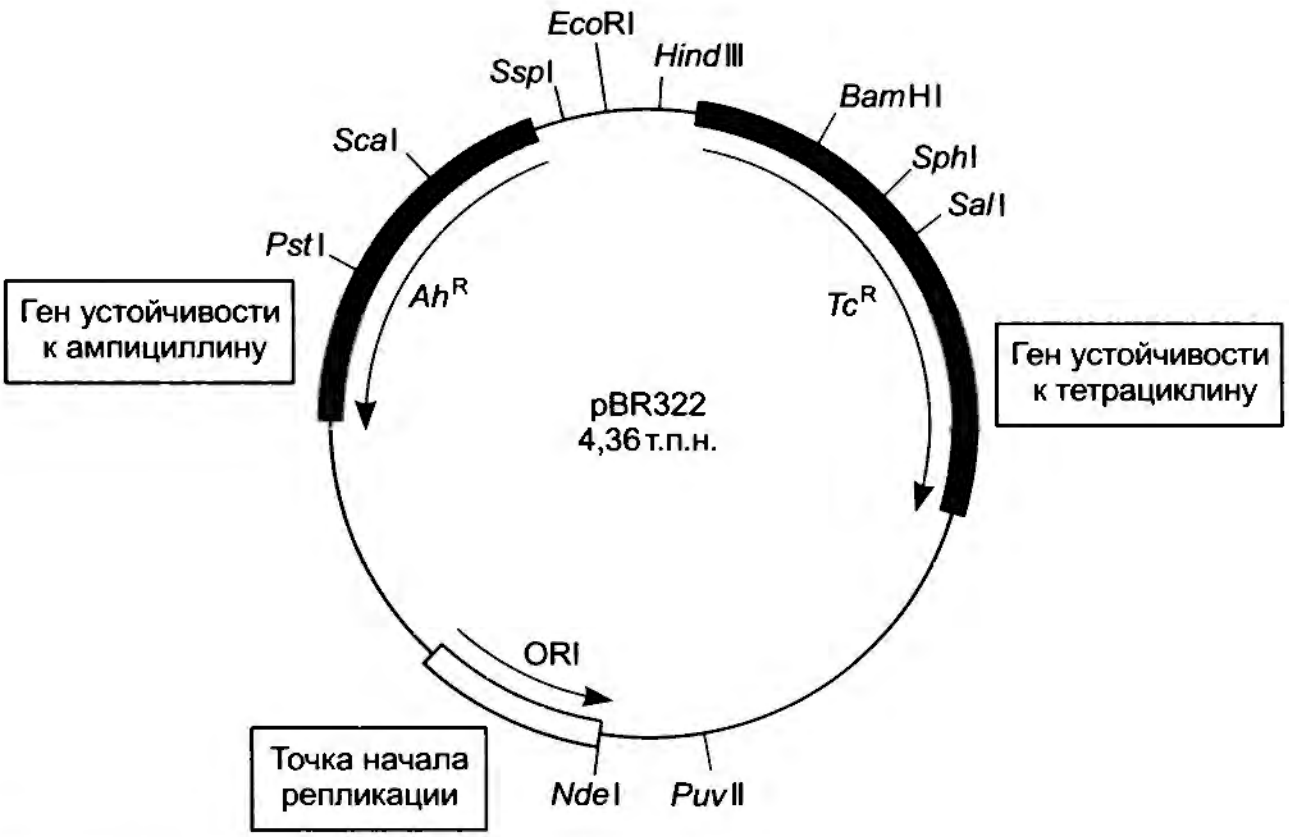


Рис. 6.11. Карта и характерные элементы pBR322

жат плазмиду: если клетки высеять на среду с сответствующим антибиотиком, только те, которые содержат плазмиду, будут расти, образуя колонии. Для обнаружения плазмид, которые содержат встроенную ДНК, может быть использован другой ген устойчивости, как это описано ниже.

- Для множества ферментов рестрикции в различных точках плазмиды существуют уникальные участки узнавания, что может быть использовано для раскрытия или линеаризации кольцевой ДНК. Превращение плазмиды в линейную форму позволяет встраивать фрагмент ДНК, а затем кольцо снова замыкают. Большой выбор сайтов не только облегчает выбор фермента рестрикции, подходящего для вектора и встраиваемой чужеродной ДНК, но и дает возможность благодаря потери устойчивости к антибиотику обнаружить вставку, поскольку некоторые сайты рестрикции расположены внутри генов устойчивости к этому антибиотику. Такой подход называется **инсерционной инактивацией**.

Инсерционная инактивация является удобным методом отбора для идентификации рекомбинантных векторов, несущих вставку. Например, выделяют и очищают фрагмент хромосомной ДНК, разрезанной *Bam*HI. Плазмиду pBR322 также разрезают в уникальном сайте с помощью *Bam*HI, и затем оба препарата депротеинизируют, чтобы инактивировать фермент рестрикции. *Bam*HI разрезает ДНК, получаются липкие концы, что позволяет осуществить лигирование плазмиды и вырезанного фрагмента ДНК в присутствии ДНК-лигазы T4. Продукты лигирования будут включать в себя плазмиду, содержащую ДНК-вставки, но будут также присутствовать нежелательные продукты, например замкнувшаяся сама на себя плазмида без вставки, димеры, соединившиеся между собой фрагменты и плазмиды, содержащие несколько встроенных фрагментов. От большинства этих молекул можно избавиться позднее. Продукты таких реакций обычно идентифицируют с помощью электрофореза в агарозном геле (разд. 5.7.4).

Лигированную ДНК затем используют для трансформации *E. coli*. В обычных условиях бактерии не поглощают ДНК из внешней среды, но этот процесс может быть индуцирован предварительной обработкой клеток раствором Ca^{2+} при 4 °C. После такой обработки клетки называют **компетентными**, поскольку ДНК, добавленная в суспензию компетентных клеток, будет поглощена во время краткого повышения температуры («**теплового шока**»). Маленькие кольцевые молекулы поглощаются более эффективно, тогда как длинные линейные молекулы не будут проникать в бактерию*.

После короткой инкубации, запускающей экспрессию генов устойчивости к антибиотикам, клетки высевают на чашки со средой, содержащей антибиотик, например ампициллин. Растущие колонии клеток

* Эффективность попадания внутрь клетки определяется размером молекулы. Просто линейные молекулы не будут реплицироваться в клетке. — *Прим. ред.*

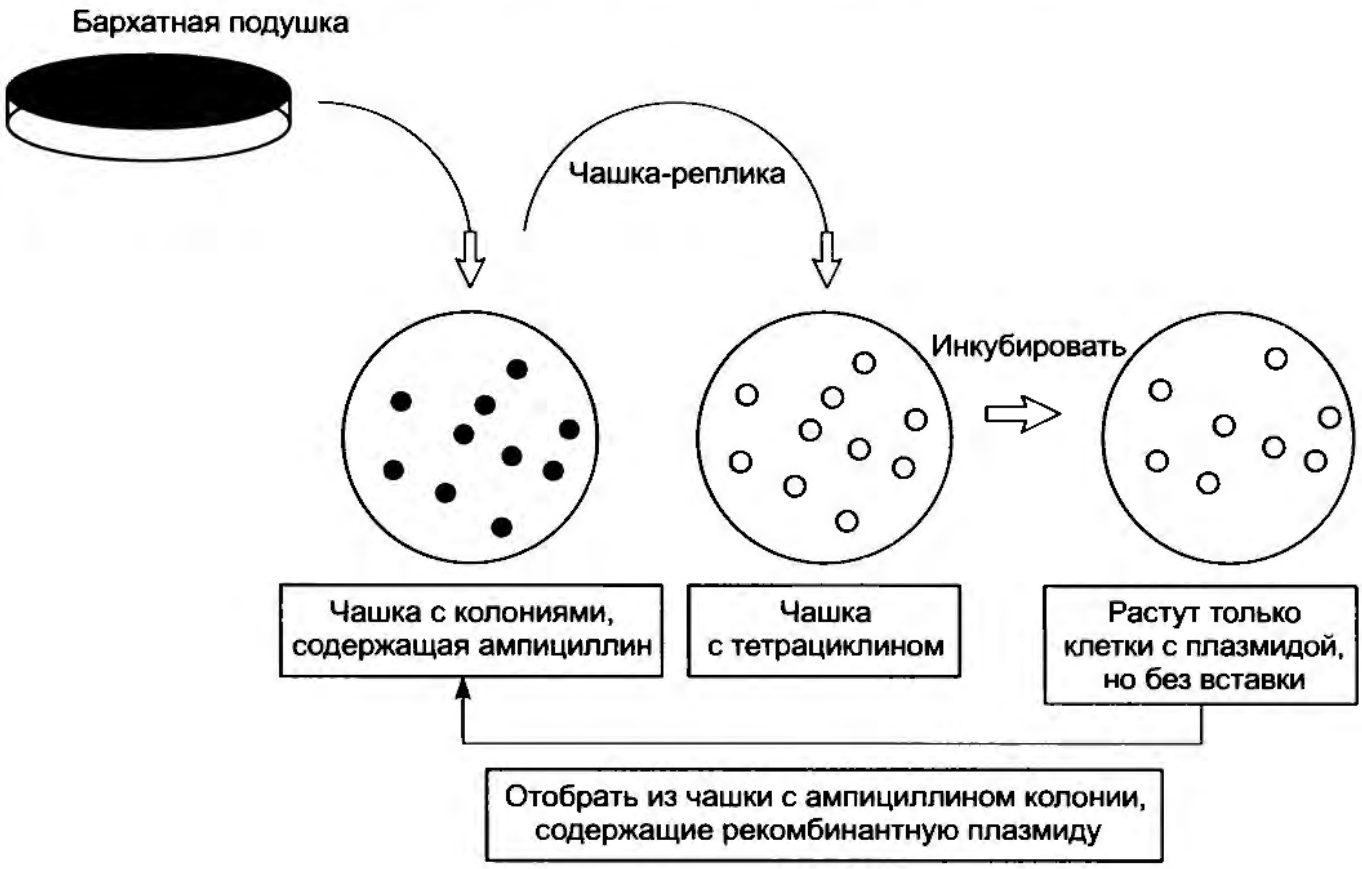


Рис. 6.12. Перенос реплики на чашку для отбора рекомбинантных клонов. Стерильную бархатную подушечку прижимают к поверхности чашки с агаром и переносят несколько клеток из каждой колонии, выросшей на этой чашке. Подушечку затем прижимают к чашке со свежим агаром, так что клетки оказываются в таком же расположении, как и на исходной чашке. Колонии клеток, которые не растут на второй чашке (например, из-за потери устойчивости к антибиотику), могут быть получены из соответствующих колоний на первой чашке

содержат плазмиды, поскольку они несут ген устойчивости к ампициллину. На этой стадии невозможно отличить колонии, содержащие плазмиды со вставкой, от тех, которые имеют лишь плазмиды, замкнувшиеся в кольцо сами на себя. Чтобы их различить, с помощью стерильной бархатной подушки делают реплики колоний на чашках со средой, содержащей тетрациклин. Поскольку участок узнавания *Bam*HI лежит внутри гена устойчивости к тетрациклину, этот ген не поврежден в тех плазмидах, которые замкнулись в кольцо сами на себя (рис. 6.12). Таким образом, колонии, которые растут на чашке с ампициллином, но не с тетрациклином, должны содержать плазмиды со вставкой. Поскольку посев бактерий в виде реплик дает идентичное расположение колоний на обеих чашках, можно идентифицировать колонии со вставками и отобрать их для дальнейшего наращивания с чашек, содержащих ампициллин. Этот пример демонстрирует важность второго гена устойчивости к антибиотику.

Хотя замкнувшаяся сама на себя плазмида может быть удалена, ее присутствие уменьшает выход рекомбинантной плазмиды, содержащей вставку. Если до реакции лигирования расщепленную плазмиду обработать щелочной фосфатазой, то можно предотвратить замыкание плазми-

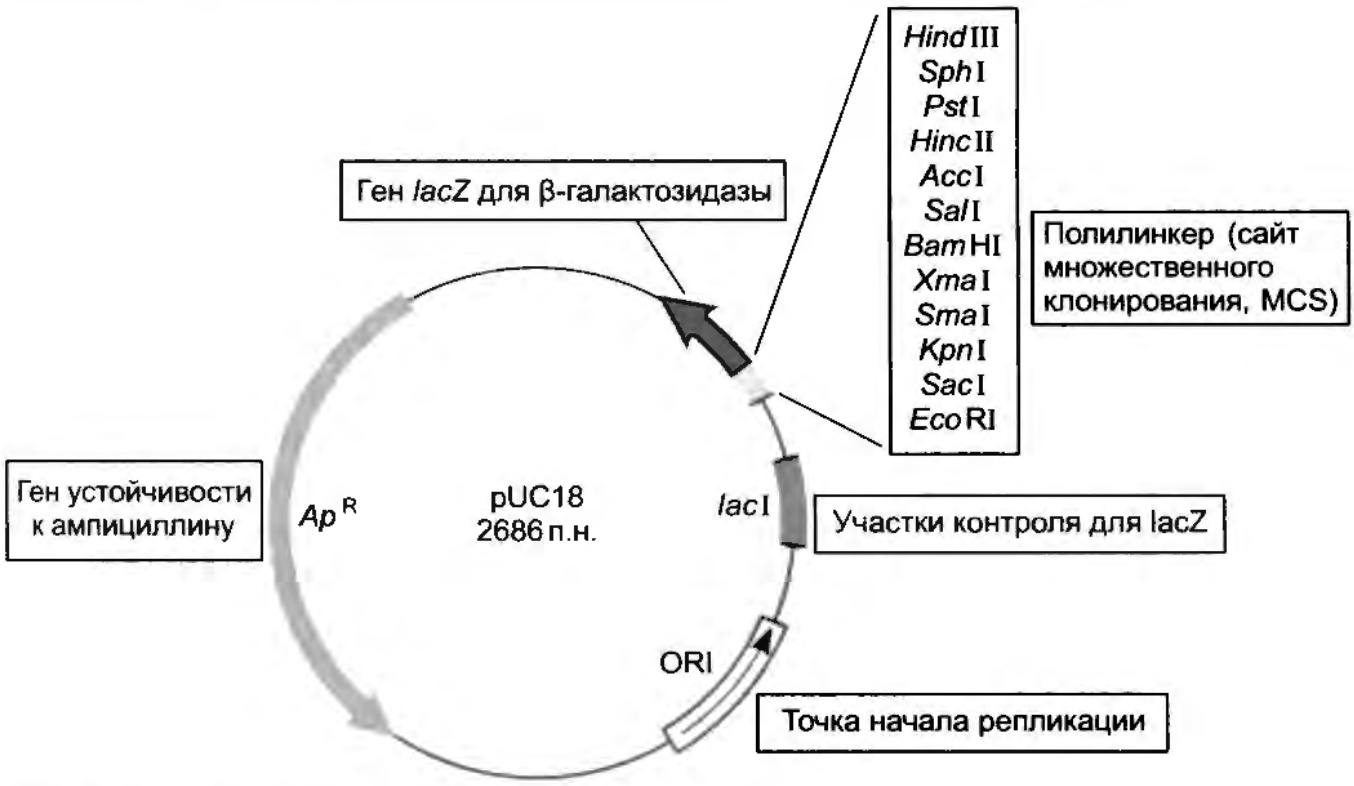


Рис. 6.13. Карта и характерные элементы pUC18

ды на себя, поскольку этот фермент удаляет 5'-фосфатные группы, необходимые для лигирования. При этом остается возможным соединение между 5'-фосфатом вставки и 3'-гидроксильной группой плазмиды; в результате могут образовываться только рекомбинантные плазмиды и последовательности связанных фрагментов ДНК. При этом не имеет значения, если лигирована только одна цепь рекомбинантной ДНК, поскольку одноцепочечный разрыв будет репарироваться бактерией, трансформированной этими молекулами.

Полезные свойства pBR322 были усовершенствованы в серии плазмид, называемых pUC (созданных в Калифорнийском университете, University of California) (рис. 6.13). В них имеется ген устойчивости к тетрациклину и ориджин репликации для *E. coli*. Кроме того, наиболее широко используемые рестрикционные сайты сосредоточены в области, называемой **полилинкером** (MCS, multiple cloning site). MCS сам по себе является частью гена и кодирует фермент, называемый β-галактозидазой. Когда плазмида pUC используется для трансформации клеток *E. coli*, ген может быть включен добавлением индуктора IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид). Его присутствие вызывает продукцию фермента β-галактозидазы. Активный фермент способен гидролизировать бесцветное вещество, называемое X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-галактопиранозид), в окрашенный в синий цвет нерастворимый в воде продукт (рис. 6.14). Однако, если ген нарушен вставкой фрагмента чужеродной ДНК, нефункциональный фермент не способен выполнять гидролиз X-gal. Таким образом, рекомбинантная плазмида pUC может быть легко обнаружена, поскольку содержащая такую плаз-

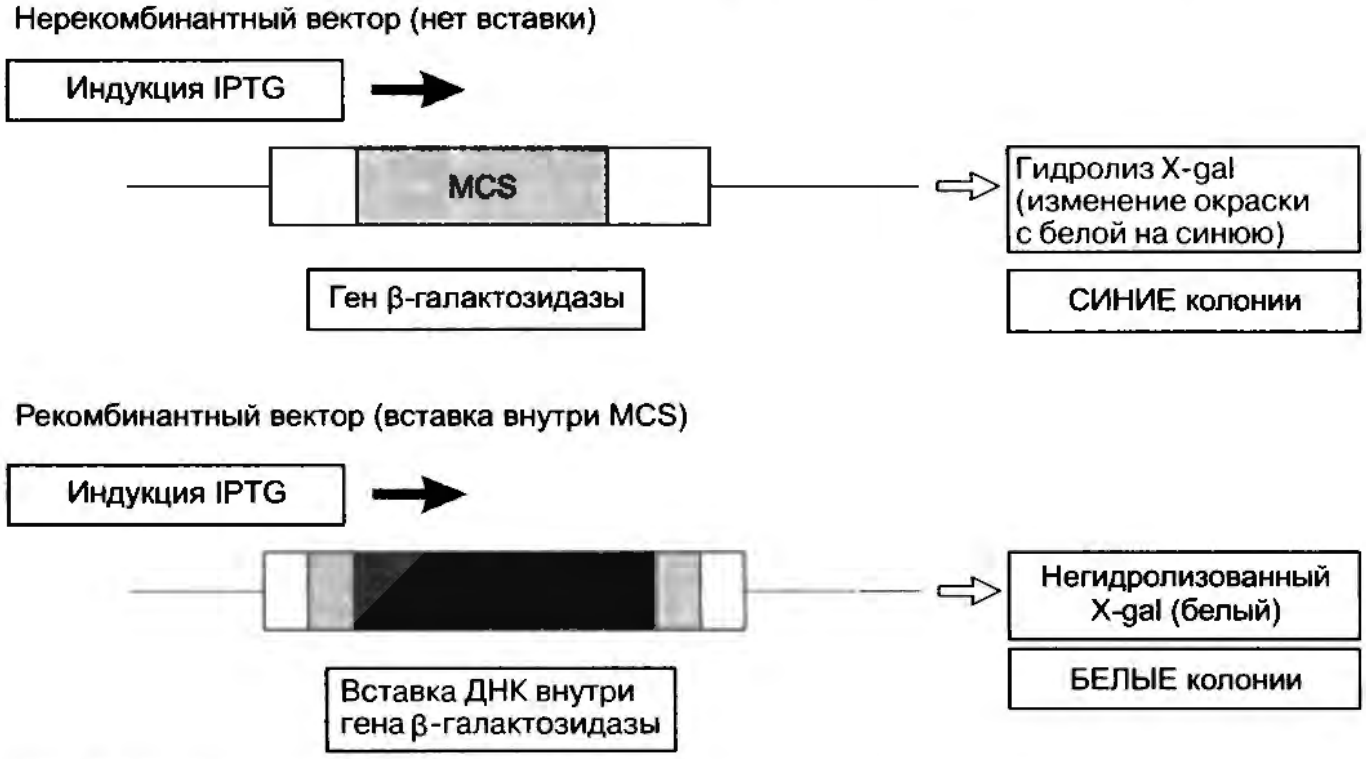


Рис. 6.14. Принцип сине-белой селекции для обнаружения рекомбинантных векторов

миду клетка становится белой или бесцветной в присутствии X-gal, тогда как клетка с интактной нерекомбинантной плазмидой синяя, так как ген цел и полностью функционален. Эта элегантная система, называемая **сине-белой селекцией**, позволяет проводить очень быструю первичную идентификацию клонов и поэтому была включена во множество векторных систем. Однако такой метод отбора и инактивации встраиванием генов устойчивости к антибиотикам не обеспечивает информацией о характере вставки ДНК. Для скрининга генных библиотек на присутствие желаемого гена требуется гибридизация с помощью ДНК-зондов, как это объясняется в разд. 6.5.

6.3.2 Векторы на основе вирусов

Полезным свойством любого клонирующего вектора является количество ДНК, которое он может принять или встроить и остаться жизнеспособным. Вставки более 5 т.п.н. увеличивают размер плазмиды до такой степени, что эффективность трансформации бактериальных клеток значительно уменьшается, и поэтому для размножения больших фрагментов ДНК в бактериальных клетках в качестве векторов стали применять бактериофаги (фаги, или вирусы бактерий). В большинстве случаев используются клонирующие векторы, полученные на основе фага λ, так как с их помощью достигается многократное преимущество* в эффективности клонирования по сравнению с наиболее эффективными плазмидными векторами.

* Из-за разного механизма доставки плазмиды и вируса в клетку. — *Прим. ред.*

Фаг λ представляет собой линейный двухцепочечный фаг длиной приблизительно 49 т.п.н. (рис. 6.15). Этот фаг заражает *E. coli* с большой эффективностью, вводя свою ДНК через клеточную мембрану. В фаге λ дикого типа ДНК следует одному из двух возможных типов репликации. Во-первых, ДНК может стабильно интегрироваться в хромосому *E. coli*, где она остается спящей до того, как подается сигнал ее вырезания. Этот процесс называется **лизогенным жизненным циклом**. Во-вторых, она может следовать **литическому жизненному циклу**, при котором ДНК реплицируется при проникновении в клетку, быстро синтезируются белки головки и хвоста фага и собирается новый функциональный фаг. После этого фаг высвобождается из клетки посредством разрушения клеточной мембраны, чтобы затем инфицировать новые клетки *E. coli*, находящиеся поблизости. На противоположных концах фага λ имеются *cos*-последовательности (*от англ.* **cohesive sites**) в 12 п.н. Хотя эти последовательности асимметричны, они подобны липким концам и позволяют фаговой ДНК замыкаться в кольцо. Таким способом фаг может быть реплицирован с большой эффективностью, результатом чего являются конкатемеры, содержащие много копий фагового генома, которые расщепляются по *cos*-сайтам и встраиваются во вновь образованные белковые головки фага.

Фаг λ широко использовался для получения геномных библиотек, главным образом благодаря его эффективному проникновению в клетки *E. coli* и тому факту, что большие фрагменты ДНК могут быть стабильно интегрированы. Для клонирования длинных фрагментов ДНК, приблизительно до 25 т.п.н., большую часть ДНК фага λ, незначащую для литического жизненного цикла, удаляют и замещают вставкой чужеродной ДНК. Рекомбинантный фаг затем собирается в преформированные белковые вирусные частицы в процессе, называемом **упаковкой *in vitro***. Этот вновь сформированный фаг используют, чтобы инфицировать бактериальные клетки, которые затем высевают на чашки с агаром (рис. 6.16).

Оказавшись внутри хозяйской клетки, рекомбинантная вирусная ДНК реплицируется. Так как все гены, необходимые для нормального литического роста, присутствуют в фаговой ДНК, размножение вируса происходит через циклы лизиса клетки и заражения окружающих клеток, в результате чего бляшки лизированных клеток образуются на фоне, или **газоне**, бактериальных клеток. Вирусная ДНК, включая клонированную чужеродную ДНК, может быть получена из этих бляшек и проанализирована с помощью рестрикционного картирования (разд. 5.9.1) и электрофореза в агарозном геле (разд. 5.7.4).

Было разработано два основных типа векторов на основе фага λ, **векторы внедрения и векторы замещения** (рис. 6.17). Векторы внедрения принимают меньше ДНК, чем векторы замещения, поскольку чужеродная ДНК просто встраивается в область фагового генома с подходящими участками рестрикции; примерами служат λgt10 и λcharon16A. В случае вектора замещения центральная область ДНК, несущественная для литического роста (**«лишний» фрагмент**),

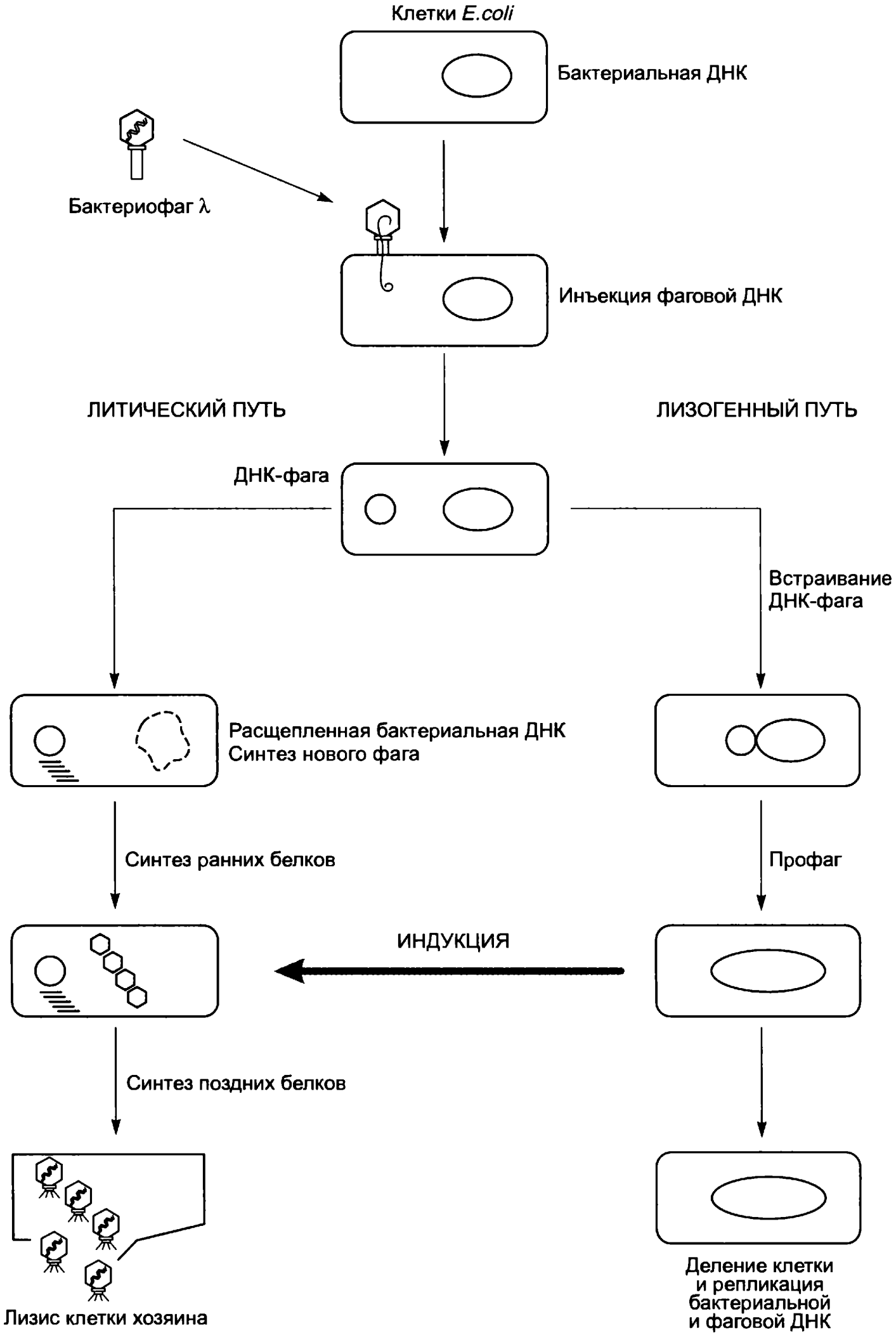


Рис. 6.15. Лизогенный и литический циклы бактериофага λ

Рис. 6.16. Две стратегии получения *in vitro* упаковочных экстрактов для бактериофага λ

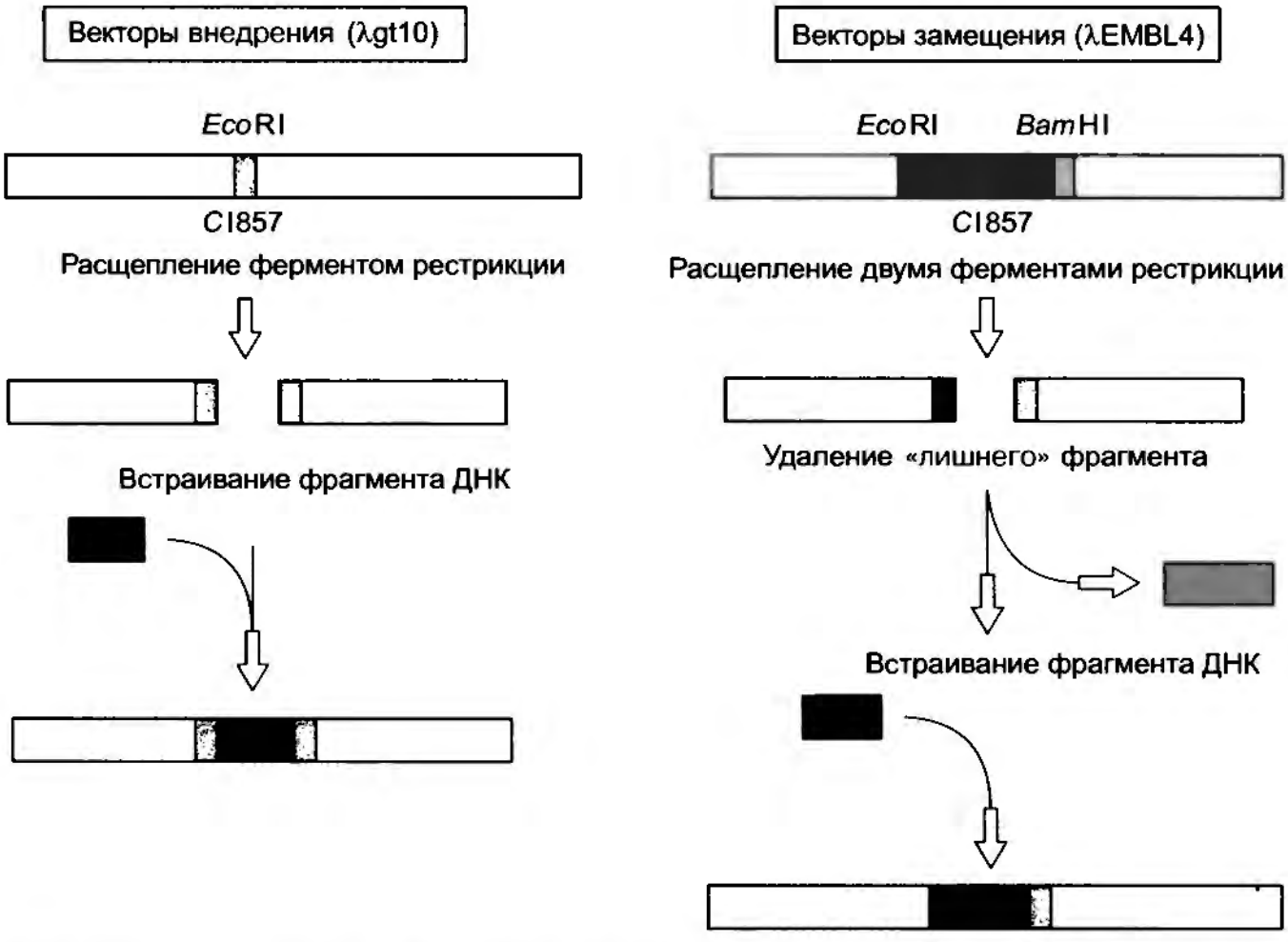


Рис. 6.17. Общая схема, используемая для клонирования в векторах внедрения и замещения на основе фага λ. C1857 представляет собой термочувствительную мутацию, которая способствует лизису при 42 °C после инкубации при 37 °C

удаляется с помощью двойной рестрикции, например *Eco*RI и *Bam*HI. При этом остаются два фрагмента ДНК, называемые правым и левым плечом. «Лишний» фрагмент замещается встраиванием чужеродной ДНК между плечами, образуя функциональный рекомбинантный фаг λ. Наиболее известными примерами векторов замещения являются λEMBL и λZap.

λZap является фирменным клонирующим вектором, который имеет уникальные участки для клонирования, собранные в кластер MCS (рис. 6.18). Кроме того, MCS располагается внутри области *lac*Z, обеспечивая таким образом сине-белую систему отбора, основанную на инсерционной инактивации (рис. 6.14). С помощью этого вектора можно также экспрессировать чужеродную клонированную ДНК. Это очень полезное свойство некоторых векторов на основе фага λ, поскольку предоставляет возможность скрининга белкового продукта, а не ДНК, встроенной в вектор. Такой скрининг осуществляют с помощью антител против искомого белка (разд. 6.5.4). Другим свойством, которое делает этот вектор удобным, является его способность продуцировать транскрипты РНК, называемые **кРНК** или **рибозондами**. Это возможно, поскольку существует два промотора для фермента РНК-полимеразы — Т3 и Т7, которые располагаются по обе стороны MCS (разд. 6.4.2).

Одним из наиболее полезных свойств λZap является то, что он был сконструирован так, чтобы происходило автоматическое вырезание *in vivo* небольшого (2,9 т.п.н.) вектора pBluescript SK, называемого **фазмидой** (разд. 6.3.3). Этот метод иногда называют **высвобождением одноцепочечной ДНК** (single-stranded DNA rescue), происходящим в результате процесса **суперинфекции**, при которой фаг-помощник добавляют к клеткам, растущим дополнительное время, приблизительно 4 ч (рис. 6.19).

Фаг-помощник вытесняет из λZap цепь, содержащую вставку чужеродной ДНК. Затем эта цепь замыкается в кольцо и упаковывается в ни-

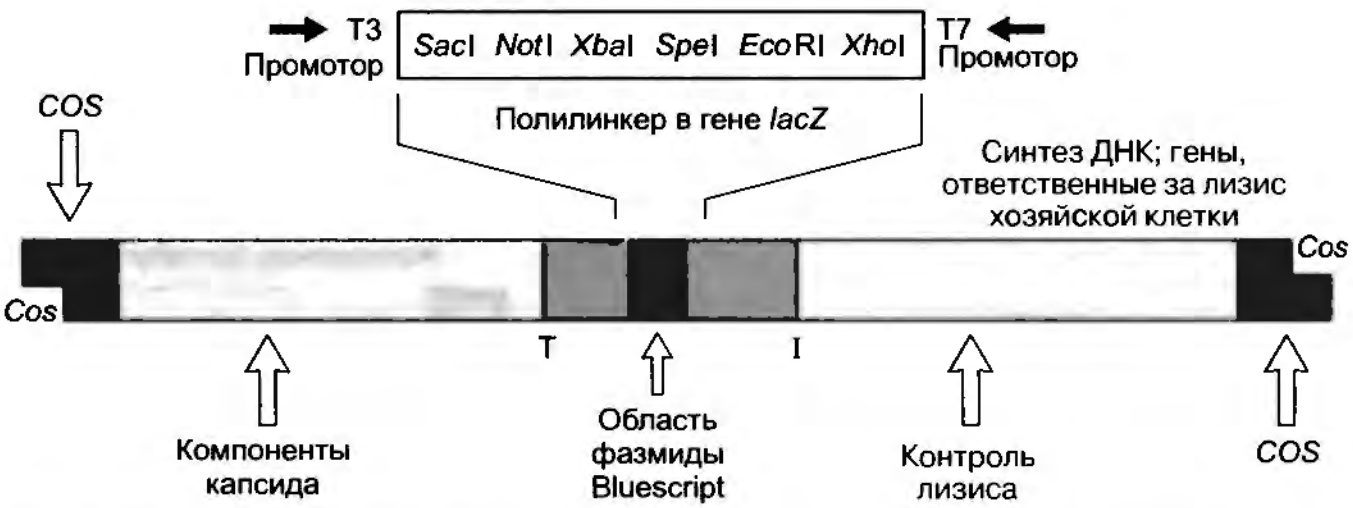


Рис. 6.18. Карта клонирующего вектора λZap, показывающая важные области вектора. Полилинкер находится в гене *lac*Z, обеспечивая сине-белую селекцию, основанную на активности гена β-галактозидазы. Между участком инициации (I) и терминации (T) лежит последовательность, кодирующая фазмиду Bluescript

теобразный фаг, подобный фагу M13 (разд. 6.3.3). Упакованная фазмида секретируется из клеток *E. coli* и может быть выделена из супернатанта. Таким образом, вектор λZap позволяет выполнять множество различных манипуляций без необходимости переклонирования или **субклонирования** фрагментов чужеродной ДНК. Иногда субклонирование необходимо, если для использования фрагмента гена, который был клонирован в универсальный вектор, требуется его перенос в более специализированный вектор, в частности для таких методов, как мутагенез *in vitro* или для продукции белка (разд. 6.6).

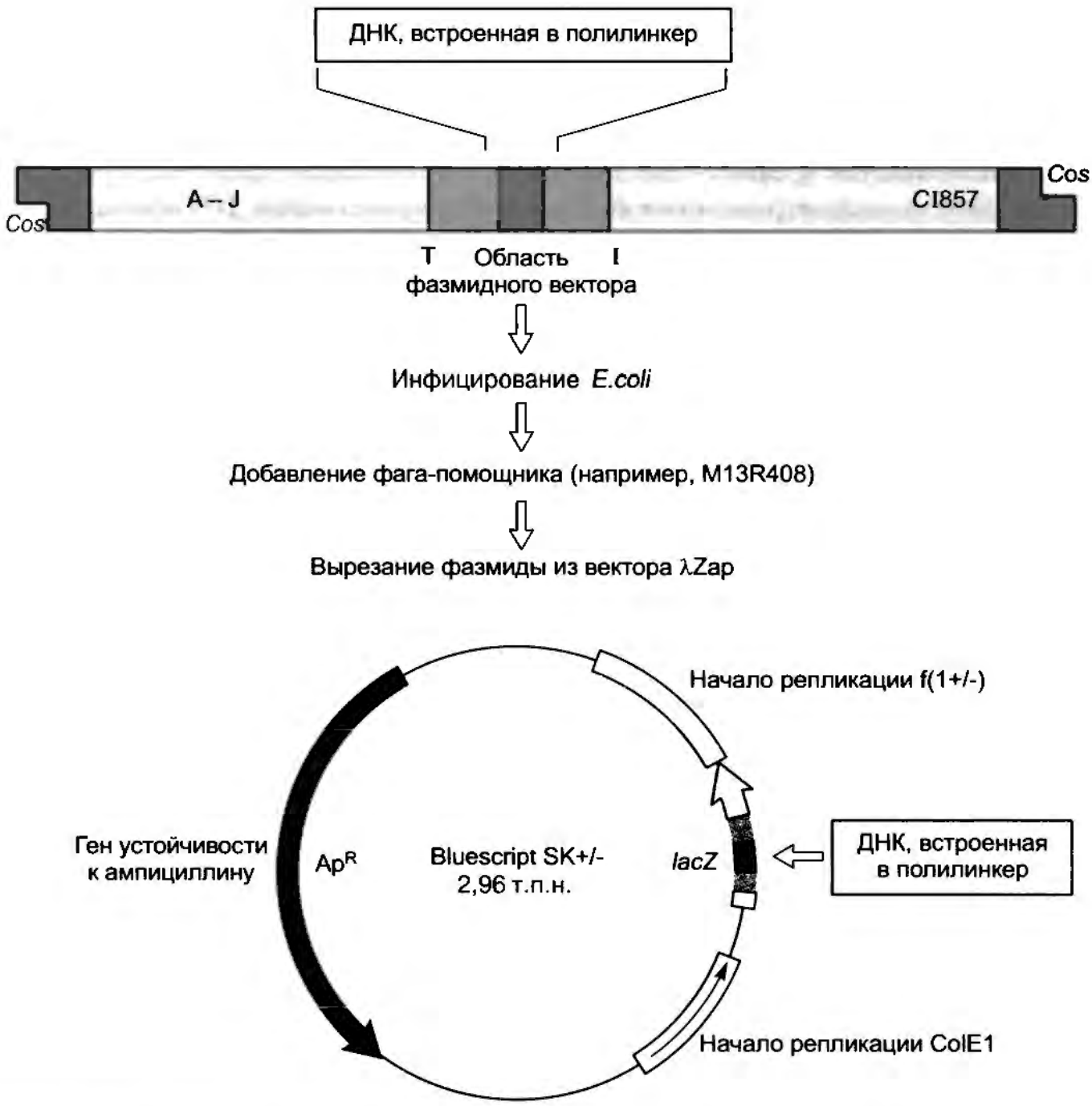


Рис. 6.19. Высвобождение одноцепочечной фазмидной ДНК из λZap. Одноцепочечная фазмида Bluescript SK может быть вырезана из λZap с помощью фага-помощника. Фазмида, встроенная между I и T в родительском фаге, кодирует белки и факторы транскрипции, необходимые для репликации и воспроизведения фрагмента ДНК, клонированного в родительский вектор

6.3.3 M13 и векторы на основе фазмид

Значительный успех был достигнут при использовании векторов на основе одноцепочечных бактериофагов, таких как M13, и векторов, которые обладают комбинированными свойствами фага и плазмид, именуемых фазмидами. M13 представляет собой нитчатый бактериофаг с одноцепочечной кольцевой геномной ДНК (рис. 6.20). После инфекции *E. coli* ДНК первоначально реплицируется как двухцепочечная молекула, но затем образует одноцепочечные вирусные частицы, или вирионы, для дальнейшего заражения бактериальных клеток (литический рост). Природа этих векторов делает их идеальными инструментами для таких методов, как секвенирование с обрывом цепи (разд. 6.6.1) и мутагенез *in vitro* (разд. 6.6.2), поскольку они требуют использования однонитевой ДНК.

M13 или фазмиды, такие как pBluescript SK, заражают *E. coli*, обладающие специфическими для мужских клеток структурами, называемыми F-пилями (рис. 6.21). Они проникают в клетку при поглощении этими структурами и, оказавшись внутри, фаговая ДНК переходит в двунитевую **репликативную форму** или РФ-ДНК. Репликация происходит быстро до тех пор, пока внутри клетки *E. coli* не образуется около 100 молекул РФ-ДНК. Синтез ДНК затем переключается на продукцию одиночных цепей, и ДНК собирается и упаковывается в капсид в периплазме бактерии. ДНК бактериофага затем заключается в оболочку, состоящую из основного белка оболочки, белка гена VIII, который существует приблизительно в количестве 2800 копий, с 3–6 копиями белка гена III на одном конце частицы. Выход бактериофага через бактериальную периплазму приводит к умень-

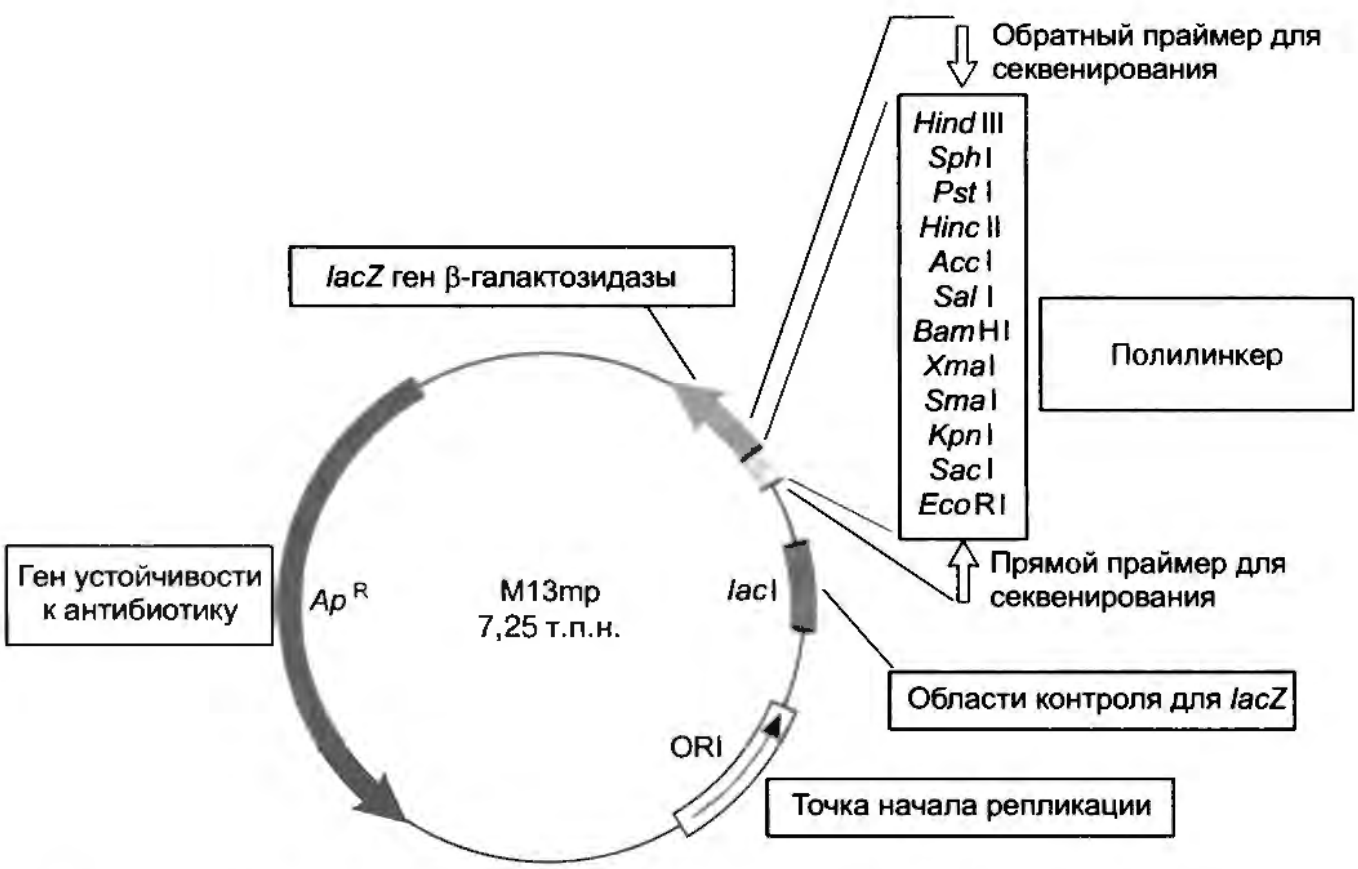


Рис. 6.20. Генетическая карта и характерные элементы вектора на основе бактериофага M13

шению скорости роста клеток *E. coli*, а не к лизису хозяйских клеток, и это хорошо видно на бактериальном газоне в виде областей просветления. Приблизительно 1000 упакованных фаговых частиц может быть высвобождено в среду при одном делении клетки.

Кроме продукции одноцепочечных ДНК векторы на основе бактериофагов имеют множество других свойств, которые делают их удобными для использования в качестве клонирующих векторов. Поскольку ДНК бактериофага реплицируется как двухцепочечная промежуточная РФ-ДНК, это свойство может быть использовано для множества обычных манипуляций, таких как рестрикционный анализ, картирование и лигирование ДНК. РФ-ДНК получают при лизисе зараженных клеток *E. coli* и очистке суперскрученной кольцевой ДНК фага, применяя такие же методы, как и для выделения плазмид. Интактная одноцепочечная ДНК, упакованная в фаговую белковую оболочку и находящаяся в супернатанте, может быть осаждена таким реагентом, как полиэтиленгликоль, и затем очищена смесью фенол/хлороформ (разд. 5.7.1). Таким образом, при определенных условиях фаг может действовать как плазмида и в то же время продуцировать ДНК, подобно вирусу. В настоящее время широко используется семейство векторов, производных фага M13, называемых M13mp8/9,

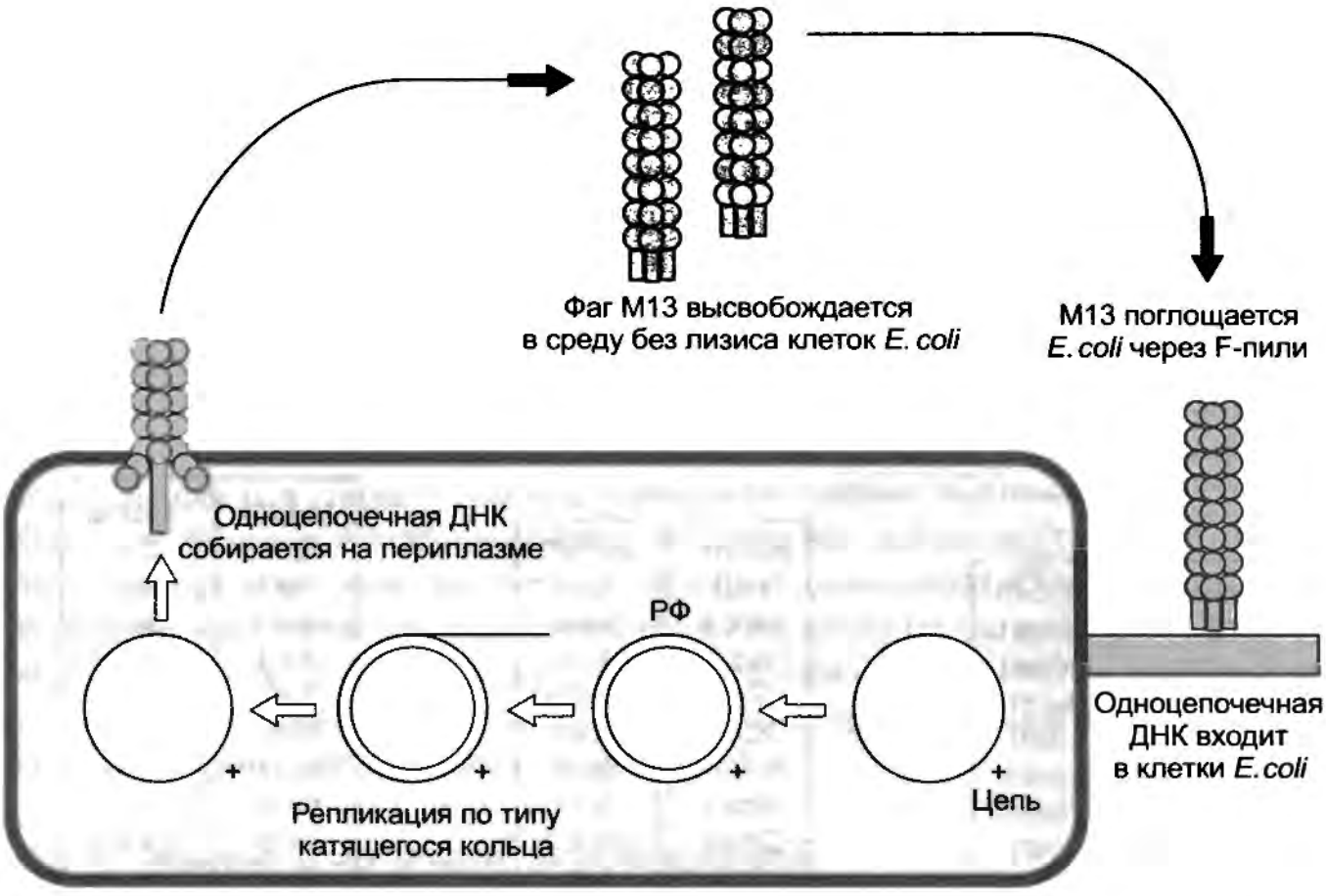


Рис. 6.21. Жизненный цикл бактериофага M13. Вирус входит в клетку *E. coli* через F-пили. После этого следует стадия, когда кольцевые одноцепочечные молекулы ДНК превращаются в двухцепочечные. Затем в результате репликации по механизму катящегося кольца образуются одноцепочечные молекулы ДНК, которые упаковываются и выталкиваются через мембрану *E. coli*

mp18/19 и т. д., обладающих множеством полезных свойств. Все они содержат синтетический MCS, который располагается в гене *lac*Z без нарушения его рамки считывания. Это позволяет осуществлять эффективный отбор на основе сине-белой селекции (разд. 6.3.1). При разработке серии таких векторов увеличилось число сайтов рестрикции, расположенных асимметрично. Таким образом, M13mp8, mp12, mp18 и родственные векторы, имеющие такой же MCS, но в обратной ориентации (M13mp9, mp13, mp19 соответственно) и больше сайтов рестрикции в MCS, являются более удобными, поскольку при работе с ними существует широкий выбор рестрикционных ферментов (рис. 6.22). Однако при использовании M13 можно столкнуться с проблемой нестабильности и спонтанной потерей вставок размером более 6 т.п.н.

Фазмиды очень похожи на M13 и реплицируются подобным же образом. Один из первых фазмидных векторов pEMBL был сконструирован встраиванием фрагмента другого фага, именуемого f1, содержащего ориджин репликации фага и элементы для его морфогенеза, в плазмиду pUC8. После суперинфекции с помощью фага-помощника область f1 активируется, стимулируя продукцию одноцепочечной ДНК. Фаг собирается в фаговую оболочку, выводится через периплазму и секретируется в среду подобно M13. Без суперинфекции фазмида реплицируется как плазмида типа pUC, и ДНК выделяется в двухспиральной репликативной форме. Это позволяет осуществлять дальнейший анализ с помощью рестрикции, лигирования и картирования. Вектор pBluescript SK также фазмида и может быть использован как клонирующий вектор и как плазмида подвергаться манипуляциям. Подобно M13, он может быть использован в определении первичной нуклеотидной последовательности, сайт-направленном мутагенезе, кроме того, возможно получать транскрипты РНК, которые используются в методе меченых комплементарных зондов РНК, или рибозондов (разд. 6.4.2).

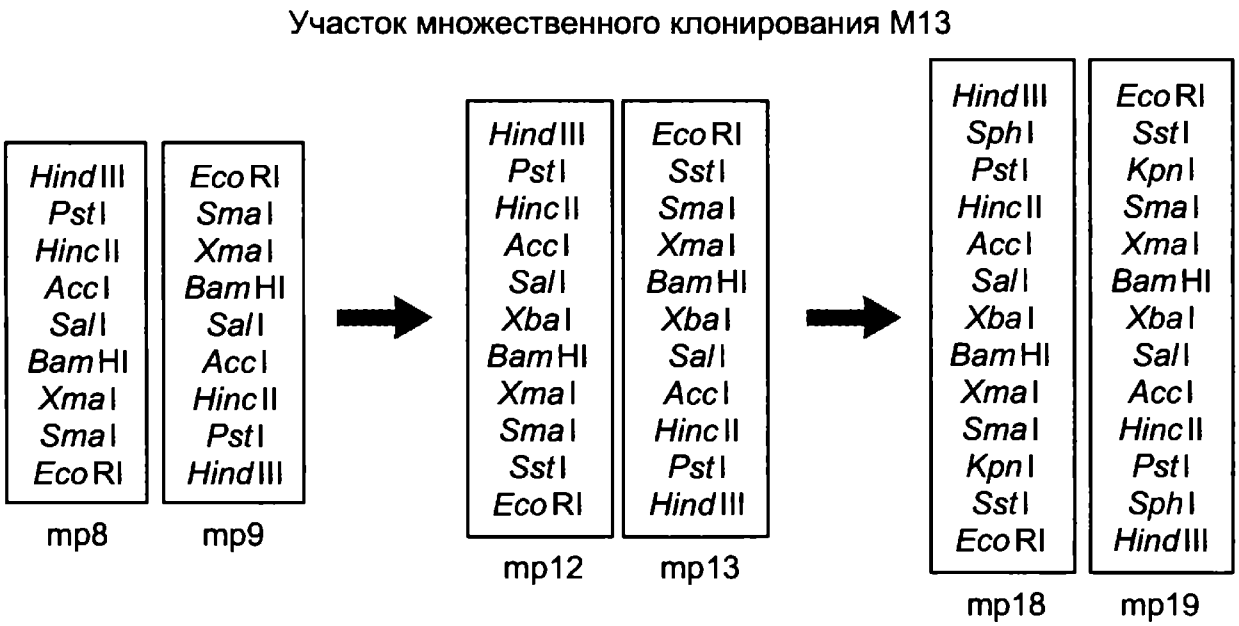


Рис. 6.22. Структура и ориентация полилинкеров серии M13. Указаны только основные ферменты рестрикции

6.3.4 Векторы на основе космид

Способ репликации ДНК фага λ исключительно интересен для создания клонирующих векторов, называемых космидами и обладающих способностью вмещать большие вставки (рис. 6.23). Таковые являются особенно удобными для анализа очень сложных геномов и составляют важную часть различных проектов по картированию генома (разд. 6.9).

Верхний предел емкости фага λ составляет приблизительно 21 т.п.н., так как необходимо присутствие основных генов, и максимальная длина между *cos*-сайтами составляет 52 т.п.н. Поэтому космидные векторы сконструированы так, что они сочетают в себе *cos*-сайты фага λ и основные элементы плазмиды, например ориджин репликации плазмиды, ген устойчивости к антибиотику и несколько уникальных сайтов рестрикции для встраивания клонируемой ДНК. Когда препарат такого вектора превращается в линейную форму с помощью рестрикционного расщепления и лигируется с клонируемой ДНК, получаемые продукты будут содержать конкатемеры чередующихся последовательностей космидного вектора и вставки. Таким образом, единственным требованием для длины фрагмента ДНК, которая упаковывается в вирусные головки, является то, что он должен содержать *cos*-сайты, расположенные на определенном расстоянии друг от друга; на практике это расстояние составляет от 37 до 52 т.п.н. Такая ДНК может быть упакована *in vitro*, если имеются предшественники фаговой головки, хвост и упаковочные белки. Поскольку космида очень маленькая, легче всего встраиваются вставки размером около 40 т.п.н. Оказавшись внутри клетки, ДНК замыкается в кольцо посредством своих *cos*-сайтов и с этого момента ведет себя как плазмида.

6.3.5 Векторы, способные вмещать большие вставки

Преимущество векторов, которые вмещают большие фрагменты ДНК по сравнению с фагом λ или космидами, состоит в том, что для поиска встроенной чужеродной ДНК приходится анализировать небольшое количество клонов. Эти векторы также широко использовались при картировании генома мыши и в проекте по картированию генома человека (разд. 6.9.3). Векторы с большой емкостью были созданы на основе искусственных бактериальных хромосом (bacterial artificial chromosomes, BAC), искусственных хромосом млекопитающих (mammalian artificial chromosomes, MAC) и искусственных хромосом вируса PI (PI artificial chromosomes, PAC). Однако, наверное, наиболее значительным достижением являются векторы на основе искусственных хромосом дрожжей.

6.3.6 Векторы на основе искусственной хромосомы дрожжей

Искусственные хромосомы дрожжей (yeast artificial chromosomes, YAC) представляют собой линейные молекулы, состоящие из центромеры, теломеры и участка начала репликации, называемого элементом АРП (**автономно реплицирующаяся последовательность**). YAC расщепляют ферментом

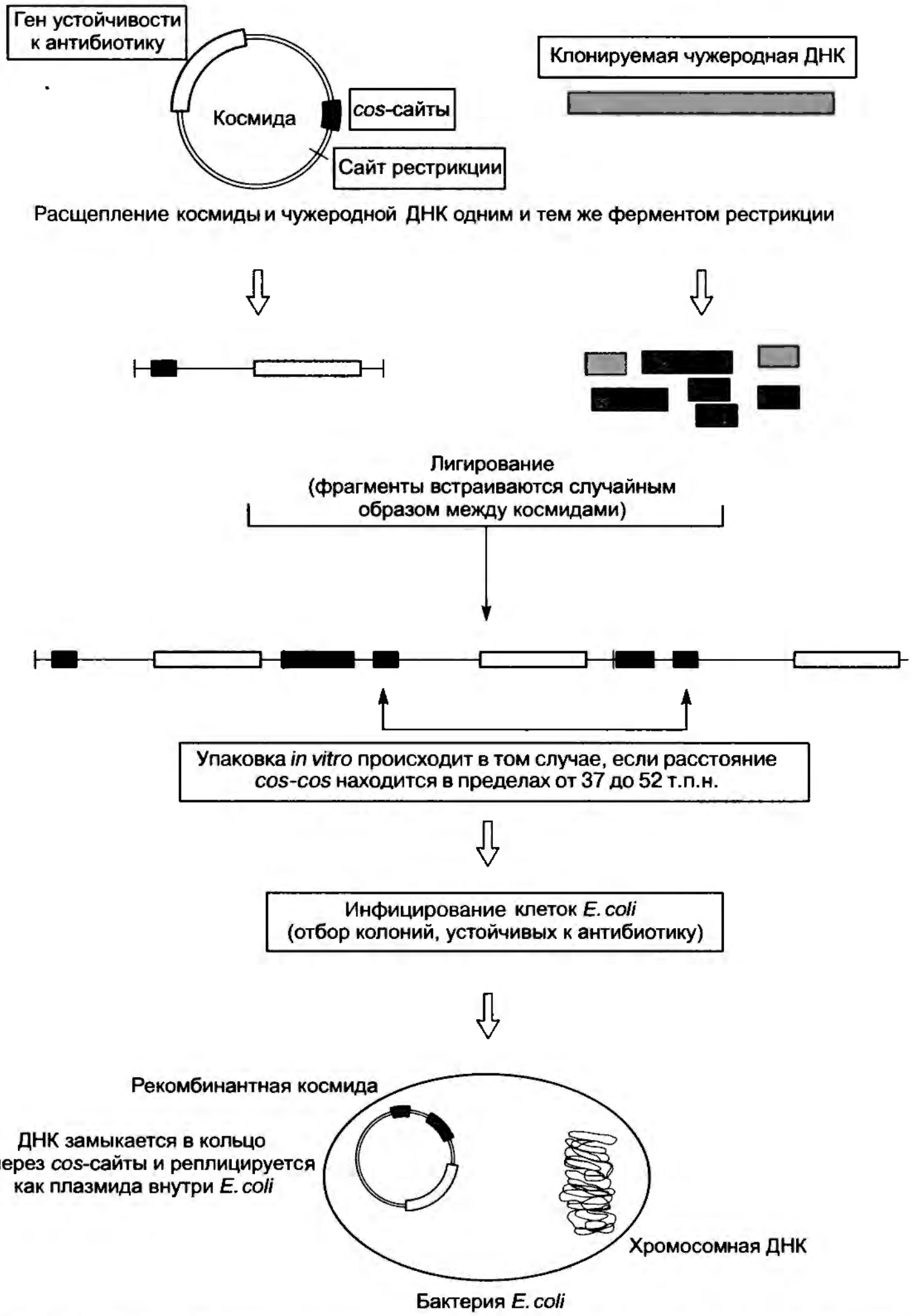


Рис. 6.23. Схема клонирования чужеродных фрагментов ДНК в космидных векторах

рестрикции на участке SUP4 (ген супрессорной тРНК) и по сайтам *Bam*HI, что приводит к отделению теломерных последовательностей (рис. 6.24). В результате образуются два плеча, и чужеродная геномная ДНК лигируется, давая функциональный конструкт YAC. YAC реплицируются в дрожжевых клетках; однако внешнюю клеточную стенку дрожжей удаляют, чтобы получился сферопласт. Последний является осмотически нестабильным, поэтому его встраивают в твердый матрикс, например агар. После трансформации дрожжевых клеток только правильно сконструированные YAC с селективными маркерами реплицируются в дрожжевых штаммах. Фрагменты ДНК с повторяющимися последовательностями, которые иногда трудно клонировать в векторы бактериального происхождения, также могут быть клонированы в системах YAC. Основным преимуществом векторов на основе YAC, однако, является возможность клонировать очень большие фрагменты ДНК. Таким образом, в векторах YAC осуществляется стабильное хранение и репликация фрагментов чужеродной ДНК размером

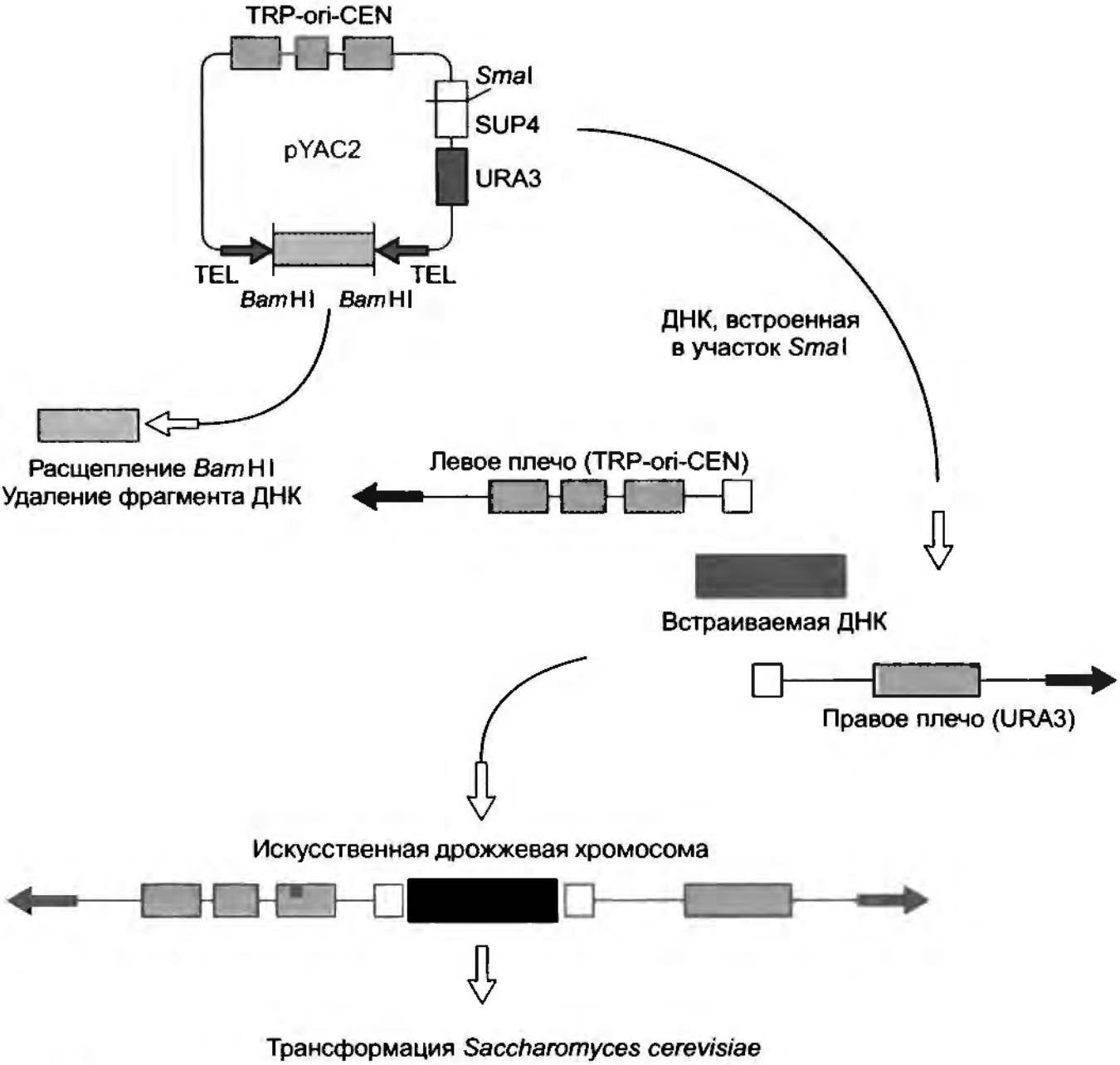


Рис. 6.24. Схема клонирования больших фрагментов ДНК в векторах YAC

до 2000 т.п.н. (т. е. 2 млн оснований), и именно им отдается предпочтение при выполнении различных проектов по геномному картированию и определению первичной нуклеотидной последовательности (разд. 6.9).

6.3.7 Эукариотические векторы

Использование клеток *E. coli* возможно для обычного клонирования и манипуляций с ДНК; однако также созданы системы для клонирования в эукариотических клетках. Плазмиды для клонирования в эукариотических клетках нуждаются в ориджине репликации эукариотического происхождения и маркерных генах, которые могут экспрессироваться в эукариотических клетках. В настоящее время двумя наиболее важными применениями плазмид в эукариотических клетках являются клонирование в дрожжах и в растениях.

Хотя дрожжи имеют плазмиду природного происхождения, называемую **кольцом в 2 мкм**, она слишком большая, чтобы использоваться в клонировании. С помощью генетического подхода, используя ориджин репликации из кольца 2 мкм и встраивая ген, дополняющий дефектный ген в дрожжевой хозяйской клетке, были созданы такие плазмиды, как эписомальная дрожжевая плазмида (YEp, yeast episomal plasmid). Если применяется штамм дрожжей, который имеет дефектный для био-

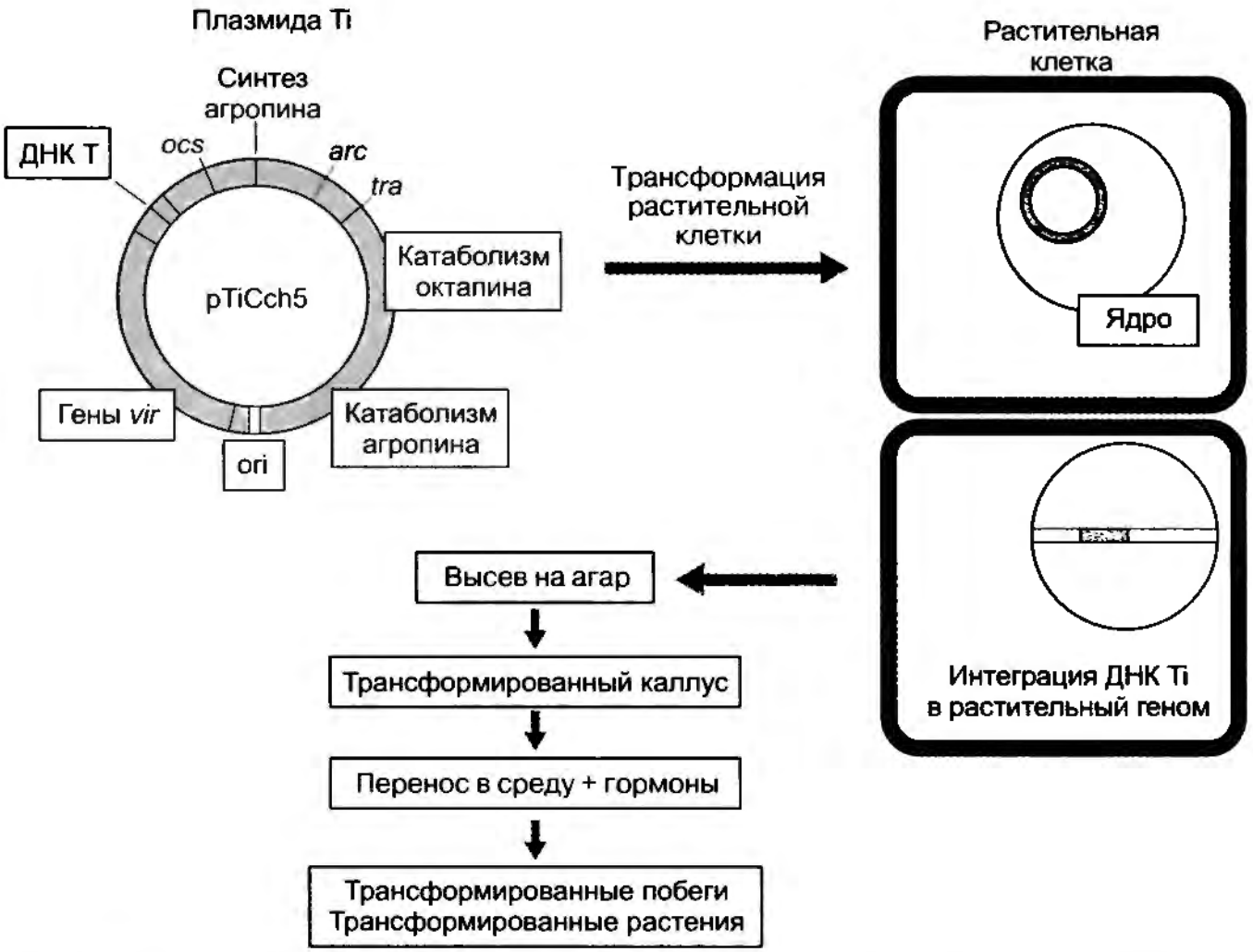


Рис. 6.25. Схема клонирования в растительных клетках с использованием плазмиды Ti

синтеза аминокислоты ген, то активная копия такого гена в дрожжевой плазмиде может быть использована как селективный маркер для обнаружения этой плазмиды. Дрожжи, подобно бактериям, растут быстро и поэтому хорошо подходят для клонирования. Особенно ценным достижением было создание **челночных векторов**, имеющих ориджин репликации для дрожжей и для бактерии, такой как *E. coli*. Это означает, что конструкции могут быть приготовлены в бактерии и переведены в дрожжи для анализа экспрессии.

Бактерия *Agrobacterium tumefaciens* заражает растения, которые были повреждены вблизи почвенного уровня, и такая инфекция часто сопровождается образованием опухолей вблизи зараженной области. В настоящее время известно, что *A. tumefaciens* содержат плазмиду Ti, часть которой переносится в ядро растительной клетки, зараженной бактерией. Оказавшись в ядре, эта ДНК сохраняется путем интеграции в хромосомную ДНК. Встроенная ДНК содержит гены для синтеза опинов (которые усваиваются бактерией, но не растениями) и для индукции опухоли (значит Ti). ДНК, встроенная в соответствующую область плазмиды Ti, будет перенесена в зараженные растительные клетки, и таким образом возможно клонировать и экспрессировать чужеродные гены в растениях (рис. 6.25). Этот подход является предпосылкой для развития генетической инженерии зерновых.

6.3.8 Перенос векторов в эукариотические клетки

Вслед за получением рекомбинантной молекулы так называемый «конструкт» вводят в клетки, чтобы дать ему возможность реплицироваться большое количество раз во время репликации клетки. Ранние эксперименты с рекомбинантной ДНК выполнялись в бактериальных клетках благодаря легкости наращивания и короткого времени удвоения. Грамотрицательная бактерия, например *E. coli*, может быть сделана **компетентной** для ввода плазмидной ДНК в клетки (разд. 6.3.1). Природная способность фага вносить ДНК в клетки *E. coli* также используется, что позволяет в 10–100 раз повысить эффективность внесения рекомбинантной ДНК по сравнению с трансформацией компетентных бактерий плазмидами. Существование таких хорошо укоренившихся и традиционных подходов объясняет, почему разработано так много клонирующих векторов для *E. coli*. Перенос клонирующих векторов в эукариотические клетки, однако, не является настолько простым, как для *E. coli*.

Возможно вносить рекомбинантные молекулы в животные клетки с помощью **трансфекции**, эффективность которой может быть повышена прежде всего переосаждением ДНК раствором Ca^{2+} или увеличением проницаемости мембраны с помощью двухвалентных катионов или полимеров, таких как DEAE-декстран или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Такой метод малоэффективен, хотя для контроля могут быть использованы селективные маркеры, обеспечивающие устойчивость к токсичным компонентам, например к неомицину. С другой стороны, ДНК может быть внесена в животные клетки посредством **электропорации**. В этом процессе

клетки подвергаются импульсам высокого напряжения, в результате чего многие из них поглощают ДНК из окружающего раствора. Этот метод оказался успешным для клеток ряда животных, растений и микробов. Позднее для переноса стал использоваться метод **липофекции**. Рекомбинантная ДНК заключается в капсулу из имеющих липидную оболочку частиц, которые соединяются с липидной мембраной клеток и высвобождают ДНК в клетку. Для многих клеток млекопитающих была успешно выполнена также микроинъекция ДНК в клеточные ядра яйцеклеток или эмбрионов.

Введение рекомбинантных молекул в растительные клетки также сопровождается некоторыми сложностями. Как правило, внешняя клеточная стенка растения должна быть разрушена, обычно с помощью ферментативного расщепления, оставляющего протопласт. После этого клетка становится способной захватывать рекомбинантную ДНК из супернатанта. Клеточная стенка затем может быть восстановлена помещением в соответствующую среду. Для протопластов трансформацию также можно проводить с помощью электропорации. Существует даже более сложная процедура трансформации, состоящая во введении микроскопических титановых или золотых частиц, покрытых рекомбинантной молекулой ДНК, в растительные клетки в интактных тканях. Этот так называемый метод **биолистики** (баллистики) с детонацией взрывного заряда с тем, чтобы ввести микрочастицы внутрь клетки с высокой скоростью. После этого, получив рекомбинантную молекулу, клетка самостоятельно закрывается. Этот метод подает особые надежды в тех случаях, когда протопласты растений не могут регенерировать в целые растения.

6.4 ГИБРИДИЗАЦИЯ И ЗОНДЫ

6.4.1 Клонированные ДНК-зонды

Увеличение возможности доступа к базам данных нуклеиновых кислот и наличие заказного синтеза олигонуклеотидов обеспечили относительно простые способы дизайна и получения ДНК-зондов и праймеров для ПЦР. Дизайн ДНК-зондов и праймеров обычно выполняется с использованием компьютерных программ и баз данных для нуклеиновых кислот или родственных последовательностей, как это показано в разд. 5.9.3. Однако многие ДНК-зонды были получены традиционным путем из кДНК или геномных последовательностей с последующим клонированием в плазмидные или фаговые векторы. Это требует специальных манипуляций до того, как зонды могут быть помечены или использованы в экспериментах по гибридизации. ДНК-зонды различаются по длине — от 100 п.н. до нескольких тысяч пар нуклеотидов, что зависит от их происхождения. Многие ДНК-зонды слишком короткие, чтобы быть клонированными в плазмидные векторы, которые удобны в работе и относительно стабильны при перевозке или в лабораториной практике. Последовательности ДНК, представляющие собой ДНК-зонды, обычно

вырезают из клонирующего вектора с помощью ферментов рестрикции и затем очищают. В этом случае последовательности вектора, которые могут гибридизоваться неспецифически и давать сильные сигналы фона в экспериментах гибридизации, удаляются. Существуют различные пути мечения ДНК-зондов, как это описано в разд. 5.9.4.

6.4.2 Зонды на основе РНК

С помощью **транскрипции *in vitro*** ДНК-зондов, клонированных в подходящий вектор, можно также приготовить кРНК-зонды, или рибозонды. Хорошим примером таких векторов является фазмида pBluescript SK, поскольку на каждом конце множественного сайта клонирования, где находится фрагмент ДНК, имеются промоторы Т3 или Т7 РНК-полимераз (разд. 6.3.3). Вектор обычно линеаризуется с помощью фермента рестрикции, и затем используют Т3 или Т7 РНК-полимеразу, чтобы транскрибировать клонированный фрагмент ДНК. Подготовленный меченый NTP добавляют в реакцию, и в результате получают меченый с высокой специфической активностью рибозонд (рис. 6.26). Одним из преимуществ рибозондов является то, что они одноцепочечные и, как правило, их чувствительность выше, чем для клонированных двухцепочечных ДНК-зондов, рассмотренных в разд. 6.4.1. Они широко используются для гибридизаций *in situ* и для обнаружения и анализа мРНК, что более подробно описывается в разд. 6.8.

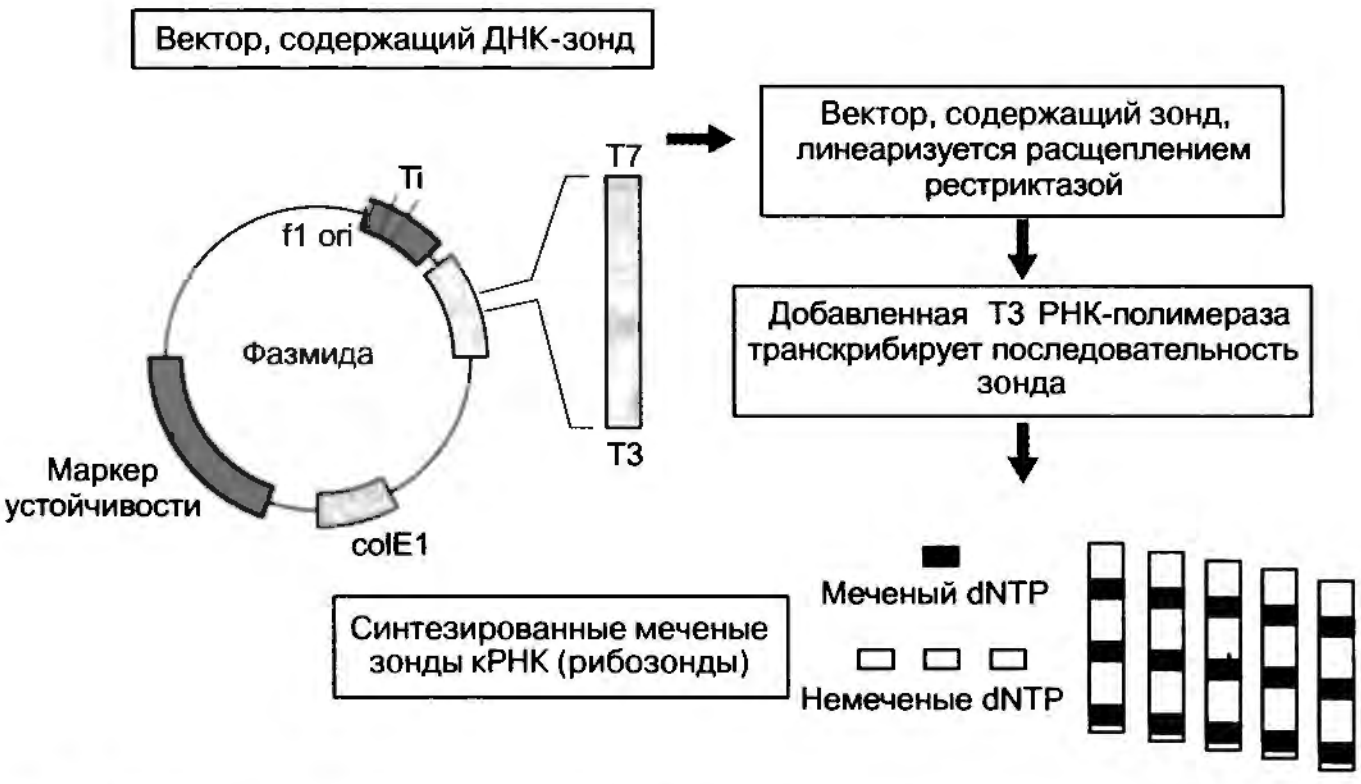


Рис. 6.26. Получение кРНК (рибозонда) с помощью РНК-полимеразы Т3 и фазмидных векторов

6.5 СКРИНИНГ ГЕНОМНЫХ БИБЛИОТЕК (КЛОНОТЕКА)

6.5.1 Гибридизация колоний и бляшек

Когда получена библиотека кДНК или геномная библиотека, следующей задачей является идентификация искомых фрагментов. Во многих случаях это может быть более сложной задачей, чем конструирование библиотеки, поскольку она представлена сотнями тысяч клонов. Необходимо выделить из библиотеки один клон, содержащий искомый фрагмент, и для решения этой задачи было разработано несколько методов, основанных в основном на гибридизации.

Гибридизация колоний является одним из методов, используемых для обнаружения определенных фрагментов ДНК в плазмидной геномной библиотеке (рис. 6.27). Наращивают большое число клонов, образующих колонии на одной или нескольких чашках, которые затем методом реплик переносятся на нейлоновые мембраны, помещенные на твердый агар. Питательные вещества проникают сквозь мембрану, что позволяет колониям расти на ней. Колонии затем лизируют, а высвобожденная ДНК денатурирует и связывается с мембранами, так что расположение колоний соответствует расположению связанной ДНК. Мембраны затем инкубируют с **предгибридизационной смесью**, содержащей немеченую неспецифическую ДНК, например ДНК спермы лосося, чтобы блокировать свободные участки мембраны. После этого добавляют денатурированный меченый зонд. В условиях гибридизации зонд будет связываться только с клонированным фрагментом, содержащим, по крайней мере, часть соответствующего гена (разд. 5.9.4). Сопоставление расположения пятен на авторадиографе с расположением колоний на чашках позволяет выделить для дальнейшего анализа те колонии, которые содержат искомый ген (или его часть). Подобный подход используется для обнаружения искомых генов, клонируемых в векторы на основе бактериофага. В последнем случае процесс называется **гибридизацией бляшек**. При этом ДНК, находящуюся в частицах бактериофага в каждой бляшке, фиксируют на нейлоновой мембране. Эту мембрану затем гибридизуют с меченым комплементарным зондом, и детекция производится, как при гибридизации колоний.

6.5.2 Скрининг клонотек с помощью ПЦР

В настоящее время во многих случаях для скрининга библиотек кДНК или геномных библиотек, сконструированных в плазмидах или бактериофагах, можно использовать ПЦР. Это обычно выполняется с помощью праймеров, которые отжигаются с вектором, но не со вставкой чужеродной ДНК. Размер амплифицированного продукта служит для характеристики клонированной ДНК, для которой также проводят рестрикционное картирование (рис. 6.28). Главным преимуществом ПЦР по сравнению с традиционным скринингом, основанным на гибридизации, является его быстрота: ПЦР-скрининг может быть выполнен за 3–4 часа, тогда как результаты гибридизации получают через несколько дней. Метод ПЦР-скрининга дает представление о размере клонированной вставки, но не

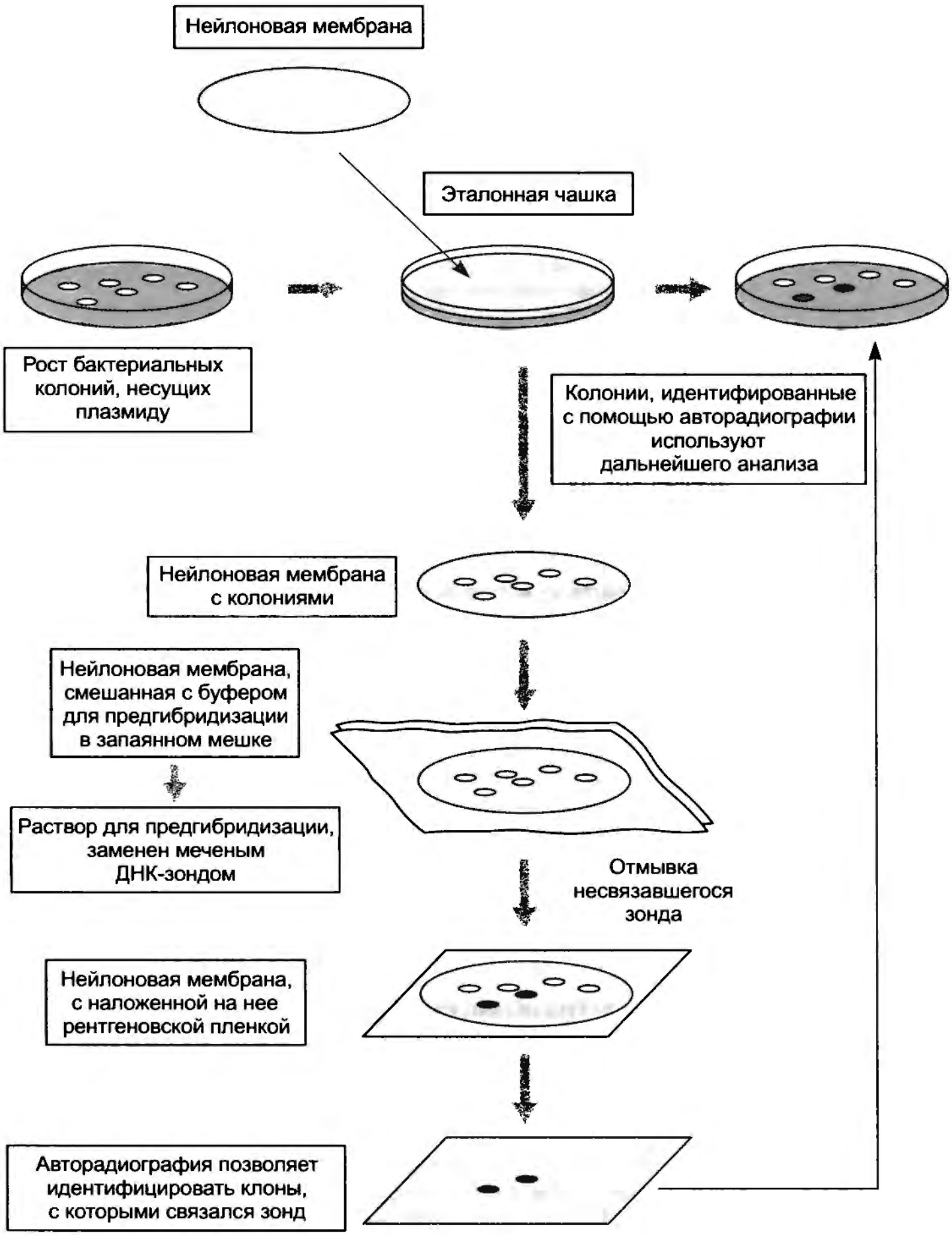


Рис. 6.27. Метод гибридизации колоний для обнаружения специфических бактериальных колоний, содержащих рекомбинантные плазмидные векторы с искомыми фрагментами ДНК

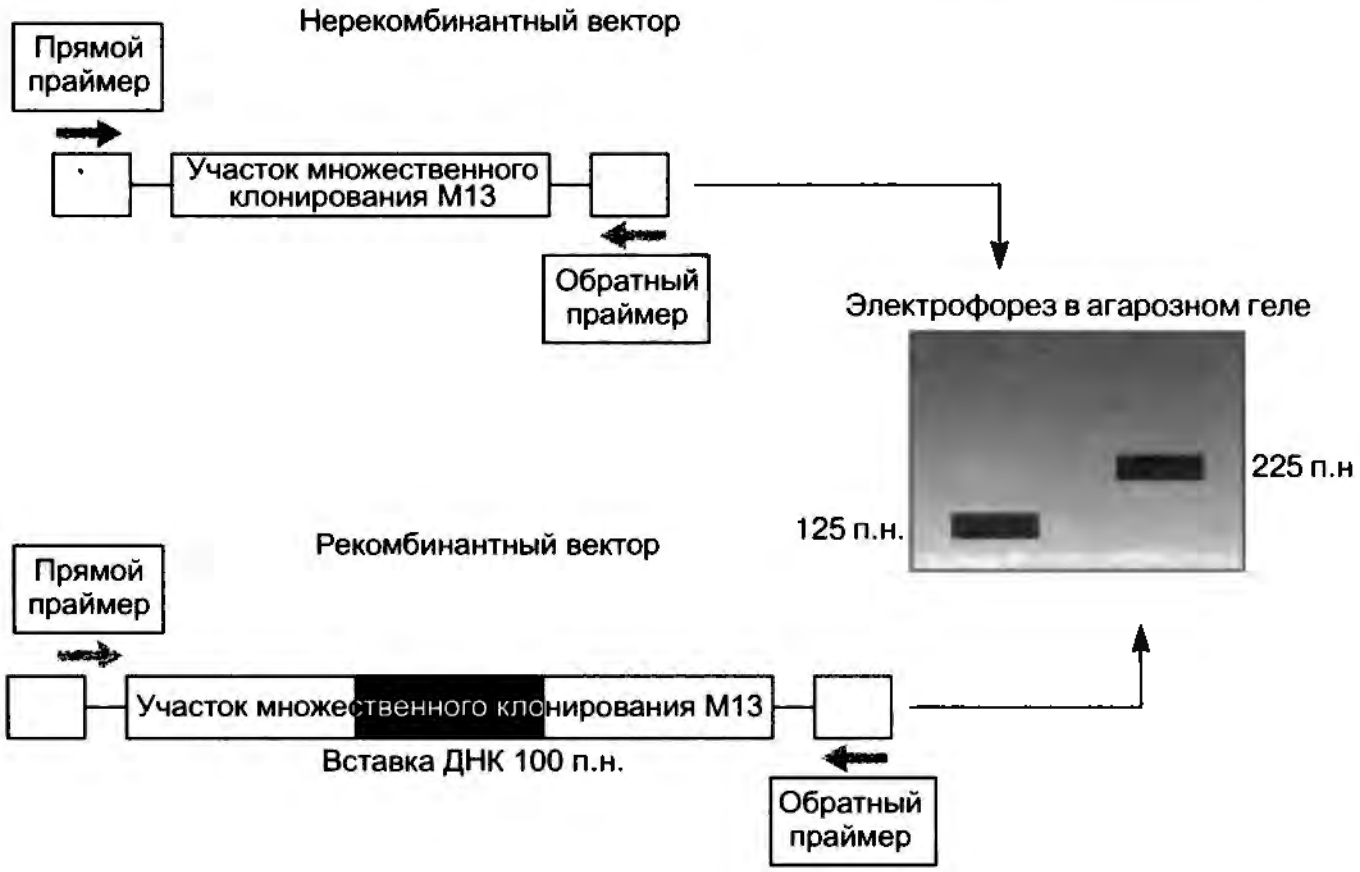


Рис. 6.28. Скрининг рекомбинантных векторов с помощью ПЦР. Здесь нерекомбинантный M13 не имеет вставки и, следовательно, ПЦР, выполненная с прямым и обратным праймерами для секвенирования, дает продукт длиной 125 п.н. Рекомбинантный M13 со вставкой 100 п.н. будет давать продукт ПЦР длиной 125 п.н. + 100 п.н. = 225 п.н., который может быть отделен от нерекомбинантного продукта с помощью электрофореза в агарозном геле

о ее нуклеотидной последовательности; однако для ПЦР можно использовать праймеры, специфичные чужеродной вставке ДНК. Это позволяет проводить более строгую характеристику клонов из библиотеки кДНК или геномной библиотеки.

6.5.3 Селекция гибрида/трансляция, подавляемая гибридом

Трудности, возникающие при характеристике клонов и обнаружении искомого фрагмента ДНК в смешанной библиотеке кДНК, можно преодолеть с помощью двух удобных методов, называемых **трансляция, стимулированная гибридом** (hybrid select (release) translation), и **трансляция, подавляемая гибридом** (hybrid arrest translation). После получения в плазмидном векторе библиотеки кДНК из каждой колонии выделяют плазмиду, и каждый препарат затем денатурируют и фиксируют на нейлоновой мембране (рис. 6.29). Мембраны пропитывают в растворе общей клеточной мРНК в строгих условиях, т. е. обычно при температуре лишь на несколько градусов ниже $T_{пл}$, при этом гибридизация может происходить только между комплементарными цепями нуклеиновых кислот. Следовательно, каждая мембрана связывает только один вид мРНК, поскольку на ней фиксирован только один тип кДНК. Несвязанную мРНК смывают

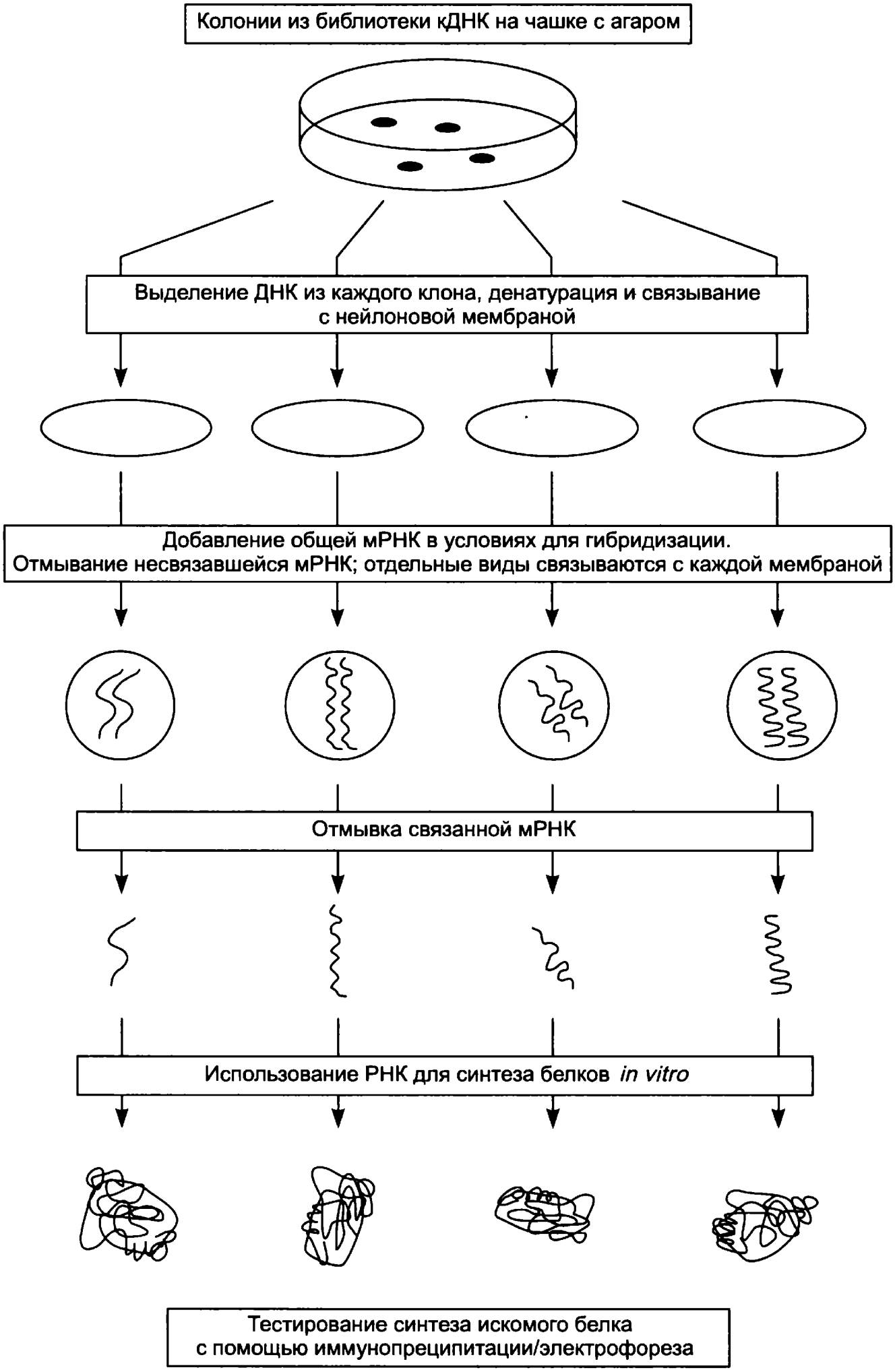


Рис. 6.29. Основные принципы, лежащие в основе метода трансляции, стимулированная гибридом (hybrid select transtion)

с мембраны, после чего смывают связанную мРНК и используют для трансляции *in vitro* (разд. 6.7). мРНК, кодирующая определенный белок, может быть идентифицирована посредством иммунопреципитации или белкового электрофореза, после чего выделяют клон, содержащий соответствующую кДНК. Этот метод известен под названием трансляции, стимулированной гибридом. В родственном методе трансляции, подавляемой гибридом, в случае положительного результата не образуется продукта трансляции при гибридизации общей мРНК с избытком кДНК. Это является следствием того факта, что мРНК не может быть транслирована, если она гибридизуется с другой молекулой.

6.5.4 Скрининг экспрессирующих библиотек кДНК

В некоторых случаях белок, для которого необходимо определить последовательность гена, является частично охарактеризованным, и тогда возможно получить антитела к этому белку. Это позволяет применить **иммунологический скрининг** вместо гибридизации гена. Такие антитела являются удобными, поскольку они могут быть использованы как зонды, если в распоряжении имеется лишь небольшая часть последовательности гена либо она совсем неизвестна. В таких случах можно создать библиотеку кДНК в специально адаптированном векторе, называемом **экспрессирующим вектором**, который транскрибирует и транслирует любую встроенную в него кДНК. Белок обычно синтезируется связанным с другим белком, например с β-галактозидазой. Примерами таких экспрессирующих векторов являются векторы на основе бактериофагов λgt11 и λZap или на основе плазмид, например pEX. Требования к таким векторам идентичны требованиям к векторам, продуцирующим белки *in vitro*, и описываются в разд. 6.7.1. В некоторых случаях экспрессирующие векторы включают в свой состав индуцируемые промоторы, которые могут быть активированы, например, повышением температуры, позволяя таким образом осуществлять строгий контроль экспрессии клонированных молекул кДНК (рис. 6.30).

Библиотеку кДНК высевают на чашки и готовят фильтры из нейлоновой мембраны, как это делается для гибридизации колоний или бляшек. Затем на мембрану помещают раствор, содержащий антитела к искомому белку. Мембрану отмывают от несвязавшихся белков, после чего наносят раствор меченого антитела против первичного антитела. Такой подход позволяет визуализировать бляшки или колонии, содержащие клонированную кДНК для этого белка, после чего их можно отобрать из чашки с агаром и вырастить для дальнейшего анализа.

6.6 ПРИМЕНЕНИЕ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

6.6.1 Определение последовательности клонированной ДНК

Последовательность фрагментов ДНК, клонированных в плазмидные векторы, можно определить с помощью реакции терминации по Сенгеру, описанной в деталях в разд. 5.11.1. Однако, поскольку плазмиды являются

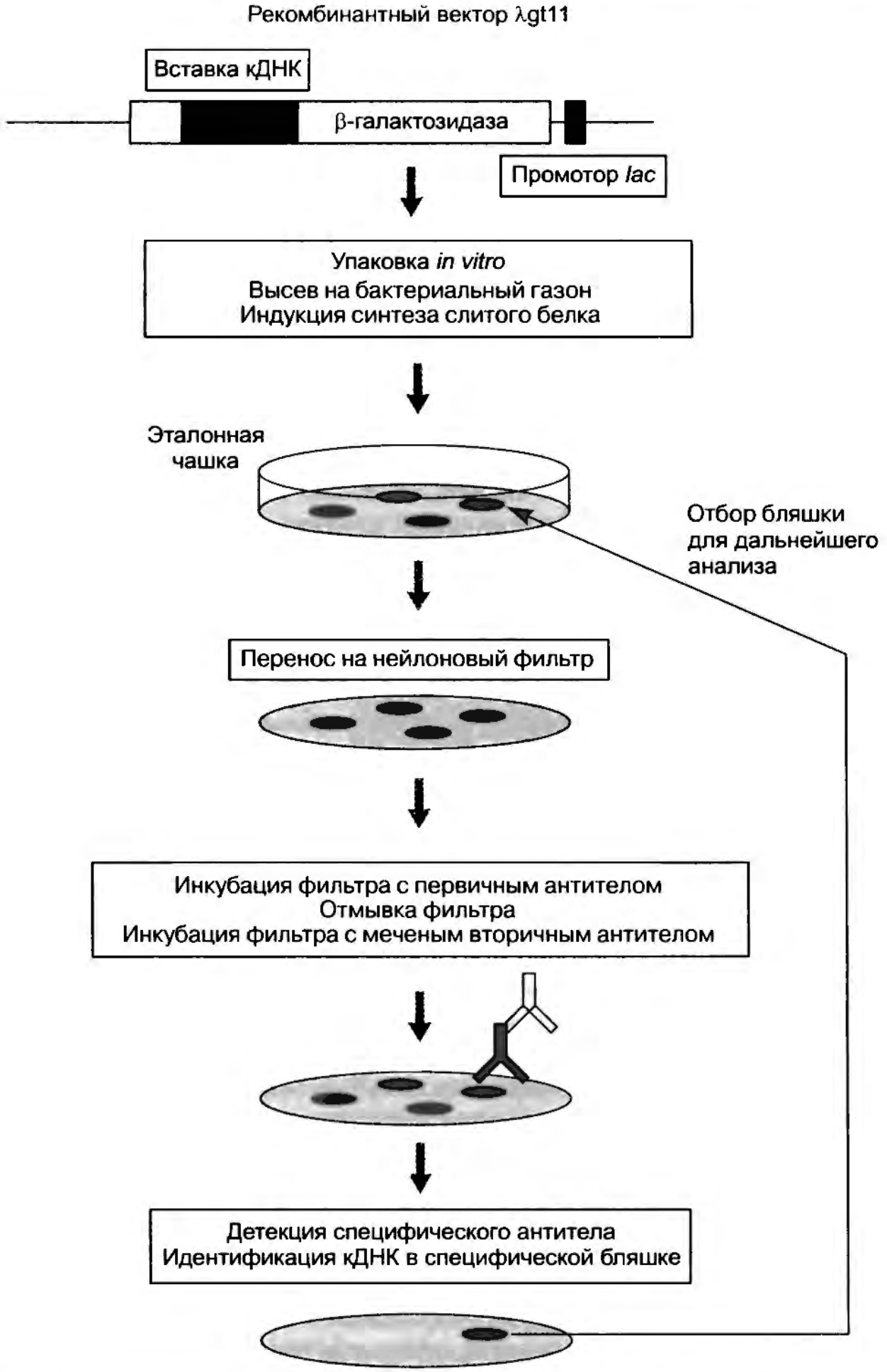


Рис. 6.30. Скрининг библиотек кДНК в экспрессирующем векторе λgt11. кДНК, встроенная выше гена β-галактозидазы, будет давать при индукции (например, IPTG) слитый белок. Бляшки затем переносят на нейлоновую мембрану и гибридизуют с антителами к белку, кодируемому кДНК. Вторичное меченое антитело против специфического антитела может быть использовано для идентификации бляшки

двухцепочечными, до применения этой реакции требуются дополнительные манипуляции. В таких случаях плазмиды обычно денатурируют щелочной обработкой. Хотя после этого цепи плазмид, содержащих вставки чужеродной ДНК, могут заново слипаться, кинетика реакции такова, что цепи остаются одноцепочечными достаточно долго, чтобы можно было их использовать в реакциях секвенирования. Для предотвращения отжига одноцепочечных молекул можно также применять такой денатурирующий агент, как формамид*. Как правило, однако, для получения хороших результатов при секвенировании одноцепочечной ДНК с использованием M13 или однонитевых фазмид требуется субклонирование искомой ДНК в эти векторы.

Векторы M13 традиционно применяются для секвенирования с помощью реакции терминации из-за одноцепочечной природы их ДНК. Дополнительной модификацией, которая делает M13 удобным в таком методе секвенирования, является расположение универсальных участков праймеров на расстоянии –20 или –40 п.н. от начала MCS. Это позволяет секвенировать любой ген, используя один универсальный праймер, поскольку его отжиг до реакции секвенирования происходит вне участка MCS, и он, таким образом, является специфичным к M13, а не к гену. Это устраняет необходимость синтеза новых олигонуклеотидных праймеров для каждой новой вставки чужеродной ДНК. Более того, имеется также участок для связывания обратного праймера, находящийся на противоположном конце полилинкера, позволяющий проводить секвенирование в противоположном направлении.

6.6.2 Мутагенез *in vitro* и рациональный дизайн

Одним из наиболее выдающихся достижений молекулярной биологии явилась возможность искусственно создавать определенные мутации в гене и анализировать получающиеся в результате белки, экспрессирующиеся *in vitro*. В настоящее время для получения сайт-специфических мутаций доступны несколько методов, в некоторых используется ПЦР. Подобные методы называют обычно **методами белковой инженерии**; они включают определенную последовательность аналитических и компьютерных методов, составляющих цикл белкового дизайна: биохимическое получение и анализ белков, последующая идентификация гена, кодирующего белок, и его модификация. Полученный модифицированный белок после последующего биохимического анализа открывает перспективу для дальнейших мутаций с целью улучшить структуру и функцию белка (рис. 6.31).

Использование циклов белкового дизайна и систем **рационального дизайна** можно рассмотреть на примере субтилизина. Эта сериновая протеаза обладает широкой специфичностью; она используется в стиральных порошках, в пищевой и кожевенной промышленностях. Методами белковой инженерии были изменены некоторый свойства субтилизина: специфичность, оптимум pH, профиль и устойчивость к окислителям, тепловой и щелочной инактивации. С целью получения более устойчивого субтили-

* Как уже отмечалось выше, секвенирование плазмид с использованием термоциклеров сейчас является рутинным методом. — *Прим. ред.*

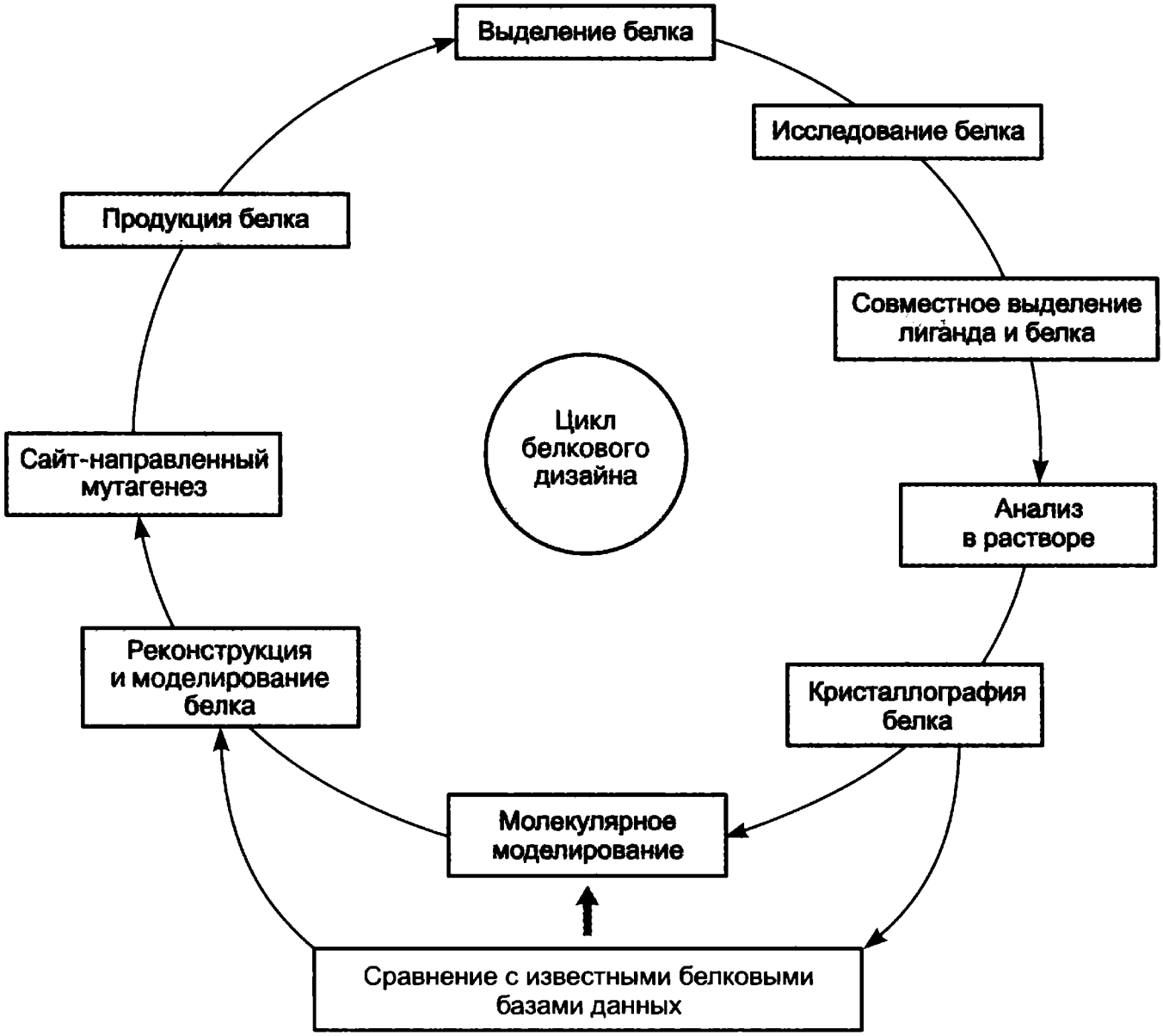


Рис. 6.31. Цикл белкового дизайна в рациональной реконструкции белков и ферментов

зина были также исследованы гомологичные белки из термофильных организмов. При этом бы получен субтилизин с повышенной устойчивостью к отбеливателям и улучшенной моющей способностью, который в настоящее время используется во многих марках стиральных порошков.

6.6.3 Направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов

Традиционный метод сайт-специфического мутагенеза предполагает, что ген уже клонирован или субклонирован в одноцепочечный вектор, например в M13. Определение полной последовательности гена является существенным для выбора потенциальных областей мутации. Как только выбрано основание для изменения, создают олигонуклеотид, комплементарный этой части гена, но имеющий одно или несколько измененных оснований. Мутация должна изменить определенный кодон, который после трансляции будет давать другую аминокислоту, и, следовательно, изменять свойства белка.

Олигонуклеотид и одноцепочечная ДНК отжигаются, после чего добавляют dNTP и ДНК-полимеразу. Началом реакции служит 3'-конец олигонуклеотида. ДНК-полимераза продуцирует новые цепи ДНК, которые комплементарны уже существующим, но включают в себя олигонуклеотид с мутированным основанием. Последующее клонирование рекомбинантного продукта приводит к образованию многочисленных копий, половина из которых содержит последовательности дикого типа. Гибридизация бляшек с использованием олигонуклеотида в качестве зонда проводится в таких условиях, которые позволяют идентифицировать бляшки, содержащие мутированную последовательность (рис. 6.32).

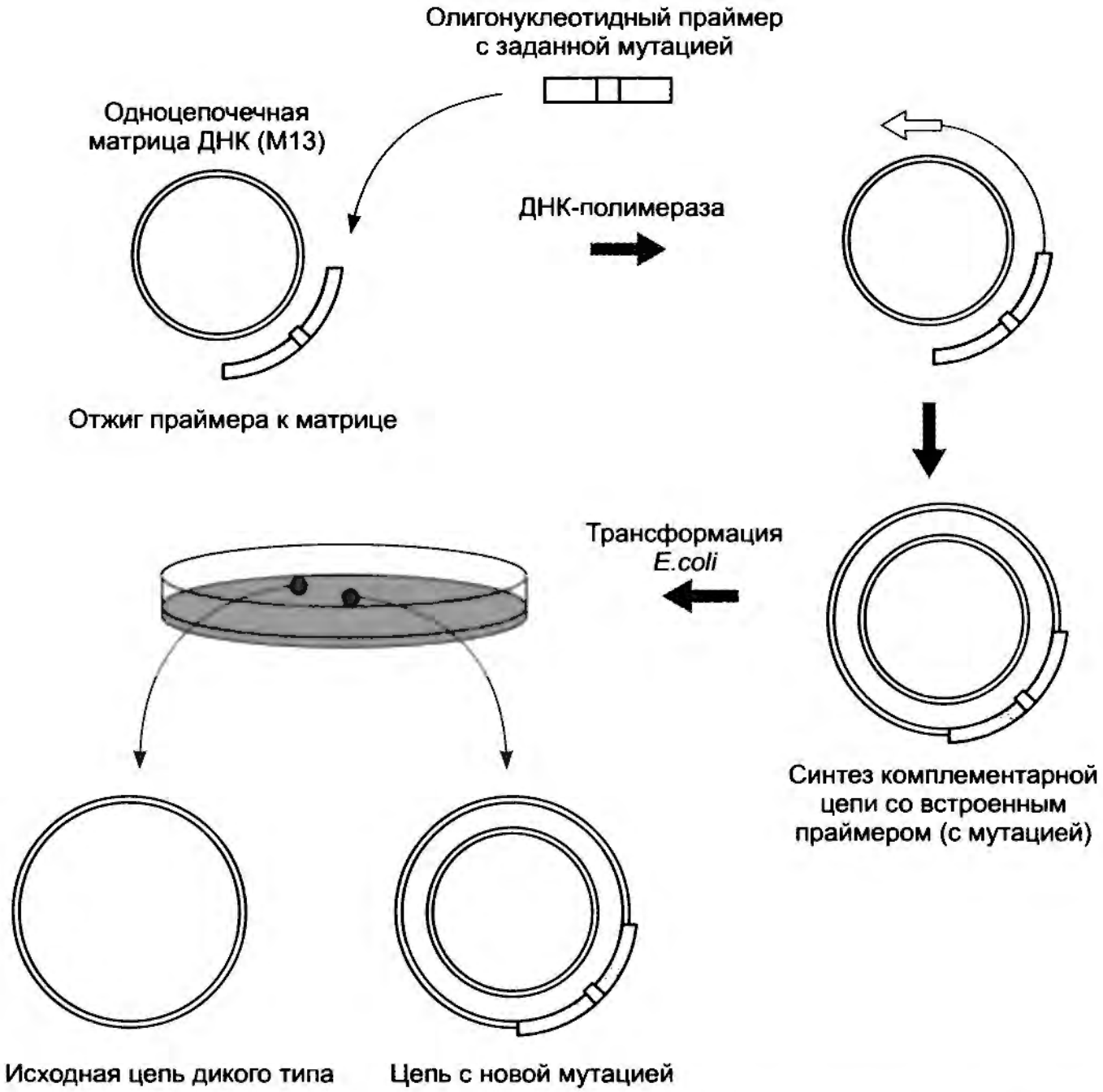


Рис. 6.32. Направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов. Этот метод требует знания нуклеотидной последовательности, поскольку олигонуклеотид может быть синтезирован с мутацией основания. Отжиг олигонуклеотида с комплементарной (за исключением мутации) одноцепочечной ДНК позволяет ДНК-полимеразе синтезировать новую цепь, и, таким образом, встраивать праймер с мутацией

Разработаны и другие методы, позволяющие упростить детекцию последовательностей, содержащих мутации.

6.6.4 Мутагенез на основе ПЦР

Метод ПЦР был адаптирован для проведения мутагенеза; в его основе лежит встраивание в продукт амплификации единственного основания, спаренного неправильным образом с одним из праймеров ПЦР*.

Основная схема **мутагенеза с помощью ПЦР** включает в себя первоначальное проведение двух реакций ПЦР с тем, чтобы получить два перекрывающихся фрагмента ДНК с одинаковыми мутациями в районе перекрывания у обоих фрагментов. Такой метод называется **ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов**. Два продукта ПЦР делаются одноцепочечными, и последовательность в области перекрывания позволяет им гибридизоваться. После гибридизации один из двух гибридов, обладающий свободной 3'-гидроксильной группой, удлиняется, давая новый спаренный фрагмент. Другой гибрид, имеющий 5'-гидроксильную группу, не может действовать как субстрат. Таким образом, перекрывающийся и удлиненный продукт будет содержать направленную мутацию (рис. 6.33). С помощью этого метода можно также создавать делеции и инсерции, хотя необходимость четырех праймеров и трех реакций ПЦР ограничивает его применение. Модификация ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов может быть также использована для конструирования направленных мутаций; этот метод называется **мегапраймерным ПЦР**. В этом случае используют три олигонуклеотидных праймера, чтобы выполнить два раунда ПЦР. Полный продукт ПЦР, мегапраймер, делают одноцепочечным и используют как большой праймер в последующей реакции ПЦР с дополнительным праймером.

Описанные выше методы служат для введения заданных мутаций в рамках цикла рационального дизайна. Однако также возможно вносить случайные мутации в ген с последующим отбором белков и ферментов с улучшенными или новыми свойствами. Эта ускоренная форма искусственной молекулярной эволюции может быть выполнена с помощью метода ошибочно-направленной («error-prone») ПЦР, в котором намеренные и случайные мутации вносятся посредством реакций амплификации с низкой точностью. Получающийся в результате амплифицированный ген затем транслируется, его активность исследуется. Такой подход был применен для получения нового фермента *n*-нитробензилэстеразы, проявляющего удивительное сродство к органическим растворителям. Этот ускоренный эволюционный подход был успешно использован для получения новых антител с помощью метода фагового дисплея (разд. 6.7.2) и в создании антител с ферментативными активностями (каталитические антитела) (разд. 15.3.5).

---

* Можно вводить и до 10 других оснований в один праймер. — *Прим. ред.*

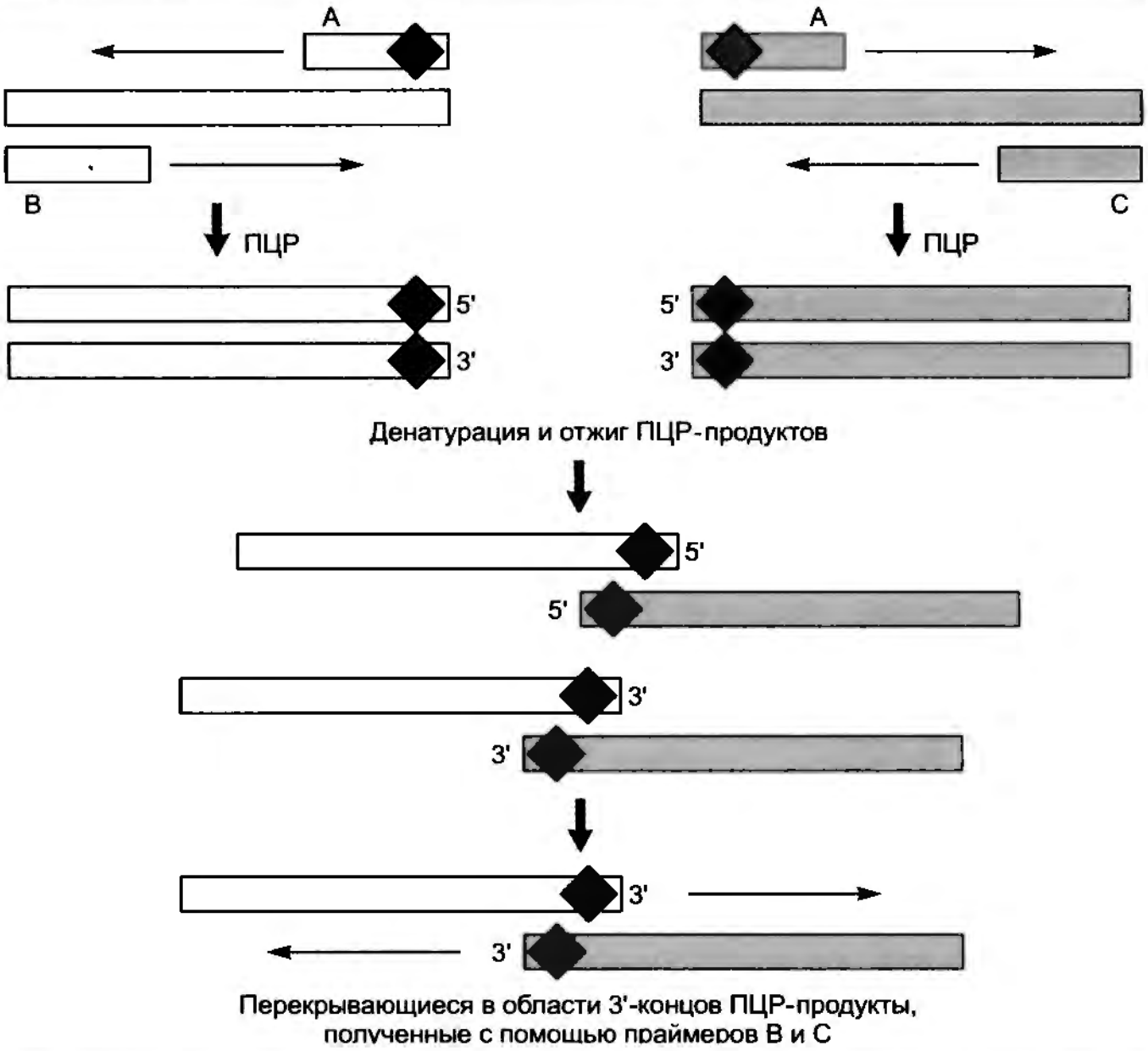


Рис. 6.33. Конструирование синтетического фрагмента ДНК с заданной мутацией. Использование мутагенеза с ПЦР — ПЦР с удлинением перекрывающихся фрагментов

6.7 ЭКСПРЕССИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Одно из наиболее удачных применений технологии рекомбинантной ДНК — искусственный синтез больших количеств природных или модифицированных белков в клетках бактерий или дрожжей. После того как в 1982 г. были клонированы и экспрессированы первые молекулы инсулина, этими методами успешно пользовались в течение нескольких лет (табл. 6.3). Контаминация других белков, например фактора продукции крови VIII, инфекционными агентами также повысила необходимость развития эффективных векторов для экспрессии *in vitro* чужеродных генов. Как правило, экспрессия чужеродных генов производится в специализированных клонирующих векторах (рис. 6.34). Однако возможно использовать бесклеточные системы транскрипции и трансляции, которые управляют синтезом белков без необходимости наращивания и поддержания клеток. Трансляция *in vitro* выполняется при наличии соответствующих аминокислот, рибосом, молекул тРНК и выделенных

Таблица 6.3. **Некоторые лекарственные препараты, полученные на основе рекомбинантной ДНК**

Типы препаратов	Рекомбинантный продукт
Лекарства	Эритропоэтин
	Инсулин
	Гормон роста
	Фактор коагуляции (например, фактор VIII)
	Активатор плазминогена
Вакцины	Гепатит B
Цитокины/факторы роста	ГМ-КСФ
	Г-КСФ
	Интерлейкины
	Интерфероны

ГМ-КСФ — колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов; Г-КСФ — колониестимулирующий фактор гранулоцитов

фракций мРНК. Экстракты пшеничных зародышей или лизаты ретикулоцитов кролика обычно служат в качестве систем для трансляции *in vitro*. Полученные в таких системах белки можно определять методом электрофореза в полиакриламидном геле или иммунологически с помощью **вестерн-блоттинга**. Недавно были синтезированы олигонуклеотидные праймеры ПЦР, позволяющие встраивать промотор для РНК-полимеразы и **участки связывания рибосомы**. При проведении так называемой **экспрессирующей ПЦР** (E-PCR, expression PCR) продук-

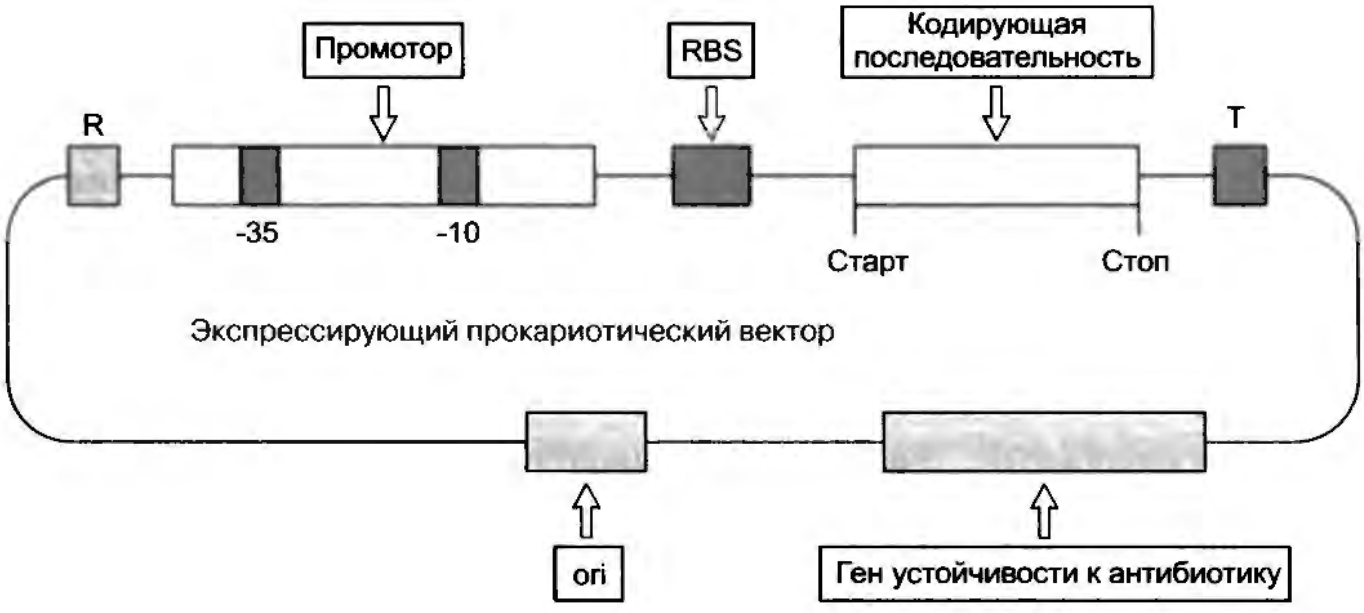


Рис. 6.34. Компоненты типичного экспрессирующего прокариотического вектора. Чтобы получить транскрипт (кодирующую последовательность) и транслировать его, в векторе должны существовать определенные последовательности, в частности промотор и участок связывания рибосомы (RBS — ribosome-binding site). Активность промотора может регулироваться регуляторным геном (R), который действует подобно регуляторному гену в *lac*-опероне. T — терминатор транскрипции

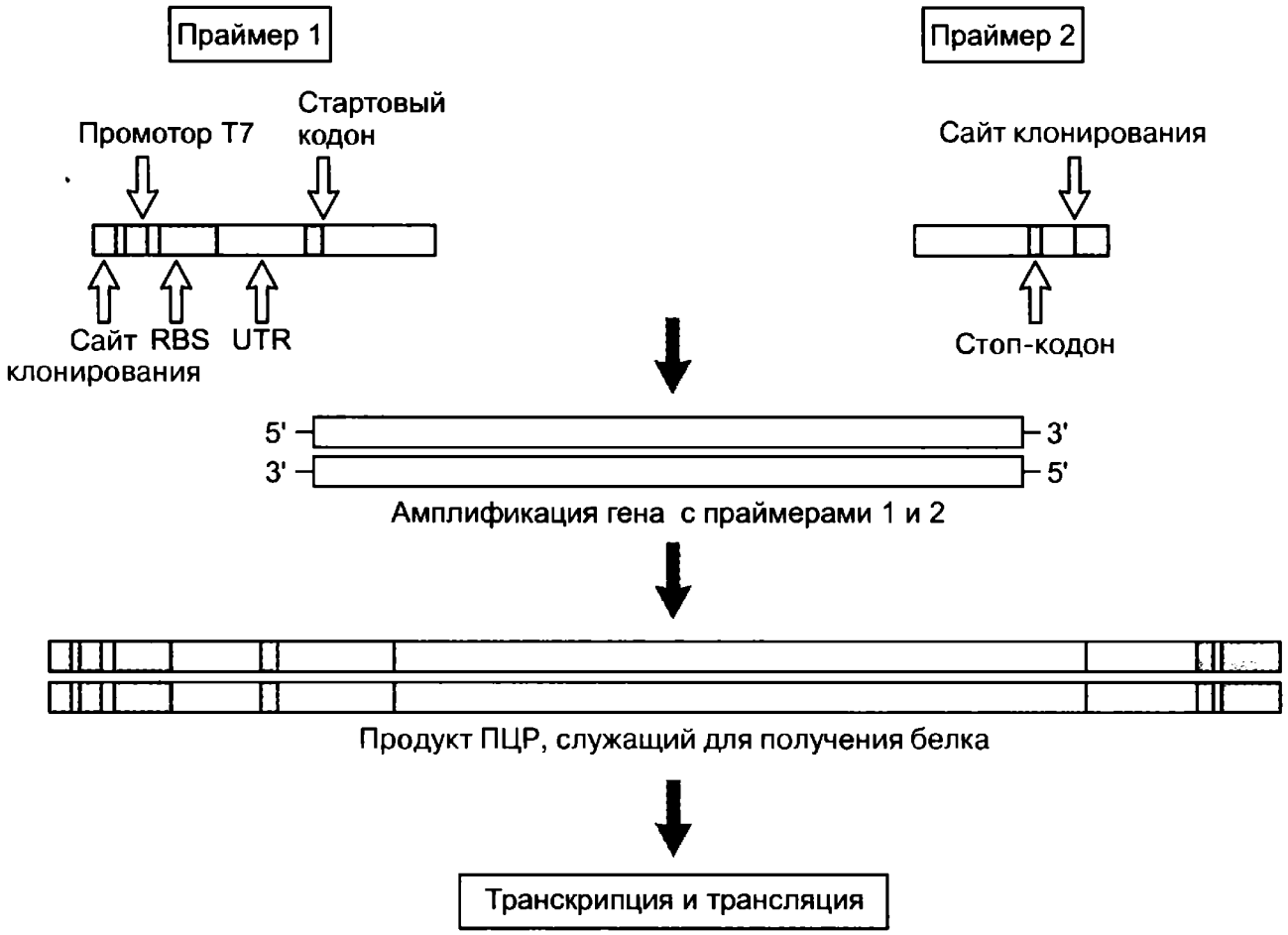


Рис. 6.35. Метод экспрессирующей ПЦР (E-PCR). Этот метод позволяет амплифицировать последовательность-мишень с одним праймером, содержащим промотор транскрипции, участок связывания рибосомы (RBS), нетранслируемую лидерную область (UTR, untranslated leader region) и стартовый кодон. Другой праймер содержит стоп-кодон. Амплифицированные продукты ПЦР могут быть использованы для транскрипции и трансляции с целью получения белка

ты амплификации подвергают денатурации и транскрибируются РНК-полимеразой, после чего они транслируются *in vitro*. Преимуществом такого метода является синтез большого количества специфической РНК, что увеличивает выход соответствующих белков (рис. 6.35).

6.7.1 Получение слитых белков

Чтобы чужеродный ген экспрессировался в бактериальной клетке, он должен иметь выше кодирующей области определенную промоторную последовательность для связывания РНК-полимеразы. Выбор промотора является существенным для правильной и эффективной транскрипции, поскольку последовательность и положение промоторов специфичны для такого особого хозяина, как бактерия (разд. 5.5.5). Промотор также должен содержать область связывания рибосомы, расположенную непосредственно перед кодирующей частью. Не имеющий этих последовательностей ген не будет экспрессироваться бактериальной клеткой. Если ген получен через кДНК из эукариотических клеток, он, конечно же,

не обладает такими последовательностями. Поэтому разработаны экспрессирующие векторы, содержащие промотор и область связывания рибосомы сразу же после одного или нескольких сайтов рестрикции для встраивания чужеродной ДНК. Такие регуляторные последовательности, например *lac*-оперон из *E. coli*, получают обычно из генов, индукция которых обеспечивает высокий уровень экспрессии в бактерии. Поскольку продуцируемая геном мРНК читается в виде триплетов, встраиваемая последовательность должна располагаться в одной рамке со стартовым кодоном. Этого можно достичь путем использования трех векторов, которые различаются только числом оснований между промотором и участком встраивания, т. е. второй и третий вектор длиннее первого на одно или два основания соответственно. Если вставку клонируют во все три вектора, в одном из них она окажется в правильной рамке считывания. Полученные в результате клоны анализируют для обнаружения функционального чужеродного белка (разд. 6.5.4).

В некоторых случаях белок экспрессируется в виде общей полипептидной цепи с основным белком, таким как β-галактозидаза или глутатион-S-трансфераза (GST), что облегчает его выделение. Белок может также содержать полигистидин (последовательность из шести остатков гистидина), который с высоким сродством связывается с хроматографической колонкой, заполненной нитрилотриацетатом никеля (Ni-NTA). Преимущество этого подхода состоит в том, что связывание не зависит от трехмерной структуры гистидинового «хвоста», и поэтому выделение белка эффективно даже в сильных денатурирующих условиях, часто необходимых для выделения мембранных белков и телец включения (рис. 6.36). Аффинная группа затем может быть удалена с помощью такого реагента, как бромциан, а полученный искомый белок очищают методами хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле.

Для получения функционального белка в бактерии необходимо использовать кДНК вместо эукариотической геномной ДНК. Причиной этого является то, что бактерия не способна процессировать РНК, чтобы удалять интроны, и поэтому любой из чужеродных генов, содержащий интроны, должен быть предварительно процессирован, как кДНК. Следующая проблема возникает, если белок должен быть гликозилирован присоединением олигосахаридов к специфическим участкам для того, чтобы стать функционально активным. Использование бактериальных систем экспрессии для эукариот отчасти ограничено, но существует множество эукариотических систем экспресии, основанных на растительных клетках, клетках млекопитающих, насекомых и дрожжей. Такие типы клеток могут выполнять так называемые пост-трансляционные модификации, включая гликозилирование и в некоторых случаях корректное удаление интронов. Возможно также присоединять **сигнальную последовательность** к 5'-концу гена в мРНК, чтобы направлять белок к определенному клеточному компартменту или даже выводить из клетки в супернатант. Это позволяет упростить получение вновь экспрессированных рекомбинантных белков путем отделения супернатанта в процессе синтеза белка.

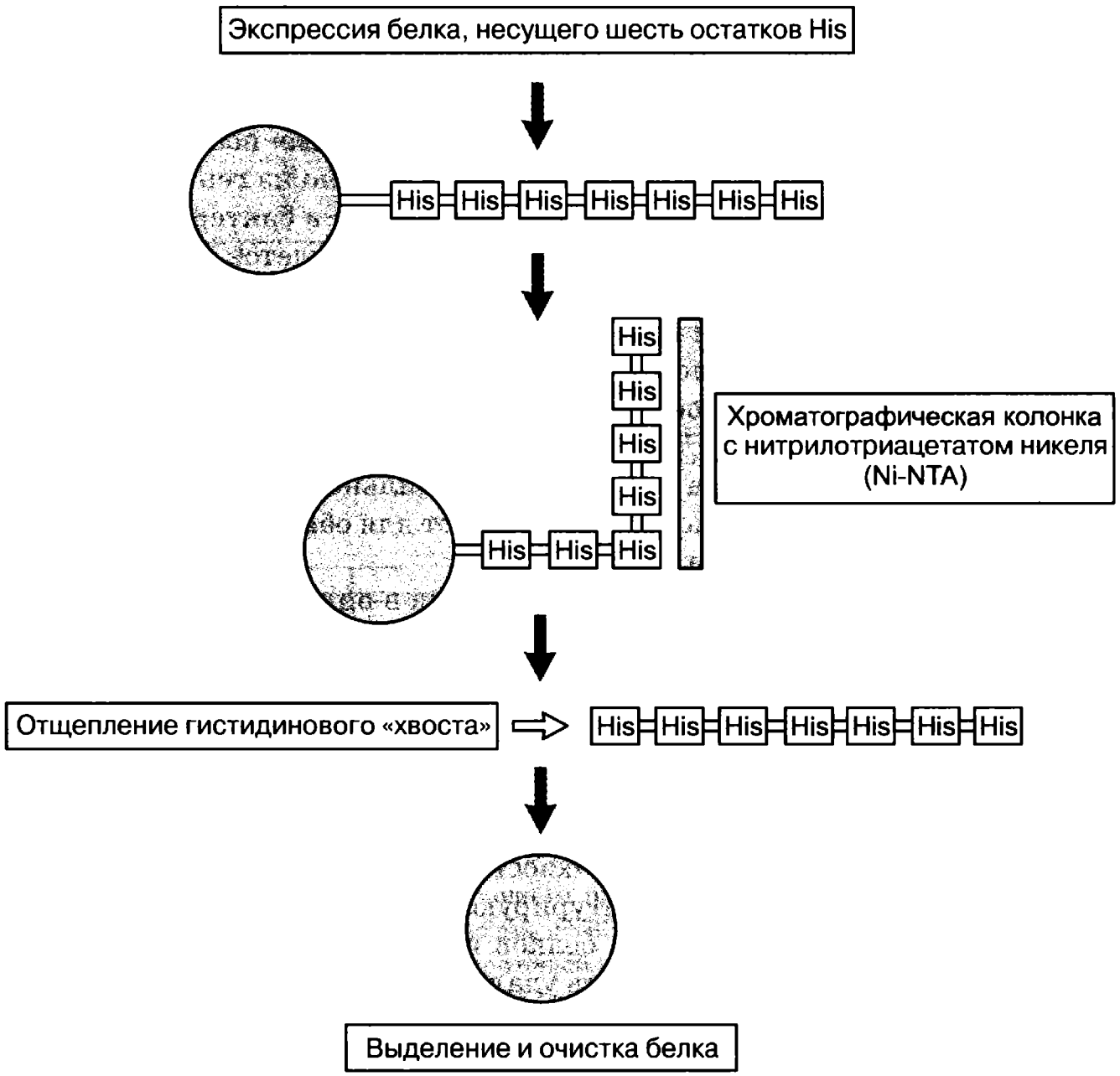


Рис. 6.36. Получение белков, имеющих последовательность из шести остатков гистидина, с помощью хроматографической колонки Ni-NTA

Одна из известных эукариотических систем экспресии основывается на **клеточной линии COS** из обезъян. Геном каждой из этих клеток содержит область, полученную из вируса обезьян, называемого обезьяньим вирусом SV40 (simian virus SV40). Дефектная область генома SV40 стабильно интегрирована в геном COS-клеток. Это позволяет осуществлять экспрессию белка, называемого большим Т-антигеном, который необходим для репликации вируса. Когда рекомбинантный вектор, имеющий ориджин репликации SV40 и несущий чужеродную ДНК, встраивается в клетки COS, начинается репликация вируса. Это приводит к высокому уровню экспрессии чужеродных белков. Недостатками такой системы являются полный лизис COS-клеток и ограниченная встраивающая способность вектора. Наибольший интерес в настоящее время сфокусирован на других модифицированных вирусах: вирусе коровьей оспы и бакуловирусе. Они предназначены для

достижения высокого уровня экспрессии в клетках млекопитающих и насекомых. В частности, вирус коровьей оспы был использован, чтобы исправлять дефектный ионный транспорт с помощью введения гена кистозного фиброза дикого типа в клетки, несущие мутированный ген регулятора CFTR (cystic fibrosis transmember regulator). Нет сомнения, что развитие таких векторных систем позволит в будущем увеличивать экспрессию эукариотических белков.

6.7.2 Методы фагового дисплея

В результате использования фазмидных векторов и решения проблем скрининга большого количества клонов из геномных библиотек генов антител был создан метод, позволяющий проводить корреляцию между генотипом и фенотипом или экспрессией белка. Этот метод называют **фаговым дисплеем**, поскольку функциональный белок соединен с главным белком оболочки бактериофага, в то время как одноцепочечный ген, кодирущий белок, упакован в вирион. Вначале проводят ПЦР для амплификации фрагментов гена, которые представляют собой функциональные домены или субъединицы белка, например антитела. Затем эти фрагменты клонируют в вектор фагового дисплея — адаптированный фазмидный вектор (разд. 6.3.3) для трансформации *E. coli*. После этого добавляют фаг-помощник, обеспечивающий вспомогательные белки для конструирования новых молекул фага. Фрагменты ДНК, кодирующие интересующий белок или полипептид, также транскрибируются и транслируются, но связаны они с главным белком оболочки gIII. Таким образом, когда собирается фаг, искомый белок или полипептид встраивается в оболочку фага и экспонируется наружу, тогда как соответствующая ДНК заключается в капсулу (рис. 6.37).

Существует множество применений дисплея белков на поверхности фагов, вирусов, бактерий и других организмов, и во многих фирмах эта технология уже эксплуатируется. Одним из главных применений является анализ и конструирование антител, для которых и была исходно развита эта технология. Скрининг новых рекомбинантных структур может быть выполнен с помощью аффинной хроматографии. При этом удается получать большое количество генов тяжелой и легкой цепей антитела при амплификации методом ПЦР и последующего их смешивания случайным образом. Такие **комбинаторные библиотеки** могут помочь в создании как новых, так и существующих в природе структур. Эта стратегия используется не только для анализа антител; в **комбинаторной химии** обширные библиотеки пептидов используются для идентификации новых соединений, применяемых в биотехнологии или медицине.

Еще одним преимуществом методов клонирования, основанных на использовании фагов, является относительная легкость проведения последующих стадий мутагенеза. Метод позволяет получать антитела с таким же высоким сродством, как у иммунной системы человека или мыши. Это

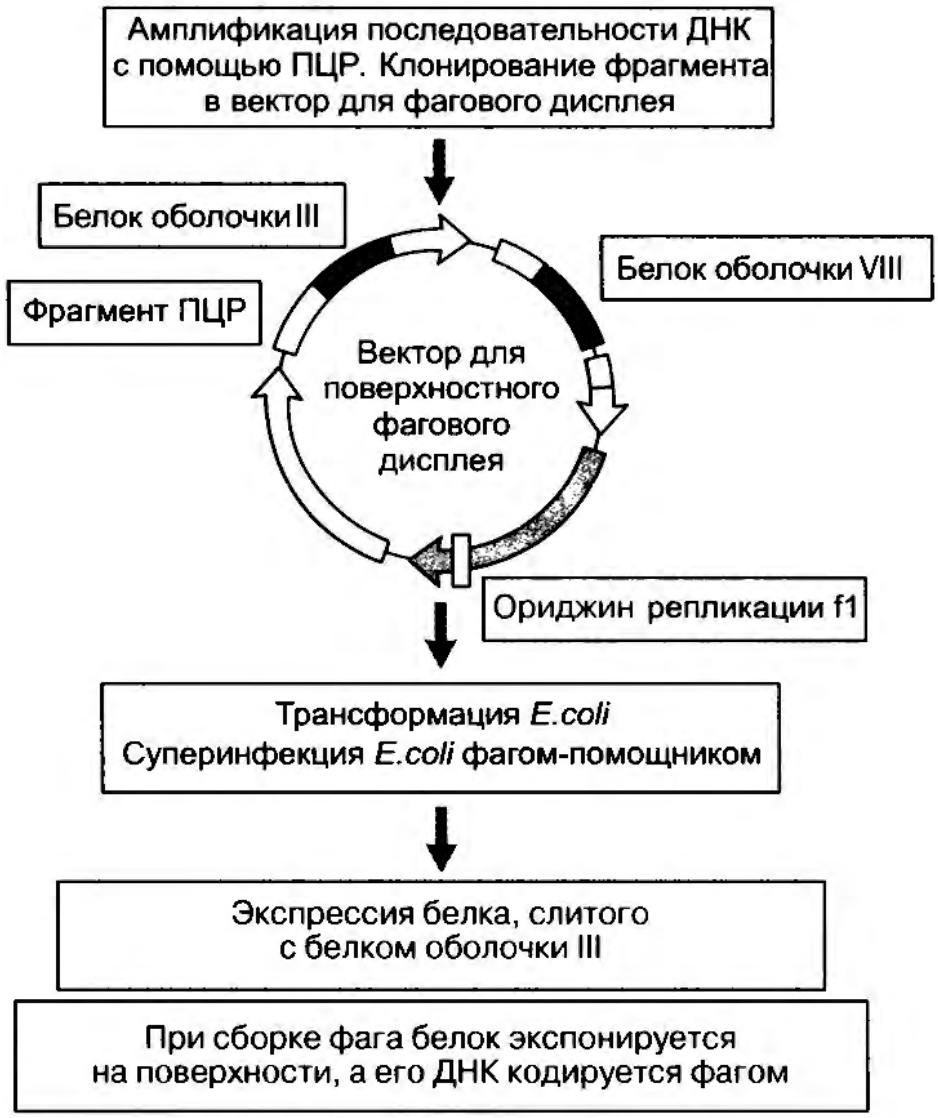


Рис. 6.37. Метод фагового дисплея. Основные стадии

достигается методом «ошибок» (error-prone) ДНК-полимеразы на начальных этапах конструирования библиотеки фагового дисплея. Возможно, что такие типы библиотек обеспечивают способ получения фрагментов высокоаффинных рекомбинантных антител, которые трудно получить более традиционным методом слияния гибридом (разд. 7.2.4). Были также приготовлены библиотеки поверхностного дисплея для отбора лигандов, гормонов и других полипептидов, а также для исследования белок-белковых или ДНК-белковых взаимодействий или точного определения связывающих доменов при взаимодействиях лигандов с рецепторами.

6.8 АНАЛИЗ ГЕНОВ И ИХ ЭКСПРЕССИИ

6.8.1 Идентификация и анализ мРНК

Уровень и характер экспрессии мРНК определяют многие клеточные процессы, и поэтому возможность анализировать и определять количества специфической мРНК представляет большой интерес. В последнее время были разработаны такие методы, как ПЦР в реальном времени, или количественный ПЦР, микрочипы для анализа экспрессии, которые

были впоследствии усовершенствованы для проведения анализа с высокой производительностью. Было создано множество других информативных методов анализа тонкой структуры мРНК и подсчета относительных количеств РНК, не связанных с проведением ПЦР. Это важно не только для исследования регуляции гена, но также может быть использовано как маркер при определенных клинических состояниях. При детекции транскриптов РНК традиционно использовался норзерн-блот — перенос выделенной мРНК на нейлоновую мембрану (разд. 5.9.2). Последующая гибридизация с меченым зондом позволяет точно определять размер и природу транскрипта. Однако в последнее время с большим успехом применяют различные нуклеазы, которые расщепляют одноцепочечные, но не двухцепочечные нуклеиновые кислоты. Много информации относительно природы транскриптов мРНК можно получить с помощью метода **защиты от РНКазы** (RPA, ribonuclease protection assay) (рис. 6.38). В этом методе одноцепочечная мРНК гибридизуется в растворе с избытком меченого однонитевого РНК-зонда. Гибридизованная часть комплекса становится защищенной, тогда как негибридизованная часть зонда, полученная из РНК, расщепляется РНКазой А и РНКазой Т. Защищенные фрагменты затем анализируют в полиакриламидном геле с высоким разрешением. Этот метод может дать ценную информацию, касающуюся точной структуры транскрипта мРНК (участок начала транскрипции, соединения экзонов и интронов и т. д.). Метод является количественным и требует меньше РНК, чем норзерн-блот. Существует родственный метод, **картирование с помощью нуклеазы S1**, только в этом случае нуклеаза S1 расщепляет негибридизованную часть ДНК-зонда, но не РНК-зонда.

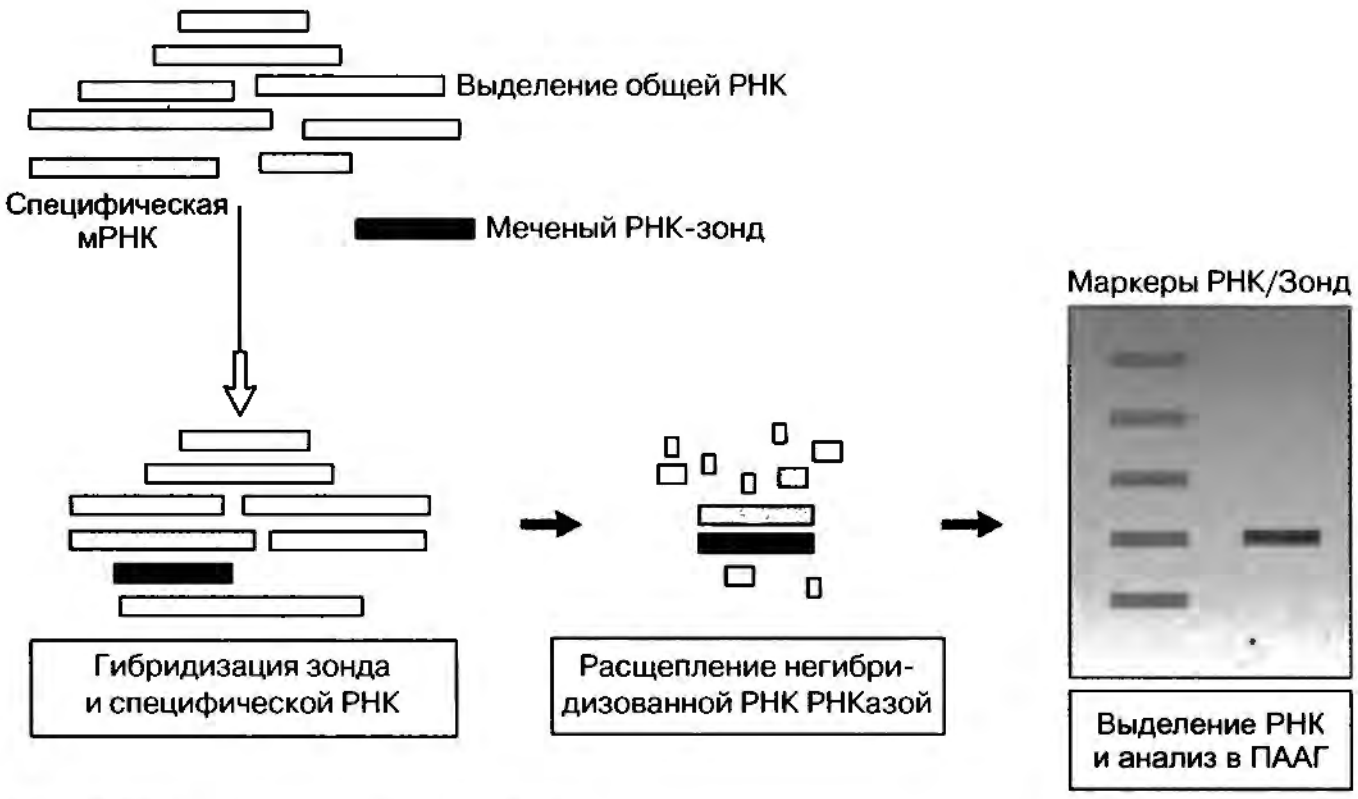


Рис. 6.38. Защита от действия РНКазы

Метод ПЦР также оказал влияние на анализ РНК. Был разработан метод ПЦР с **обратной транскриптазой** (ОТ-ПЦР). В этом методе выделяют РНК и с помощью обратной транскриптазы синтезируют первую цепь кДНК, которая затем используется в традиционном методе ПЦР (разд. 6.2.5). При определенных условиях некоторые термостабильные ДНК-полимеразы обладают активностью обратной транскриптазы, что устраняет необходимость разделять две реакции и позволяет выполнять ОТ-ПЦР в одной пробирке. Одним из главных достоинств ОТ-ПЦР является возможность идентифицировать с большой чувствительностью редкие транскрипты или низкий уровень мРНК. Это особенно удобно, когда следят, например, за экспрессией генов и вирусов; более того, метод позволяет различать латентные и активные вирусы (рис. 6.39). Уровень продукции мРНК может быть также определен с помощью другого метода, основанного на ПЦР, — **количественного ПЦР** (разд. 5.10.7).

Во многих случаях требуется анализ экспрессии тканеспецифических генов, и вновь для решения возникающих задач был адаптирован метод ПЦР. Такой подход, называемый **дифференциальным дисплеем**, основан также на ПЦР с обратной транскриптазой, причем выде-

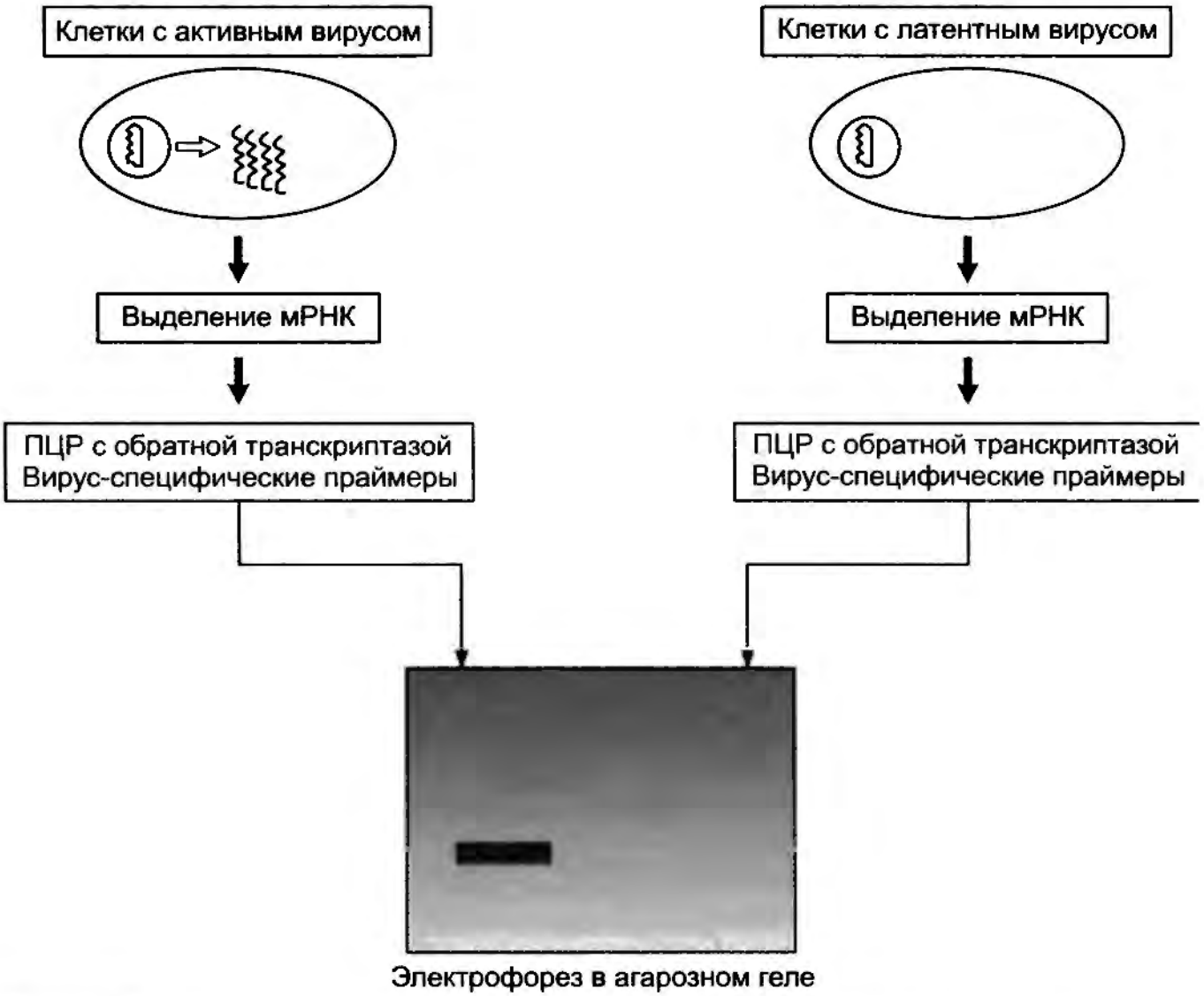


Рис. 6.39. Детекции активных вирусов с помощью ПЦР с обратной транскриптазой

ленная РНК должна быть прежде всего превращена в кДНК. Вслед за этим один из праймеров ПЦР, способный гибридизоваться с основными элементами мРНК, такими как poly(A)-хвост в эукариотических клетках, используется в сочетании с произвольными праймерами длиной 6–7 п.н., которые связываются с 5'-концами транскриптов. В результате происходит воспроизводимый синтез множества продуктов ПЦР (рис. 6.40). Сравнительный анализ продуктов ПЦР, полученных из различных типов клеток, с помощью электрофореза в геле позволяет обнаружить и выделить по-разному экспрессируемые транскрипты. Как и для многих других методов, основанных на использовании ПЦР, время идентификации таких генов сократилось до нескольких дней по сравнению с конструированием и скринингом библиотек кДНК, на которые затрачивается несколько недель.

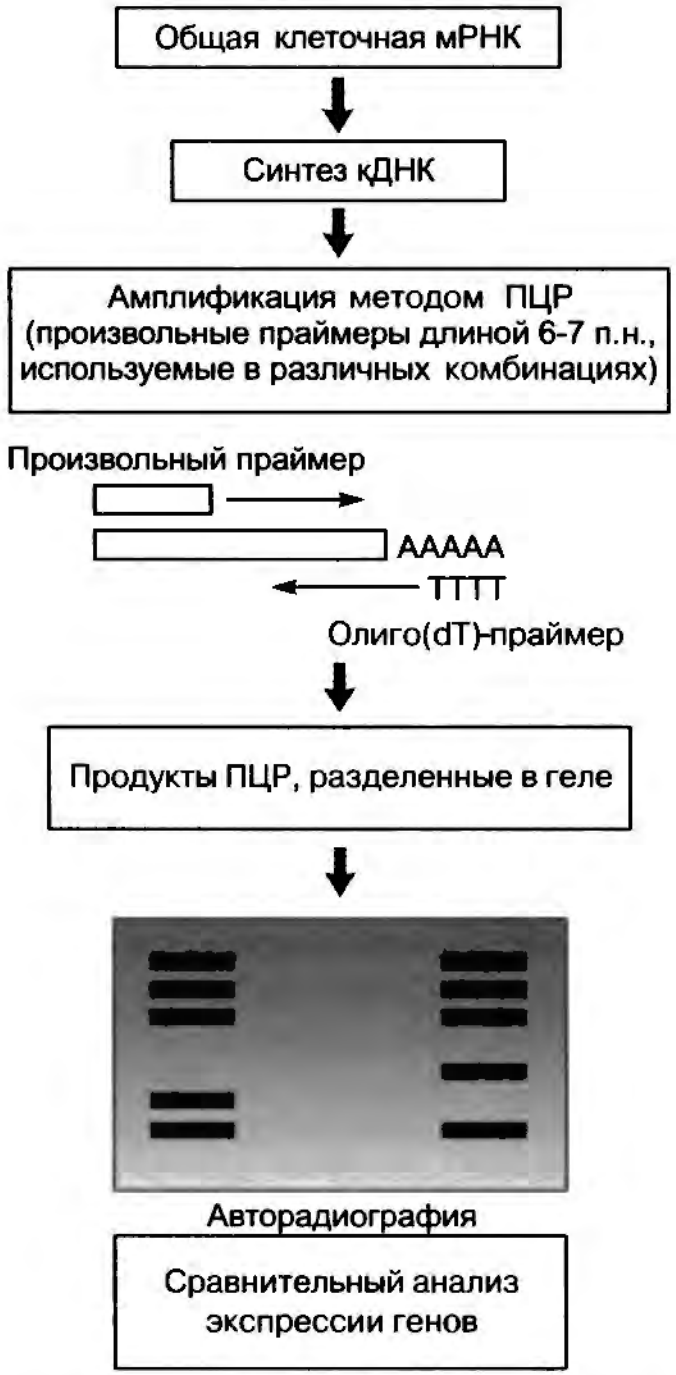


Рис. 6.40. Анализ экспрессии гена методом дифференциального дисплея

6.8.2 Анализ генов *in situ*

Значительные изменения в хромосомах часто детектируют с помощью анализа кариотипа под микроскопом (разд. 5.3.3). Одна или несколько замен в основаниях, делеции, перестройки или инсерции определить гораздо сложнее, но они могут оказать глубокое воздействие на нормальные клеточные биохимические процессы. Гибридизация *in situ* делает возможным определение расположения на хромосоме отдельного фрагмента гена или мутации гена. Для этого готовят радиоактивные РНК- или ДНК-зонды и наносят их на препараты тканей или хромосом, фиксированных на стекле для микроскопии. Зонды, которые не гибридизуются с комплементарной последовательностью, затем отмывают и посредством авторадиографии визуализируют картину распределения или расположения связавшегося зонда (рис. 6.41). Используя ткани или клетки, фиксированные на стеклах, можно также выполнять ПЦР *in situ*. Это высокочувствительный метод, при котором ПЦР происходит прямо на предметном стекле с тканью со стандартными реактивами для ПЦР. Требуются специальные термоциклеры, которые позволяют удерживать стекла и осуществлять ПЦР. Таким образом можно локализовать и идентифицировать, например, единственные копии внутриклеточных вирусов.

Альтернативным способом мечения, используемым для кариотипирования и определения локализации генов, является **флуоресцентная гибридизация *in situ*** (FISH, fluorescence in situ hybridisation). Этот метод, иногда называемый окрашиванием хромосом (chromosome painting), основан на гибридизации *in situ*, но при этом разные зонды метят с помощью

Рис. 6.41. Общая схема гибридизации *in situ*

различных флуорофоров, каждый из которых специфичен для определенной хромосомы. Преимущество такого метода состоит в том, что разные области гена могут быть идентифицированы и сравнены в одном и том же препарате хромосомы. Этот метод также широко используется в геномном картировании для упорядочения ДНК-зондов вдоль сегмента хромосомы (разд. 6.9).

6.8.3 Анализ взаимодействий между промотором и белками

Для того чтобы определить потенциальные транскрипционные регуляторные последовательности, фрагменты геномной ДНК могут быть клонированы в специально разработанные **векторы для поиска промоторов**. Они содержат участки для встраивания чужеродной ДНК, которые расположены выше последовательности **репортерного гена**. В настоящее время используется множество таких генов, включая ген *lacZ*, кодирующий β-галактозидазу, *CAT*-ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу, и ген *lux*, который продуцирует люциферазу и определяется в биолюминесцентном анализе. Фрагменты ДНК, потенциально содержащие область промотора, клонируют в вектор, а затем полученные конструкции переносят в эукариотические клетки. Если наблюдается экспрессия репортерного гена, значит чужеродная ДНК содержит последовательности промотора (рис. 6.42). Такие плазмиды и другие репортерные гены, например ген зеленого флуо-

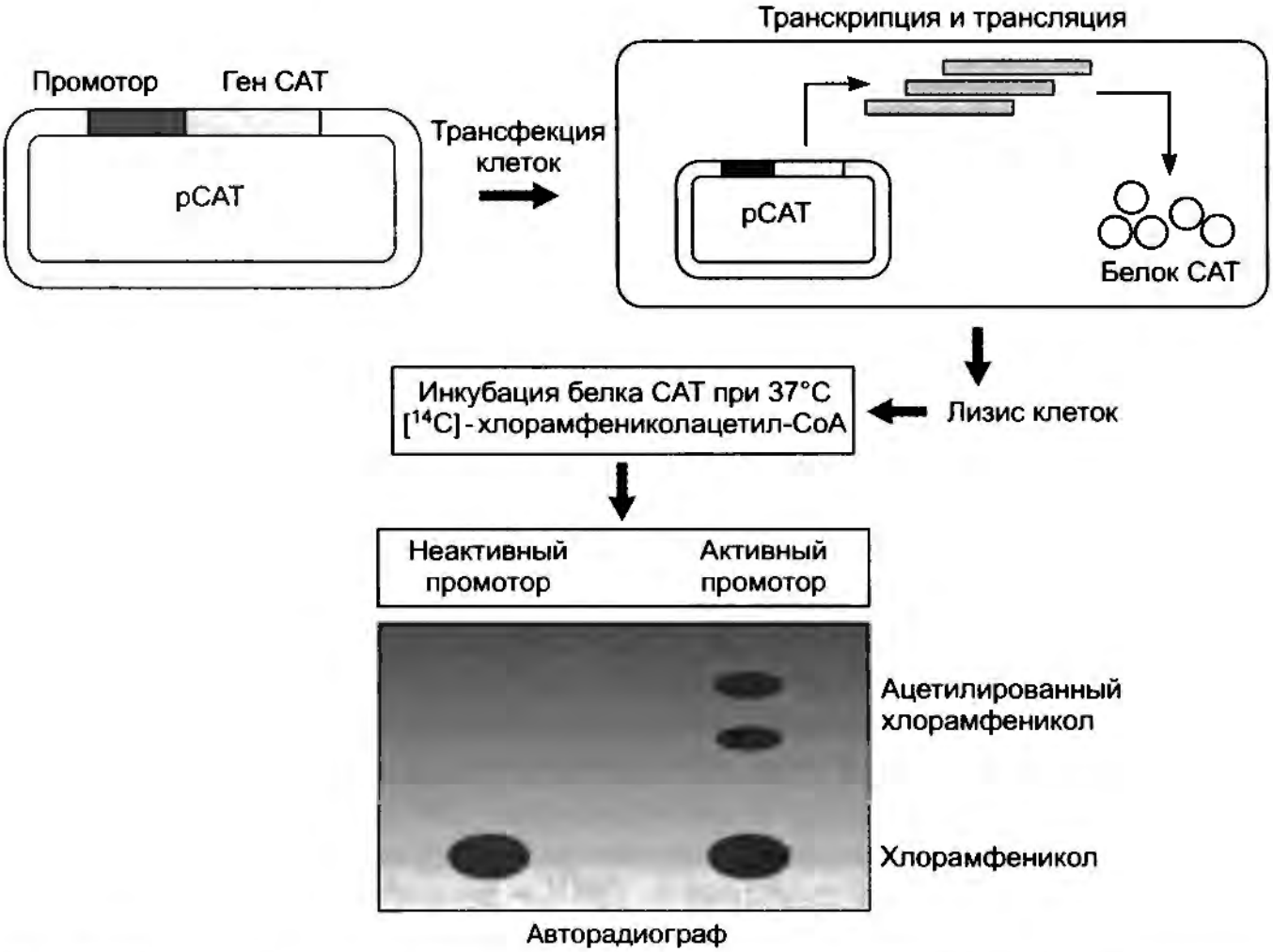


Рис. 6.42. Анализ промоторов с помощью репортерного гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)

ресцентного белка (GFP, green fluorescent protein) или ген люциферазы светляка, позволяют проводить количественное определение транскрипции гена в ответ на действие активаторов транскрипции.

Связывание регуляторного белка или фактора транскрипции со специфическим участком ДНК приводит к образованию комплекса, который можно проанализировать с помощью **метода задержки в геле**. По мере проведения электрофореза миграция фрагмента ДНК, связанного с белком с относительно большой массой, будет замедляться по сравнению с миграцией свободного фрагмента. Для успешного выполнения анализа область, содержащую промоторный элемент ДНК, следует картировать с помощью рестрикционной эндонуклеазы до того, как ДНК свяжется с белком. Область промотора можно затем определить по положению на карте рестрикции того фрагмента, который связывается с регуляторным белком и вследствие этого задерживает его миграцию при электрофорезе. Одной из потенциальных проблем этого метода является невозможность точно детектировать участок белка, связывающий нуклеотидную последовательность, что объясняется ограниченной точностью и подробностью карты рестрикции, а также ограниченным числом подходящих сайтов рестрикции. Однако данный метод удобен на начальных этапах изучения взаимодействия регуляторного белка с ДНК.

Метод **футпринтинга ДНК** основан на том, что взаимодействие ДНК-связывающего белка с регуляторной последовательностью ДНК защищает эту последовательность от расщепления ферментом ДНКаза I. Прежде всего регуляторную последовательность ДНК метят на одном конце с помощью радиоактивной метки и смешивают с ДНК-связывающим белком (рис. 6.43). Затем добавляют ДНКазу I и выполняют частичное расщепление, что позволяет разрезать ДНК на фрагменты в тех участках, где она не защищена ДНК-связывающим белком. Защищенная область остается нерасщепленной. Все фрагменты затем разделяют в полиакриламидном геле с высоким разрешением рядом с расщепленной контрольной ДНК, к которой не добавляли ДНК-связывающего белка. Авторадиограф геля представляет собой набор полос, соответствующих частично расщепленным фрагментам. Там, где ДНК защищена, нет полос, и это место (дырка) называется футпринтом ДНК. Положение последовательности, связывающей белок, может быть истолковано, исходя из размера фрагментов по обе стороны от области футпринта. Футпринтинг является более точным методом определения участка ДНК-белкового взаимодействия, чем метод задержки в геле, однако он также не дает информации относительно взаимодействия отдельных нуклеотидов или их вклада во взаимодействие.

Кроме определения последовательностей ДНК, которые вносят вклад в регуляцию экспрессии гена, был разработан оригинальный путь обнаружения белковых факторов транскрипции. Этот подход реализуется в **дрожжевой двухгибридной системе**. Факторы транскрипции имеют два домена: один — для связывания ДНК и второй для связывания с другими белками (**домен активации**). В природных факторах транскрипции, таких, как TFIID, эти домены являются частями одной и той же молекулы (разд. 5.5.4). Однако они также могут быть образованы из двух независи-

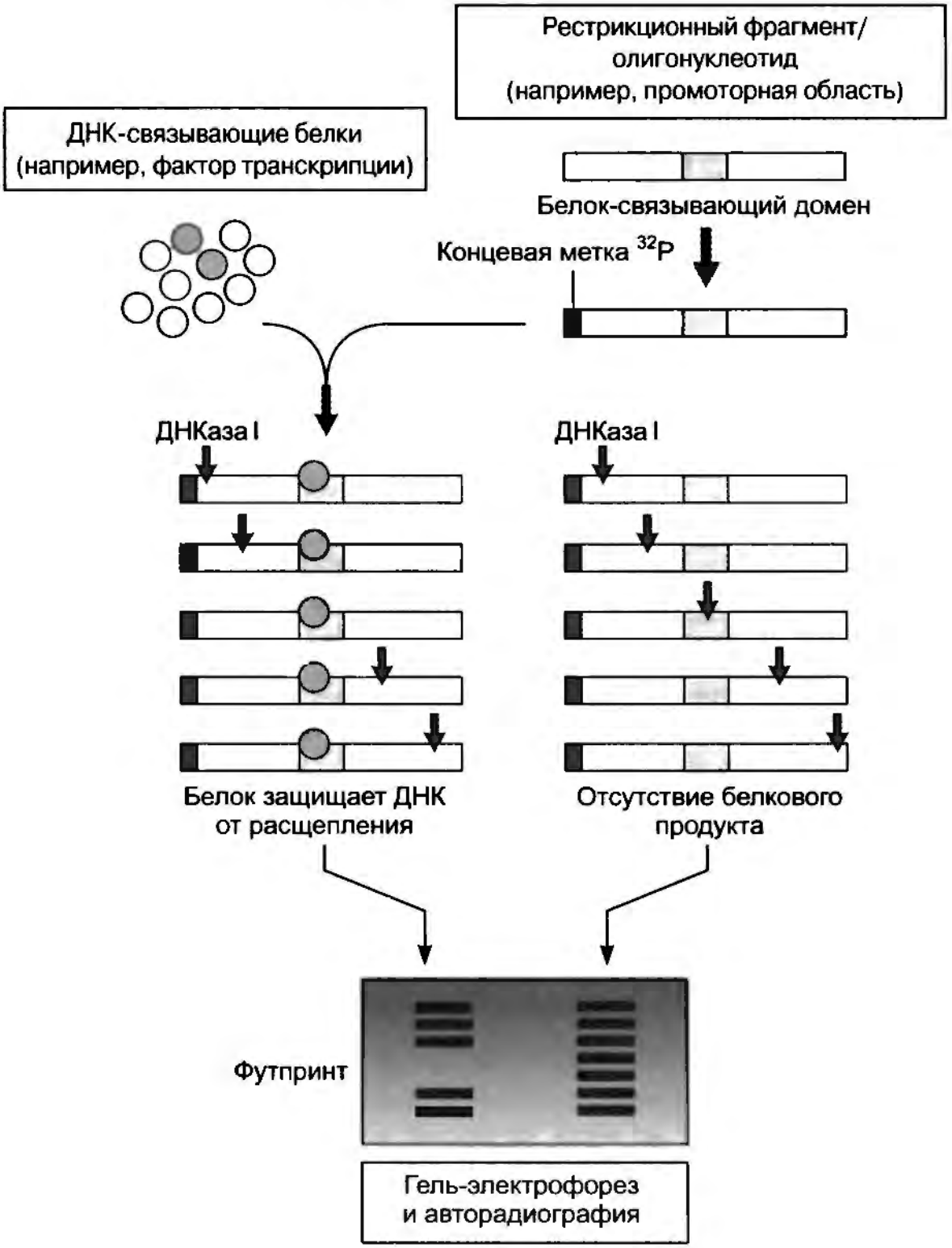


Рис. 6.43. Стадии метода футпринтинга ДНК

мых доменов. Так образуется рекомбинантная молекула, кодирующая исследуемый белок, слитый с ДНК-связывающим доменом. Однако такая молекула не может активировать транскрипцию. Гены из библиотеки кДНК экспрессируются в виде слитного белка с доменом-активатором; но такая конструкция тоже не может активировать транскрипцию. Если же домены являются комплементарными, при смешивании двух фракций происходит инициация транскрипции (рис. 6.44). Это обнаруживается по транскрипции гена-репортера, например *CAT*. Использование этого метода не ограничивается изучением факторов транскрипции, но может оказаться полезным для анализа взаимодействий в любой белковой системе.

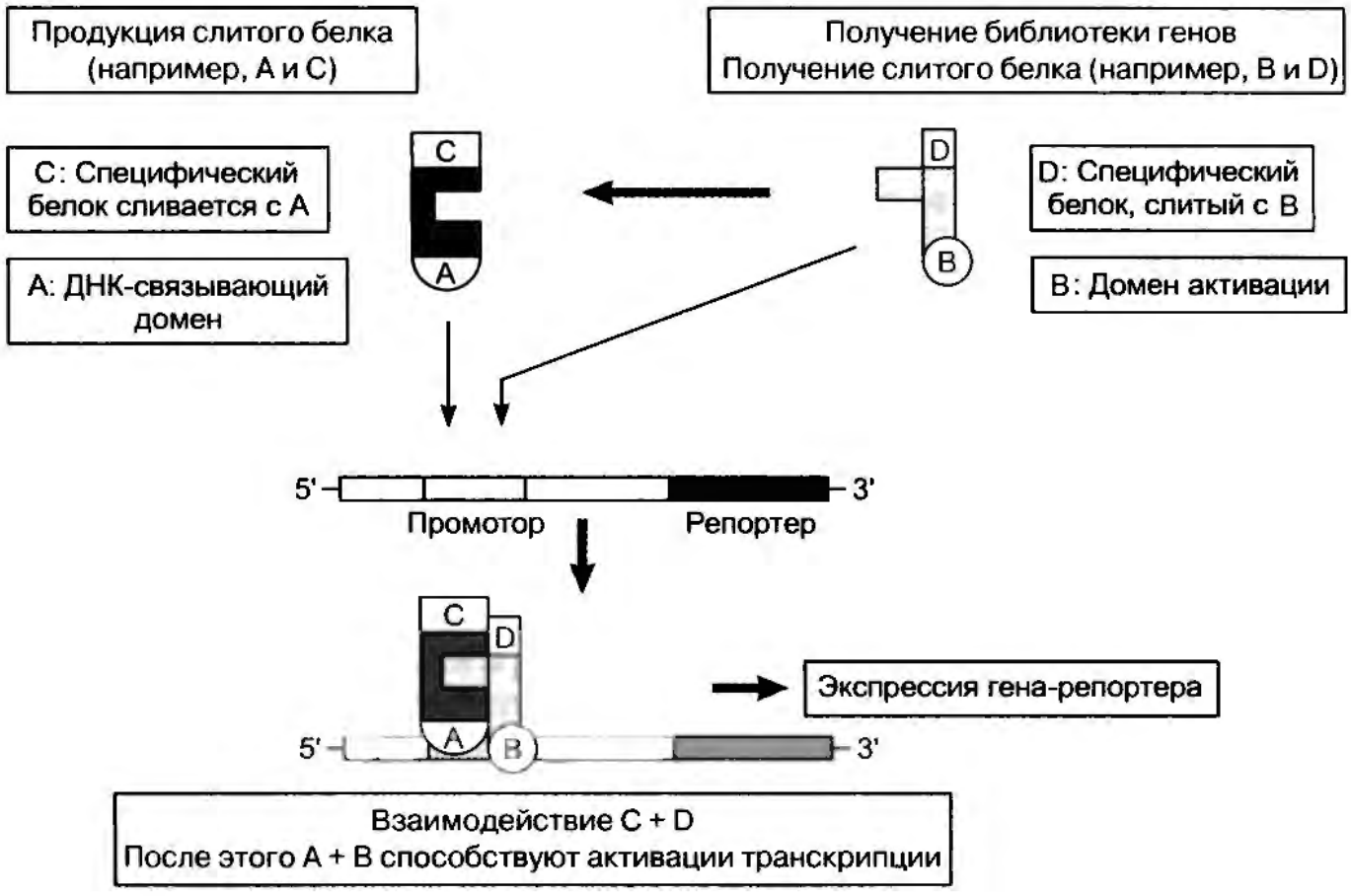


Рис. 6.44. Дрожжевая двухгибридная система (метод обнаружения взаимодействия). Факторы транскрипции имеют два домена: один — для связывания ДНК (A) и второй — для связывания других белков (B). Рекомбинантная молекула образуется из белка (C) посредством слияния с ДНК-связывающим доменом. Однако она не может активировать транскрипцию. Гены из библиотеки кДНК (D) экспрессируются в виде слитых белков с доменом-активатором (B), но также не могут самостоятельно инициировать транскрипцию. Когда две фракции смешиваются, происходит инициация транскрипции (если домены комплементарны) и экспрессия гена-репортера

6.8.4 Трансгенез и нацеливание генов

Во многих случаях полезно изучить действие определенных генов и белков в организме, а не в пробирке. Фармацевтические продукты и терапевтические белки также выгоднее получать в целом организме (табл. 6.4). Это также имеет важное значение для биотехнологии и сельского хозяйства (см. табл. 6.10) (разд. 6.11). Внесение чужеродных генов в зародышевые клетки и получение трансгенных организмов называется **трансгенетикой**. Существует две главные стратегии для получения трансгенных организмов. Первая заключается в прямом **переносе генов** млекопитающих, при котором рекомбинантную ДНК вводят непосредственно в мужской пронуклеус только что оплодотворенной яйцеклетки. Эта зигота затем выращивается в организме приемной матери, давая полностью трансгенное потомство. **Селективный трансгенез** имеет место, когда рекомбинантную ДНК вводят в эмбриональные стволовые клетки. Эти клетки затем культивируют в лаборатории, и те из них, в которых происходит экспрессия желаемого белка, отбирают и вносят во внутреннюю массу клеток ранне-

Таблица 6.4. **Использование трансгенных мышей для изучения некоторых заболеваний у человека**

Ген/белок	Генетическое нарушение	Заболевание
Тирозинкиназа (ТК)	Неконтролируемая экспрессия гена	Гипертрофия сердца
Трансактиватор ВИЧ	Экспрессия *tat*-гена ВИЧ	Саркома Капоши
Ангиотензиноген	Экспрессия гена ангиотензиногена крысы	Повышенное кровяное давление
Белок, переносящий эфир холестерина (белок CET, cholesterol ester transfer)	Экспрессия гена *CET*	Атеросклероз
Гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HPRT)	Инактивация гена HPRT	Недостаточность HPRT

го эмбриона. Полученное в результате трансгенное животное выращивают в организме приемной матери, но в этом случае оно является «мозаичным» или «химерным», поскольку только небольшая доля его клеток будет экспрессировать новый белок. Проблемой в обоих методах является случайный характер интеграции рекомбинантной ДНК в геном яйцеклетки или стволовые клетки эмбриона. В результате белок может продуцироваться в тех клетках, где он не требуется, а также может происходить нарушение работы генов, необходимых для правильного роста и развития.

Усовершенствованием такого подхода является метод **нацеливания гена**, который состоит в получении измененного гена в интактной клетке — вариант мутагенеза *in vivo* в отличие от мутагенеза *in vitro* (разд. 6.6.2). Ген встраивается, например, в геном стволовых клеток эмбриона с помощью специализированных векторов на основе вирусов. Однако такое встраивание не будет случайным, поскольку существуют гомологичные гену последовательности в векторе и гене-мишени. Таким образом, **гомологичные рекомбинации** могут сообщать новые генетические свойства клетке или инактивировать уже существующие (так называемый **нокаут гена** (gene knockout)). Вероятно, наиболее важным свойством этих методов является то, что они позволяют изучать заболевания человека на животных моделях. Это очень полезно, поскольку физиологические и биохимические последствия заболевания часто очень сложны и их трудно исследовать, что мешает развитию методов диагностики и лечения.

6.8.5 Модулирование экспрессии гена с помощью РНКи

Существует множество экспериментальных путей изменения экспрессии генов. Традиционные методы сводились к изменению уровня экспрессии мРНК посредством манипуляций с последовательностями промотора или уровнем синтеза вспомогательных белков, вовлеченных в контроль экс-

прессии. Кроме того, применяются методы с образованием пост-мРНК, например метод с анти-смысловой РНК, когда в клетку вводят последовательность нуклеиновой кислоты, комплементарной экспрессируемой мРНК. Эта анти-смысловая последовательность связывается с мРНК и предотвращает ее трансляцию. Такой процесс, обнаруженный во множестве нормальных клеток, называется **интерференцией РНК** (РНКи) и происходит с участием микроРНК. Было предложено много методов, позволяющих модулировать экспрессию гена в определенных клетках. Не приходится сомневаться, что в ближайшие годы такой тип модуляции экспрессии гена будет применен на многих организмах.

6.8.6 Анализ генетических мутаций

Существует несколько типов мутаций нуклеиновых кислот, временно или стабильно внедряющихся в геном. В процессе эволюции мутации могут наследоваться либо одной, либо обеими копиями хромосом, приводя к полиморфизму внутри популяции (разд. 5.3). В принципе мутации могут встречаться в любой области генома; однако возможны ситуации, когда мутации наблюдаются в совершенно определенных областях. Это явно проявляется у прокариот, где элементы генома (называемые **гипервариабельными областями**) подвергаются многочисленным мутациям, что ввиду высокой скорости репликации приводит к образованию большого числа вариантов гена. Аналогичным образом, гипервариабельные последовательности антител связаны с нормальным иммунным ответом у эукариот. Мутации могут оказывать различное влияние на структуру и функции генома. Некоторые мутации могут приводить к недетектируемым воздействиям на нормальные клеточные функции и называются **консервативными мутациями**. Часть таких мутаций встречается в последовательностях интронов и поэтому не играет роли в окончательной структуре и функции белка или его регуляции. С другой стороны, мутации могут приводить к серьезным нарушениям нормальных клеточных функций, например к изменению скорости транскрипции или последовательности мРНК.

Мутации, встречающиеся внутри экзонов, могут изменять состав аминокислот кодируемого белка в результате замены аминокислоты или изменения рамки считывания при трансляции. Такие точечные мутации традиционно обнаруживают с помощью саузерн-блоттинга или, если имеются подходящие участки рестрикции, с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP, restriction fragment length polymorphism) (разд. 5.9.1). Однако метод ПЦР оказал огромное влияние на выявление мутаций — был разработан метод ПЦР с **аллель-специфическими олигонуклеотидами** (ASO-PCR, allele-specific oligonucleotide PCR); при этом используют два конкурирующих и один основной праймер (рис. 6.45). Один из праймеров комплементарен известной точечной мутации, тогда как другой — праймер дикого типа; то есть праймеры идентичны, за исключением основания на 3'-конце. Таким образом, если ДНК содержит точечную мутацию, только

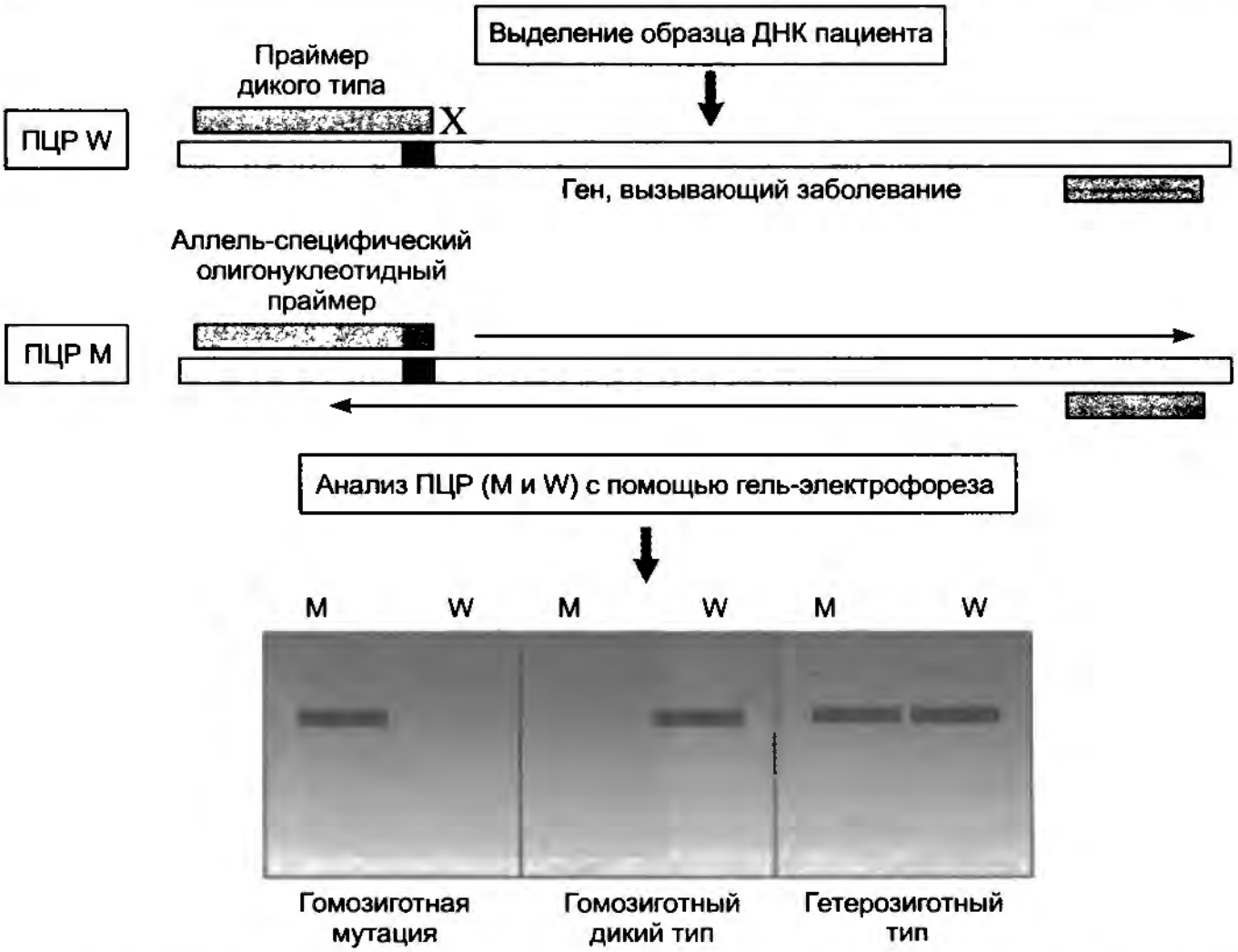


Рис. 6.45. Детекция точечной мутации с использованием ПЦР с аллель-специфическим олигонуклеотидом; W — дикий тип, M — мутация

праймер с комплементарной последовательностью будет связываться и включаться в амплифицированную ДНК, но, если ДНК нормальная, то связывается праймер дикого типа. Результаты ПЦР анализируют методом электрофореза в агарозном геле. Были разработаны дальнейшие модификации ASO-PCR, в которых каждый из праймеров метят различными флуорофорами. Поскольку праймеры мечены по-разному, положительный или отрицательный результат получают немедленно, без необходимости анализа в агарозном геле.

В настоящее время различные модификации метода позволяют производить одновременно несколько ПЦР (**множественная ПЦР**), и поэтому возможно одновременное обнаружение нескольких мутаций. Там, где мутации неизвестны, возможно использование метода ПЦР с детекцией с помощью **денатурирующего градиентного гель-электрофореза**. В этом методе образец гетеродуплекса ДНК, содержащего мутацию, амплифицируют с помощью ПЦР, которая также используется для присоединения G+C-богатой последовательности к одному из концов гетеродуплекса. Мутированный гетеродуплекс идентифицируют по изменению плавления в полиакриламидном геле, содержащем градиент денатурирующего агента, такого как мочевина. В определенной

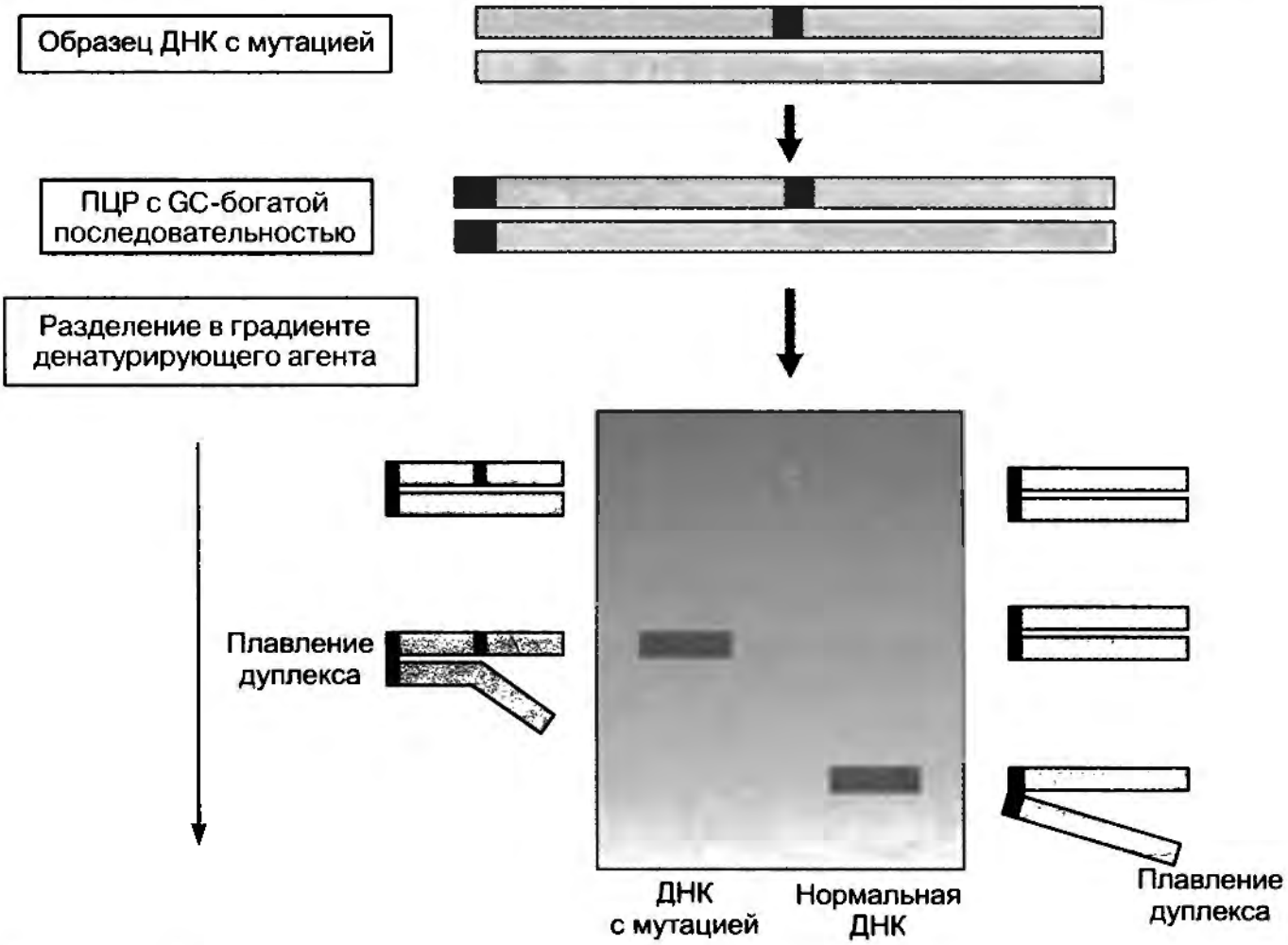


Рис. 6.46. Поиск мутаций с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза

Таблица 6.5. **Основные методы поиска мутаций в образцах ДНК**

Метод	Основной инструмент метода	Основные характеристики детекции
Саузерн-блоттинг	Гель	Гибридизация меченой пробы с ДНК
Дот-блоттинг	Нанесение образца	Гибридизация меченой пробы с ДНК
Аллель-специфический олиго-ПЦР (ASO-PCR)	ПЦР	Олигонуклеотид, соответствующий образцу ДНК
Денатурирующий градиентный гель-электрофорез	Гель/ПЦР	Температура плавления цепей ДНК
Полиморфизм конформации однонитевой ДНК (SSCP)	Гель/ПЦР	Различие в конформациях цепей ДНК
Лигазная цепная реакция (LCR)	Гель/автоматизация	Олигонуклеотид, соответствующий образцу ДНК
Секвенирование ДНК	Гель	Анализ нуклеотидной последовательности ДНК
Микрочипы ДНК	Стеклянные чипы	Гибридизация образца ДНК с чипом

точке градиента гетеродуплекс будет денатурировать в отличие от «нормального» гомодуплекса, что позволяет его идентифицировать. GC-богатая последовательность поддерживает целостность конца дуплекса во время прохождения в геле (рис. 6.46). Чувствительность этого и других методов детекции мутаций была значительно повышена с помощью использования ПЦР и других методов обнаружения известных и неизвестных мутаций, как показано в табл. 6.5. Этот принцип применяется в многочисленных методах детекции, использующих высокоэффективную жидкостную хроматографию в денатурирующих условиях. Этот метод детекции денатурированных одноцепочечных последовательностей, содержащих ошибочно спаренные основания, является быстрым и подходит для анализа большого количества образцов.

6.8.7 Обнаружение полиморфизмов ДНК

Полиморфизмы являются чрезвычайно интересными элементами генома человека и могут быть использованы для установления различий между индивидами. Все люди обладают повторяющимися последовательностями, известными как минисателлитные ДНК, причем число повторов у неродственных индивидов различается. Гибридизация зондов с этими последовательностями методом саузерн-блоттинга дает возможность классифицировать и идентифицировать индивиды (разд. 5.3.1).

Фингерпринтинг ДНК — это общее название двух отдельных генетических систем тестирования, которые используют либо «многолокусные», либо «однолокусные» зонды. Первые зонды для фингерпринтинга ДНК были многолокусными; название связано с тем, что они способны обнаруживать гипервариабельные минисателлитные ДНК на всем протяжении генома (т. е. во многих участках генома). Напротив, однолокусные зонды при определенных условиях находят только две аллели одного локуса и создают так называемый профиль ДНК, поскольку в отличие от многолокусных зондов двух полос недостаточно для однозначной идентификации индивида.

Разработаны методы, сочетающие ПЦР с детекцией минисателлитных локусов. Такие области ДНК имеют слишком большой размер для амплификации методом ПЦР; однако новые разработки метода ПЦР предоставляют такие возможности. Открытие полиморфизмов внутри повторяющихся последовательностей минисателлитной ДНК привело к развитию основанного на ПЦР метода, позволяющего идентифицировать индивид по случайному распределению повторов вдоль двух аллелей одного такого минисателлита этого человека. Этот метод, известный как анализ **минисателлитных вариабельных повторов** (MVR, minisatellite variant repeat), основан на цифровом кодировании обнаруженных вариаций повторов. Такой подход сочетает чувствительность и быстроту ПЦР с дискриминационной способностью анализа минисателлитных аллелей. Таким образом, на сегодняшний день в стадии разработки и усовершенствования находится множество интересных систем идентификации.

Генетический анализ полиморфизмов используется для определения отцовства и в иммиграционном контроле и становится основным методом анализа во многих криминалистических анализах. Кроме того, метод является ценным инструментом в биотехнологии растений для классификации зерновых культур, а также для определения родословной при разведении животных.

6.8.8 ДНК-микрочипы

Одним из выдающихся достижений молекулярной биологии является развитие и усовершенствование анализа с помощью **микрочипов ДНК** (разд. 8.5). Этот метод представляет собой радикально новый подход для современных лабораторных исследований в области молекулярной биологии, позволяющий одновременно осуществлять широкомасштабный анализ и количественное определение генов и их экспрессии. Микрочип представляет собой упорядоченное расположение тысяч последовательностей ДНК, таких как олигонуклеотиды или кДНК, на твердой поверхности размером приблизительно 1,2 см × 1,2 см. Твердая подложка обычно сделана из стекла, хотя также используется кремний. В последнее время чипы синтезируются на стекле или вне стекла и требуют сложных методов производства, подобных тем, которые используются для получения микросхем. Они могут также быть нанесены с помощью сверхточных инструментов, распределяющих малые объемы порядка 30 пиколитров. В альтернативном варианте, предложенном фирмой Affimetrix, олигонуклеотиды синтезируются непосредственно на подложке, используя метод фотолитографии, заимствованный из производства микросхем. При этом сверхтонкие шаблоны с отверстиями позволяют осуществлять фотоактивацию специфических dNTP, которые связаны между собой на специфических участках чипа. В результате получают слои олигонуклеотидов, причем положение каждого нуклеотида определяют с помощью компьютера.

На микрочипах могу быть нанесены самые разные варианты нуклеиновых кислот. Это может быть мРНК, полученная в определенном типе клеток (так называемый микрочип для анализа экспресии кДНК), или кодирующие и регуляторные области определенного гена или группы генов. Один фирменный чип содержит 50 000 олигонуклеотидов, представляющих известные мутации в гене опухолевого супрессора *p53*; кодируемый им белок мутирован во многих случаях рака у человека. Образец ДНК пациента инкубируют с чипом и затем отмывают всю негибридизованную ДНК. Чип анализируют и определяют характер гибридизации, регистрируя флуоресценцию. Любая мутация в гене *p53* может быть быстро обнаружена с помощью компьютерного анализа полученных результатов гибридизации. Интерпретация результатов, однако, представляет собой не меньшую проблему, чем производство чипов. Потенциальные возможности микрочипов кажутся неограниченными; разработано множество чипов для определения различных генетических мутаций, в том

числе гена кистозного фиброза *CFTR*, гена рака груди *BRCA1*, а также для изучения вируса иммунодифицита человека (ВИЧ).

В настоящее время для изготовления микрочипа требуется высокая степень очистки ДНК, что ограничивает применение метода. Однако по мере внедрения автоматической очистки ДНК и усовершенствования технологии микрочипов реальной становится возможность проведения многочисленных лабораторных тестов на единственном микрочипе. Это может быть использовано для изучения не только отдельных генов, но и большого числа генов или ДНК из микроорганизмов, вирусов и т. д. Поскольку существует возможность количественного определения транскрипции гена, чипы для анализа экспрессии также могут использоваться при изучении определенных заболеваний. Этот подход может иметь важное значение, так как позволяет быстро собирать большое количество информации о нуклеотидной последовательности и оказывает помощь во многих областях молекулярной биологии, особенно в больших проектах по секвенированию генома или в так называемых проектах по ресеквенированию, когда для изучения области гена, содержащей потенциально важные полиморфизмы, требуется анализ многих образцов.

Одним из недавних применений технологии микрочипов является получение каталога однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в геноме человека. Оценки показывают, что существует приблизительно 10 млн SNPs и среди них 200 000 кодирующих SNPs, которые находятся внутри генов и могут указывать на развитие определенных заболеваний. Таким образом, SNPs очень удобно анализировать с помощью микрочипов; микрочипы фирмы Affimetrix HuSNP позволяют одновременно анализировать более 10 000 SNPs на одном чипе. Для упрощения анализа огромного числа SNPs предпринят проект HapMap, в рамках которого анализируют SNPs, наследуемые блоками; теоретически для генотипирования индивидума необходимо лишь 500 000 SNPs.

Микрочипы можно также применять для анализа срезов тканей. В так называемом тканевом микрочипе (TMA, tissue microarray) используется внутренняя часть ткани или биопсии из тканей, заключенных в парафин стандартным методом. Тысячи таких образцов нарезают слоями и помещают на твердую подложку типа стекла, где все они подвергаются иммуногистохимическому окрашиванию или анализу с помощью зондов для гибридизации *in situ*. Как и в случае ДНК-чипов, много образцов может быть проанализировано одновременно, требуется меньше ткани и достигается значительная стандартизация результатов.

6.9 АНАЛИЗ ЦЕЛЫХ ГЕНОМОВ

Вероятно, в биологических науках наиболее амбициозным проектом является инициатива картировать и полностью определить первичную последовательность геномов различных организмов. Картирование и секвенирование геномов организмов, перечисленных в табл. 6.6, уже

Таблица 6.6. **Новые проекты по секвенированию генома**

Организм		Размер генома, м.п.н.
Бактерия	*Escherichia coli*	4,6
Дрожжи	*Saccharomyces cerevisiae*	14
Червь	*Caenorhabditis elegans*	100
Дрозофила	*Drosophila melanogaster*	165
Рыба иглобрюх	*Fugu rubripes rubripes*	400
Мышь	*Mus musculus*	3000

завершено, а для других находится в стадии завершения. Такое многомасштабное картирование и секвенирование явилось движущей силой развития и усовершенствования многих стандартных технологий молекулярной биологии, например определения первичной последовательности ДНК. Кроме того, появились новые методы идентификации важных последовательностей, кодирующих белки и ферменты. Использование ресурсов биоинформатики для сопоставления, аннотации и публикации данных в Интернете также имело огромное значение. Доступность информативной карты генома человека (например, Genome Web (NCBI)), с помощью которой можно провести детальный анализ всех хромосом, является лишь одним из примеров разработок в области анализа генов и биоинформатики. Подобные источники информации настолько мощны и просты в использовании, что сегодня немыслимо работать без их помощи.

6.9.1 Физическое картирование генома

Составление физической карты является первичной задачей при картировании генома. Посредством определения частоты рекомбинаций между двумя отдельными локусами были также получены карты генетических связей. Векторы на основе YAC, необходимые для масштабного клонирования, содержат вставки ДНК со средней длиной 300 000 п.н., что в 10 раз больше, чем самые длинные вставки в ранних экспериментах по картированию. Разработка векторов с большой емкостью позволила получать **контиги**. Контиги представляют собой перекрывающиеся клонированные фрагменты, расположенные в соответствующем порядке. Используя такие карты, любой клонированный фрагмент можно идентифицировать и поставить в соответствующий ряд. Для того чтобы разместить фрагменты ДНК, полученные при конструировании библиотеки в YAC или космиде, необходимо определить перекрывающиеся области между клонированными фрагментами ДНК. Перекрывающиеся области создаются в условиях частичного расщепления определенной эндонуклеазой рестрикции при конструировании библиотеки. В результате такого подхода все фрагменты ДНК, клонированные в вектор, имеют перекрывающиеся

концы, которые можно теоретически определить и расположить клоны так, чтобы получить физическую карту (рис. 6.47).

Для того чтобы расположить перекрывающиеся последовательности, лучше всего провести секвенирование ДНК; однако такой подход непрактичен, поэтому предпочитают делать фингерпринт каждого клона, применяя картирование с помощью рестрикционных ферментов. Хотя этот метод не дает однозначных результатов, при упорядочении клонов он весьма полезен, если учитывать также статистическую вероятность перекрывания клонов. Для соединения контигов можно использовать метод гибридизации *in situ* или зонд, полученный из одного конца контига для скрининга различных несвязанных контигов. Такой метод идентификации с использованием зонда был назван «**прогулкой**» и был успешно применен при построении физических карт геномов *E. coli* и дрожжей. Этот цикл получения клона, фингерпринта и контига поддается автоматизации; однако остается проблема закрытия брешей между контигами.

Для того чтобы для всех научных лабораторий определить общий путь систематизации клонов и объединить физические карты, был разработан основанный на ПЦР метод с использование STS-маркеров (sequence-tagged sites) — коротких секвенированных участков генома. Эти небольшие уникальные последовательности размером от 200 до 300 п.н. ам-

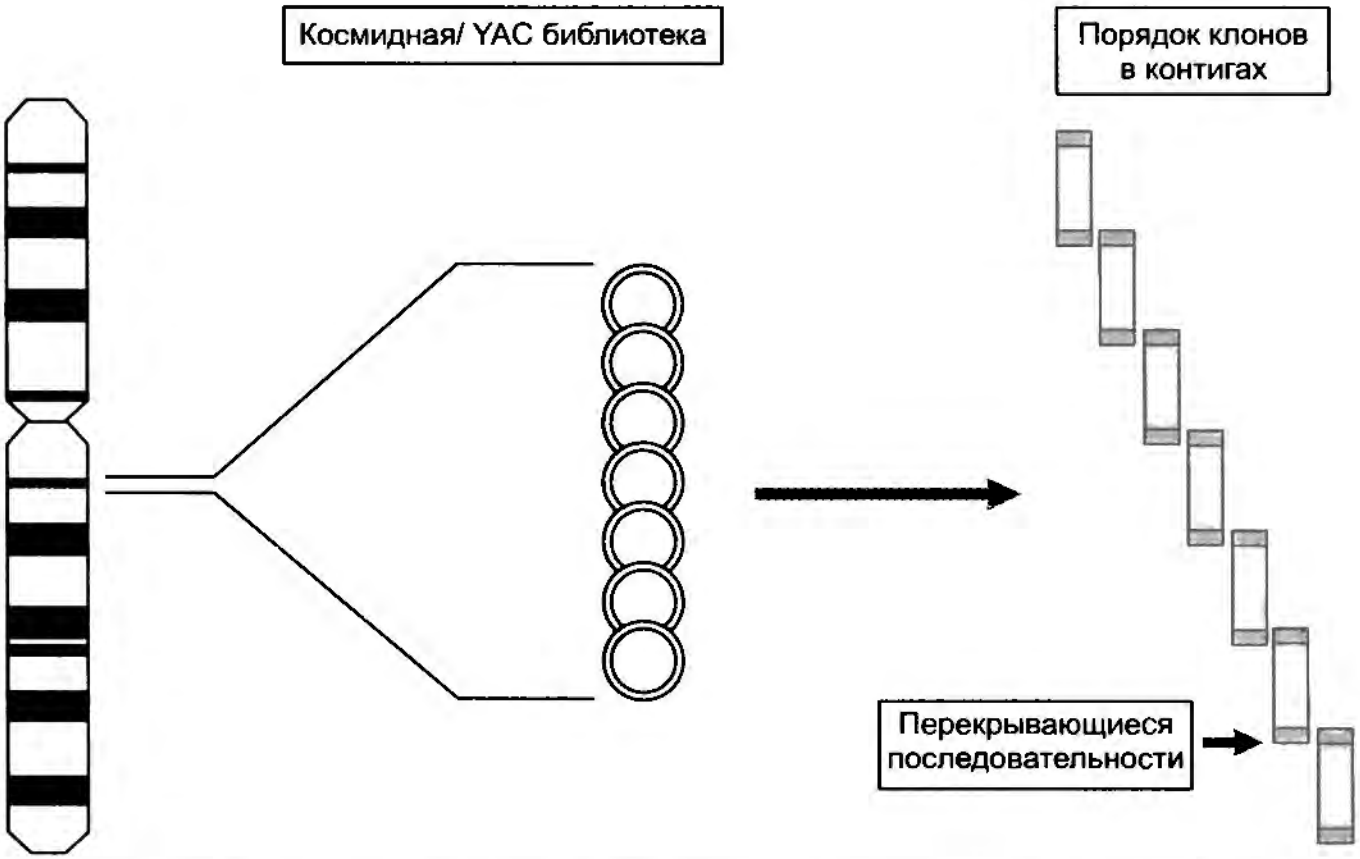


Рис. 6.47. Физическое картирование с помощью непрерывного ряда перекрывающихся клонированных фрагментов (контигов). Для того чтобы установить положение клонированных фрагментов ДНК, полученных в результате конструирования библиотеки в YAC или космидном векторе, определяют области перекрывания между фрагментами. Область перекрывания возникает в условиях частичного расщепления рестриктазой при конструировании библиотеки

плифицируют методом ПЦР (рис. 6.48). Уникальность STS определяется фланкирующими последовательность праймерами. Если в результате ПЦР происходит селективная амплификация области-мишени, то она может служить в качестве STS-маркера. По результатам детекции STS-маркеров, лежащих приблизительно на расстоянии 100 000 оснований друг от друга на карте перекрывающихся сегментов, можно упорядочить такие контиги. Таким образом, все исследовательские группы, работающие с клонами, имеют ориентиры, с помощью которых можно упорядочить клоны, полученные в их библиотеках.

Один и тот же STS, полученный в двух клонах, может быть использован для упорядочения клонов в контиге. Клоны, содержащие STS, обычно обнаруживают с помощью саузерн-блоттинга, фиксируя клоны на нейлоновой мембране.

В другом варианте библиотеку клонов разделяют на серии и каждую серию подвергают скринингу. Такой подход обеспечивает более быстрый путь идентификации STS внутри клона, а применение ПЦР позволяет обнаружить определенный клон внутри серии (рис. 6.49). STS-маркеры могут также быть получены из вариабельных областей генома для создания полиморфного маркера, который можно обнаружить в семействе и на карте сцепления генетических признаков (вместе с другими маркерами ДНК). Эти полиморфные STS-маркеры могут служить в качестве маркеров как для физической карты, так и для карты сцепления генети-

Рис. 6.48. Общая схема получения функционального STS-маркера

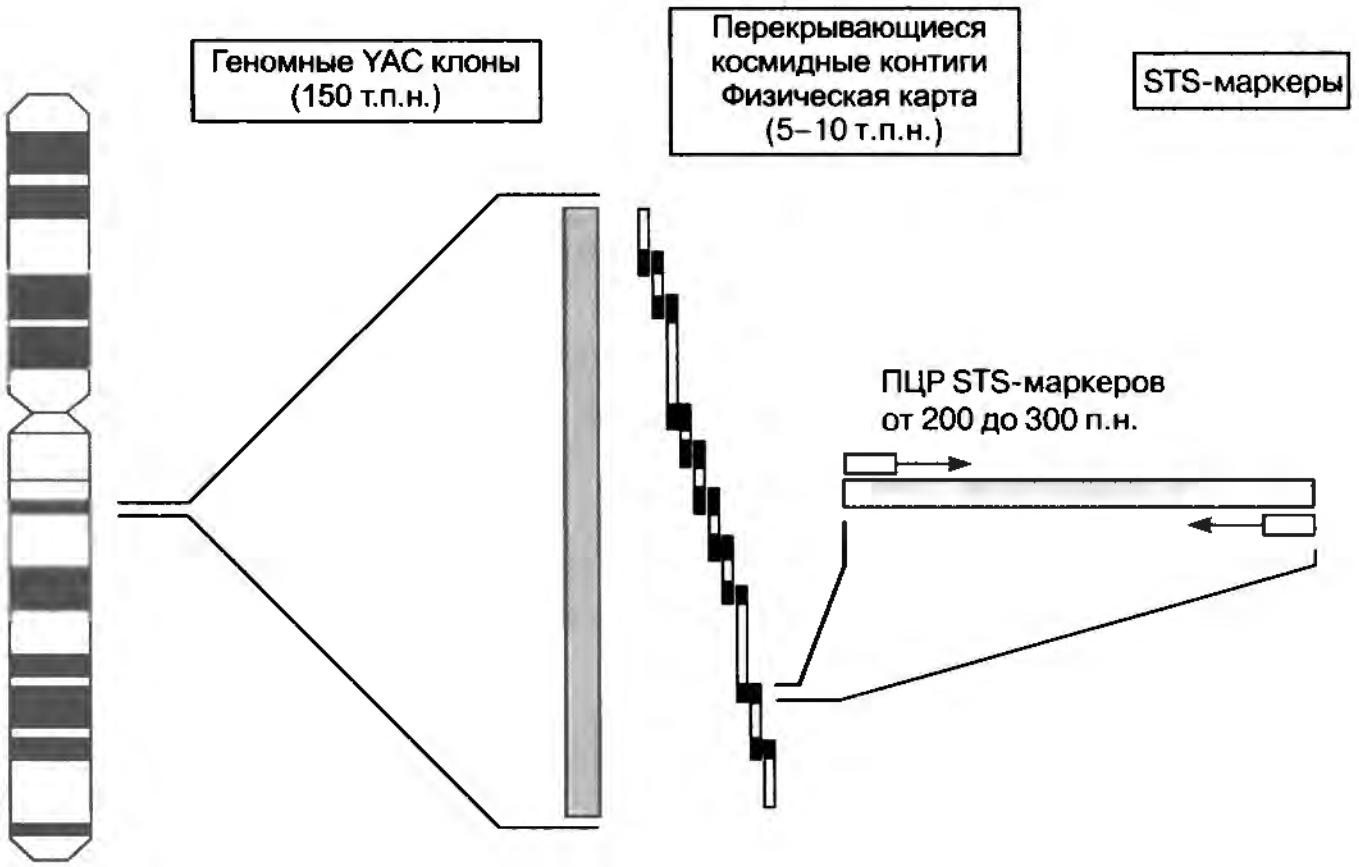


Рис. 6.49. Происхождение STS-маркера. STS представляет собой небольшую уникальную последовательность от 200 до 300 п.н., амплифицированную методом ПЦР и позволяющую расположить фрагменты на карте контигов. Такие последовательности обычно находятся друг от друга на расстоянии около 100 000 п.н. и могут служить ориентирами, с помощью которых можно расположить клоны, полученные в геномных библиотеках

ческих признаков для каждой хромосомы, являясь удобным инструментом для сопоставления двух карт.

6.9.2 Обнаружение гена и его локализация

На разных хромосомах было идентифицировано и локализовано довольного много участков, связанных с различными заболеваниями. Для упрощения анализа используют такую технику картирования *in situ*, как FISH (разд. 6.8.2). Действительно, было обнаружено много генов и кодируемых ими белков, хотя изначально о них имелось мало информации, кроме расположения гена. Этот метод обнаружения генов известен как **позиционное клонирование**; он был применен, например, для выделения гена *CFTR* (рис. 6.50).

Число генов, которые активно экспрессируются в клетке в любой момент времени, оценивается всего лишь в 10% от общего количества генов. Оставшаяся ДНК упакована и служит для неизвестных целей. Недавние исследования показали, что определенные активные гены могут быть идентифицированы по наличию так называемых **островков HTF** (*Hpa*II tiny fragments), часто обнаруживаемых на 5'-концах генов. Они являются CpG-богатыми неметилированными участками и при рас-

Рис. 6.50. Схема идентификации гена с помощью позиционного клонирования

щеплении ферментом рестрикции *Hpa*II образуют мелкие фрагменты. Еще одним методом обнаружения генов, который активно использовался в последние годы, является основанный на ПЦР метод образования продукта, называемого **экспрессирующейся маркерной последовательностью** (EST, expressed sequence tag). EST представляют собой часть предполагаемого гена, функция которого еще не установлена. Такой вариант ПЦР выполняется на матрице кДНК с помощью праймеров, которые связываются с якорными последовательностями типа poly(A) и праймерами, которые связываются с последовательностью на 5'-конце гена. Такие ПЦР могут впоследствии быть использованы, чтобы локализовать предполагаемый ген на участке хромосомы или использовать в качестве зонда для поиска оставшихся частей гена в библиотеке геномной ДНК. В настоящее время такие последовательности вызывают большой интерес, так как они могут представлять собой кратчайший путь к обнаружению генов.

Для идентификации последовательностей экзонов может быть использована другая система выделения генов с адаптированными векторами, называемая **амплификацией экзонов**. Для амплификации экзонов необходимы специализированные экспрессирующие векторы, которые способны включать фрагменты геномной ДНК, содержащей последовательности для сплайсинга. После трансфекции линии клеток эукариот получается транскрипт, который может быть обнаружен с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Это позволяет определить природу чужеродной ДНК по наличию сигнала сплайсинга. В табл. 6.7 перечислены методы обнаружения кодирующих последовательностей.

Таблица 6.7. **Методы определения кодирующих последовательностей**

Метод идентификации	Некоторые детали
Перекрестная гибридизация	Эволюционная консервативность последовательности ДНК, свидетельствующая о функциональной значимости
Поиск гомологии	Поиск в базах данных последовательностей, относящихся к семейству данного гена
Идентификация островков CpG	Участки гипометилированных CpG, часто обнаруживаемых в 5'-областях генов позвоночных животных
Идентификация открытых рамок считывания/промоторов/ участков сплайсинга/ участков связывания рибосомы	Компьютерный поиск косенсусных последовательностей
Нозерн-блоттинг	Детекция мРНК по связыванию меченых зондов
Амплификация экзонов	Анализ сплайсинга искусственной РНК для идентификации экзона
Экспрессирующаяся маркерная последовательность (EST)	Амплификация кДНК, соответствующей части гена

6.9.3 Проект «Геном человека»

Можно с уверенностью утверждать, что картирование и секвенирование генома человека — один из самых амбициозных проектов современной науки. Проект завершен досрочно, и мы теперь понимаем многие новые функции гена и их регуляцию. Реализация проекта стала результатом сотрудничества многих научно-исследовательских групп во всем мире и сопровождалось множеством дебатов о научных, технических, финансовых и этических аспектах проблемы. Одним из интересных результатов является секвенирование полного генома с идентификацией кодирующих последовательностей. Большая часть генома человека оказалась некодирующей и построенной из повторяющихся последовательностей. Оценки показывают, что лишь 10% генома кодирует ферменты и белки, но это приблизительно 22 000 генов и до полного понимания функций многих из них еще далеко. Обнаружено множество случаев альтернативного сплайсинга, в результате которого экзоны перемешиваются и подбираются так, чтобы образовывать различные мРНК и соответствующие различные белки. Дальнейшие научные исследования направлены на понимание сути и поиск методов лечения некоторых из 4000 известных генетических заболеваний, а также заболеваний, наследование которых является многофакторным. В связи с этим возникло много специфических геномных проектов, например проект «Генетическая анатомия рака» (Cancer Genome Anatomy), направленный на изучение мутаций, возникающих при развитии опухолей.

6.10 ФАРМАКОГЕНОМИКА

Благодаря успехам в области геномики были разработаны новые подходы к направленному медикаментозному лечению. Предполагается, что можно выявлять людей, которые реагируют специфическим образом на действие некоторого лекарства, с помощью изучения их генетики. В частности, SNPs (**полиморфизмы одного нуклеотида**) может служить хорошим маркером возможного развития заболевания и реакции на проведенное лечение. Простым примером является реакция на лекарство, используемое для лечения острого лимфобластного лейкоза у детей. Успешное лечение большинства пациентов может быть достигнуто с помощью 6-меркаптомочевины. Некоторые пациенты не реагируют на лечение, у других применение этого лекарства может иногда оказаться летальным. В настоящее время известно, что это происходит из-за мутации гена, кодирующего фермент, необходимый для метаболизма этого лекарства. Таким образом, до начала лечения следует проанализировать ДНК пациента, чтобы выяснить, каким будет вероятный ответ. Уже разработана технология для установления генотипа пациента (см. разд. 6.8.7). В настоящее время можно изучать SNPs, которые могут коррелировать с развитием определенных заболеваний, с помощью микрочипов. Это открывает возможность установления фармакогенетического профиля при рождении, почти таким же образом, как определение группы крови. Кроме того, можно устанавливать предрасположенность человека к заболеванию на основании генетической информации. Это возможно уже сейчас, хотя и в ограниченной форме; например, исландская генетическая компания deCode может обеспечить информацией о генах, связанных с определенными заболеваниями, полученную при изучении больших групп населения.

6.11 МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Не так давно, всего лишь в начале 1970-х гг. были выполнены первые эксперименты с рекомбинантной ДНК. С тех пор огромные успехи были достигнуты не только в развитии технологий молекулярной биологии, но также в их практическом применении. Изучение молекулярных основ заболеваний и новые приложения генетического анализа и генной терапии подают большие надежды. В прошлом медицинская наука полагалась на белковые и ферментативные маркеры, отражающие течение заболевания. В настоящее время стало возможным не только обнаруживать аномалии на ранних стадиях, используя технологии мРНК, но также в некоторых случаях предсказывать течение заболевания с помощью анализа генома. Завершение картирования и секвенирования генома человека и разработка таких методов, как ДНК-микрочипы, без сомнения ускоряют развитие этих процессов. Вероятно, наиболее трудно объяснить многофакторные заболевания, на течение которых влияют, в том числе, факторы окружающей среды.

Одним из наиболее изученных примеров такого типа заболеваний является рак. Молекулярно-генетический анализ позволил обнаружить определенный набор клеточных генов, называемых **онкогенами**, которые играют ключевую роль в развитии новообразований. Эти гены и их белки также активны в ключевые моменты клеточного цикла и тесно связаны с регуляцией клетки. Некоторые из них указаны в табл. 6.8. В некоторых случаях раковых заболеваний определенные молекулярные события коррелируют с мутациями в онкогенах и, следовательно, в соответствующих белках. Сегодня стало возможным проводить скрининг и предсказывать течение некоторых заболеваний на ранних стадиях, что вызывает определенные этические проблемы. Кроме понимания сути клеточных процессов, происходящих в нормальном состоянии и при заболевании, открываются большие возможности в создании лекарств и развитии генной терапии. Получено множество генно-инженерных терапевтических белков и ферментов, которые уже используются при лечении заболеваний. Кроме того, полным ходом идет разработка методов коррекции нарушений на уровне генов (**генная терапия**), что, вероятно, является одним из наиболее поразительных применений современной молекулярной биологии. Некоторые из таких разработок перечислены в табл. 6.9.

Продукция модифицированных культур и животных для сельского хозяйства и для получения важных терапевтических белков также является неоспоримым достижением молекулярной биологии. Генетические манипуляции позволили получить модифицированные растения с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды (табл. 6.10). Получение трансгенных животных также подает большие надежды для повышения качества рогатого скота, снижение стоимости производства лекарств и выведения здоровых или устойчивых к заболеваниям штаммов. В будущем это может помочь в

Таблица 6.8. **Основная классификация онкогенов и их клеточные и биохимические функции**

Онкоген	Пример	Описание
G-белки	H-K и N-*ras*	GTP-связывающие белки/GTPазы
Факторы роста	*sis, nt-2, hst*	β-цепь тромбоцитарного фактора роста)
Рецепторы факторов роста	*erbB*	Рецептор фактора роста эпидермиса
	fms	Рецептор колониестимулирующего фактора-1
Протеинкиназы	*abl, src*	Тирозиновые протеинкиназы
	mos, ras	Сериновые протеинкиназы
Факторы транскрипции	*myc*	ДНК-связывающий белок
	myb	ДНК-связывающий белок
	jun, fos	ДНК-связывающий белок

Таблица 6.9. **Некоторые примеры мишеней для генной терапии**

Заболевание	Дефект	Ген-мишень	Клетка-мишень
Эмфизема	Недостаточность (α1-АТ)	α1-антитрипсин (α1-АТ)	Клетки печени
Болезнь Гоше (болезнь накопления)	Недостаточность ГЦ	Глюкоцереброзидаза (ГЦ)	Фибробласты с ГЦ
Гемоглобинопатия	Талассемия	β-Глобин	Фибробласты
Синдром Леша–Найхана (первичная гиперурикемия)	Метаболическая недостаточность	Гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансфераза (ГФРТ)	Клетки с ГФРТ
Нарушение иммунной системы (иммунодефицит)	Недостаточность аденозиндезаминазы	Аденозиндезаминаза	Т- и В-клетки

Таблица 6.10. **Сельскохозяйственные растения, модифицированные генетическими методами**

Сельскохозяйственное растение	Генетическая модификация
Рапс (масличные семена)	Устойчивость к насекомым, модификация масла
Кукуруза	Переносимость гербицидов, устойчивость к насекомым
Рис	Модифицированный запасной белок семян, устойчивость к насекомым
Соевые бобы	Переносимость гербицидов, модификация запасного белка семян
Томат	Изменение созревания, устойчивость к насекомым и вирусам
Подсолнечник	Модификация запасного белка семян

преодолении таких опасностей как, например, заражение бычьей губчатой энцефалопатией. Нет сомнения в том, что усовершенствованные методы разведения домашнего рогатого скота посредством клонирования целого животного также принесет значительную пользу. Однако подобные разработки требуют серьезного обсуждения, особенно их этических сторон.

6.12 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WALTER, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn. Garland Publishing, New York. Понятное изложение общих вопросов.

BROWN, T.A. (2001). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Blackwell Science, Oxford. Прекрасное введение в генетику и молекулярную биологию.

BROWN, T.A. (2001). *Genomes 2*. Bios Scientific Publishers, Oxford. Прекрасное введение в концепцию геномов.

RAPLEY, R. and HARBRON, S. (2004). *Molecular Analysis and Genome Discovery*. John Wiley&Sons, Chichester. Современный сборник методов анализа нуклеиновых кислот и белков, в том числе для создания лекарств.

READ, A.P. and STRACHEN, T. (2004). *Human Molecular Genetics*. Garland Science, London. Прекрасный полный учебник с отличными иллюстрациями.

TURNER, P.C., BATES, A.D. and MCLENNAN, A.G. (2000). *Instant Notes in Molecular Biology*. Barnes and Noble/Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford. Ясное изложение основных концепций молекулярной биологии.

Глава 7

Иммунохимические методы

7.1 ВВЕДЕНИЕ

7.1.1 Иммунная система

Иммунная система животных отвечает за создание иммунного ответа против молекул, которые воспринимаются как чужеродные (не свои). Наука иммунология изучает иммунные реакции организма и работу иммунной системы.

Иммунная система защищает животных от микробной инфекции (вирусов, бактерий, микоплазмы, грибов и простейших), а также помогает избавляться от паразитов и выводить токсины. Иммунная система противостоит развитию опухолей и новообразований, но также может отторгать пересаженные клетки и органы от генетически неидентичных организмов. Физиологическая функция иммунной системы — обеспечить защиту организма от опасных для жизни клеток и биологических веществ (термин «иммунология» происходит от латинского *immunitas*, что означает «свободный от»). Неадекватный и нежелательный иммунный ответ может приводить к клиническим последствиям, таким как аллергия, отторжение трансплантатов и аутоиммунные нарушения. Иммунный ответ подразделяют на врожденный и приобретенный. Для проявления **врожденного иммунитета** не требуется предварительного воздействия постороннего вещества и реализуется он главным образом клетками линии моноцитов (например, макрофагами) и полиморфноядерными лейкоцитами. Врожденный иммунитет относительно неспецифичен, хотя в норме осуществляет четкое различие между «своим» и «посторонним». Врожденный иммунитет представляет собой мощный и быстрый механизм защиты против инвазивных поражений и инфекций. Применение лабораторных методов, основанных на этом механизме, ограничено общими вопросами биохимической методологии.

Для появления реакций **приобретенного иммунитета** необходим контакт организма с чужеродным веществом («праймирование»). Приобретенный иммунитет опосредован главным образом лимфоцитами и подразделяется далее на клеточный и гуморальный иммунный ответ. Клеточно-опосредованный иммунитет связан в основном с активностью Т-лимфоцитов, которые специфическим образом реагируют с чужерод-

ным веществом (антигеном) и запускают целый ряд иммунных процессов, например, когда цитотоксические Т-клетки уничтожают посторонние клетки и микроорганизмы. Лабораторные методы, основанные на механизмах клеточного иммунитета, могут быть полезны для изучения клеточной иммунологии и некоторых аспектов клинической иммунологии, однако применение этих методов в биохимии не является ни простым, ни особенно перспективным.

Гуморальный иммунитет опосредован в первую очередь растворимыми белками, называемыми **антителами**, которые циркулируют в крови и проникают в большинство органов. Антитела также могут находиться на поверхности клеток, где они действуют в качестве рецепторов антигенов и связывающих белков. Антитела производятся и секретируются В-лимфоцитами, однако этот процесс контролируется активностью других типов клеток, в частности лимфоцитов Т-хелперного ряда. Окончательно дифференцированные В-клетки называют плазматическими клетками, они секретируют основную массу антител. Изучение антител (а также некоторых других молекул иммунной системы, таких как компоненты комплемента) составляет предмет иммунохимии. Некоторые антитела проявляют удивительную специфичность и чувствительность к антигенам, так что эти свойства легли в основу многих методов анализа, называемых иммунохимическими методами. Эти методы чрезвычайно важны не только для изучения различных вопросов иммунологии, но и совершенно незаменимы при проведении исследований практически во всех областях биологии, особенно в биохимии. В табл. 7.1 расшифрованы некоторые наиболее часто используемые иммунохимические термины.

7.1.2 Антитела

Антитела — это группа глобулярных белков, которые называют иммуноглобулинами. Они представляют собой мономеры или полимеры, в основе которых лежит структура, состоящая из двух легких и двух тяжелых цепей (рис. 7.1). У высших позвоночных существует пять вариантов тяжелых цепей (γ, μ, α, δ и ε-цепи), определяющих класс иммуноглобулина (соответственно IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, табл. 7.2). Все классы иммуноглобулинов связывают антигены, но функции их различаются. У млекопитающих выделяют подклассы иммуноглобулинов IgG и IgA, различающиеся аминокислотной последовательностью тяжелых цепей (однако это различие менее значимо, чем между классами иммуноглобулинов). Количество подклассов варьирует у разных видов. Легкие цепи не обладают значительной иммунобиологической активностью, но участвуют в связывании антигена, а также важны для поддержания устойчивости белка и образования надмолекулярных структур. Иммуноглобулины IgG, IgE и IgD существуют в основном в виде мономеров, IgA часто встречается в виде димера, а IgM — в виде пентамера, по крайней мере, у млекопитающих. Иммуноглобулины IgA и IgM содержат небольшой дополнительный белок, называемый J-цепью и необходимый для образования полимерных структур; секретируемый IgA, кроме того, содержит еще один белок, называемый секреторным компонентом.

Таблица 7.1. **Словарь иммунохимических терминов**

Антиген. Вещество, которое узнается антителом и связывается с ним.

Антигенная детерминанта. См. Эпитоп

Антисыворотка. Сыворотка животного, содержащая антитела, которые реагируют со специфическим антигеном. Другое название — иммунная сыворотка.

Аутоантитела. Антитела, реагирующие с антигеном (антигенами) собственного организма. В норме в крови или жидкостях организма такие антитела не должны присутствовать, а их наличие часто связано с патологическим состоянием, называемым аутоиммунным заболеванием, к числу которых относятся ревматоидный артрит, системная красная волчанка, первичный билиарный цирроз, инсулинозависимый сахарный диабет.

Двухвалентный. Способный связывать две молекулы лиганда. Двухвалентные антитела могут связывать две молекулы антигена.

Иммуноген. Вещество или смесь веществ, использующихся для индукции иммунного ответа.

Клетки миеломы. Опухолевые клетки линии плазматических клеток. Другое название — клетки плазмацитомы.

Клон. Растущая популяция клеток, происходящих от одной клетки-предшественницы. Клон растет благодаря многократному митотическому делению, все его клетки генетически идентичны (если в процессе роста не произошли мутации).

Лимфоциты. Клетки, участвующие в развитии и поддержании специфического иммунитета. Происходят из линии лейкоцитов и составляют большинство клеток лимфоидных тканей.

Микротитровальный планшет. Пластиковый планшет с большим количеством лунок (чаще всего их 96), который гораздо более удобен для проведения различных типов иммуноанализа, чем отдельные пробирки. Лунки могут иметь плоское дно (используются для ELISA), U-образное дно (для РИА) или V-образное дно (для гемагглютинации). Планшеты могут быть гибкими или жесткими.

Одновалентный. Способный связывать лишь одну молекулу лиганда.

Парапротеин. Моноклональный иммуноглобулин, секретируемый клетками миеломы. Такие молекулы очень напоминают иммуноглобулины, производимые «нормальными» плазматическими клетками/лимфоцитами. Другое название — миеломный белок.

Пептид. Молекула, состоящая из нескольких аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями. Крупные пептиды называют полипептидами или белками.

Плазма. Жидкая фракция несвернувшейся крови, которую получают в результате осаждения клеточных компонентов. В отличие от сыворотки содержит все компоненты системы свертывания крови. Для получения плазмы используют антикоагулянты, такие как гепарин или цитрат.

Поливалентный. Способный связывать несколько молекул лиганда.

Сыворотка. Жидкость, получаемая из свернувшейся крови путем удаления сгустка и клеточных компонентов.

Эпитоп. Участок антигена, который узнается и связывается антителом. Обычно эпитоп содержит около шести аминокислотных или углеводных остатков. Эпитопы на белковых антигенах могут не быть непрерывными по своей структуре. Другое название — антигенная детерминанта.

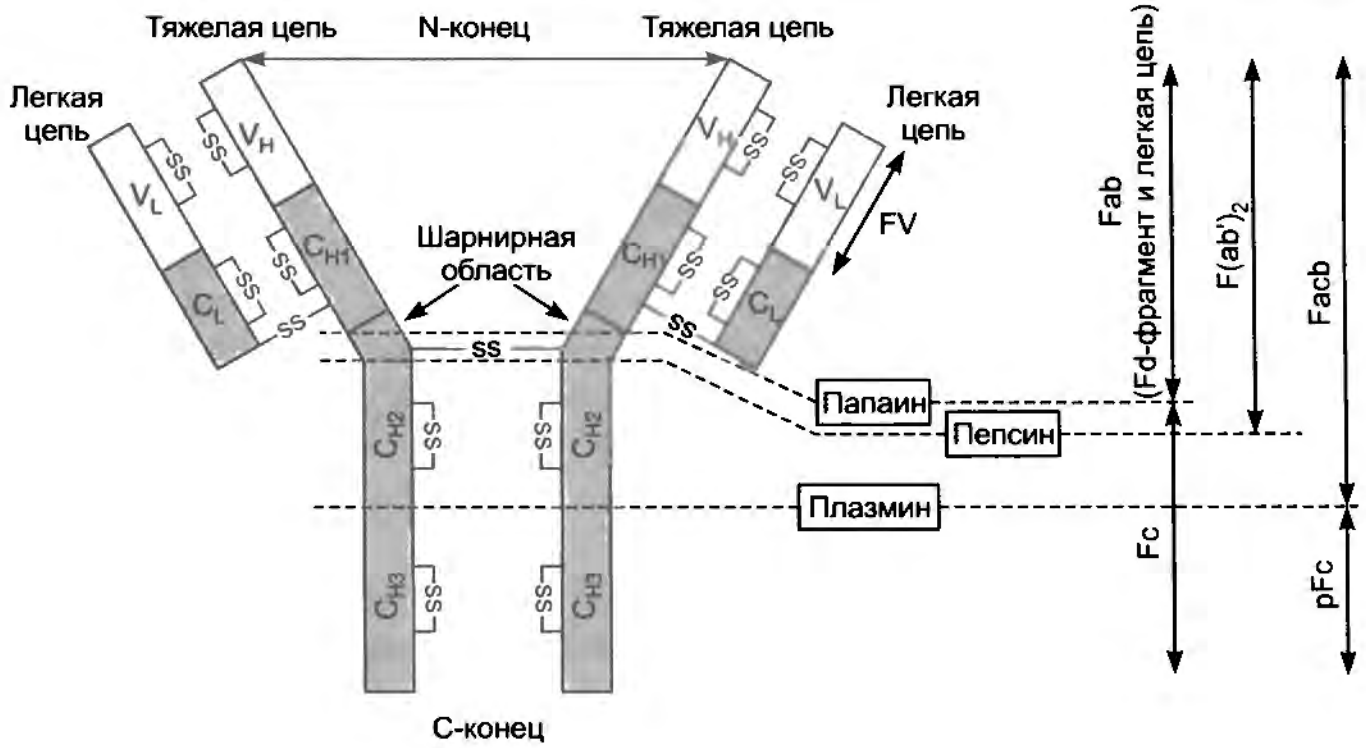


Рис. 7.1. Общая структура IgG с указанием участков расщепления ферментами и образующихся фрагментов. Следует отметить, что количество S-S-связей в шарнирной области различно для разных подклассов и видов организмов

Молекулы иммуноглобулинов расщепляются некоторыми протеолитическими ферментами с образованием характерных фрагментов, которые используются в иммунохимическом анализе, а также отражают важные аспекты структуры и функции антител. Растительная протеаза папаин расщепляет человеческий IgG на три фрагмента примерно одинакового размера (около 50 000); два фрагмента идентичны, а третий фрагмент отличается и может быть отделен от первых двух методом ионообменной хроматографии. Два идентичных фрагмента способны связывать по одной молекуле антигена, но не способны осаждать антиген из раствора или в геле. Эти фрагменты называют **Fab-фрагментами** (*от англ. f*ragment — *a*ntigen *b*inding). Третий фрагмент не связывает антиген, но сравнительно легко кристаллизуется, что отражает большую гомогенность его структуры. Его называют **Fc-фрагментом** (*от англ. f*ragment *c*rystallisable). Протеаза млекопитающих пепсин при низких значениях pH расщепляет человеческий IgG на один большой фрагмент, один фрагмент поменьше и несколько небольших пептидов. Большой фрагмент (100 000) связывает две молекулы антигена (если антиген не слишком велик), может образовывать с ним перекрестные сшивки и комплексы, которые образуют осадок. По структуре он очень похож на димер Fab-фрагмента, который образуется при расщеплении папаином; его называют **$F(ab')_2$-фрагментом**. Аналогичным образом фрагмент меньшего размера представляет собой усеченную версию Fc-фрагмента и носит название **Fc'-фрагмента**. Как папаин, так и пепсин расщепляют молекулу IgG в шарнирной области, но только первый фермент производит разрыв ближе к N-концу, а второй — ближе к C-концу белка (рис. 7.1). Это объясняет, почему при расщеплении папаи-

Таблица 7.2. **Состав полипептидных цепей иммуноглобулинов человека**

Класс подкласс	Нормальная концентрация в сыворотке, мг/мл	M_r (×10^{-3})	Домены H-цепи	Состав цепи	M_r (×10^{-3}) Всего	Пептид	Содержание остатков углеводов (число углеводных остатков), %	Аминокислоты в шарнирной области	Дисульфидные связи в тяжелых цепях
IgG1	5–10	146	4	2γ1	51	49	3–4 (1)	15	2
				2L (κ:λ 2:1)	23	23	< 0,5		
IgG2	1,8–3,5	146	4	2γ2	51	49	3–4 (1)	12 4	
				2L (κ:λ 2:1)	23	23	< 0,5		
IgG3	0,6–1,2	170	4	2γ3	60	57	3–4 (1)	62	11
				2L (κ:λ 1:1)	23	23	< 0,5		
IgG4	0,3–0,6	146	4	2γ4	51	49	3–4 (1)	12	2
				2L (κ:λ 1:1)	23	23	< 0,5		
IgM	0,5–2,0	900	5	10□	67	57	12–16 (5)	0	1[а]
				2L (κ:λ 3:1)	23	23	< 0,5		
				1J	15	14	7,5		
IgA1[б]	0,8–3,4	160	4	2α1	56	50	10–15 (5)	20	2[в]
				2L (κ:λ 1:1)	23	23	< 0,5		
IgA2[б]	0,2–0,6	160	4	2α2	53	48	10–15 (2)	7	2[в]
				2L (κ:λ 1:1)	23	23	< 0,5		
Секретируемый IgA1 или IgA2[г]	–	390	4	4α	53–56	48–50	10–15		
				4L	23	23	< 0,5		
				1J	15	14	7,5		
				ISC[д]	75	63	15–16		
IgD	0,003–0,3	165	4	2δ	60	51	14–71 (3)	64	1
				2L (κ:λ 1:10)	23	23	< 0,5		
IgE	0,0001–0,0007	185	5	2ε	70	59	13–16 (6)	0	2
				2L	23	23	< 0,5		

[а] Один дисульфидный мостик связывает остатки цистеинов между доменами C_H2 и C_H3; между мономерными единицами существуют другие дисульфидные связи.

[б] Представлены данные для мономерной формы, преобладающей в человеческой сыворотке. Существуют также полимерные формы, вплоть до пентамерной, которые наряду с α и L-цепью содержат одну J-цепь.

[в] Существует еще одна дисульфидная связь между цистеином из хвостовой области с соответствующим цистеином либо в другой тяжелой цепи, либо в J-цепи, либо в секреторном компоненте секретируемого IgA.

[г] Представлены данные для димера; у человека встречается также тетрамерная форма.

[д] SC — секреторный компонент, образованный из мембранного poly(Ig)-рецептора, транспортирующего IgA сквозь эпителиальные клетки.

Воспроизводится в соответствии с: M. A. Kerr and R. Thorpe, *Immunochemistry Labfax* (1994), Bios Scientific, Oxford.

ном образуется одновалентный Fab-фрагмент, а при расщеплении пепсином — двухвалентный димерный $F(ab')_2$-фрагмент. Два Fab'-компонента, составляющие $F(ab')_2$, связаны между собой дисульфидными мостиками, образующими шарнирную область. Для получения фрагментов иммуноглобулинов можно использовать и другие ферменты, однако папаин и пепсин используют чаще других. IgG из других организмов расщепляется на похожие фрагменты, но различные виды организмов могут быть более или менее чувствительными к действию протеаз. Другие классы иммуноглобулинов также можно разделить на фрагменты (см. разд. 7.11).

В большинстве иммунохимических методов наиболее широко применяется именно IgG.

7.1.3 Структура иммуноглобулинов. Гены иммуноглобулинов. Многообразие антител

Цепи иммуноглобулинов различных классов или типов содержат участки, одни из которых более консервативны по своей последовательности, а другие более вариабельны. Цепи построены из доменов, имеющих сходную трехмерную структуру (рис. 7.1). Тяжелые цепи состоят из трех (γ-, α- и δ-цепи) или четырех (μ- и ε-цепи) константных доменов и одного вариабельного домена, в то время как легкие цепи — из одного константного и одного вариабельного домена (рис. 7.1 и табл. 7.2). **Константные области** антител важны для поддержания трехмерной структуры, отвечают за многие иммунобиологические функции (такие, как фиксация комплемента) и взаимодействие с рецепторами иммуноглобулинов, которые обнаружены на многих типах клеток. **Вариабельные области** ответственны за связывание антигена. Внутри вариабельных областей выделяют относительно короткие участки с наиболее сильно различающимися последовательностями, которые непосредственно связываются с антигенами. Эти участки называют **гипервариабельными областями** или участками, ответственными за комплементарность (complementarity-determining regions, **CDR**). Три таких участка приходится на каждую тяжелую или легкую цепь. Менее изменчивые участки вариабельных областей важны для поддержания структуры молекулы антитела, необходимой для эффективного связывания антигена.

Иммуноглобулины представляют собой исключение из общего правила, что один ген кодирует один белок; в данном случае несколько зародышевых генов кодируют каждую из тяжелых и легких цепей. Константные области тяжелых цепей кодируются каждая одним геном, причем каждому классу или подклассу соответствует отдельный ген (C_H-гены) и все они отличаются от зародышевых генов, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи (V_H-гены). Сравнительно большое количество генов вариабельных областей собрано в кластеры (для тяжелых цепей иммуноглобулинов человека существует около 100 V_H-генов). Между ними и генами константных областей расположен участок коротких генов, кодирующих соединительный участок (J; существует шесть таких генов для тяжелых цепей иммуноглобулинов человека), и генов, от-

ветственных за разнообразие иммуноглобулинов (D; четыре для генов тяжелых цепей человека). Аналогичным образом организованы гены легких цепей (известны генные сегменты V_L, J_L и C_L), но D-генов легких цепей не существует; всего известно около 70 V_L- и 4 J_L-генов для легкой к-цепи человека. На ранних стадиях созревания В-клеток происходит транслокация генов, в результате которой происходит соединение определенного V-гена с J-геном, D-геном (только в случае тяжелых цепей) и С-геном. Полученная последовательность кодирует полную цепь иммуноглобулина. Такой механизм позволяет животным синтезировать молекулы иммуноглобулинов, которые сильно различаются гипервариабельными областями, т. е. именно теми участками молекул, которые ответственны за связывание антигена. Подобное разнообразие еще более расширяется за счет включения различного количества D-областей (для тяжелых цепей), а также в результате соматических мутаций, происходящих в процессе формирования иммунного ответа. Комбинация всех перечисленных механизмов приводит к тому, что, по крайней мере, высшие позвоночные животные способны образовывать огромное количество разных антител (теоретически количество различных антител у человека оценивается в 10^8), различающихся специфичностью и сродством к антигенам. Фактически *любой* чужеродный антиген соответствующего размера приводит к синтезу узнающих его антител. Подобные свойства антител широко используются в иммунохимических методах анализа.

7.2 ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ

Практически все иммунохимические методы анализа основаны на использовании антител, а эффективность этих методов зависит от качества используемых антител. Природа антитела определяет как **специфичность** метода (т. е. способность отличать анализируемое вещество от других веществ), так и его **чувствительность** (т. е. способность обнаруживать/измерять низкие концентрации анализируемого вещества). Для этой последней характеристики важна авидность антител (см. разд. 7.9). Хотя некоторые используемые в иммунохимических методах антитела, например некоторые аутоантитела, могут существовать «в естественных условиях», обычно требуется стимулировать синтез антител путем иммунизации животных (важное исключение рассматривается в разд. 7.2.6). Для этой цели разработано множество различных подходов.

7.2.1 Иммунный ответ; поликлональные и моноклональные антитела

Все позвоночные животные могут синтезировать антитела против чужеродных антигенов. Однако у низших позвоночных возникает весьма слабый иммунный ответ (хотя даже у самых примитивных животных, таких как миксины и миноги, возникает иммунная реакция против некоторых чужеродных белков), поэтому антитела таких организмов фактически не используются в иммуноанализе. Наиболее развит гуморальный иммуни-

тет у млекопитающих, поэтому в аналитических целях обычно используют именно антитела млекопитающих. В некоторых случаях применяют птичьи антитела. Чаще всего для анализа используют антитела класса IgG, хотя для некоторых процедур могут также применяться IgM и IgA. Применение IgE ограничено изучением аллергических и анафилактических реакций, а IgD обычно не применяют, поскольку никакие специфические функции секретируемого IgD не известны.

На сегодняшний день известно, что каждый зрелый В-лимфоцит секретирует антитела с одной определенной последовательностью. Гуморальный ответ на антиген приводит к активации гетерогенной популяции В-клеток, секретирующих различные иммуноглобулины. Созревание иммунного ответа выражается в клональной экспансии этих предварительно стимулированных антигеном клеток с образованием популяции плазматических клеток, секретирующих целый спектр связывающих антиген иммуноглобулинов, часто относящихся к различным подклассам и классам. Антитела из этой фракции обладают различной специфичностью и авидностью к иммуногену. Обычно при реализации данного механизма образуется множество различных антител, узнающих разные эпитопы каждого антигена. Такие антитела называют **поликлональными**, поскольку они образуются несколькими клонами В-лимфоцитов и различаются по аминокислотной последовательности. Поликлональные антитела, как неочищенные — в виде сыворотки, так и очищенные (разд. 7.3), часто используют в различных иммунохимических методах анализа. Однако сравнительно недавно были разработаны методы получения **моноклональных антител**, образующихся в одном клоне В-клеток и имеющих идентичную аминокислотную последовательность. Моноклональные антитела гомогенны по своим свойствам (в том числе обладают одинаковой специфичностью и авидностью к антигену, т. е. узнают один и тот же эпитоп) и для определенных аналитических целей имеют преимущества перед поликлональными антителами. Получение моноклональных антител обсуждается в разд. 7.2.3.

7.2.2 Получение поликлональных антител (антисыворотки)

Можно получить антитела, которые связывают белки, пептиды, углеводы или нуклеиновые кислоты, однако последние обладают низкой специфичностью к нуклеотидной последовательности, поэтому практически не используются в анализе. Антитела против углеводов используются в аналитических целях, но за исключением отдельных случаев также обладают низкой специфичностью. В основном большинство иммунохимических методов основано на использовании антител, узнающих белки и пептиды.

У большинства высших позвоночных в ответ на попадание в организм чужеродного белка возникает гуморальный иммунный ответ. Однако сила этого ответа зависит от ряда факторов. Наиболее важное значение имеют размер белка (пептида) и филогенетическое различие между источником антигена и животным, синтезирующим антитела. Общее правило

гласит, что чем дальше отстоят друг от друга животные в филогенетическом отношении, тем лучше для получения антител. Кроме того, выбор животного для получения антител зависит от количества имеющегося антигена, количества требуемой сыворотки и ее качества. В некоторых случаях для получения антител с особыми свойствами используют близкородственные виды животных или даже разные штаммы одного и того же вида. Для возникновения иммунного ответа важно, чтобы антиген в качестве **иммуногена** и эквивалентный антиген (если он существует) у животного, продуцирующего антитела, имели разную аминокислотную последовательность (а, следовательно, и структуру). Обычно чем сильнее это различие, тем более выраженными иммуногенными свойствами обладает антиген. В некоторых случаях отдельные фрагменты антигена могут приводить к очень сильному иммунному ответу; такие эпитопы называют **иммунодоминантными**.

Пептиды с молекулярной массой <200 обычно вызывают очень слабый иммунный ответ или не вызывают никакого ответа. Иммуногенность возрастает с увеличением молекулярной массы. Белки с молекулярной массой >10 000 обычно вызывают иммунный ответ, если воспринимаются иммунизированным животным как чужеродные.

Антитела, связывающие небольшие пептиды или другие небольшие неиммуногенные молекулы, такие как стероиды или лекарства, можно получить путем связывания (конъюгации) этих веществ с крупными белками, называемыми носителями. Получающаяся антисыворотка содержит как антитела, распознающие носитель, так и те, что связывают небольшие молекулы. Некоторые белки наиболее удобно использовать в качестве носителей (например, гемоцианин и тиреоглобулин), а другие вызывают слабый гуморальный ответ против белка-носителя (очищенный белковый дериват туберкулина (purified protein derivate, PPD) из бациллы Кальметта–Герена (BCG)). Вещества, которые являются иммуногенными не самостоятельно, а только в виде конъюгатов, называются **гаптенами**.

При получении антител для иммуноанализа обычно в состав иммуногена вводят адъювант. Такие вещества усиливают иммунный ответ путем формирования депо, медленно высвобождающего антиген, путем стимуляции Т-клеток или при участии в презентации антигена. Некоторые адъюванты действуют сразу по нескольким из названных механизмов (см. табл. 7.3). Чаще всего одной-единственной иммунизации животного недостаточно для получения хорошей антисыворотки, поскольку она содержит антитела с низкой авидностью и почти все IgM, использование которых в анализе весьма ограничено. Обычно проводят серию иммунизаций через определенные промежутки времени, за которые успевает развиться иммунный ответ, и в результате получают **гипериммунное животное**, в крови которого содержится высокая концентрация авидных антител, специфичных к данному антигену. Такая «гипериммунная сыворотка» используется в иммунохимических анализах в качестве поликлональных антител. Условия проведения иммунизации в каждом случае зависят от конкретного антигена и используемого вида животного; некоторые общие принципы указаны

Таблица 7.3. **Некоторые наиболее распространенные адъюванты**

Адъювант	Состав и применение
Полный адъювант Фрейнда (ПАФ)[a]	Минеральное масло, содержащее убитые нагреванием микобактерии (*Mycobacterium tuberculosis* или *M. butyricum*) Используется в виде эмульсии с водным раствором антигена
Неполный адъювант Фрейнда (НАФ)	Минеральное масло Используется в виде эмульсии с водным раствором антигена
Alum	Комплекс солей алюминия. Существуют различные варианты, некоторые продаются в готовом виде (Алгидрогель), другие готовят в лаборатории из нескольких солей, например $NaHCO_3$ и сульфата алюминия-калия. Водный раствор антигена впитывается гелем
Бентонит	Натриевый бентонит (Вайоминг, США) в виде геля. Водный раствор антигена поглощается поверхностью геля
Quil A	Сапонин из южноамериканского дерева *Quillaja saponana*. Образует комплекс с водным раствором антигена
Мурамилдипептид А (МДП)	N-Ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин. Смешивают с водным раствором антигена. Используются также различные производные МДП
Монофосфорил-липид А (МФЛ)	Используется в разных вариантах, часто в виде масляной эмульсии. Антиген включают в эмульсию
Bacillus pertussis	Убитые клетки смешивают с водным раствором антигена

[a] ПАФ, возможно, наиболее мощный адъювант, но он подходит не для всех случаев.
Воспроизводится в соответствии с: M. A. Kerr and R. Thorpe, *Immunochemistry Labfax* (1994), Bios Scientific, Oxford.

в табл. 7.4. В общем, чем крупнее животное, тем больше антигена необходимо для иммунизации, однако у более крупных животных больше объем крови (следовательно, сыворотки или плазмы). Поэтому для иммунизации крупных животных требуется большее количество иммуногена, но от них можно получить и больше антисыворотки (от мыши можно получить лишь несколько миллилитров сыворотки, тогда как овцы и лошади могут дать несколько литров).

7.2.3 Моноклональные антитела

Моноклональные антитела имеют важнейшее значение для иммунохимического анализа. Их производят отдельные клоны клеток. Зрелые производящие антитела лимфоциты от иммунизированных животных можно клонировать, однако в культуре они живут очень ограниченное время, поэтому не могут производить достаточное количество антител. Были разработаны методы получения больших количеств моноклональ-

Таблица 7.4. **Примеры протоколов иммунизации**

Вид	Первая иммунизация	Перерыв, недели	Первая бустер-доза	Перерыв, недели	Последующие бустер-дозы
Мыши, крысы, морские свинки	5–100 мкл антигена в ПАФ (или в другом адъюванте), п/к или в/м	2–3	5–100 мкл антигена в НАФ, в другом адъюванте или ФСБ, п/к или в/м	3	5–100 мкл антигена в НАФ или в ФСБ, п/к, в/м, в/в или в/б
Кролики	50–250 мкл антигена в ПАФ (или в другом адъюванте), п/к, в/м или в/к	3–4	50–250 мкл антигена в НАФ, в другом адъюванте или ФСБ, п/к или в/м	4 и более	50–250 мкл антигена в НАФ или в ФСБ, п/к, в/м или в/в
Овцы и козы	250 мкг — 10 мг антигена в ПАФ или другом адъюванте, п/к, в/м или в/к	4	250 мкг — 10 мг антигена в НАФ или другом адъюванте, п/к или в/м	4–8 и более	250 мкг — 10 мг антигена в НАФ или в ФСБ, п/к, в/м или в/в
Лошади и ослы	250 мкг — 50 мг антигена в ПАФ или другом адъюванте, п/к, в/м или в/к	4	250 мкг — 50 мг антигена в НАФ или другом адъюванте, п/к или в/м	4–8 и более	250 мкг — 50 мг антигена в НАФ или в ФСБ, п/к или в/м
Приматы	50 мкг — 1 мг в адъюванте, в/м или п/к		50 мкг — 1 мг в адъюванте или ФСБ, в/м или п/к	4–8 и более	50 мкг — 1 мг в адъюванте или ФСБ, в/м, п/к или в/к
Куры	30–200 мкг в ПАФ или другом адъюванте, в/м	2–3	30–200 мкг в НАФ или другом адъюванте, в/м	3 и более	30–200 мкг в НАФ, другом адъюванте или ФСБ, в/м

ПАФ — полный адъювант Фрейнда, НАФ — неполный адъювант Фрейнда, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, в/б — внутрибрюшинно, п/к — подкожно, в/м — внутримышечно, в/в — внутривенно, в/к — внутрикожно.

Воспроизводится в соответствии с: M. A. Kerr and R. Thorpe, *Immunochemistry Labfax* (1994), Bios Scientific, Oxford.

ных антител из постоянно растущих (бессмертных) клеточных линий, эффективно секретирующих антитела. Эти методы основаны на использовании гибридных клеток, трансформации лимфоцитов вирусами или на технике рекомбинантной ДНК.

7.2.4 Получение гибридом

В 1975 г. Келер и Мильштейн разработали процедуру получения гибридных клеток, которые растут в культуре и секретируют антитела (рис. 7.2). Для этого необходимо осуществить слияние лимфоцитов иммунизированной мыши с клетками мышиной миеломы. Такие гибридные клетки, которые первоначально назывались фузомами, а теперь гибридомами, наследуют от лимфоцитов способность производить антитела, а от клеток миеломы — способность к неограниченному росту. Были получены линии клеток миеломы, которые уже не секретируют аномальный иммуноглобулин парапротеин, что имеет определенные преимущества для гибридомной технологии.

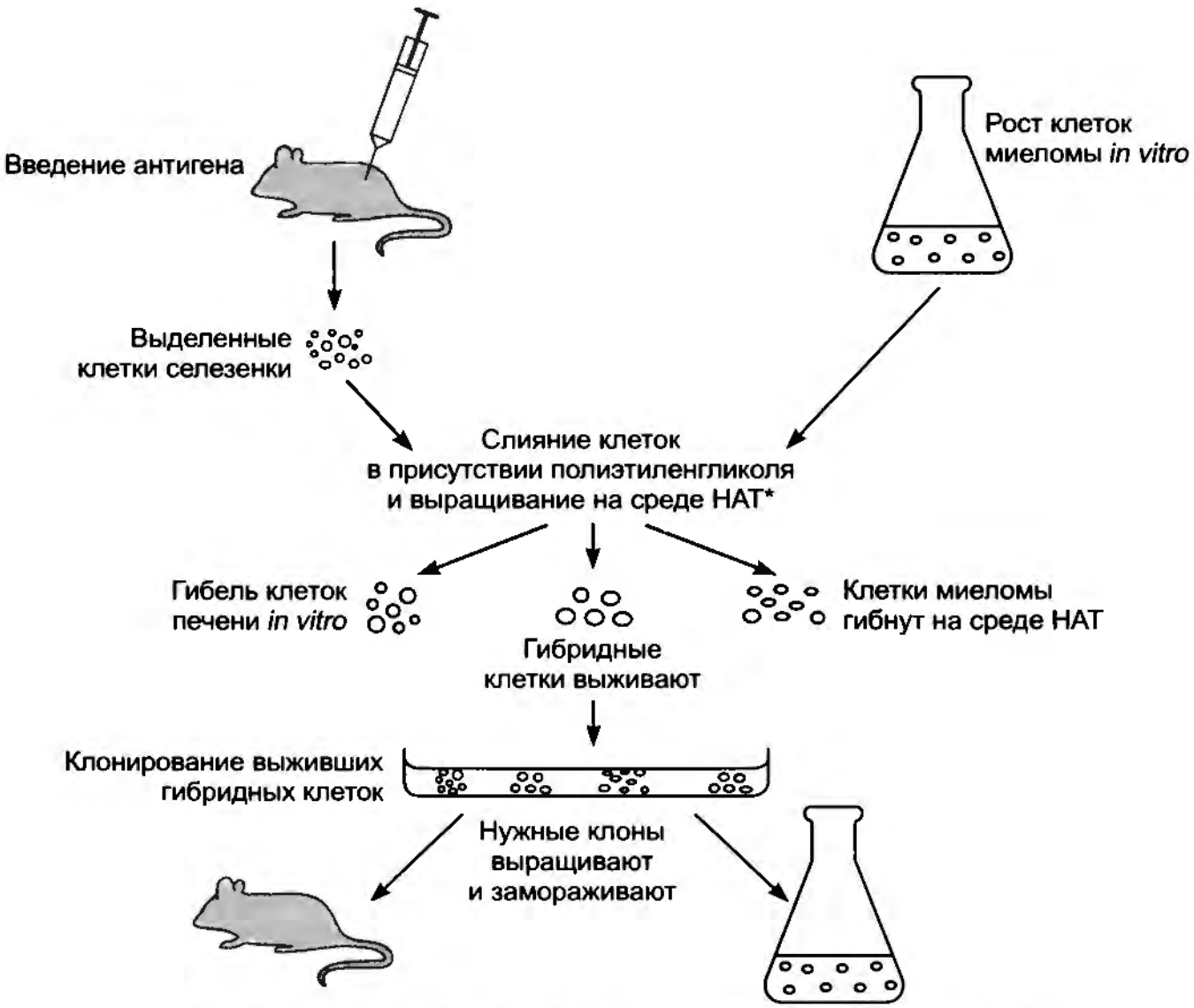


Рис. 7.2. Схема получения мышиных моноклональных антител

Лимфоциты и клетки миеломы смешивают в высокой концентрации и обрабатывают специальным агентом (ранее использовали вирус Сендай, а в настоящее время полиэтиленгликоль). В таких условиях образуется некоторое количество слитых клеток, но все же преобладают отдельные лимфоциты и клетки миеломы, которые, если их не отделить, будут доминировать и подавлять гибридные клетки. Разделение обычно осуществляют с помощью селективных сред, на которых клетки миеломы погибают, а гибридные клетки выживают. Наиболее распространенные селективные среды содержат антибиотик аминоптерин. Он ингибирует метаболический путь синтеза нуклеотидов *de novo*, с помощью которого нуклеотиды и в конечном итоге нуклеиновые кислоты синтезируются из небольших молекул. Обычные клетки выживают, поскольку они имеют запасной путь синтеза нуклеиновых кислот из отдельных нуклеотидов, образующихся при разрушении существующих нуклеиновых кислот. Однако этот путь реализуется только в тех клетках, которые производят фермент гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу (HGPRT), в противном случае на среде с аминоптерином клетки погибают. Такие клетки получают на среде с 8-азагуанином; на сегодняшний день известно множество линий мышиной миеломы, не имеющих HGPRT.

После слияния лимфоцитов с HGPRT-отрицательными клетками миеломы их выращивают на среде HAT, содержащей аминоптерин, а также гипоксантин и тимидин для обеспечения клеток субстратами, необходимыми для реализации запасного пути синтеза нуклеиновых кислот. На этой среде клетки миеломы погибают, а гибридные клетки выживают, поскольку они унаследовали от лимфоцитов способность синтезировать HGPRT. Оставшиеся отдельные лимфоциты гибнут в культуре, спустя некоторое время, так что в результате получается чистый препарат гибридных клеток, которые можно клонировать с помощью одного из приведенных ниже методов.

- *Метод лимитирующего разведения*. Суспензию клеток гибридомы разбавляют и распределяют по лункам планшета с таким расчетом, чтобы на одну лунку приходилась приблизительно одна клетка. Выращивают отдельные клоны, а затем супернатант после осаждения клеток анализируют на наличие искомых антител. Для получения моноклональной линии гибридом эту процедуру обычно повторяют несколько раз.
- *Клонирование в мягком агаре*. Суспензию клеток разбалтывают в 0,25%-м жидком агаре, покрывают сверху 0,5%-м агаром и оставляют осаждаться. Клоны растут в культуре в виде отдельных очагов и обнаруживаются с помощью инвертированного микроскопа. Когда клоны достигнут определенного размера, их можно снять с агара с помощью тонкой стеклянной пипетки, перенести в жидкую среду, а после выращивания проанализировать супернатант на наличие антител.
- *Клонирование с помощью метода FACS*. Клетки метят флуоресцентной меткой (например, с помощью меченного флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) антигена), а затем выделяют методом проточной цитометрии с помощью сортировщика активированных флуоресценцией клеток

(FACS). Отобранные клетки выращивают, а после их осаждения анализируют супернатант на наличие антител.

Все существующие методы клонирования предназначены для получения моноклональных гибридом, но полностью гарантировать этого они не могут. Повторное клонирование повышает вероятность получения моноклональных клеток. С этой целью готовят субклоны линий гибридомы (как описано выше) и определяют долю клеток, секретирующих искомые антитела. Если исходная линия моноклональная, то эта доля близка к 100%. Если цифра иная, это означает, что либо линия гибридомы не является моноклональной, либо она нестабильна в отношении секреции моноклональных антител.

Моноклональные клеточные линии можно выращивать в культуре и выделять моноклональные антитела из супернатанта (промышленные ферментеры и биореакторы с мембранами из полых волокон позволяют получать несколько килограммов антител), либо выращивать их в брюшной полости мышей и получать асцитическую жидкость с высокой концентрацией антител (до 5–10 мг/см^3). Клетки можно замораживать и использовать для получения антител по мере необходимости.

Подобный подход используется для получения крысиных моноклональных антител, но с той только разницей, что вместо аминоптерина в состав селективной среды добавляют О-диазоацетил-L-серин (азасерин). Этот антибиотик ингибирует реакции аминирования, некоторые из этих реакций важны для синтеза пуринов *de novo*. Гетерогибридомы можно получать путем слияния лимфоцитов хомяка с HGPRT-отрицательными клетками мышиной миеломы. Обычно гибридомные технологии менее эффективны при работе с клетками высших млекопитающих, поскольку не всегда имеются в наличии подходящие линии клеток миеломы, а гетерогибридомы из лимфоцитов высших организмов часто нестабильны. Были описаны линии клеток миеломы кролика, пригодные для получения гибридом.

7.2.5 Трансформация лимфоцитов вирусом; получение человеческих моноклональных антител

В некоторых случаях желательно, а иногда совершенно необходимо, использовать именно человеческие моноклональные антитела, а не антитела грызунов. Например, человеческие антитела имеют преимущество для терапевтических целей *in vivo*, поскольку они менее иммуногенны и выполняют определенные иммунобиологические функции, кроме того, часто довольно сложно или вовсе невозможно получить моноклональные антитела грызунов против некоторых антигенов, например антигена группы крови человека Rh D. С помощью гибридомной технологии получено несколько человеческих моноклональных антител (практически всегда из гетерогибридом), но этот подход сложен и малоэффективен. Однако инфицирование человеческих В-лимфоцитов вирусом Эпштейна–Барр приводит к трансформации определенной доли клеток и позволяет получать постоянно растущие клеточные линии, которые можно клонировать. Не-

которые из клонов секретируют моноклональные антитела, которые можно использовать в терапевтических и аналитических целях. Довольно большая доля клеток секретирует антитела класса IgM, однако удается получать линии клеток, секретирующих любые классы и подклассы иммуноглобулинов. Некоторые клеточные линии оказываются нестабильными и секретируют мало антител; иногда эту проблему удается решить путем их слияния со стабильными, не секретирующими антитела гетерогибридомами или клетками миеломы.

7.2.6 Генно-инженерные антитела

Хотя путем иммунизации лабораторных животных удается получать мышиные или крысиные моноклональные антитела с определенными антигенсвязывающими свойствами, остается проблема их клинического применения для лечения людей, например раковых больных. Дело в том, что такие антитела могут вызывать в организме человека иммунные реакции, поскольку воспринимаются как чужеродные. Кроме того, некоторые применения моноклональных антител основаны на их эффекторных функциях (опосредованных Fc-фрагментами определенных подклассов иммуноглобулинов) в сочетании со специфичностью (определяемой вариабельной областью), чего нелегко добиться путем простой иммунизации. Для других клинических применений предпочтительными являются малые фрагменты антител, а не целые молекулы, например в тех случаях, когда необходимо проникнуть внутрь ткани. Подобные проблемы решаются методами генетической инженерии. Гены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов можно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и клонировать в подходящий вектор для экспрессии и проведения определенных манипуляций, например для соединения вариабельной области одного антитела с константной областью другого. Для экспрессии целых антител обычно используют клетки млекопитающих (чтобы обеспечить правильное гликозилирование и сборку цепи), а фрагменты антител можно экспрессировать в клетках *Escherichia coli*. Кроме того, стало возможным имитировать *in vitro* реакцию антител *in vivo* путем экспрессии спектра генов фрагментов антител на поверхности бактериофага (фаговый дисплей), что позволяет отбирать антитела необходимой специфичности.

Амплификация генов антител методом полимеразной цепной реакции

Гены антител можно легко амплифицировать с помощью ПЦР. Процедура заключается в многократном повторении циклов удлинения участка последовательности между двумя олигонуклеотидными праймерами, гибридизованными с 5'- и 3'-концами последовательности гена. Можно выделить следующие стадии данного процесса:

- подготовка клеточного лизата и экстракция РНК (фракция РНК должна содержать мРНК, которая кодирует легкие и тяжелые цепи антител);

- синтез комплементарной однонитевой ДНК (кДНК) с помощью фермента обратной транскриптазы; гибрид РНК/кДНК используется в качестве матрицы для ПЦР;
- специфическая амплификация гена (или генов) антител с матрицы РНК/кДНК с помощью олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с матрицей с внешней стороны по отношению к той области, последовательность которой нужно определить (обычно это вариабельная область, рис. 7.3).

Можно синтезировать ПЦР-праймеры для большинства семейств генов вариабельных областей, поскольку нуклеотидные последовательности, фланкирующие гены вариабельных областей, довольно консервативны. Включение в праймеры участков узнавания для ферментов рестрикции позволяет осуществлять клонирование амплифицированных последовательностей.

Исходным материалом для данной процедуры может быть гибридома, секретирующая моноклональные антитела, что позволяет далее осуществлять определенные генетические манипуляции. В другом варианте РНК из лимфоцитов периферической крови человека используют

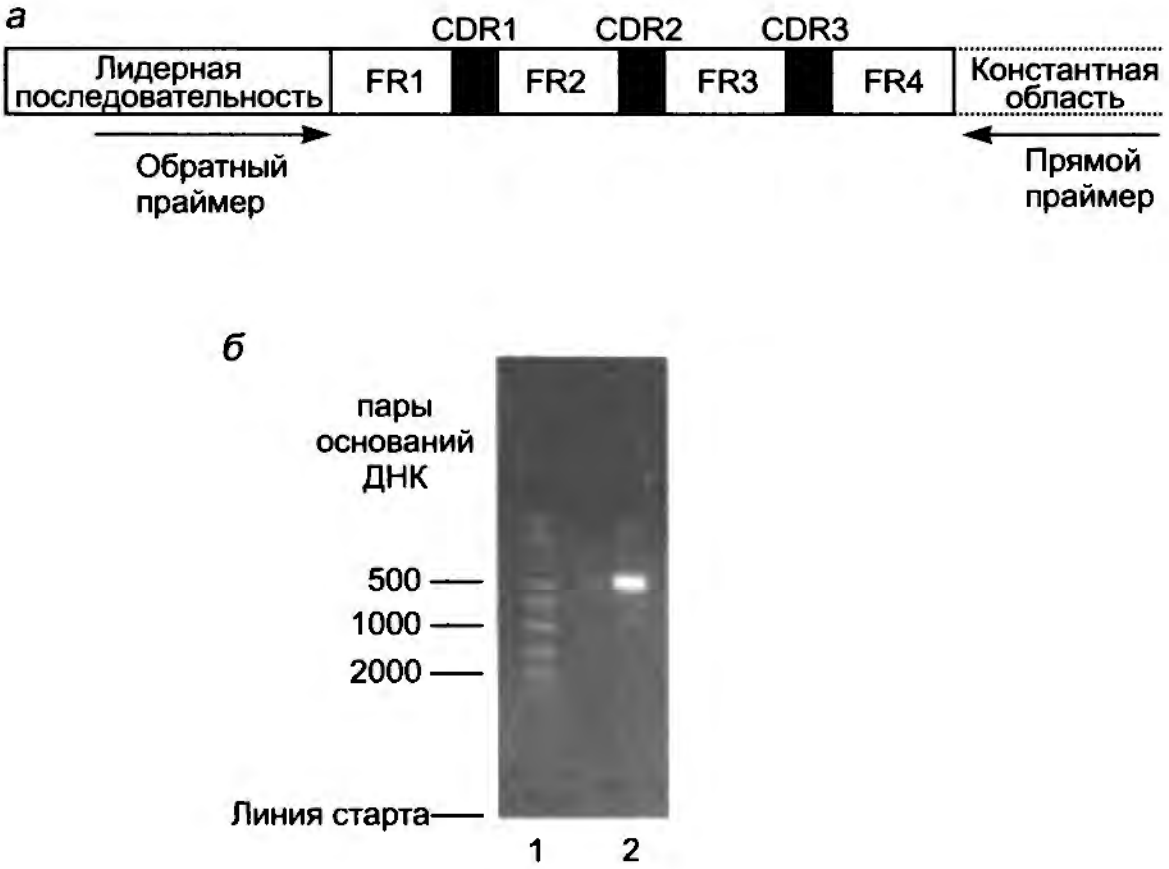


Рис. 7.3. Амплификация гена вариабельной области тяжелой цепи методом ПЦР. *а* — расположение праймеров по отношению к области гена: FR — рамочный участок; CDR — область, определяющая комплементарность. *б* — фотография агарозного геля после электрофоретического разделения продуктов амплификации гена вариабельной области тяжелой цепи (дорожка 2). На дорожке 1 нанесены ДНК-маркеры. Гель окрашивали с помощью бромистого этидия (флуоресцентный краситель, связывающийся с нуклеиновыми кислотами) и фотографировали в ультрафиолетовом свете

для выделения генов вариабельных областей тяжелых и легких цепей с целью получения спектра генов фрагментов антител и фагового дисплея (см. ниже).

Спектр генов и фаговый дисплей

Амплифицированные гены вариабельных областей тяжелых и легких цепей (V_H и V_L соответственно) можно соединить между собой, используя синтетическую последовательность ДНК, кодирующую пептидный линкер. В результате получается набор генов **одноцепочечных** (sc) **фрагментов антител Fv** (это наименьшие фрагменты антител, все еще содержащие функциональный антигенсвязывающий участок, рис. 7.4, *б*). Использование линкерной последовательности предотвращает диссоциацию фрагментов V_H и V_L, которые в противном случае не были бы связаны ковалентной связью. Затем набор генов scFv амплифицируют с праймерами, содержащими участки расщепления ферментами рестрикции, что позволяет встроить их в подходящий вектор, например pHEN-1 и экспрессировать в клетках *E. coli*. Таким образом получают фаговую библиотеку антител. Техника фагового дисплея позволяет экспрессировать фрагменты scFv на поверхности фага в виде продуктов слияния с белками оболочки фага. В результате становится возможным отбирать закодированные в фаге фрагменты путем скрининга с помощью антигена, связанного на твердом носителе. Другой вариант метода позволяет экспрессировать растворимые scFv-фрагменты (в других штаммах *E. coli*). Преимущество описанного метода состоит в возможности получать антитела от неиммунизированных индивидов.

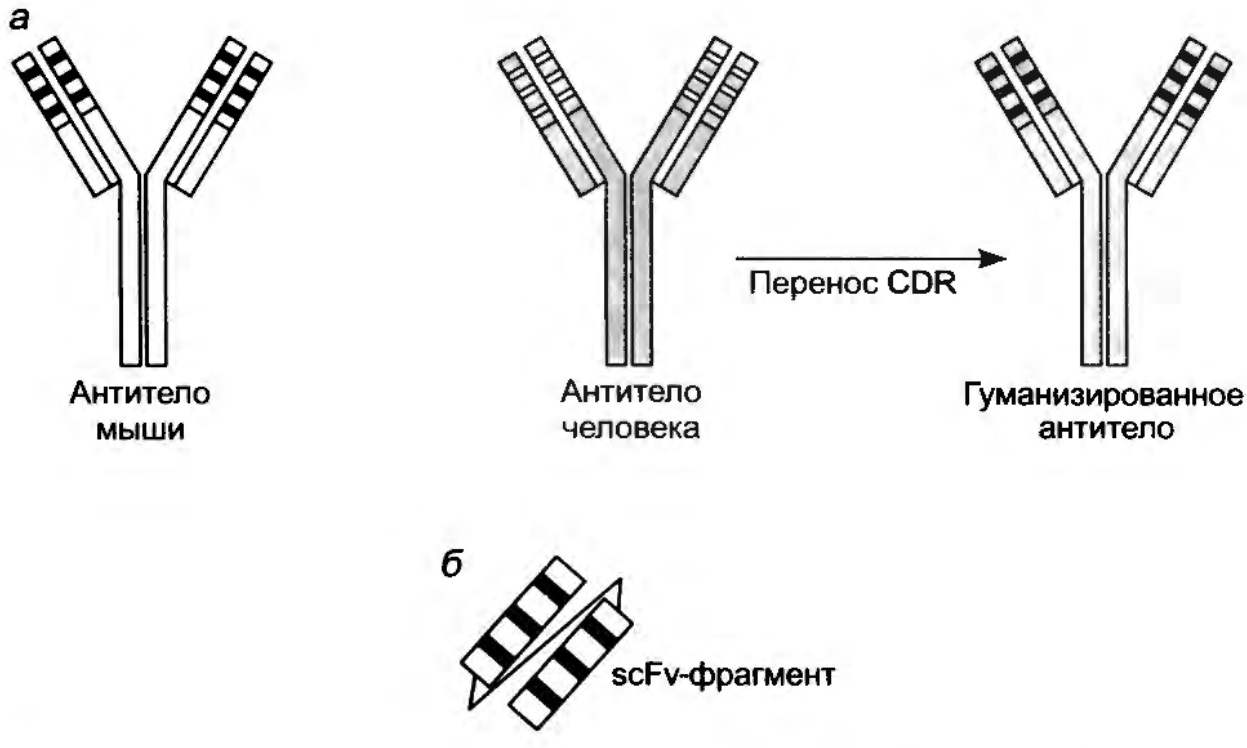


Рис. 7.4. Генно-инженерные методы получения антител и их фрагментов: *а* — перенос ответственных за комплементарность областей (CDR) для получения гуманизированных антител; *б* — одноцепочечный Fv-фрагмент

Ключевыми моментами данной технологии является получение большого количества генов антител, фаговый дисплей и отбор с помощью конкретного антигена.

Использование фрагментов антител может иметь преимущества для решения некоторых клинических задач. Например, благодаря малому размеру они легче проникают внутрь опухолей. Однако в лабораторной практике применение фрагментов антител в качестве реагентов осложняется тем, что они имеют сравнительно низкую функциональную аффинность.

Пути снижения иммуногенности

Для снижения иммуногенности антител при сохранении их антигенсвязывающих свойств было предложено несколько подходов. В **химерных антителах** константные области мышиных или крысиных антител заменены на человеческие аналоги. В результате такие антитела приобретают еще и дополнительные полезные свойства, связанные с наличием человеческих Fc-фрагментов, для использования на людях *in vivo* и в некоторых методах *in vitro*. Более того, константные области можно заменить не на фрагменты антител, а на другие белки, такие как токсины или ферменты. Альтернативный подход состоит в **гуманизации** мышиных или крысиных антител путем введения мышиных CDR в человеческие гены вариабельной области (рис. 7.4, *а*). Такие антитела необходимо экспрессировать в клетках млекопитающих. Кроме того, можно производить замену или введение аминокислотных остатков для обеспечения правильной конформации вариабельной области.

На сегодняшний день стало возможным получать полностью человеческие моноклональные антитела с набором определенных специфичностей и иммунологических функций. С этой целью гены антигенсвязывающих фрагментов с необходимой специфичностью, которые чаще всего получают с применением техники фагового дисплея, соединяют с генами, кодирующими необходимые легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов. Экспрессия сконструированных таким образом последовательностей (обычно в клетках миеломы млекопитающих) приводит к получению целых молекул иммуноглобулинов, полностью синтезированных на основании человеческих генов. Для «стандартного» производства scFv-фрагментов методом фагового дисплея антигенсвязывающие фрагменты могут быть отобраны из библиотек Fv-фрагментов неиммунизированных индивидов.

Определение последовательностей моноклональных антител

Клонирование генов вариабельных областей антител значительно облегчило задачу определения кодируемых ими аминокислотных последовательностей, поскольку определение нуклеотидной последовательности гена осуществить намного легче, чем последовательности аминокислот в молекуле иммуноглобулина методом Эдмана (см. разд. 8.4.3). Метод Эдмана требует наличия достаточно большого количества чистого препарата антител и позволяет определять сравнительно короткие фрагменты

последовательности, поэтому для анализа полной последовательности необходимо проводить секвенирование многочисленных перекрывающихся участков. Знание аминокислотной последовательности антител позволяет проводить корреляцию между их структурой и иммунологическими свойствами, такими как антигенсвязывающая способность, а также предсказывать их трехмерную структуру. Знание нуклеотидной последовательности, кроме того, позволяет выяснить, какие гены зародышевой линии задействованы в выработке конкретных антител (вспомните, что гены антител образуются путем соединения различных генных сегментов при созревании лимфоцитов; разд. 7.1) и в созревании сродства (соматические мутации).

Амплифицированные гены антител можно секвенировать непосредственно. Однако чтобы избежать ошибок, связанных с наличием аномальных ПЦР-продуктов, материал после амплификации следует встроить в фаговый вектор и трансформировать им клетки *E. coli*, что позволит получить более надежные и воспроизводимые результаты секвенирования. Секвенирование ДНК методом обрыва цепи описано в разд. 5.11.

7.3 ОЧИСТКА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ИХ ФРАГМЕНТОВ

Для многих иммунохимических методов (например, с применением агара или методов иммуногистохимии; разд. 7.4 и 7.8) вполне приемлемо использовать неочищенные антитела в виде антисыворотки, супернатанта культуры клеток, содержащего моноклональные антитела, а также асцитической жидкости из грызунов. Однако другие методы требуют частичной или полной очистки специфических антител или, по крайней мере, выделения общей фракции иммуноглобулинов. Это требуется, например, для мечения антител (разд. 7.5), их иммобилизации для **иммуноаффинной хроматографии** (разд. 7.3.4), а также для их анализа методом изоэлектрофокусирования (разд. 10.3.4) или высокоэффективной жидкостной хроматографии (разд. 11.3.2). Разработано множество методов очистки иммуноглобулинов; оптимальный метод и конкретные условия его проведения в каждом случае определяются классом и подклассом антител, видом животного, в котором они были получены, целью их получения, а также типом исходного материала, например сыворотка в случае поликлональных антител, супернатант культуры клеток или асцитическая жидкость в случае моноклональных антител. Методы выделения иммуноглобулинов из смеси белков сыворотки, супернатанта культуры или асцитической жидкости включают осаждение, основанное на различной растворимости антител и других белков, ионообменную хроматографию, основанную на различии зарядов иммуноглобулинов и других белков, гель-фильтрацию — метод разделения белков в соответствии с их размерами, а также аффинную хроматографию, основанную на специфических взаимодействиях антител с лигандами. Для достижения тре-

буемой чистоты материала иногда приходится комбинировать несколько методов. Однако только метод аффинной хроматографии с иммобилизованными антигенами позволяет получить антитела одной определенной специфичности, за исключением тех случаев, когда исходный материал содержит исключительно моноклональные антитела.

7.3.1 Методы осаждения

Под действием некоторых солей, органических растворителей и органических полимеров молекулы иммуноглобулинов осаждаются из раствора с образованием видимых глазом нерастворимых агрегатов, которые можно отделить с помощью центрифугирования и вновь растворить в подходящем буфере (см. разд. 8.3.4). Молекулы иммуноглобулинов в растворе окружены гидратной оболочкой, а принцип методов осаждения основан на нарушении структуры этой оболочки. При определенной концентрации солей иммуноглобулины находятся в растворе, но за пределами этого диапазона концентрации соли они выпадают в осадок. При высокой концентрации соли иммуноглобулины теряют свою гидратную оболочку, поскольку ионы соли оттягивают воду на себя, в результате открывшиеся гидрофобные области молекул иммуноглобулинов могут контактировать между собой, что приводит к их слипанию. Такой процесс называют «высаливанием»; он приводит к необратимому осаждению антител. Высаливание наиболее эффективно осуществляется под действием солей многозарядных анионов и однозарядных катионов; чаще всего применяют сульфаты аммония или натрия. Растворимость некоторых иммуноглобулинов уменьшается и при снижении концентрации соли, поскольку в таких условиях, т. е. при низкой ионной силе раствора (в растворе мало ионов), молекулы белка слабо гидратированы и гидратная оболочка вокруг молекул белка неустойчив. Этот механизм называется осаждением эуглобулинов, и чаще всего этот метод используют для первичной очистки IgM, а вот для выделения IgG он обычно не подходит. Для осаждения иммуноглобулинов можно также применять смешивающиеся с водой органические растворители, поскольку они снижают гидратирующую способность воды. В промышленных масштабах отделение иммуноглобулинов от других белков плазмы крови в промышленных масштабах осуществляют путем добавления этанола. Полиэтиленгликоль — это растворимый в воде полимер с большой молекулярной массой, который можно применять для отделения иммуноглобулинов от других белков плазмы путем осаждения, аналогично тому, как это происходит при действии органических растворителей.

Осаждение иммуноглобулинов наиболее эффективно происходит вблизи их изоэлектрической точки (т. е. при таком значении pH, когда суммарный заряд молекулы иммуноглобулина равен нулю), поскольку в таких условиях сводится к минимуму электростатическое отталкивание между молекулами. Методы осаждения дешевы и просты в исполнении, но обычно они служат лишь для первичной очистки белка, поскольку осаждаемый белок не достаточно чистый.

7.3.2 Гель-фильтрация

Гель-фильтрация позволяет разделить молекулы в соответствии с их размерами (разд. 11.7). Поскольку IgM значительно превосходит по размеру иммуноглобулины всех других классов и многие другие белки сыворотки, выделение этого класса иммуноглобулинов обычно осуществляют методом гель-фильтрации или методом ВЭЖХ. Для очистки IgG одной гель-фильтрации обычно недостаточно, но ее можно использовать, например, в сочетании с ионообменной хроматографией.

7.3.3 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография, проводимая в системе ВЭЖХ или FPLC в обычных условиях (высокоэффективная жидкостная хроматография белков), основана на разделении иммуноглобулинов и отделении их от других белков в соответствии с поверхностными зарядами этих моле-

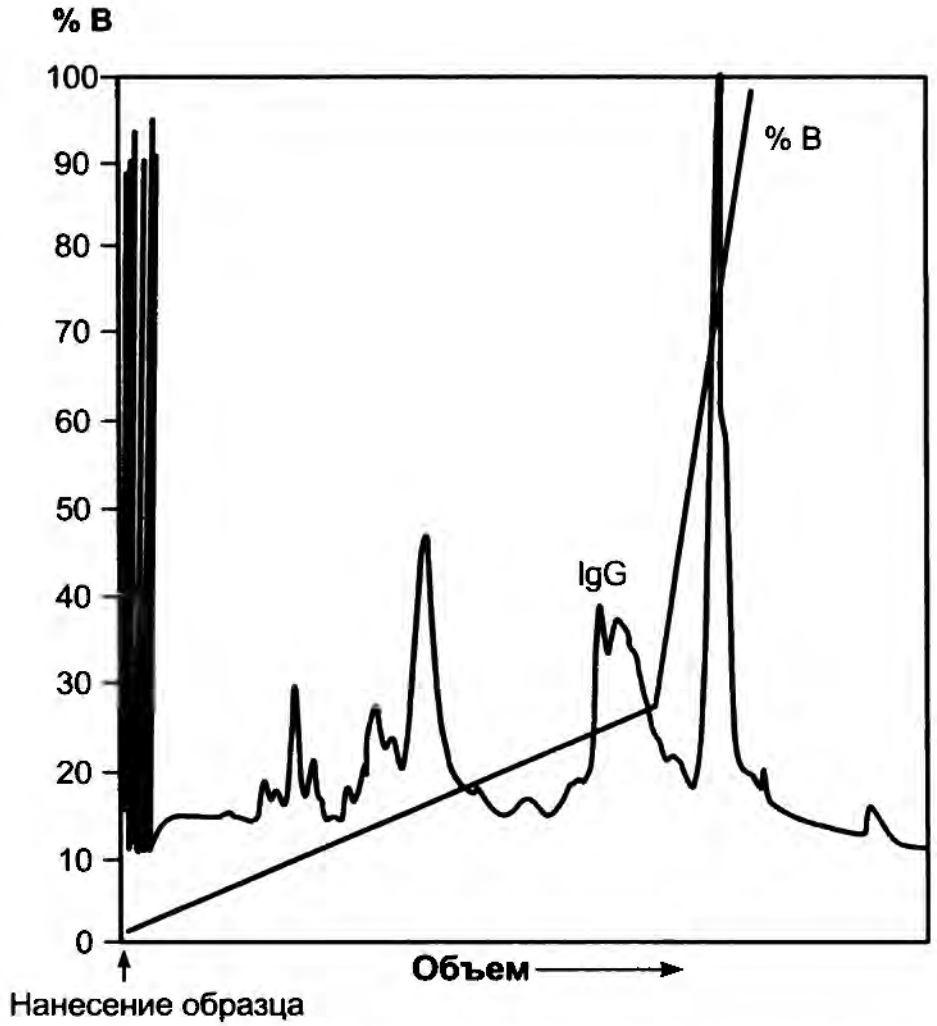


Рис. 7.5. Очистка мышиных IgG из асцитической жидкости методом ионообменной хроматографии (FPLC). Для первичной очистки IgG использовали осаждение сульфатом аммония (разд. 7.3.1). Осадок растворяли в 20 мМ триэтаноламине, pH 7,7 (буфер A). Колонку с анионообменным носителем уравновешивали в том же буфере. Нанесенный образец смывали с колонки с помощью градиента буфера B (A + 1 M NaCl). На хроматограмме обозначен пик, соответствующий IgG

кул (разд. 11.7). При нейтральном значении pH большинство иммуноглобулинов заряжены отрицательно и связываются с положительно заряженными анионообменными носителями. Повышение концентрации соли или изменение pH раствора позволит элюировать иммуноглобулин с носителя (рис. 7.5).

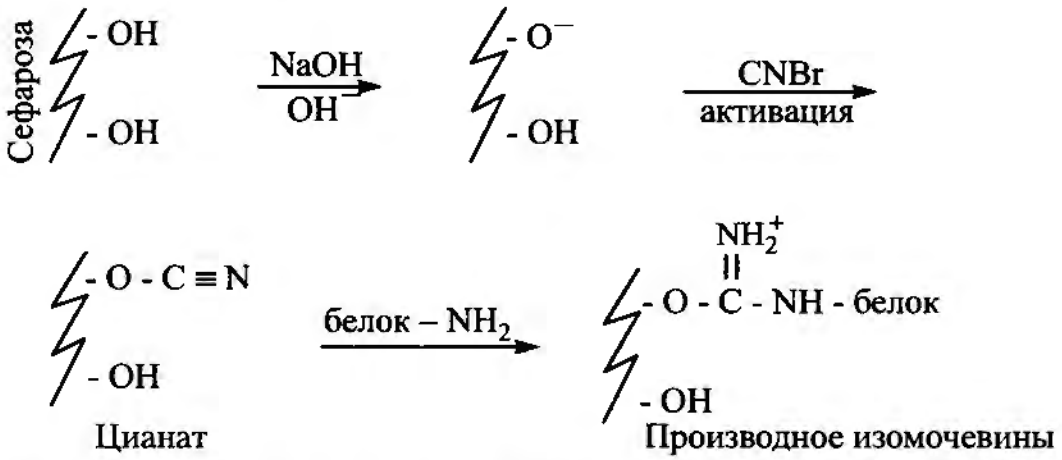
7.3.4 Аффинная хроматография

Аффинная хроматография основана на специфических обратимых взаимодействиях между лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем, и антителами, которые нужно очистить (разд. 11.8). В качестве лиганда может выступать антиген — для очистки антител особой специфичности, антииммуноглобулиновые антитела — для очистки антител из определенного вида животного, определенного класса или подкласса, а также иммуноглобулинсвязывающий белок (некоторые штаммы бактерий образуют белки, имеющие высокое сродство к иммуноглобулинам, см. табл. 7.5). Чаще всего в качестве иммуноглобулинсвязывающих белков используют бактериальные белки A и G, которые связываются с константной областью IgG (в зависимости от вида животного и подкласса иммуноглобулина). Кроме того, описан белок, связывающий легкую цепь (белок L), но он связывает лишь некоторые типы легких цепей. Очень часто аффинная хроматография с иммобилизованным белком A или G является методом выбора для очистки моноклональных антител IgG из супернатанта культуры клеток. В качестве инертного носителя могут использоваться агароза, сефароза, полиакриламид, полистирол или устойчивый при высоком давлении акриловый полимер — для ВЭЖХ. Кроме того, лиганд может быть связан с магнитными шариками, которые впоследствии можно отделить магнитом. На сегодняшний день доступно множество

Таблица 7.5. **Лиганды для аффинной хроматографии**

Тип лиганда	Примеры	Очистка антител
Гаптен	Динитрофенол	Антитела, связывающие гаптен
Антиген	Гемоглобин, фактор VII	Антитела определенной специфичности
Бактериальный иммуноглобулинсвязывающий белок	Белок A, белок G	Большинство подклассов IgG из многих видов организмов
	Белок L	Некоторые к-цепи из многих видов организмов
Антииммуноглобулиновые антитела	Антитела козы против IgG человека	Фракция иммуноглобулинов, специфическая для определенного класса/вида
Лектины	Джакалин	Человеческий IgA
	Маннансвязывающий белок	Мышиный IgM

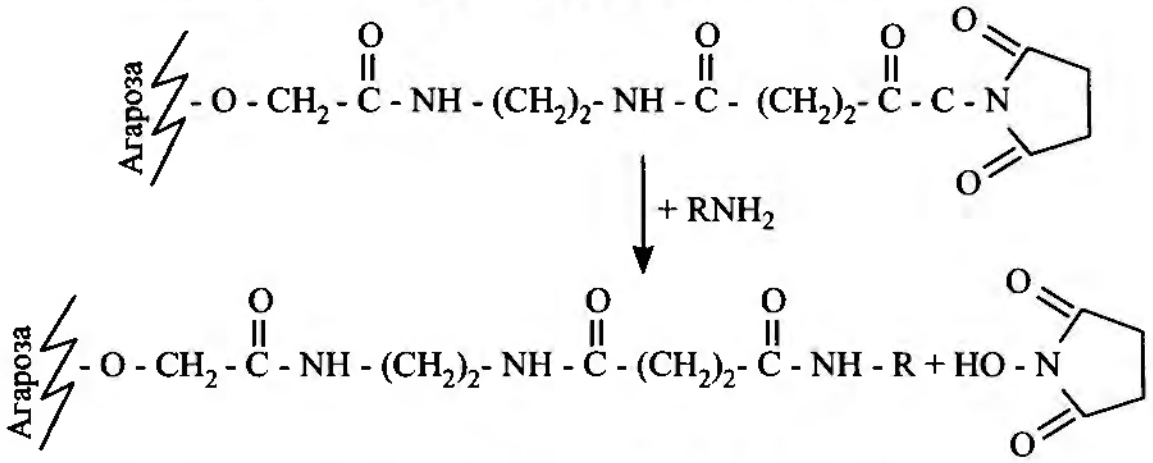
а) Активация сефарозы с помощью CNBr для последующего связывания аминогрупп белка



При высоких значениях pH CNBr реагирует с гидроксильными группами сефарозы с образованием цианата, которые затем реагируют с аминогруппами белка, образуя ковалентные связи.

б) Иммобилизация лиганда с помощью эфира *N*-гидроксисукцинимида

i) Affi-Gel 10 (для связывания основных белков)



ii) Affi-Gel 15 (для связывания кислых белков)

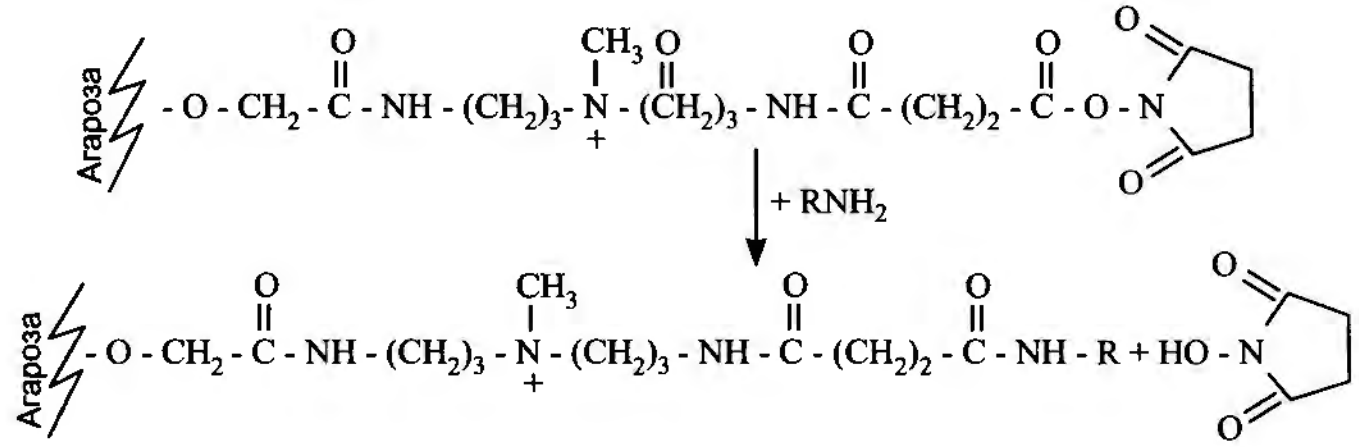


Рис. 7.6. Связывание лигандов с носителями для аффинной хроматографии

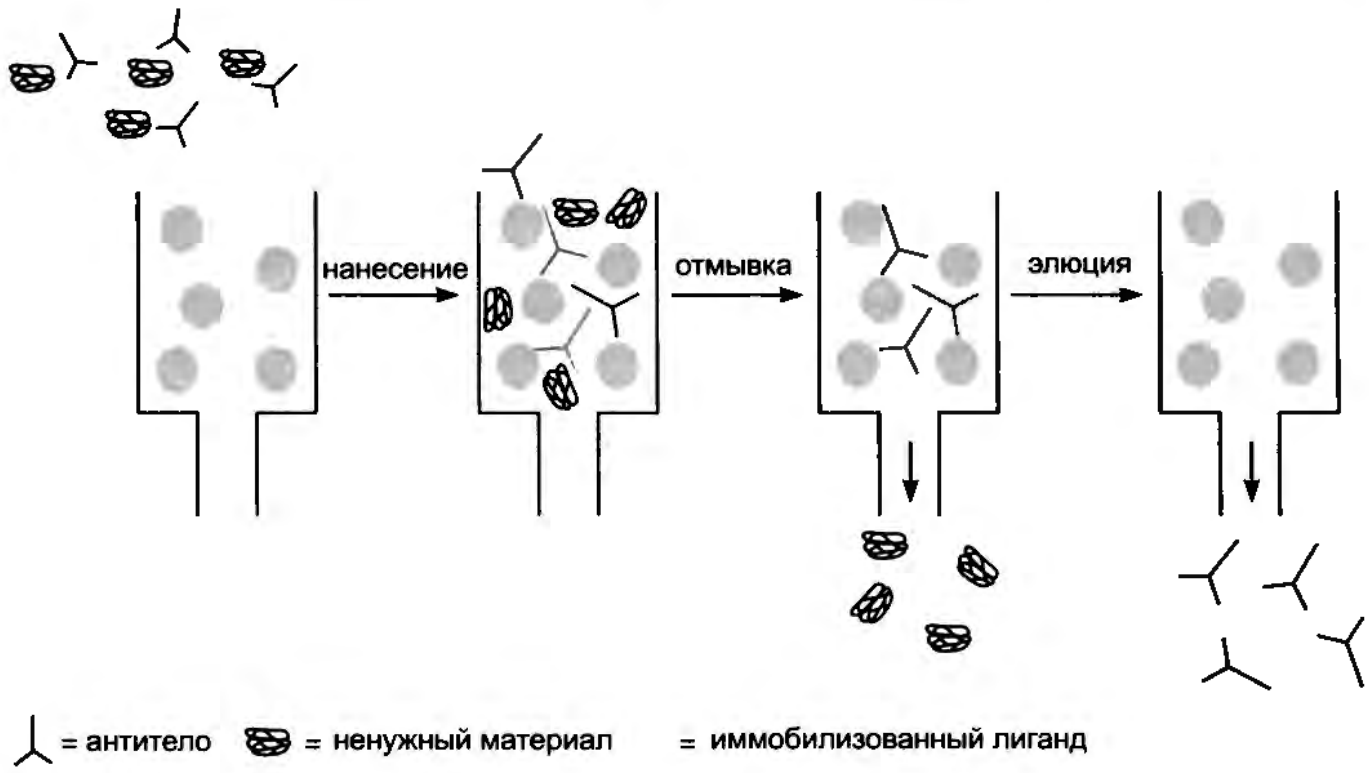


Рис. 7.7. Схема очистки антител методом аффинной хроматографии

готовых иммобилизованных лигандов, но можно и в лаборатории осуществить связывание лиганда с активированным носителем через первичные аминогруппы, карбоксилы или тиогруппы (см. примеры на рис. 7.6). При контакте раствора антител с иммобилизованным лигандом происходит связывание антител, т. е. они становятся также иммобилизованными (рис. 7.7). Несвязавшийся материал удаляется промывкой. Для элюирования антител необходимо ослабить специфическое взаимодействие антитело–лиганд, но сам лиганд оставить связанным с носителем. С целью диссоциации специфических связей между антителами и их лигандами обычно применяют условия, нарушающие электростатические взаимодействия и(или) гидрофобные связи (за счет вандерваальсовых сил) (табл. 7.6).

Таблица 7.6. **Условия элюирования антител с аффинной колонки**

Условия элюирования	Механизм действия
Глицин-HCl, pH 2,2–2,8 1М пропионовая кислота 0,005 М диэтиламин, pH 11,5 1 М аммиак, pH 11,0	Изменение конформации и нарушение электростатических взаимодействий
2–8 М мочевина 5–6 М гуанидин гидрохлорид	Сильный денатурирующий агент
3,5 М тиоцианат натрия 4 М тиоцианат калия 2–5 М $MgCl_2$, KI, NaI	Хаотропный агент
50%-й этиленгликоль, pH 11,5 10%-й (об./об.) диоксан в кислой среде	Нарушение гидрофобных взаимодействий

Лектины — это гликопротеины неиммунной природы, которые выделяют из растений или животных. Они связывают специфические углеводы, такие как галактоза или фукоза. Например, маннансвязывающий белок — это лектин из сыворотки млекопитающих, который связывает маннозу и N-ацетилглюкозамин. Если этот лектин иммобилизовать на инертном носителе, то такую систему можно использовать для очистки мышиного IgM, содержащего 12–16% углевода, в состав которого входит манноза. Джакалин — это галактозосвязывающий лектин, который можно применять для очистки человеческого IgA1.

Аффинная хроматография с иммобилизованными антителами очень широко применяется для очистки антигенов.

7.3.5 Фрагментация и диссоциация иммуноглобулинов

Для некоторых целей требуется иметь не целые молекулы антител, а только их фрагменты (разд. 7.1.2). Например, удаление Fc-фрагмента

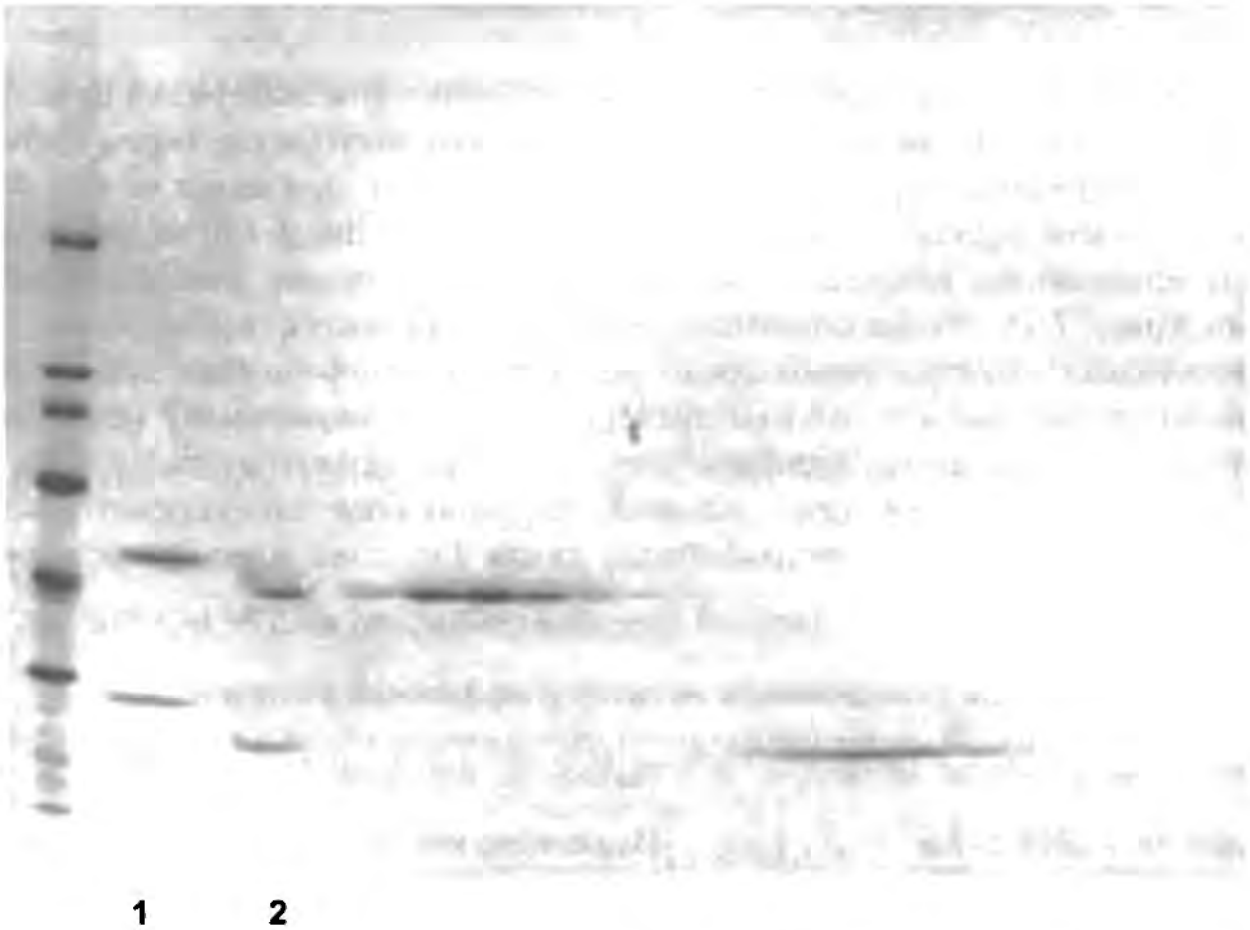


Рис. 7.8. Электрофоретическое разделение тяжелых и легких цепей IgG (SDS–ПААГ). IgG восстанавливали и алкилировали, а образующиеся легкие и тяжелые цепи разделяли методом гель-фильтрации в присутствии пропионовой кислоты. Фракции анализировали методом SDS–ПААГ в невосстанавливающих условиях. Дорожки 1 и 2: восстановленный и алкилированный IgG до проведения гель-фильтрации в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях соответственно. Обратите внимание на кажущееся увеличение размера цепи (дорожка 1) в условиях, когда дисульфидные связи внутри цепей восстановлены. Слева нанесены маркеры для определения молекулярной массы фрагментов

антитела предотвращает связывание антител с Fc-рецепторами на лейкоцитах и других клетках. Это бывает необходимо в тех случаях, когда хотят проанализировать антигены поверхности клетки, распознаваемые антителами, например, методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Для приготовления фрагментов антител обычно используют протеолитические ферменты, расщепляющие пептидные связи. Существует несколько ферментов, расщепляющих тяжелые цепи на определенные фрагменты. Чаще всего фрагменты получают расщеплением папаином, пепсином и плазмином; участки расщепления IgG этими ферментами и образующиеся фрагменты представлены на рис. 7.1. Коммерческие препараты данных ферментов существуют в виде растворов или в виде ковалентных комплексов с сефарозой (в качестве инертного носителя), что облегчает удаление фермента после завершения расщепления (сефарозу со связанным на ней ферментом удаляют просто центрифугированием). Кроме того, антитела можно разделить на цепи. Тяжелые и легкие цепи соединены между собой дисульфидными связями, которые легко разрушаются в присутствии восстановителей, таких как дитиотрейтол; важно соблюдать условия, при которых не затрагиваются дисульфидные связи внутри самих цепей. Чтобы предотвратить образование новых дисульфидных связей, после проведения реакции добавляют алкилирующие агенты, такие как иодацетамид. Однако тяжелые и легкие цепи связаны между собой еще и нековалентными связями, для разрушения которых применяют, например, пропионовую кислоту. Цепи можно далее разделить в соответствии с их молекулярными массами методом гель-фильтрации (рис. 7.8). Авидность изолированных цепей иммуно-глобулинов обычно ниже, чем у интактных молекул или фрагментов Fab и $F(ab')_2$.

7.4 ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ

Важным свойством многих антител является их способность осаждать антигены из раствора. Антитела могут быть двухвалентными (IgG) или поливалентными (IgM), а если антиген также поливалентен, то в результате взаимодействия антигенов и антител образуются крупные надмолекулярные структуры, которые не могут находиться в растворенном состоянии и выпадают в осадок. Образование нерастворимых комплексов антигенов и антител очень сильно зависит от концентраций антигенов и антител и происходит лишь в узком диапазоне концентраций, называемом зоной эквивалентности. В этом диапазоне концентраций условия таковы, что образуются достаточно крупные комплексы, не способные удерживаться в растворе. Вне указанного диапазона концентраций создаются условия избытка антител или антигенов, при которых образуются небольшие растворимые комплексы (рис. 7.9). Следует подчеркнуть, что некоторые моноклональные антитела, узнающие лишь один эпитоп антигена (т. е. моновалентный антиген), никогда не выпадают в осадок, поскольку не могут образовывать крупных комплексов.

Рис. 7.9. Схема образования иммунных комплексов при разных соотношениях концентраций антигенов и антител. Иммунопреципитация имеет место лишь в диапазоне эквивалентности в результате образования крупных нерастворимых комплексов

Принцип иммунопреципитации можно использовать как в растворе, так и на агаризованной среде.

7.4.1 Иммунопреципитация в агаре и агарозе

Агар — это высокомолекулярный полисахарид, образующийся в морских водорослях. Агароза — очищенный линейный галактановый гидроколлоид, производимый из агара. Оба вещества растворяются в воде при нагревании, а при последующем охлаждении образуют гель с большим размером пор, через которые могут диффундировать многие белки, включая и антитела. Если при миграции в геле антитело встречает антиген, то в зоне эквивалентности образуется нерастворимый осадок. Этот осадок обычно виден невооруженным глазом как непрозрачная линия (линия преципитации), а использование таких красителей, как кумасси бриллиантовый синий, позволяет увидеть и более слабые линии преципитации. Нерастворимые в физиологических буферах белковые антигены (например, белки мембран или цитоскелета) можно солюбилизировать в неионных детергентах и анализировать в гелях в присутствии детергента, не нарушая образования линии преципитации.

Иммунопреципитацию в агаре обычно осуществляют с помощью геля толщиной 2–3 мм, помещенного на стекло (например, предметное стекло микроскопа: теплый раствор агара просто наносят на стекло и дают ему остыть). Затем в геле проделывают лунки, например с помощью пипетки. В некоторых методах антитела и/или антигены мигрируют в геле просто за счет диффузии. В методах **двойной диффузии** одни лунки в агаре заполняют антителами, а другие — антигенами (рис. 7.10). Оба раствора диффундируют в агаре, создавая при этом градиент концентрации. В области эквивалентности концентраций антител и антигенов возникает линия преципитации. Этот метод можно использовать для определения (структурного) сходства или различия между антигенами (рис. 7.11).

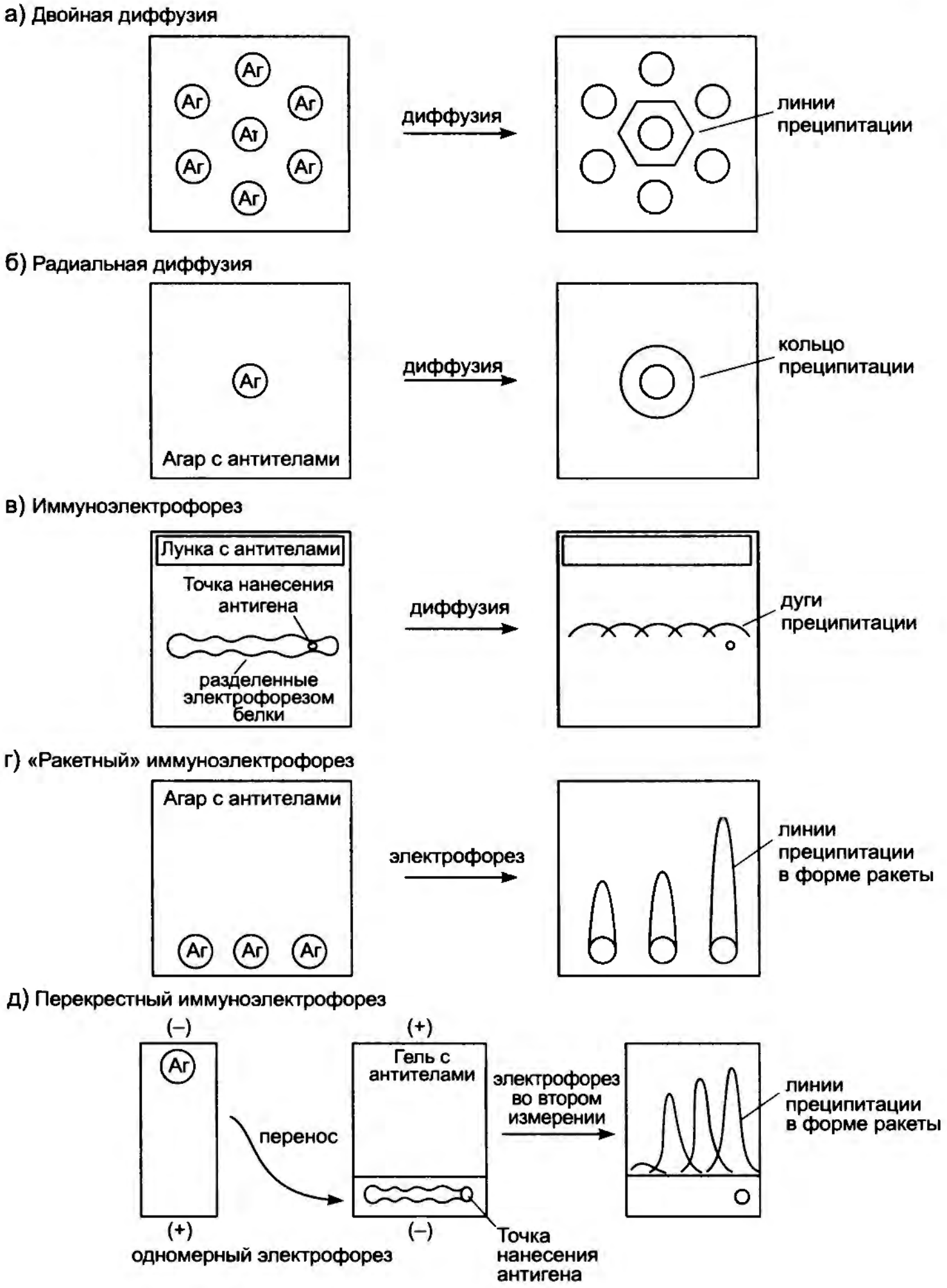


Рис. 7.10. Метод иммунопреципитации в агаре (см. детали в тексте). Ат — антитело, Аг — антиген

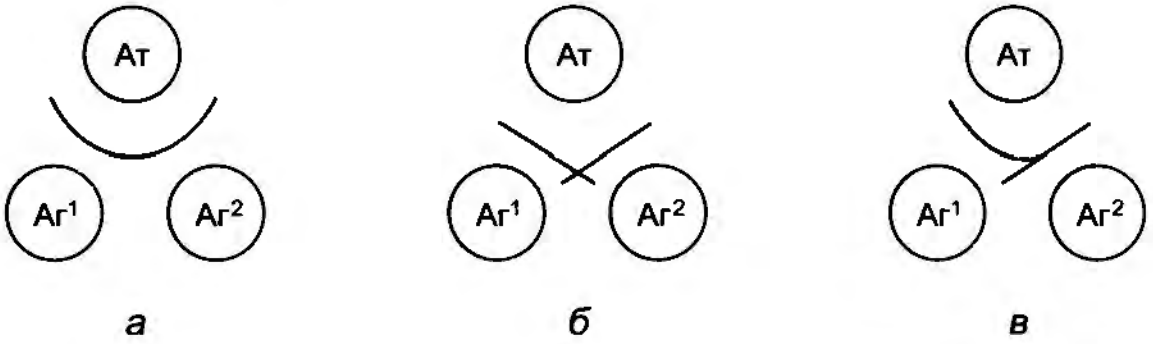


Рис. 7.11. Интерпретация линий преципитации в методе двойной иммунодиффузии. Слияние линий преципитации (*а*) указывает на идентичность иммунохимических свойств антигенов (Аг) 1 и 2, в то время как их пересечение (*б*) свидетельствует о различии антигенов. Частичное слияние (образование шпоры, *в*) указывает на частичную идентичность, т. е. означает, что антиген 2 имеет некоторые детерминанты, которых не имеет антиген 1, но все детерминанты антигена 1, узнаваемые данными антителами (Ат), имеются также на антигене 2

В методе **простой радиальной иммунодиффузии** антиген помещают в лунки в агаре, содержащем фиксированную концентрацию антител (рис. 7.10). При достижении эквивалентности концентраций вокруг лунки образуется кольцо преципитации. Диаметр этого кольца зависит от концентрации антигена. При этом можно выявить две закономерности:

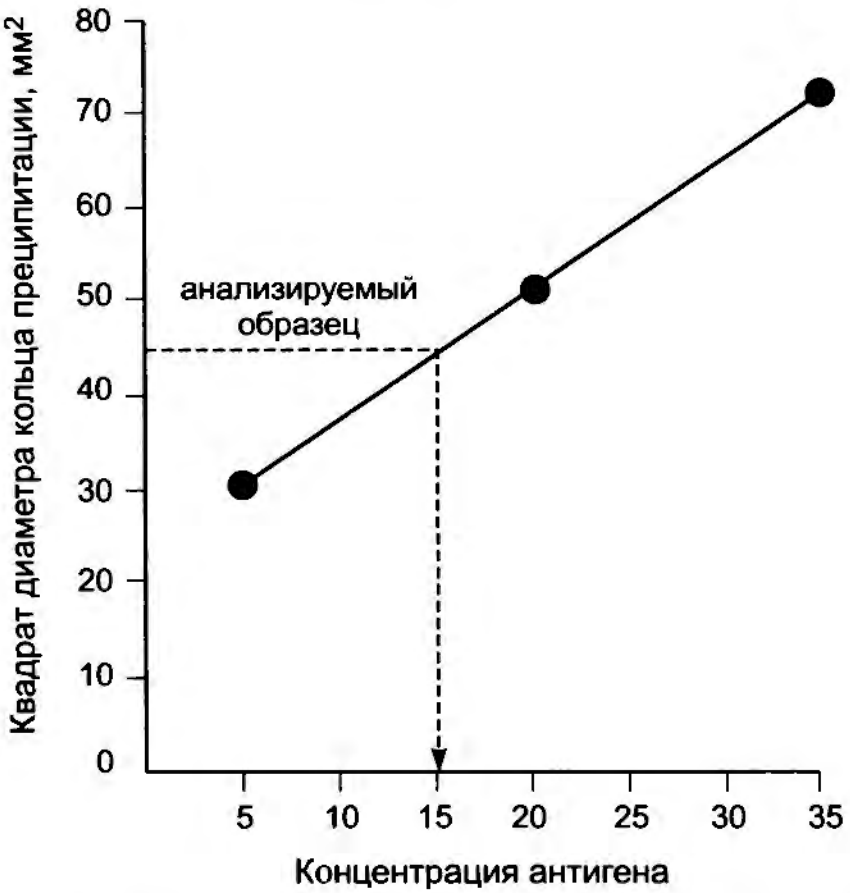


Рис. 7.12. Определение концентрации антигена в образце методом простой радиальной иммунодиффузии. Градуировочный график построен на основании квадратов диаметров линий преципитации, образованных стандартными образцами с известной концентрацией антигена. Концентрацию антигена в анализируемом образце можно определить по графику, зная квадрат диаметра образованного им кольца преципитации

1) квадрат диаметра кольца пропорционален концентрации антигена (метод Манчини, рис. 7.12); 2) диаметр кольца пропорционален десятичному логарифму концентрации антигена (метод Фахи–МакКелви). Эти методы удобны для определения концентрации таких антигенов, как сывороточные белки. Например, если агар содержит специфические антитела против человеческого IgG, а в лунки в агаре помещают анализируемые вещества, содержащие неизвестное количество человеческого IgG (например, образцы сыворотки) вместе со стандартными образцами с известной концентрацией человеческого IgG, вокруг лунок в области эквивалентности образуются линии преципитации. Измеряя диаметр кольца вокруг стандартного вещества с известной концентрацией IgG, можно построить градуировочный график в координатах «диаметр кольца преципитации в квадрате — концентрация IgG». Измерив диаметр кольца преципитации анализируемого вещества, по градуировочному графику можно определить концентрацию IgG в образце (см. рис. 7.12).

В методе **иммуноэлектрофореза** смесь белков, содержащую антиген, сначала разделяют в агаре при помощи электрофореза. Затем в лунки параллельно линии движения белков в геле (рис. 7.10) наносят антитела и дают им диффундировать внутрь геля. В зонах эквивалентности концентраций антител и антигенов образуются линии преципитации. Недостатком метода является не очень хорошее разделение смесей антигенов при электрофорезе в агаре, однако метод можно использовать для определения осаждающихся антител. В клинических условиях таким способом определяют аномальные концентрации антигенов, а также присутствие аномальных белков в сыворотке, концентрированной моче или спинальной жидкости пациентов по сравнению с контрольными образцами, которые анализируют одновременно с тестируемыми образцами.

Вариант простой радиальной иммунодиффузии реализуется при **ракетном иммуноэлектрофорезе** — это электрофорез антигена в геле, содержащем антитела (рис. 7.10). В зонах эквивалентности образуются линии преципитации в форме ракет, причем площадь под линией пропорциональна концентрации антигена. Этот метод можно использовать для определения концентрации антигена в неизвестном образце (например, концентрацию белка в сыворотке) по градуировочному графику, как в методе радиальной иммунодиффузии, или для анализа иммунохимических отношений между различными образцами (с этой целью образцы наносят в соседние лунки; см. рис. 7.11 для интерпретации линий преципитации).

В методе **перекрестного иммуноэлектрофореза** белки предварительно разделяют в агаре с помощью электрофореза, а затем подвергают их электрофорезу в содержащем антитела геле под прямым углом к направлению первого электрофореза (рис. 7.10). Метод можно использовать для анализа сывороточных белков.

Чувствительность методов, основанных на образовании линий преципитации в агаре, очень сильно зависит от природы антител и антигенов.

7.4.2 Иммунопреципитация в растворе

Антитела можно использовать для специфического осаждения антигенов из смеси белков в растворе, например из клеточного лизата. Если образующийся иммунный комплекс нерастворим, его можно осадить полностью путем центрифугирования и далее проанализировать. Растворимые комплексы антигенов и антител можно выделить путем осаждения с помощью иммуноглобулинсвязывающих белков, таких как белки A и G, антииммуноглобулиновых антител, а также этих же реагентов, ковалентно связанных с нерастворимым носителем (например, агарозой; см. разд. 7.3.4). Такой подход лежит в основе классического радиоиммуноанализа (РИА; разд. 7.7.1). Метод также позволяет выделять неизвестный антиген из смеси белков. Для выполнения данной задачи может понадобиться предварительно пометить смесь белков, например белковый лизат, с помощью ^{125}I. После этого иммунопреципитат разделяют в геле в присутствии SDS (разд. 10.3.1) и анализируют методом авторадиографии (разд. 14.2.3). Можно построить эксперимент иначе: не вводя метки, разделить иммунопреципитат с помощью электрофореза, а затем осуществить иммуноблоттинг с антителами известной специфичности (разд. 7.6), что позволит идентифицировать осажденные белки. Для получения информации об антигенах клеточной поверхности иммунопреципитацию обычно осуществляют с интактными, меченными радиоактивной меткой клетками или клеточными мембранами (рис. 7.13).

ПРИМЕР 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛА МЕТОДОМ ПРОСТОЙ ДИФФУЗИИ**

Вопрос При градуировке получены следующие значения диаметра кольца преципитации при трех различных концентрациях антигена:

Концентрация, мг/см^3	Диаметр кольца, мм	Диаметр кольца в квадрате, мм^2
10	4	16
60	7	49
100	8,7	76

Диаметр кольца преципитации для образца с неизвестной концентрацией антигена составил 6 мм. Какова концентрация антигена в этом образце?

Ответ Следует построить график, аналогичный тому, что показан на рис. 7.12. График зависимости квадрата диаметра кольца преципитации (по оси y) от концентрации антигена (по оси x) представляет собой прямую. Зная, что диаметр кольца преципитации для неизвестного образца составляет 6 мм (в квадрате 36 мм^2), по градуировочному графику определяем неизвестную концентрацию антигена. Она равна 40 мкг/см^3.

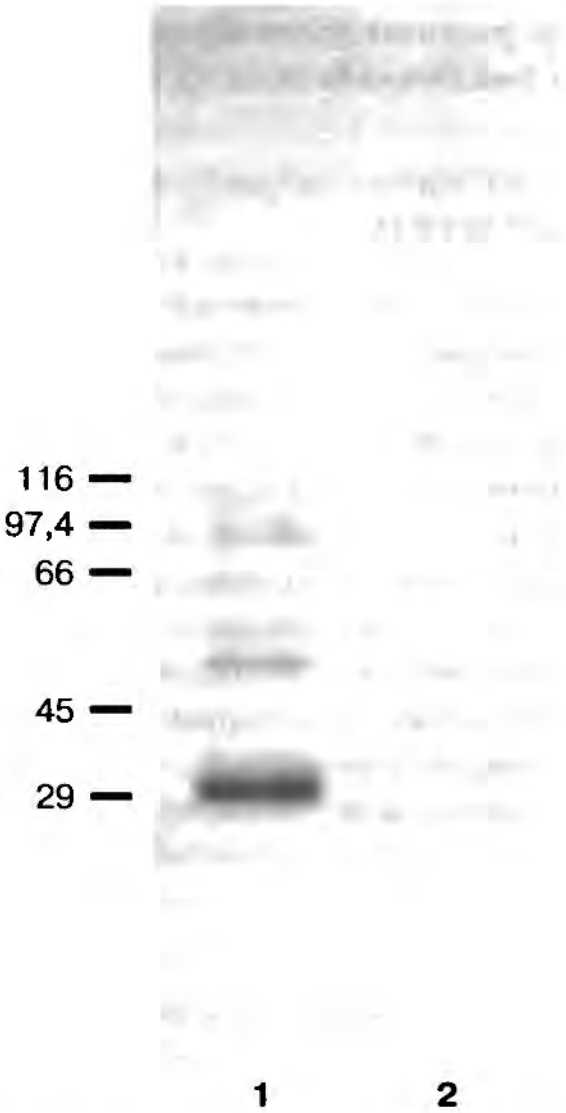


Рис. 7.13. Авторадиография иммунопреципитата моноклональных антител против Rh D с мембранами меченных ^{125}I Rh D-положительных и Rh D-отрицательных эритроцитов после электрофоретического разделения в SDS–ПААГ. Поверхность эритроцитов, положительных и отрицательных по антигену группы крови Rh D, метили с помощью ^{125}I. Клетки разрушали гипотоническим шоком, а мембраны инкубировали с моноклональными анти-Rh D антителами. После отмывки несвязанных антител мембраны растворяли, а комплексы антигенов с антителами выделяли на сефарозе с иммобилизованным белком А. Затем комплексы антиген–антитело разделяли с помощью электрофореза и анализировали методом авторадиографии. Молекулярная масса основного белка, осажденного из мембран Rh D-положительных эритроцитов, составляет ~ 31 000 (дорожка 1), что соответствует полипептиду Rh D. Из мембран Rh D-отрицательных эритроцитов с помощью иммунопреципитации никакого белка выделено не было (дорожка 2). Слева показано положение маркеров молекулярных масс белков ($M_r \cdot 10^{-3}$)

Хотя антитела можно использовать для анализа отдельных белков из смеси, разделенной с помощью электрофореза с последующим иммуноблоттингом (разд. 7.6), преимуществом иммунопреципитации в растворе является то, что антитела реагируют с нативным, а не частично денатурированным антигеном, как при иммуноблоттинге. Некоторые антигены после электрофореза и иммуноблоттинга теряют свои иммунные свойства и даже способность растворяться (особенно это касается антигенов клеточной поверхности). Это происходит в тех случаях, ког-

да структура эпитопов зависит от конформационных изменений или возникает вследствии взаимодействия нескольких белковых субъединиц/компонентов.

7.5 МЕЧЕНИЕ АНТИТЕЛ

Высокая специфичность антител делает их мощным аналитическим инструментом. В отличие от иммунопреципитации в агаре (разд. 7.4), в результате которой образуются комплексы антиген–антитело, видные невооруженным глазом, в большинстве других иммунохимических методов анализа связывание антител с антигенами можно наблюдать только с помощью мечения антител (иногда антигенов) или, что чаще, с помощью меченых антител против иммуноглобулинов (см. разд. 7.5.1); при этом метку можно детектировать либо качественно, либо количественно. Антитела метят радиоактивными изотопами (радиоиммуноанализ), связывают с ферментами, в результате реакции которых образуются окрашенные продукты (твердофазный иммуноферментный анализ, ELISA), или вводят в них флуорофоры, излучающие свет (иммуногистохимический анализ; см. табл. 7.7). Связывание немеченых антител с антигенами при этом не де-

Таблица 7.7. **Часто используемые метки для иммунохимического анализа**

Метка	Примеры	Основное применение
Флуорофоры	Флуоресцеин	Иммуногисто/цитохимия; проточная цитофлуориметрия; флуоресцентный анализ
	Родамин	Иммуногисто/цитохимия; проточная цитофлуориметрия
	Фикоэритрин	Проточная цитофлуорометрия
	Техасский красный	Проточная цитофлуориметрия
	7-Амино-4-метилкумарин-3-ацетат (AMCA)	Проточная цитофлуориметрия
	Производные BODIPY[а]	Проточная цитофлуориметрия
	Cascade Blue[б]	Проточная цитофлуориметрия
Ферменты	Щелочная фосфатаза	Иммуногистохимия; ФИА; иммуноблоттинг
	β-Галактозидаза	Там же
	Пероксидаза хрена	Там же; иммуноэлектронная микроскопия
	Глюкозооксидаза	Иммуногистохимия
	Уреаза ФИА	
Радиоизотопы	^{125}I	Конкурентный и неконкурентный РИА
Электронно-плотные вещества	Золото	Иммуноэлектронная микроскопия
	Ферритин	Там же

[а] BODIPY — 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен.

[б] Cascade Blue — торговая марка Molecular Probes Inc.

тектируется. Антитела с флуоресцентными или ферментативными метками называют **конъюгатами**.

7.5.1 Прямые и непрямые иммунохимические методы

В простом, или прямом, методе иммуноанализа с меткой связывают антитела против анализируемого антигена (так называемые первичные антитела). В более распространенном непрямом варианте иммуноанализа связывание немеченых первичных антител с антигеном детектируют с помощью меченых антител против иммуноглобулинов (или реже — с помощью меченого бактериального иммуноглобулинсвязывающего белка, такого как белок А или белок G). Вторичные антитела обычно получают против иммуноглобулина из того вида животного, в котором получали первичные антитела; они также могут быть специфичными к классу или подклассу иммуноглобулина. Схема проведения прямого и непрямого анализа представлена на рис. 7.14. Непрямые методы с использованием меченых антииммуноглобулиновых антител имеют некоторые преимущества по сравнению с прямыми методами: они более чувствительны, поскольку с каждым немеченым первичным антителом может связываться несколько меченых молекул, что усиливает сигнал; нет необходимости метить каждый тип первичных антител, поскольку, например, меченые антитела кролика против IgG будут распознавать все мышиные моноклональные IgG антитела; кроме того, отсутствует опасность потери реактивности первичных анти-

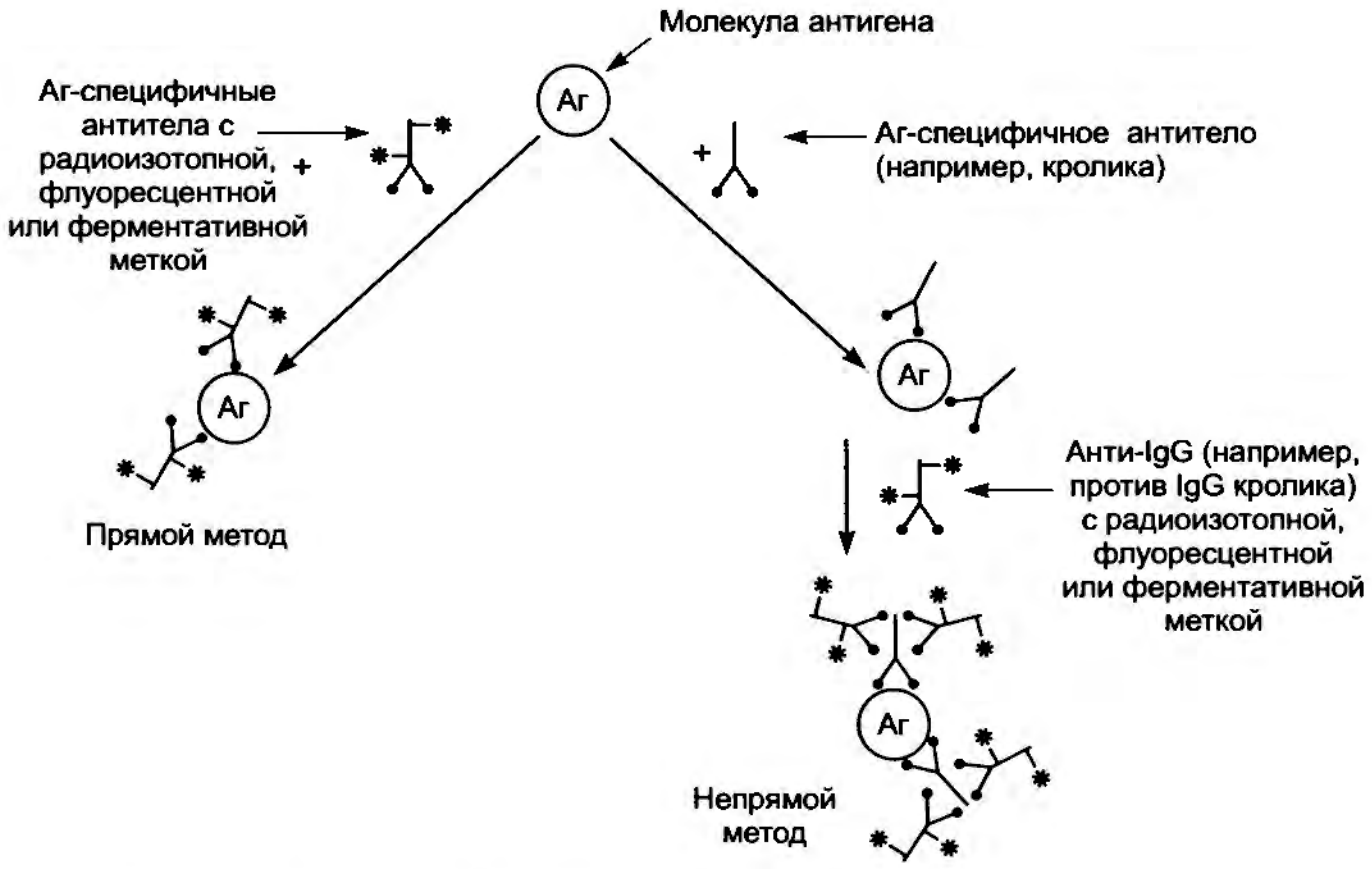


Рис. 7.14. Схема проведения прямого и непрямого иммунохимического анализа. Аг — антиген

тел в результате прямого мечения. Однако в некоторых случаях применяются прямые методы анализа (см. разд. 7.8.3 и 7.8.5). Полупрямые методы используют преимущества высокоаффинного специфического взаимодействия биотина с авидином/стрептавидином (см. разд. 7.5.5) и основаны на взаимодействии биотинилированных первичных антител с меченым авидином/стрептавидином.

7.5.2 Введение радиоактивной метки

Мечение радиоактивным иодом

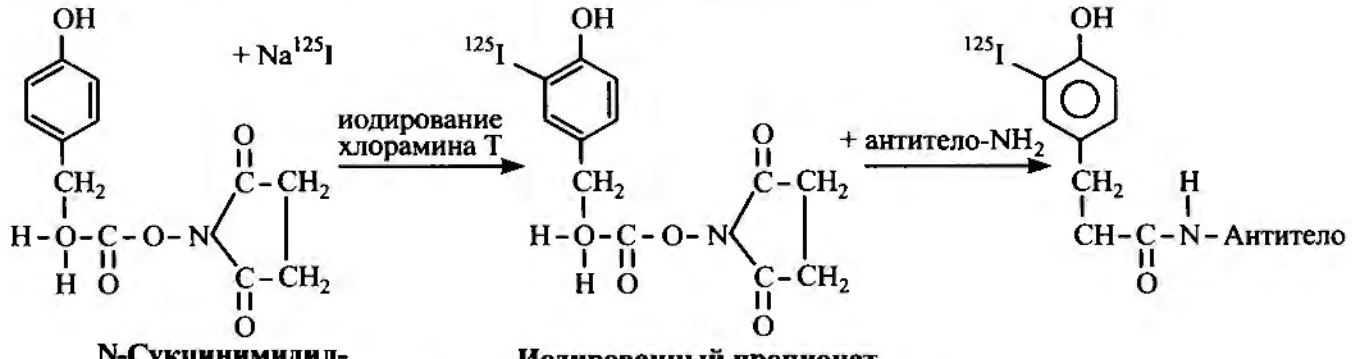
Для мечения антител чаще всего применяют радиоизотоп ^{125}I. Этот изотоп обычно доступен в форме $Na^{125}I$; он сравнительно недорогой и обладает высокой удельной радиоактивностью. При распаде этого изотопа испускаются γ-лучи, которые легко регистрировать с помощью γ-детектора и авторадиографии.

Однако при работе с радиоактивными изотопами следует придерживаться соответствующих требований техники безопасности, чтобы не допустить воздействия радиации на персонал лаборатории (у человека особенно чувствительна к этому изотопу щитовидная железа). При прямом ковалентном связывании белков с ^{125}I в окислительных условиях образуется катион I^+, который самопроизвольно вступает в электрофильную реакцию с остатками тирозина, а также (в меньшей степени) с остатками триптофана и гистидина. Основным продуктом этой реакции является иодтирозин, однако также может образовываться диодпроизводное (рис. 7.15). Концентрацию

а) Структура меченого тирозина

Однозамещенный остаток тирозина **Двузамещенный остаток тирозина**

б) Мечение реагента Болтона–Хантера и его конъюгация с антителами



N-Сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат **Иодированный пропионат**

Рис. 7.15. Прямое и непрямое мечение антител радиоизотопом ^{125}I

реагентов нужно подбирать с таким расчетом, чтобы в каждой молекуле антитела метка включалась лишь в один или два остатка тирозина, в противном случае может происходить потеря иммунореактивности и повреждение антител из-за высокого уровня радиации.

Существует несколько общепринятых методов введения радиоактивного иода, различающихся типом окислителя, необходимого для образования I^+. Поскольку сильный окислитель может ослабить иммунореактивность антител, следует искать компромисс между эффективным образованием I^+ и сохранением антигенсвязывающей способности антител.

Хлорамин Т (N-хлор-*п*-толуолсульфонамид) — окислитель ароматического ряда, часто используемый для высокоспецифичного иодирования антител и других белков. Реакция иодирования под действием этого вещества протекает очень быстро (45 с), но возможна денатурация антител и потеря антигенсвязывающей активности. Реакцию необходимо останавливать после определенной степени иодирования путем добавления восстановителя, такого как метабисульфит натрия, или избытка тирозина, превращающего весь иод в иодтирозин. По окончании реакции необходимо отделить меченые антитела от несвязанного иода. Это делают с помощью гель-фильтрации, либо — в случае мечения IgG-антител — для связывания иодтирозина можно применить сильный основной анионообменник. Альтернативный метод заключается в использовании шариков с иммобилизованным хлорамином Т; при этом реакцию можно остановить просто путем удаления твердого материала.

Другим более мягким окислителем для введения радиоактивного иода является иодоген (1,3,4,6-тетрахлор-3α,6α-дифенилгликольурил). Иодоген нерастворим в водных средах, поэтому его растворяют в бензоле или хлороформе (обычно в пластиковой пробирке), а затем выпаривают органический растворитель, так что иодоген образует слой на поверхности пробирки. Далее в этой пробирке осуществляют реакцию иодирования и останавливают ее путем удаления раствора из пробирки.

Введение иодной метки в антитела с помощью фермента лактопероксидазы протекает в очень мягких условиях с минимальным повреждением антител, однако получаемые меченые антитела не обладают высокой удельной радиоактивностью. Данную реакцию обычно используют только для иодирования компонентов клеточной поверхности, поскольку в этих условиях минимизирована диффузия реагирующих веществ через клеточную мембрану, что могло привести к мечению внутриклеточных компонентов.

Кроме того, антитела можно конъюгировать с низкомолекулярными производными фенола, в которые предварительно вводится радиоактивная метка. Обычно радиоактивный иод вводят в N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат (реагент Болтона–Хантера) с помощью хлорамина Т, а образующееся 5-[^{125}I]-фенольное производное вступает в реакцию конъюгации с аминогруппами антител (рис. 7.15). Преимуществом такого непрямого способа мечения антител является отсутствие риска их окислительного повреждения, однако, как и в случае прямого мечения, следует проводить конъюгацию лишь по одному или двум остаткам в молекуле антитела.

7.5.3 Введение флуоресцентной метки

Флуорофоры излучают свет (флуоресцируют) при ультрафиолетовом облучении. Количественную оценку флуоресценции антител с флуоресцентной меткой можно получить с помощью флуориметра. Однако наиболее интенсивное применение антитела с флуоресцентной меткой находят в иммуногисто/цитохимии; при этом связывание меченых антител с срезами тканей или клетками наблюдают с помощью флуоресцентных микроскопов (разд. 7.8.3). Меченые флуорофорами антитела чрезвычайно широко применяются в проточной цитометрии (разд. 7.8.5).

Создано множество флуорофоров с различными спектрами возбуждения и испускания, но в микроскопии чаще всего применяются флуоресцеин, излучающий зеленый свет, и тетраметилродамин — красный свет. Для конъюгации обычно используют флуоресцеин и тетраметилродаминизотиоцианаты, которые легко образуют ковалентную связь с первичными аминогруппами лизина в молекулах антител (рис. 7.16); кроме того, применяют иодацетамидные производные флуоресцеина и родамина, образующие связь через сульфгидрильные группы. Среди других флуорофоров для проточной цитометрии, которые связываются с аминогруппами или сульфгидрильными группами, можно назвать техасский красный (сульфородамин,

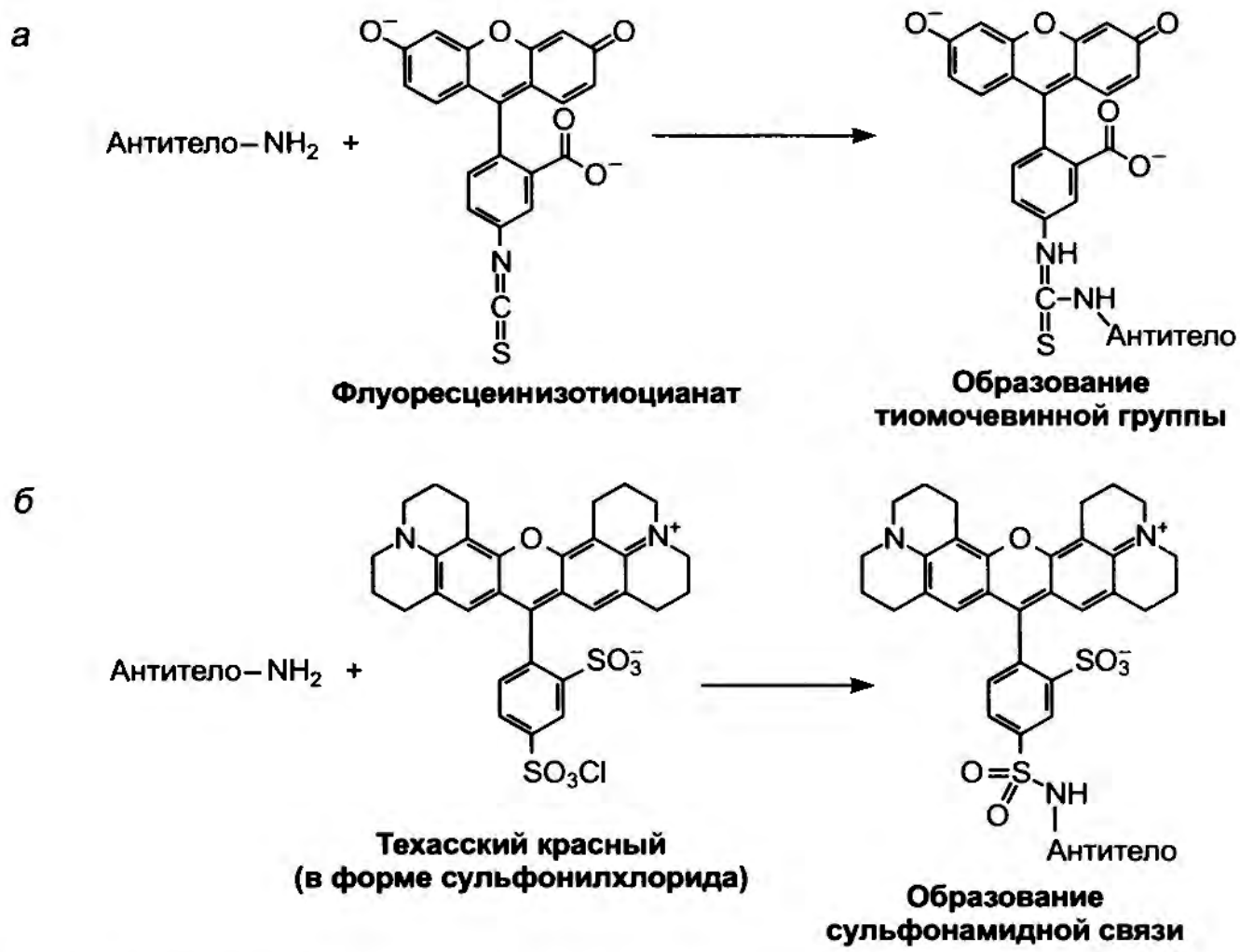


Рис. 7.16. Связывание флуоресцеинизотиоцианата (*а*) и техасского красного (сульфородамина (*б*) с аминогруппами антител

рис. 7.16), 7-амино-4-метилкумарин-3-ацетат (AMCA; излучает синий свет) и BODIPY (4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен).

Фикобилипротеины — это группа интенсивно флуоресцирующих белков из водорослей и цианобактерий, которые широко применяются в проточной цитометрии. К ним относятся B- и R-фикоэритрины (M_r 240 000), C-фикоцианин (M_r 72 000) и аллофикоцианин (M_r 110 000). Аминогруппы фикобилипротеинов можно связать с тиогруппами антител, осуществляя перекрестную сшивку с помощью химических гетеробифункциональных агентов (разд. 7.5.4).

7.5.4 Введение ферментативной метки

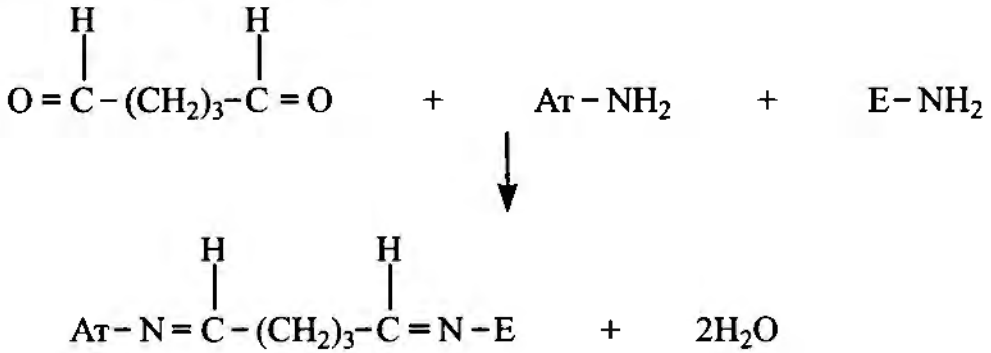
Антитела с ферментативной меткой широко применяются для проведения иммуноанализа (например, ELISA), иммуноблоттинга и иммуногисто/цитохимического анализа. В любом случае прямое или непрямое связывание (разд. 7.5.1) меченых антител с антигеном (который может находиться в срезе ткани, на мембране или в лунке планшета для микротитрования) наблюдают с помощью ферментативной реакции, в результате которой бесцветный субстрат превращается в окрашенный продукт. Для ферментативного иммуноанализа необходимо, чтобы образующийся продукт был растворимым, что позволяет проводить количественный анализ с помощью спектрофотометра. Для иммуноблоттинга и иммуногистохимического метода продукт должен быть нерастворимым, так как в противном случае нельзя определить локализацию комплекса антиген–антитело; при этом результат оценивают либо визуально (невооруженным глазом), либо в микроскоп. Ферментативная метка позволяет значительно усилить сигнал, поскольку каждая молекула фермента превращает множество молекул субстрата в окрашенный продукт. Свойства ферментов, которые наиболее часто используются в качестве метки, описаны в табл. 7.8. Поскольку ферменты — это белки, их связывание с антителами осуществляют путем перекрестных сшивок, используя специальные химические агенты. Существует два основных типа таких агентов: гомобифункциональные реагенты, которые взаимодействуют с одними и теми же функциональными группами в молекулах фермента и антитела, и гетеробифункциональные реагенты, взаимодействующие с различными химическими группами двух белков.

Глутаровый альдегид — простой гомобифункциональный агент, осуществляющий перекрестную сшивку белков через аминогруппы (например, лизина; рис. 7.17). Конъюгацию можно провести либо в одну стадию — при этом глутаровый альдегид добавляют к смеси фермента и белка (так поступают в случае пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы и β-галактозидазы), либо в две стадии (для конъюгации с пероксидазой хрена) — при этом глутаровый альдегид сначала реагирует с ферментом, а затем образующийся продукт реагирует с антителами. Существует целый ряд гетеробифункциональных агентов, которые обычно содержат разделенные спейсером группы, активные по отношению к аминогруппам и тиогруппам в белке. В результате действия таких агентов происходит сшивка между аминогруппами антител и сульфгидрильными группами ферментов. В качестве примера можно привести сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)

Таблица 7.8. **Свойства ферментов, которые используются для конъюгации с антителами**

Фермент	Источник	Структура	Катализируемая реакция
Пероксидаза	Корень хрена	Мономерный гликопротеин, M_r 40 000	H_2O_2 + окисляемый субстрат → окисленный продукт + $2H_2O$
Щелочная фосфатаза	Обычно кишечник теленка	Zn^{2+}-содержащий гликопротеин	$R\text{–}O\text{–}P + H_2O \xrightarrow[\text{спирт}]{} R\text{–}OH + P_i$ (моноэфир ортофосфорной кислоты → неорганический фосфат)
β-Галактозидаза	*E. coli*	Белок из 4 субъединиц, M_r 540 000	β-D-Галактозид + H_2O → галактоза + спирт
Глюкозооксидаза	*Aspergillus niger*	Флавинсодержащий гликопротеин	β-D-Глюкоза + O_2 → H_2O_2 + глюконовая кислота
Уреаза	Канавалия мечевидная	M_r 480 000	$(NH_2)_2CO + 3H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_4OH$

а) Глутаровый альдегид — гомобифункциональный агент, образующий перекрестные сшивки между аминогруппами



б) Сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) — гетеробифункциональный агент, образующий перекрестные сшивки между аминогруппами и сульфгидрильными группами

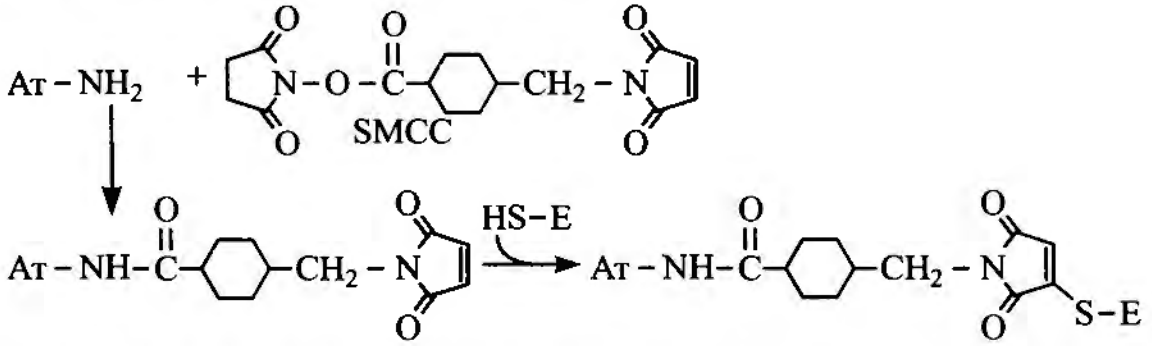


Рис. 7.17. Структура и способ действия реагентов, образующих перекрестные сшивки. Ат — антитело, Е — фермент

циклогексан-1-карбоксилат (SMCC; рис. 7.17). Еще один метод конъюгации основан на использовании периодата для создания активных альдегидных групп путем расщепления углеводной цепи ферментов, являющихся гликопротеинами. Затем эти группы реагируют с первичными аминогруппами в антителах с образованием оснований Шиффа, которые далее восстанавливают с образованием стабильных связей.

7.5.5 Биотинилирование антител

Высокоаффинное взаимодействие (константа сродства $>10^{15}$ M^{-1}) между биотином (витамином Н; M_r 244) и авидином (белок из яичного белка) или стрептавидином (белок из бактерии *Strepptomyces avidinii*) широко используется в иммунохимическом анализе. Биотин конъюгируют с антителами и используют в системе с авидином/стрептавидином с флуоресцентной, ферментативной или радиоактивной меткой (рис. 7.18). Реакция конъюгации антител с производными биотина (обычно используют N-гидроксисукцинимидобиотин или аналоги со спейсерным участком) проходит легко. Спейсер снижает пространственные затруднения при взаимодействии путем увеличения расстояния между антителом и биотином. Большинство производных биотина реагирует с первичными аминогруппами, но среди них есть вещества, которые

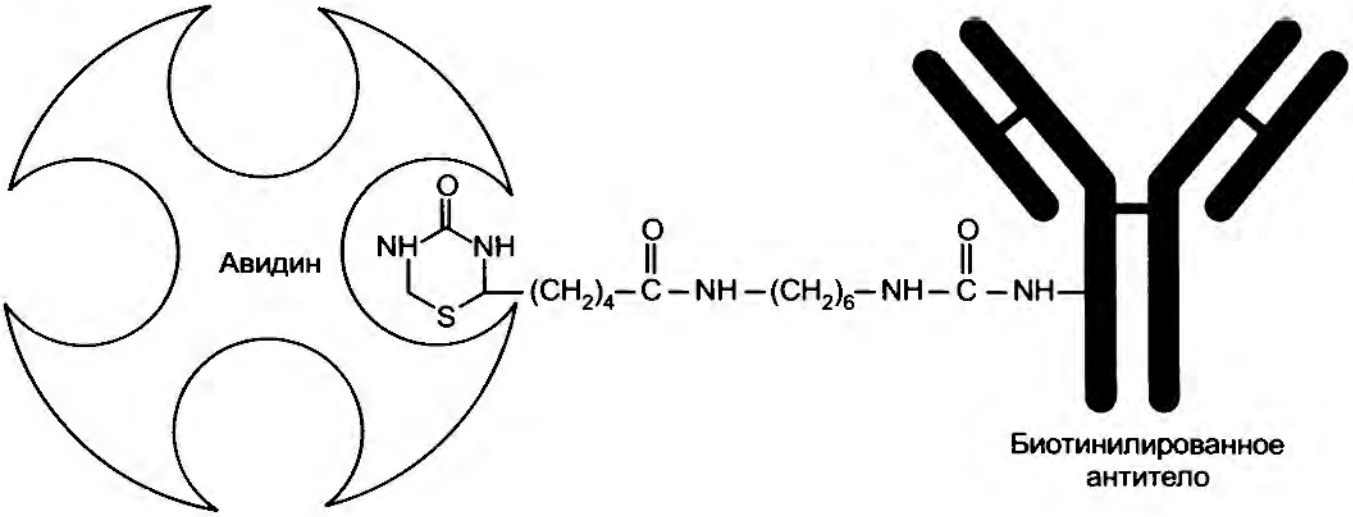


Рис. 7.18. Взаимодействие биотинилированных антител IgG с авидином. Связь очень прочная, причем каждая молекула авидина имеет четыре участка связывания биотина. В данном примере для конъюгации биотина с иммуноглобулином использовали N-гидроксисукцинимидный эфир биотинамидокапроновой кислоты

также взаимодействуют с тиогруппами или углеводными остатками иммуноглобулинов.

7.6 ИММУНОБЛОТТИНГ

Во многих случаях необходимо установить специфичность антител путем анализа их способности распознавать отдельные компоненты сложных смесей. Для идентификации таких компонентов используют также специфические антитела, что позволяет выявить возможную перекрестную реактивность с родственными молекулами. Для реализации этого подхода необходимо уметь разделять антигенные компоненты. Теоретически для этого применим любой биохимический метод, однако наилучшие результаты получают при электрофоретическом разделении в полиакриламидном геле (в частности, методом SDS–ПААГ-электрофореза и изоэлектрофокусирования, см. разд. 10.3.1 и 10.3.4). Чаще всего разделенные белки переносят из полиакриламидного геля на пористую мембрану и анализируют полученный «отпечаток» с помощью антител (антитела могут быть нанесены непосредственно на гель, однако плохая проницаемость полиакриламидных гелей делает такой подход длительным и малоэффективным). Затем образующиеся комплексы антиген–антитело детектируют либо с помощью меченых антииммуноглобулиновых реагентов, либо непосредственно путем использования меченных радиоактивной меткой (чаще всего ^{125}I) или ферментом антител (см. разд. 7.5). В результате «узнанные» антителами антигены выявляются в виде полос при авторадиографии или пятен, образующихся при обработке мембраны соответствующим субстратом. Сопоставление этих данных с гелями, окрашенными по белку, позволяет идентифицировать антигены (рис. 7.19). Этот подход, имеющий нечто общее с

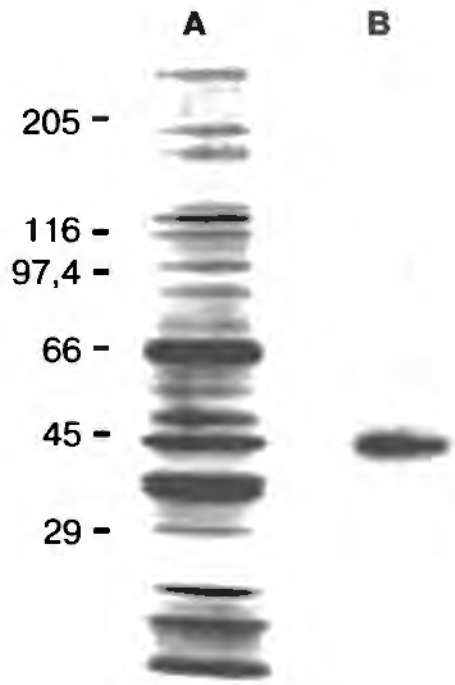


Рис. 7.19. Иммуноблоттинг демонстрирует, каким образом специфические антитела могут служить для идентификации антигенов в сложных смесях. На две дорожки полиакриламидного геля нанесли образец гомогената гладких мышц и провели электрофоретическое разделение в присутствии SDS. Дорожку А затем окрасили по белку для визуализации всех присутствующих в смеси компонентов. Белки со второй дорожки перенесли на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с моноклональными антителами против α-актина из гладких мышц, а затем обработали меченными ^{125}I антителами против IgG мыши. В результате авторадиографии выявлена единственная белковая полоса (дорожка В), соответствующая α-актину из гладких мышц. Слева показано относительное расположение маркеров молекулярной массы ($\times 10^{-3}$)

блот-гибридизацией по Саузерну и нозерн-блоттингом, получил название **иммуноблоттинга** или вестерн-блоттинга (см. также разд. 10.3.8).

В качестве пористой мембраны для иммуноблоттинга чаще всего служит нитроцеллюлоза, но иногда используют и другие материалы. Повысить чувствительность метода можно, используя наборы для усиления хемилюминесценции (ECL). В таких системах для детекции образования комплекса антиген–антитело применяют антииммуноглобулиновые антитела, конъюгированные с пероксидазой (ср. с ELISA, разд. 7.7.3). Пероксидаза при расщеплении пероксида водорода образует перкислоту, которая, в свою очередь, окисляет субстрат, что сопровождается выделением света, регистрируемым с помощью рентгеновской пленки (как в случае авторадиографии). Субстратом пероксидазы чаще всего служит люминол, а для увеличения квантового выхода в систему добавляют фенольные соединения. Разработаны и другие системы с использованием ECL, действие которых основано на реакции другого фермента — щелочной фосфатазы. Анализ с помощью регистрации хемилюминесценции (ECL)

более быстрое и более чувствительное по сравнению с прямым использованием ферментативной или радиоактивной метки. Существуют и другие системы усиления хемилюминесценции для иммуноблоттинга, содержащие различные ферменты, субстраты и усилители.

7.7 ИММУНОАНАЛИЗ

Многие иммунохимические методы, например простая радиальная иммунодиффузия и ракетный иммуноэлектрофорез, позволяют определять концентрацию анализируемого вещества в чистом растворе или в сложной смеси (разд. 7.4.1). Однако большие возможности иммунохимических методов для повышения чувствительности и специфичности анализа в разных химических и биологических системах привели к очень активной разработке этих методов. На сегодняшний день создано множество версий иммунохимического анализа, которые обозначают общим термином **иммуноанализ**, что подчеркивает возможность осуществления с их помощью количественного определения.

Усовершенствования методологии иммуноанализа связаны главным образом с необходимостью достижения еще большей специфичности и чувствительности. Иммуноанализ широко применяется для рутинной диагностики, прогнозирования и в других целях (например, для измерения уровня загрязнения окружающей среды пестицидами и токсичными побочными продуктами промышленных производств); созданы и продолжают создаваться высокопроизводительные, легко автоматизируемые, экономичные и точные методы иммуноанализа. Подробное описание всех вариантов иммуноанализа составило бы несколько томов, поэтому ниже мы остановимся на общих принципах и некоторых наиболее часто используемых возможностях данного аналитического подхода.

7.7.1 Конкурентный иммуноанализ

В **конкурентном иммуноанализе** антиген из анализируемого образца конкурирует с известным количеством меченого антигена за связывание антител, присутствующих в ограниченном количестве. При достижении равновесия в системе свободный антиген отделяют от связанного с антителами, а во фракции связанного антигена количество меченого антигена определяют по наличию β- или γ-излучения. Полученный результат обратно пропорционален концентрации антигена в исходном образце (см. рис. 7.20). Использование ряда разведений стандартного раствора с известным содержанием антигена позволяет построить зависимость доза–ответ (так называемую стандартную кривую), на основании которой можно определить неизвестную концентрацию антигена в образце. Самые первые методы иммуноанализа были именно такими, и для их проведения чаще всего пользовались радиоизотопами ^{3}H и ^{125}I. Эти методы обычно называют **радиоиммуноанализом** (РИА), хотя правильнее было бы называть их конкурентным радиоиммуноанализом, чтобы отличать от твердофазных методов анализа (разд. 7.7.3). Впервые РИА был применен для

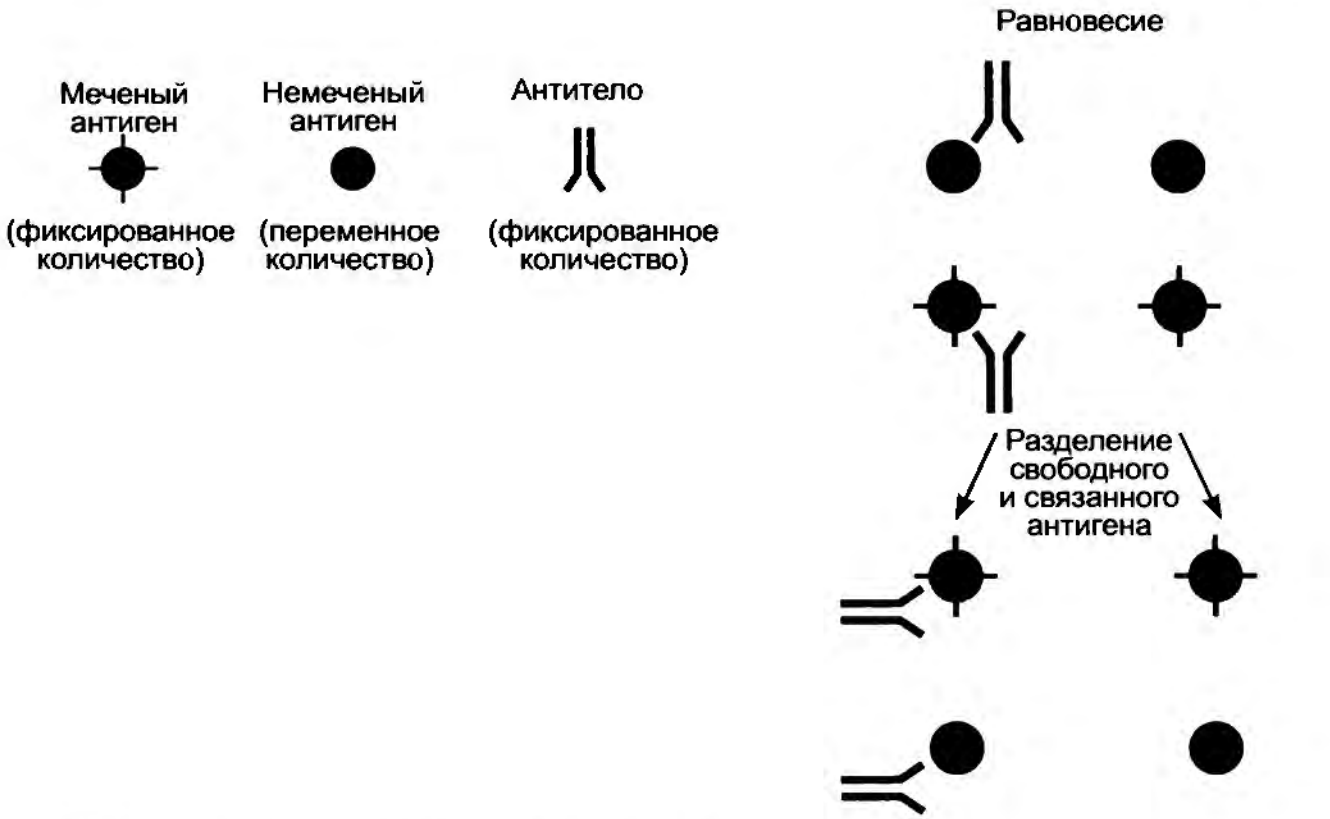


Рис. 7.20. Схема конкурентного иммуноанализа

определения инсулина; в это же время появились и другие варианты метода, основанные на связывании белков, а не антител, в частности метод определения витамина B_{12}. Чувствительность данных методов варьирует в широком диапазоне и зависит от целого ряда факторов, таких как природа используемой метки. Теоретически чувствительность РИА с применением ^{125}I может достигать 10^{-14} М, но на практике она обычно не превышает 10^{-12} М. При разработке методов РИА прежде всего строят кривую связывания антител с мечеными антигенами, что позволяет выбрать рабочий диапазон концентраций. Обычно конкурентный РИА осуществляют в условиях, при которых 50–70% меченого антигена связано с антителами. Для разделения свободного и связанного антигена существует несколько возможностей (см. табл. 7.9).

Методы РИА разработаны для весьма разных веществ — от небольших молекул (например, стероидов или пептидных гормонов в плазме или сыворотке человека или животного) до крупных белков (например, α_2-макроглобулина и иммуноглобулинов в сыворотке). Эти методы весьма точны и экономичны (для анализа требуется совсем небольшое количество антител), но их сложно автоматизировать, их реализация занимает довольно много времени, а кривая доза–ответ обычно покрывает лишь сравнительно узкий диапазон концентраций анализируемого вещества. Чувствительность методов РИА часто ниже, чем у других методов иммуноанализа. Кроме того, при проведении РИА необходимо правильно хранить и уничтожать радиоактивные вещества и постоянно следить за состоянием здоровья персонала, пользующегося данными методами. Подобные сложности в работе сокращают распространение метода.

Таблица 7.9. **Методы разделения свободных и связанных меченых лигандов в радиоиммуноанализе**

Метод	Физический процесс
Уголь	Поглощение свободной или связанной фракции
Флоризил	
Белок А из *S. aureus*	
Полиэтиленгликоль	Дробное осаждение связанной фракции
Этанол	
Сульфат аммония	
Вторичные антитела	Осаждение связанной фракции
растворимые вещества	
твердая фаза — целлюлоза	
— магнитные частицы	
Первичные антитела	Осаждение связанной фракции
твердая фаза — диски и пробирки с покрытием	
— целлюлоза	
— магнитные частицы	

Поскольку описываемые методы разработаны для лимитирующей концентрации антител, их иногда называют методами иммуноанализа с избытком реагента (антигена) (ср. иммунометрический анализ, разд. 7.7.2). Были разработаны варианты конкурентного иммуноанализа с нерадиоактивными метками, но этот подход оказался неудачным. При использовании ферментативной метки метод теряет чувствительность, а другие варианты метки делают анализ ненадежным, неточным и нечувствительным. Причина этого не всегда ясна, однако связывание антигена со сравнительно крупной молекулой фермента (по сравнению с небольшими атомами в РИА) может изменять способностт антител распознавать меченый и немеченый антиген. Подобные ограничения сокращают применение конкурентных методов иммуноанализа.

7.7.2 Иммунометрические методы анализа

Иммунометрический анализ отличается от конкурентного иммуноанализа по нескольким параметрам, хотя оба они дают похожую количественную информацию о концентрации антигена. В первых вариантах иммунометрического анализа фиксированное количество меченых антител брали для реакции с переменным количеством антигена. Несвязанные меченые антитела затем отмывали, а по оставшимся меченым антителам определяли содержание антигена (см. рис. 7.21). Данный подход сегодня используется редко, однако применение избытка меченых антител, т. е. иммуноанализ с избытком антител, а не с избытком меченых антигенов (иммуноанализ с избытком антигена, он же конкурентный иммуноанализ), имеет целый ряд преимуществ и лишь несколько недостатков (см. ниже).

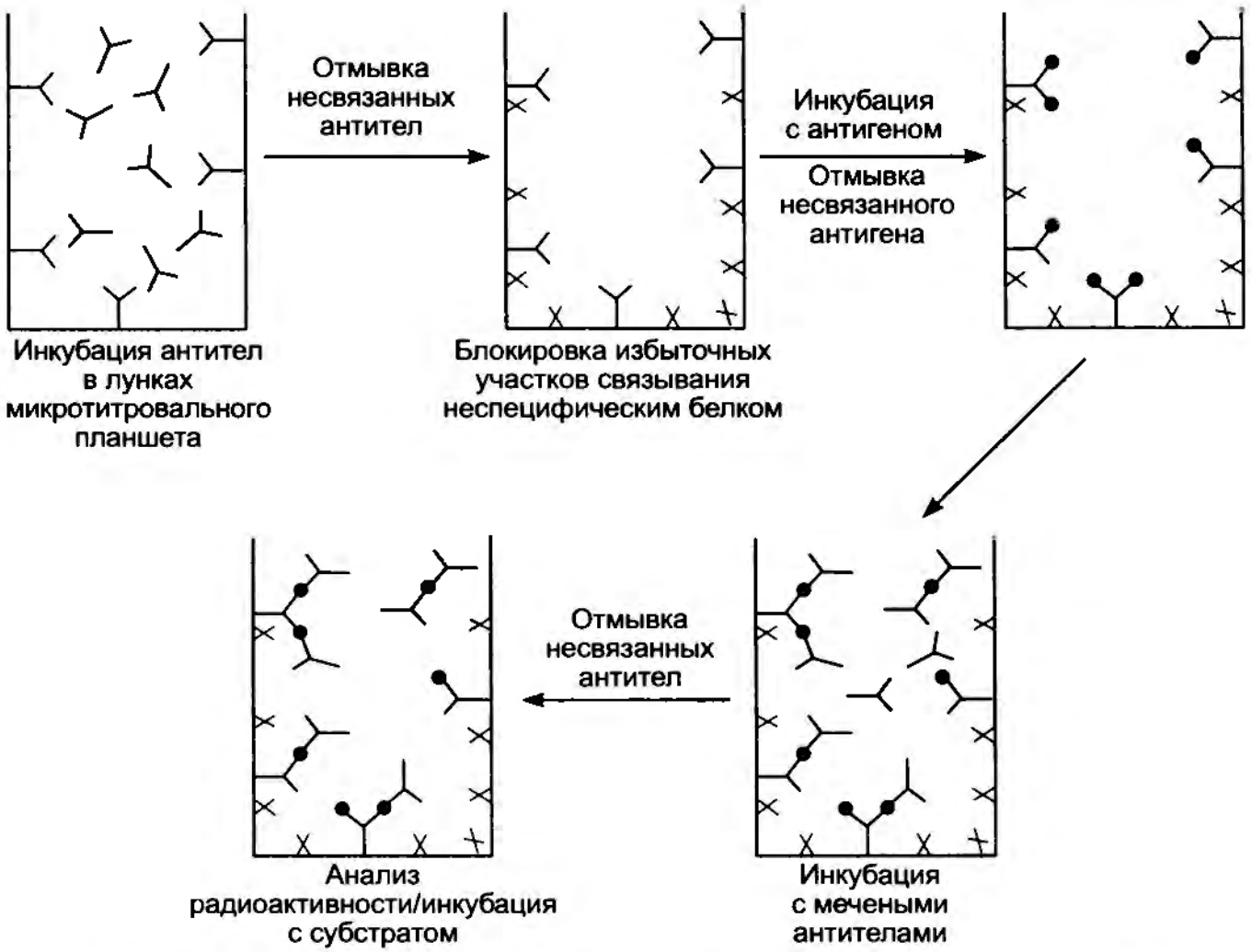


Рис. 7.21. Схема проведения иммунометрического анализа «сэндвич»-типа (IRMA или ELISA) для определения антигена. В этом варианте анализа используют 96-луночные микротитровальные планшеты

В большинстве более поздних вариантов иммунометрического анализа антиген реагирует с нерастворимыми или иммобилизованными антителами, тем самым он «выводится из раствора» и определяется по избытку другого (а в некоторых случаях — того же самого) специфичного антитела. Антитела можно иммобилизовать путем ковалентного связывания на очень мелких шариках из агарозы, путем электростатического взаимодействия на пластиковых или стеклянных шариках, а также на поверхности пластиковых пробирок или микротитровальных планшетов (см. рис. 7.22). Чаще всего применяется именно последний вариант; есть планшеты, обработанные специальным образом для улучшения связывания. В некоторых методах используют антитела против Fc-фрагмента антител; это обеспечивает необходимую ориентацию иммобилизованных антител для оптимального взаимодействия с антигеном.

Для детекции антител применяют либо прямое мечение, либо косвенное определение с помощью меченых антииммуноглобулинов, либо другие подходы, например взаимодействие авидина с биотином (разд. 7.5.5). Иммунометрические методы обычно достаточно быстрые в исполнении, имеют высокую чувствительность и позволяют работать в более широком диапазоне концентраций анализируемых веществ по сравнению с конкурентным

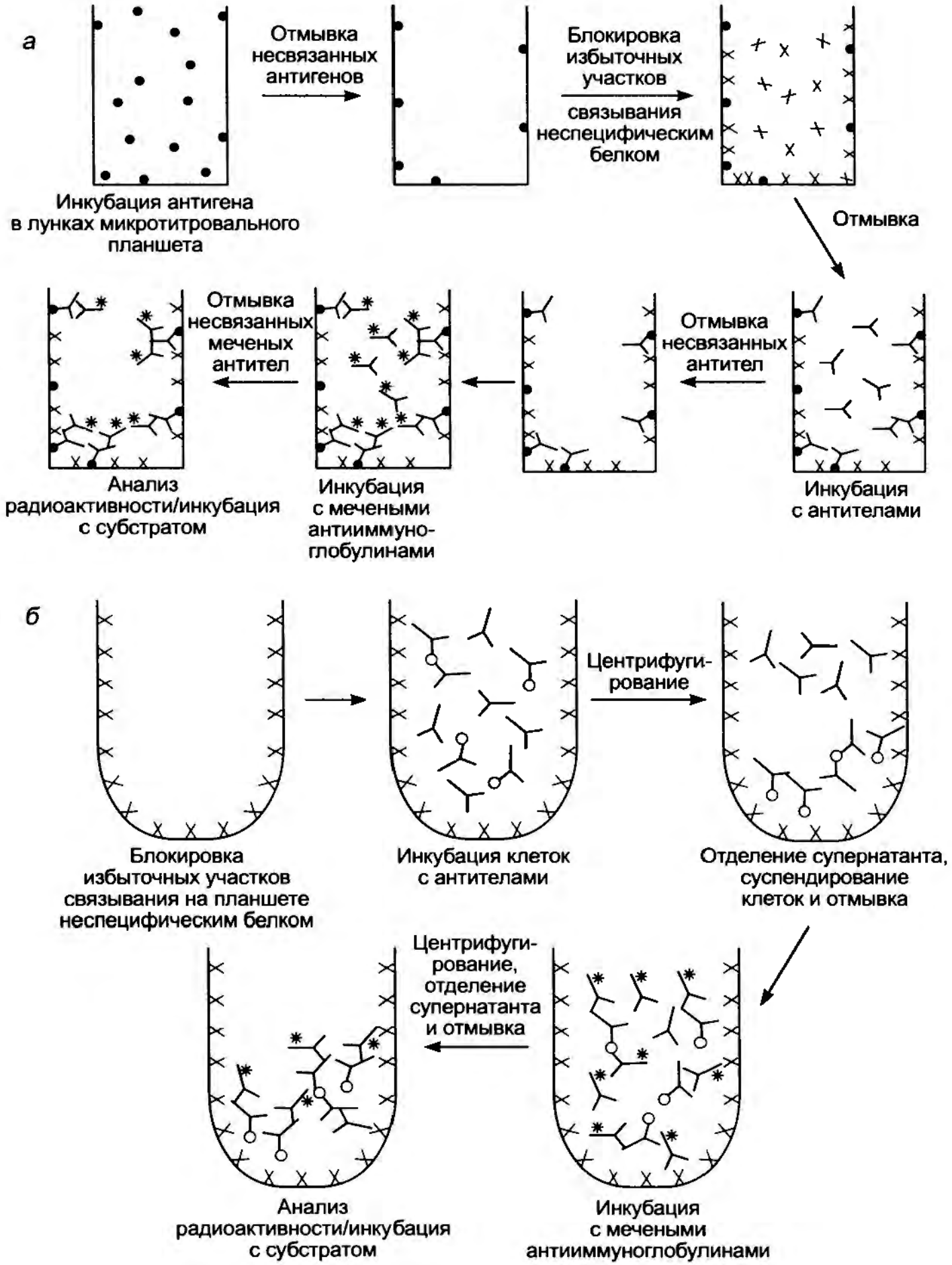


Рис. 7.22. Схема проведения твердофазного иммуноанализа в микротитровальном планшете: *а* — с антителами против растворимых антигенов; *б* — с антителами против антигенов клеточной поверхности

типом анализа. Однако для их реализации требуется больше антител и, кроме того, обычно необходимо наличие двух типов антител, распознающих разные участки антигена. Некоторые варианты иммунометрического анализа (в частности, при выполнении в микротитровальных планшетах, см. рис. 7.21) можно автоматизировать, что позволяет достичь высокой производительности.

Первые варианты иммунометрического анализа, разработанные для большого круга веществ, использовали антитела с радиоактивной меткой. Их принято называть **иммунорадиометрическими методами** (IRMA). Еще больше вариантов анализа основано на применении ферментативной метки — это **ферментативный иммунометрический анализ** (EIA или EIMA). Однако, к сожалению, эти методы часто называют ELISA, что приводит к путанице, поскольку ELISA — это принятое название для твердофазного иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay, разд. 7.7.3). Чтобы отличать от «подлинного» метода ELISA, указанные методы иммунометрического анализа часто называют **ELISA «сэндвич»-типа**. В большинстве случаев для определения концентрации антигена используют окрашенный субстрат/продукт. Для некоторых ферментов, кроме того, применяют флуоресцентные субстраты (например, для β-галактозидазы), что может повысить чувствительность определения. Существуют и другие варианты меток для иммунометрического анализа, некоторые описаны в разд. 7.7.4. Для всех типов анализа необходимо осуществить градуировку путем разведения стандартного раствора анализируемого вещества с известной концентрацией (ср. с конкурентным иммуноанализом). До создания моноклональных антител (разд. 7.2) применение иммунометрических методов ограничивалось необходимостью использования антител, распознающих разные эпитопы антигена. В данном варианте анализа также можно применять поликлональные антитела, за исключением тех случаев, когда антиген представляет собой полимерную структуру, возможности метода ограничены, поскольку первичные антитела занимают все участки связывания на антигенах, так что для связывания вторичных (детектируемых) антител уже нет места. Использование двух типов моноклональных антител, распознающих разные эпитопы антигена, позволило оптимизировать анализ. Сочетание первичных моноклональных антител с поликлональными детектирующими антителами обеспечивает чувствительное и специфичное определение. Отбор подходящих антител и получение препарата антител достаточно высокого качества играют решающую роль в успешном проведении анализа.

7.7.3 Твердофазный иммуноанализ (для определения антител)

Твердофазный иммуноанализ основан на использовании иммобилизованного антигена для количественного определения антител в анализируемом образце. Эти методы часто рассматриваются как «истинные» методы иммуноанализа, хотя их точность при определении концентрации антител обычно уступает точности иммунометрического или конкурентного имму-

ноанализа (см. разд. 7.7.1 и 7.7.2). Однако твердофазный иммуноанализ прост и быстр в исполнении, так что он идеально подходит для определения сравнительного содержания антител в сыворотке и других биологических жидкостях, а также для скрининга сыворотки иммунизированных животных, супернатантов культур гибридомных клеток, асцитической жидкости и образцов с патологиями.

Раствор, содержащий антиген, просто инкубируют в пластиковых пробирках или (чаще) в лунках пластикового микротитровального планшета; в результате некоторая небольшие количества белка связываются с поверхностью пробирки или лунки. После отмывки несвязанного антигена в пробирки/лунки помещают раствор с известной или неизвестной концентрацией антител. Если в растворе присутствуют антитела, они связываются с иммобилизованными антигенами и после отмывки их можно обнаружить с помощью меченых антииммуноглобулинов или иммуноглобулинсвязывающих белков (см. рис. 7.22). В качестве метки в таком варианте анализа может использоваться радиоизотоп, но в настоящее время в подавляющем большинстве случаев роль метки исполняет фермент; такие методы принято называть **твердофазным иммуноферментным анализом** (ELISA). К сожалению, иммунометрический анализ с ферментативной меткой также часто называют ELISA (разд. 7.7.2), поэтому, чтобы избежать путаницы, иммунометрическую версию иногда называют «двухсайтным» или ELISA «сэндвич»-типа. Поскольку антиген удерживается на поверхности пробирки или лунки за счет неспецифических взаимодействий, иногда такой метод называют «методом липкого планшета» (sticky plate) или (особенно, если используют смесь неочищенных антигенов) «методом грязного планшета» (dirty plate).

Количественное определение осуществляют путем сравнения со стандартным раствором с известной концентрацией антител, однако такой подход может быть затруднен из-за гетерогенности присутствующих иммуноглобулинов. Очень часто результат выражают как титр, определенный с помощью зависимости доза–ответ для разных образцов. Для расчета титра антител обычно берут разбавление, при котором достигается 50% максимального связывания, однако для этого максимальное связывание на всех кривых доза–ответ должны совпадать. Использование самой последней точки на кривой титрования является ненадежным и часто дает неверный результат.

Вариантом стандартного твердофазного иммуноанализа является так называемый «дот-блот»-анализ. В этом методе каплю раствора антигена наносят на нитроцеллюлозный фильтр и высушивают, а затем инкубируют с растворами антител. Антигенспецифичные антитела затем детектируют с помощью антииммуноглобулинов или антителосвязывающих белков с ферментативной или радиоизотопной меткой. Преимущество такого метода заключается в том, что антиген можно сконцентрировать в одной точке фильтра путем повторных нанесений и, кроме того, несколько образцов антигенов можно инкубировать с одним образцом антител. Основной недостаток — невозможность точного количественного определения. Название метода может ввести в заблуждение, поскольку данный

метод не подразумевает никакого переноса материала; возможно, название отражает определенное техническое сходство с иммуноблоттингом (см. разд. 7.6). Правильнее было бы называть данный метод точечным твердофазным анализом (dot immunobinding assay), но такое название практически не употребляется.

7.7.4 Усилители в иммуноанализе

Поиск путей увеличения чувствительности методов иммуноанализа привел к созданию различных систем усиления сигнала (ср. иммуноблоттинг, разд. 7.6). Большинство этих систем разработано для иммунометрического анализа с ферментативной меткой («сэндвич» ELISA) и применяются при проведении анализа в микротитровальных планшетах. Наиболее распространен ферментативный вариант усиления сигнала, который является дополнением к обычному иммунометрическому «сэндвич»-методу с щелочной фосфатазой. В этой системе щелочная фосфатаза осуществляет дефосфорилирование NADP с образованием NAD^+. Концентрация образующегося NAD^+ является лимитирующим фактором в реакции восстановления NAD^+ до NADH под действием алкогольдегидрогеназы, NADH в свою очередь восстанавливает окисленный нитросиний тетразолий до окрашенного формазана (рис. 7.23). Дополнительная ферментативная реакция значительно усиливает тот сигнал, который может быть получен в реакции, катализируемой щелочной фосфатазой. Еще одна известная система усиления сигнала — система амплификации сигнала для метода ELISA (ELAST; см. рис. 7.24) — использует стандартный иммунометрический метод с пероксидазой, но, кроме того, еще и биотинилированный тираминовый реа-

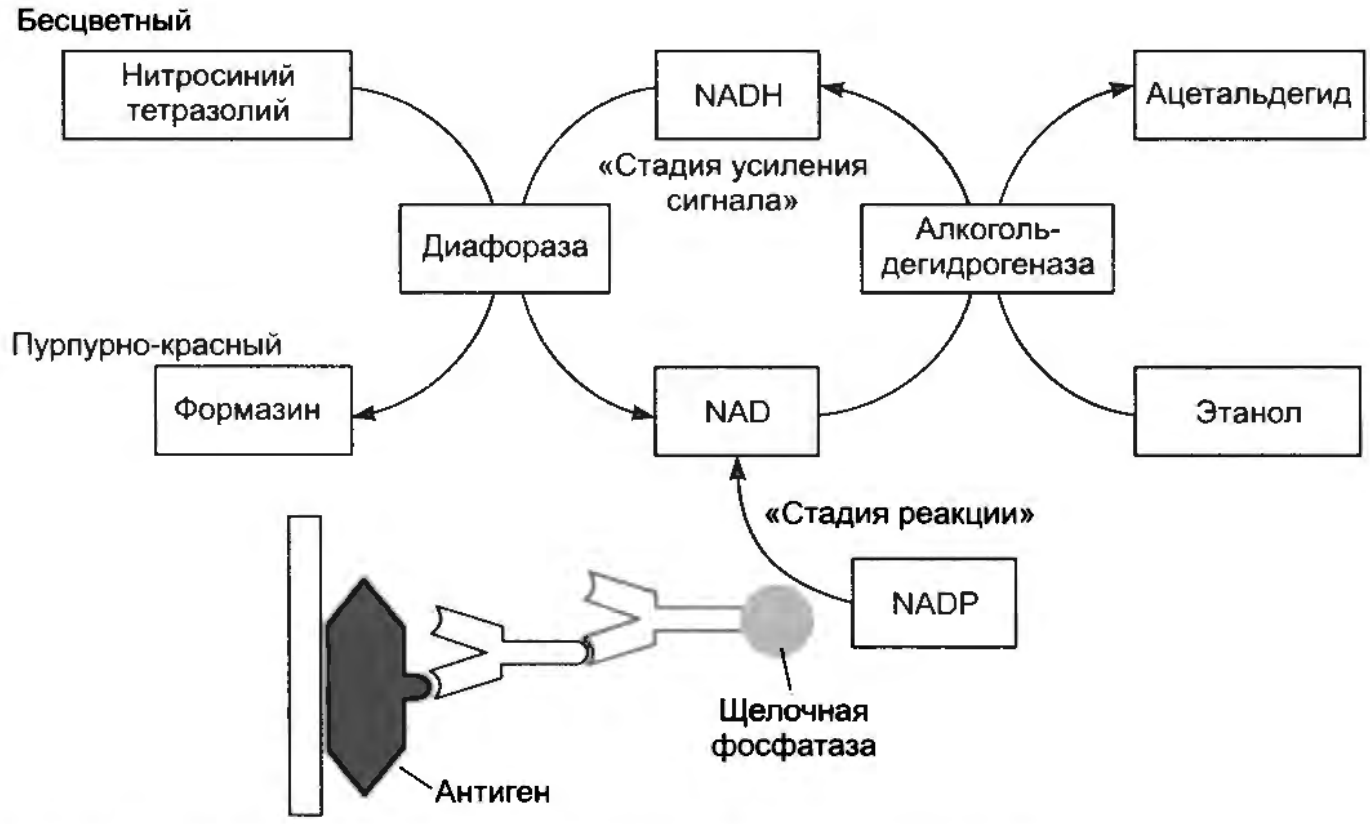


Рис. 7.23. Система амплификации сигнала для щелочной фосфатазы

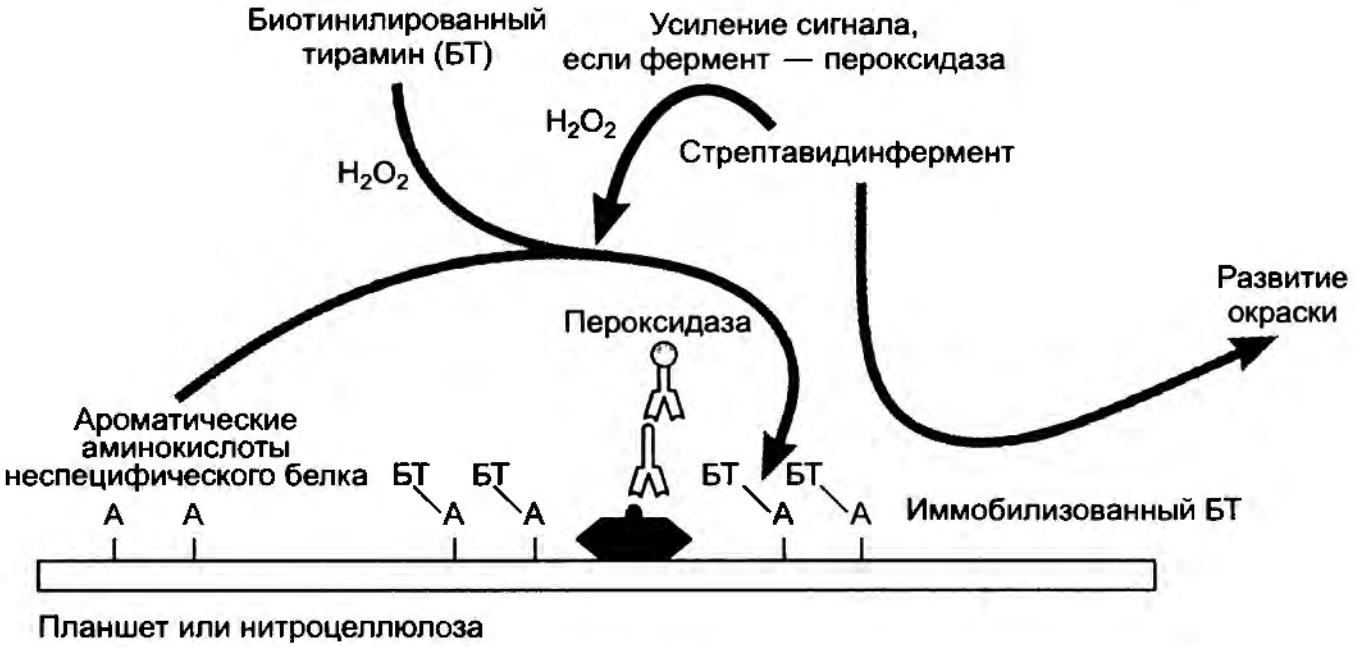


Рис. 7.24. Принципы усиления сигнала ELAST

гент, который при окислении (под действием пероксидазы) ковалентно связывается с остатками тирозина или триптофана в молекулах неспецифического белка, применяемого для блокирования не занятых антигеном участков поверхности микротитровального планшета. Иммобилизованный биотин затем детектируют с помощью меченого стрептавидина (разд. 7.5.5). Такая система амплификации позволяет определять гораздо большее количество иммобилизованных молекул биотина, чем при использовании одних только меченных биотином антител.

Системы амплификации практически всегда приводят к усилению сигнала, однако часто усиливается не только «истинный» сигнал от анализируемого вещества, но и фон. В худшем случае при этом просто повышается общий сигнал без повышения чувствительности метода. Недостаточно продуманное использование мощных систем амплификации может уменьшить надежность результатов и повысить вероятность возникновения артефактов.

7.7.5 Пептидное и эпитопное картирование

В твердофазном иммуноферментном анализе антиген может быть заменен синтетическим пептидом. Это позволяет детектировать антитела с известной эпитопной специфичностью и определять эпитопную специфичность новых антител (так называемое пептидное или эпитопное картирование). В последнем случае синтезируют набор перекрывающихся пептидных фрагментов полной последовательности антигена и «покрывают» ими последовательно лунки микротитровального планшета. Инкубация с мечеными антителами или инкубация с антителами с последующим добавлением меченых антииммуноглобулинов позволяет идентифицировать узнанные антителами пептиды и тем самым вычислить соответству-

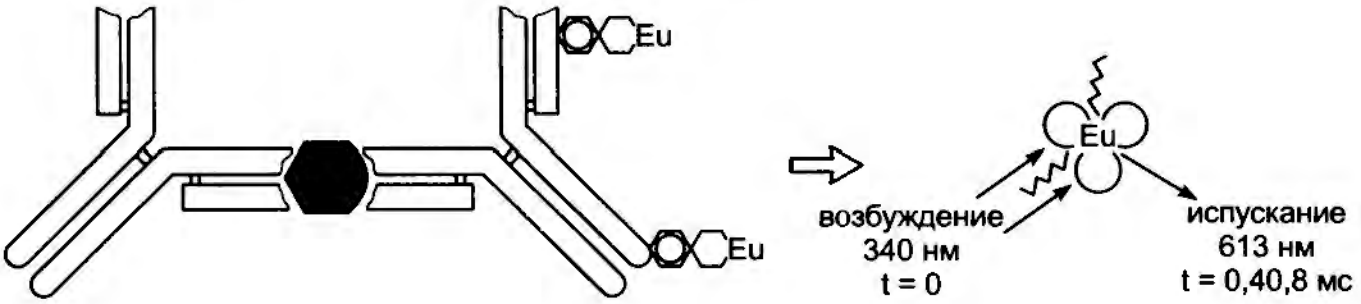
ющие эпитопы. Такой подход особенно эффективен для моноклональных антител. Обычно синтезируют пептиды длиной от 10 до 18 остатков, а области перекрывания составляют от 5 до 8 остатков. Данная процедура проста и надежна, однако возможна только для «линейных» антигенных детерминант; кроме того, следует удостовериться, что все пептиды достаточно хорошо связаны с поверхностью лунок планшета. Для улучшения связывания лунки обрабатывают полилизином (в результате чего на поверхности создается довольно сильный положительный заряд) или синтезируют пептиды с остатками биотина на конце и покрывают ими планшеты, на которые предварительно нанесен стрептавидин (что дополнительно оптимизирует ориентацию связывания). Можно также проводить синтез пептидов на «остриях» в лунках специальных планшетов и использовать их для картирования (так называемое пептидное сканирование). Конец «острия» активируют химическим способом, добиваясь связывания активированных аминокислотных остатков, которые поочередно добавляют для выстраивания желаемой пептидной последовательности.

7.7.6 Иммуноанализ с флуоресцентной и люминесцентной меткой

Попытки повысить чувствительность анализа и упростить его исполнение привели к созданию множества вариантов конкурентного и особенно иммунометрического анализа, в том числе с флуоресцентной и люминесцентной детекцией сигнала. В простейшем случае колориметрическая детекция, традиционная для ELISA «сэндвич»-типа, заменена на флуоресцентный или люминесцентный. Данные методы носят название **ферментативного флуоресцентного иммуноанализа** (ELFIA) или **хемилюминесцентного ферментативного иммуноанализа** (ECLIA). Существуют и другие подходы, существенно отличающиеся от вышеназванных; поэтому они рассматриваются ниже в отдельном разделе.

7.7.7 Отсроченный усиленный вариант иммуноанализа с лантанидами

Большинство методов **отсроченного усиленного иммуноанализа с флуоресценцией лантаноидов** (DELFIA, другое название — диссоциативный усиленный флуоресцентный иммуноанализ; см. разд. 12.5.3) основаны на стандартном «сэндвич»-варианте иммунометрического анализа и осуществляются в микротитровальном планшете. Детектируемые антитела (см. рис. 7.25) содержат в качестве метки лантаноид (переходный 4*f*-элемент; чаще всего европий), присоединенный нековалентной связью с помощью хелатирующего агента, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА) или ангидрид диэтилентриаминтетрауксусной кислоты (ДТТА). После проведения иммунометрического анализа лантаноид высвобождается из комплекса с антителом путем понижения pH до ~ 3,2 (хелатные комплексы неустойчивы в таких условиях), а свободный лантаноид далее связывается с растворимым дикетоном. Полученное



1	2	3	4
Твердофазный иммуноанализ	Европий в качестве метки	Диссоциативное усиление флуоресценции	Разрешение во времени

Рис. 7.25. Диссоциативный усиленный флуоресцентный иммуноанализ «сэндвич»-типа

соединение образует мицеллы, предотвращающие тушение флуоресценции (так называемая стадия усиления). Лантаноиды в составе хелатных комплексов с антителами не флуоресцируют, но ионы лантаноидов в составе мицелл, напротив, способны излучать свет. Максимум флуоресценции лантаноидов в мицеллах достигается сравнительно медленно, что позволяет осуществлять отсроченное определение испускаемого света после добавления усиливающих агентов. Таким образом удается свести к минимуму нежелательный вклад автофлуоресценции отдельных компонентов образца и отличить его от «истинного» сигнала лантаноида. В связи с этим данный метод анализа часто называют **иммунофлуориметрическим анализом с разрешением во времени** (TRIFMA). В данном случае интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству антигена в образце. Методы DELFIA весьма чувствительные, быстрые, точные, надежные и применимы в достаточно широком диапазоне концентрации анализируемого вещества; кроме того, их можно автоматизировать и добиться очень высокой производительности.

7.7.8 Гомогенный флуоресцентный иммуноанализ

Флуоресцентный иммуноанализ с меченым субстратом (SLFIA) основан на тех же принципах, что и конкурентный иммуноанализ, но не требует разделения свободного и связанного антигена. Для реализации данного метода необходимо синтезировать конъюгат антигена с такой химической структурой, которая бы излучала свет только после расщепления определенным ферментом. Кроме того, нужны антитела, которые связываются с конъюгатом антигена и предотвращают его расщепление ферментом с высвобождением флуоресцентной метки. В методе SLFIA образцы с известной и неизвестной концентрацией антигена инкубируют с фиксированным количеством конъюгата антигена в присутствии лимитирующей

концентрации антител. В таких условиях антиген из образца конкурирует за связывание антител с антигеном в составе конъюгата. После достижения равновесия добавляют фермент, который высвобождает флуоресцентную метку из конъюгата. Интенсивность флуоресценции пропорциональна содержанию антигена в образце. Часто в данном методе используют сочетание фермента β-галактозидазы и конъюгата, приготовленного путем связывания антигена с 4-метилумбеллиферилгалактозидом. Фермент расщепляет конъюгат, высвобождая 4-метилумбеллиферон, содержание которого легко определяется с помощью флуориметра. Основная сложность данного метода анализа заключается в создании необходимых антител, т. е. антител, которые эффективно ингибируют ферментативную реакцию. Метод обычно успешно применяется для анализа сравнительно небольших молекул, таких как морфин и другие опиаты.

7.8 ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для понимания структуры, организации и функционирования клетки, а также развития и дифференцировки клеток и тканей в здоровом и больном организме часто нужно знать распределение антигена *in situ*. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические методы используют специфическое взаимодействие антигенов и антител для определения локализации или распределения антигенов *in situ* в тканях или клетках соответственно. Кроме того, данный подход применим для изучения специфичности антител или антисыворотки к клеткам или тканям, содержащим известный антиген. Принцип иммуногисто/цитохимического анализа аналогичен принципу твердофазного иммуноанализа (разд. 7.7.3) и иммуноблоттинга (разд. 7.6), но с тем различием, что антитела инкубируют с содержащими антиген тонкими срезами ткани, помещенными на предметное стекло микроскопа, или с препаратами клеток, а не с антигеном, иммобилизованным на микротитровальном планшете или нитроцеллюлозной мембране. Для проведения иммуногисто/цитохимического анализа антитела или антииммуноглобулины (разд. 7.5.1) должны быть связаны с флуоресцентной или ферментативной меткой, что позволяет обнаружить сигнал с помощью микроскопа. Локализация метки указывает на место взаимодействия антигенов с антителами, которое можно соотнести, например, с определенным типом клеток или клеточных органелл (см. рис. 7.26).

При выполнении всех типов иммуногисто/цитохимического анализа необходимо иметь антитела для положительного и отрицательного контроля путем сравнения с тестируемыми антителами; это поможет установить специфичность иммуноокрашивания. Хотя термин «иммуноокрашивание» широко применяется для обозначения связывания меченых антител со специфическими клеточными или тканевыми антигенами, этот процесс не следует путать с дифференциальным окрашиванием компонентов тканей с помощью обычных химических красителей, таких как гематоксилин и эозин, применяющихся в гистологии и патологии.

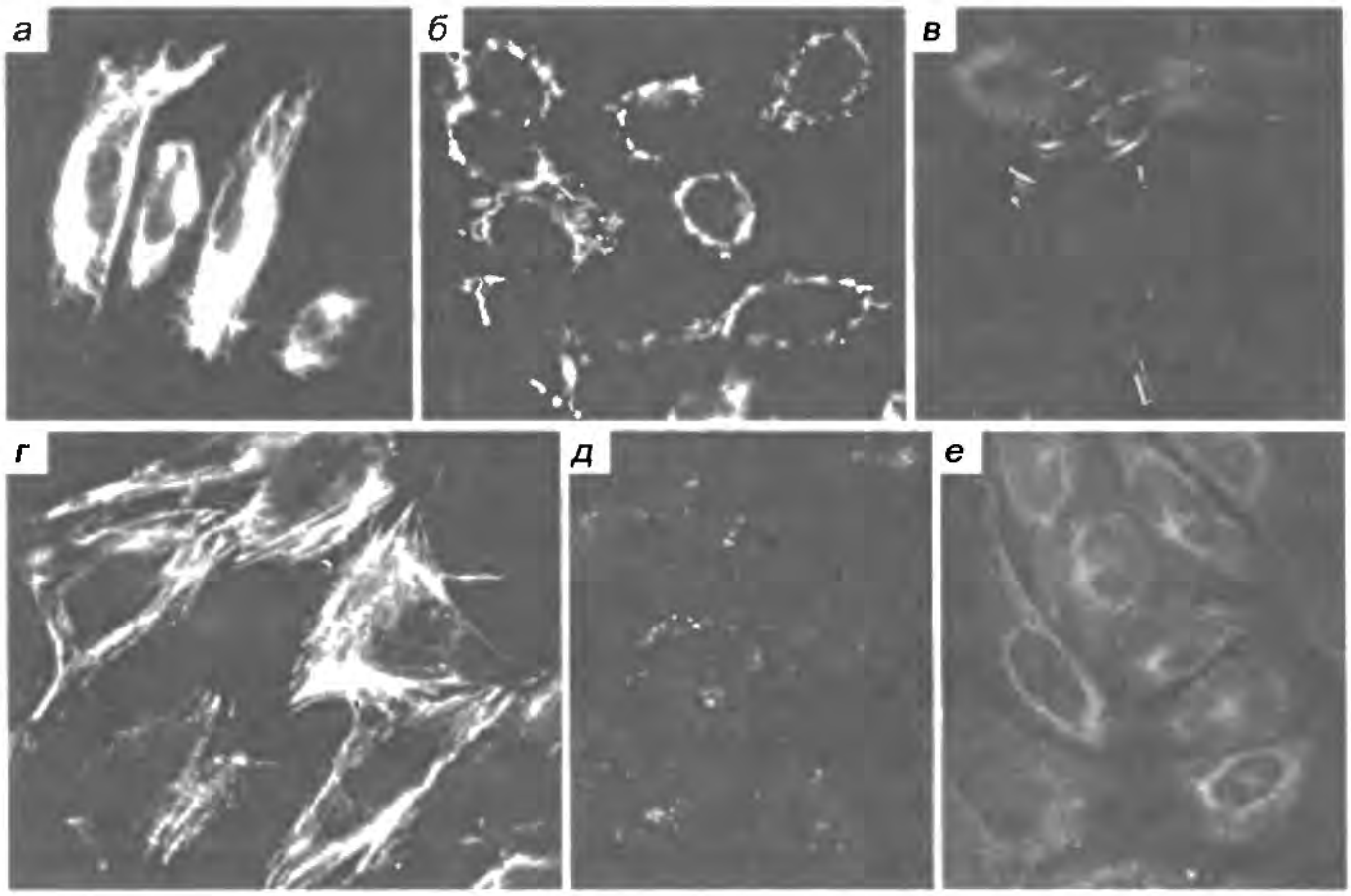


Рис. 7.26. Иммунофлуоресцентная микрофотография иллюстрирует возможность визуализации клеточных органелл с помощью меченых антител: *а* — промежуточные филаменты; *б* — митохондрии; *в* — филоподии; *г* — стрессовые волокна; *д* — гранулы; *е* — компоненты цитоплазмы. Монослои клеток глиомы крысы С6 инкубировали с моноклональными IgM антителами человека, а затем — с меченными флуоресцеином антителами против человеческого IgM

7.8.1 Иммуноферментные методы в микроскопии

Основным преимуществом использования ферментативных меток (чаще всего пероксидазы хрена или щелочной фосфатазы, разд. 7.5.4) для иммуногисто/цитохимического анализа является возможность получения изображений срезов тканей или клеток с помощью обычного светового микроскопа; химические красители типа гематоксилина (окрашивает ядра в синий цвет) помогают идентифицировать морфологию клеток. Основные недостатки метода — присутствие эндогенных тканевых ферментов, которые могут создавать сильный фон при окрашивании, а также наличие в анализе дополнительной стадии проведения ферментативной реакции.

7.8.2 Пероксидаза–антипероксидаза

Метод с использованием **пероксидазы–антипероксидазы (ПАП)** представляет собой модификацию непрямого ферментативного иммуногисто/цитохимического анализа, разработанную с целью усиления сигнала (рис. 7.27). В данном методе немеченые анти-мышиные или анти-кроличьи антитела образуют мостик между первичными мыши-

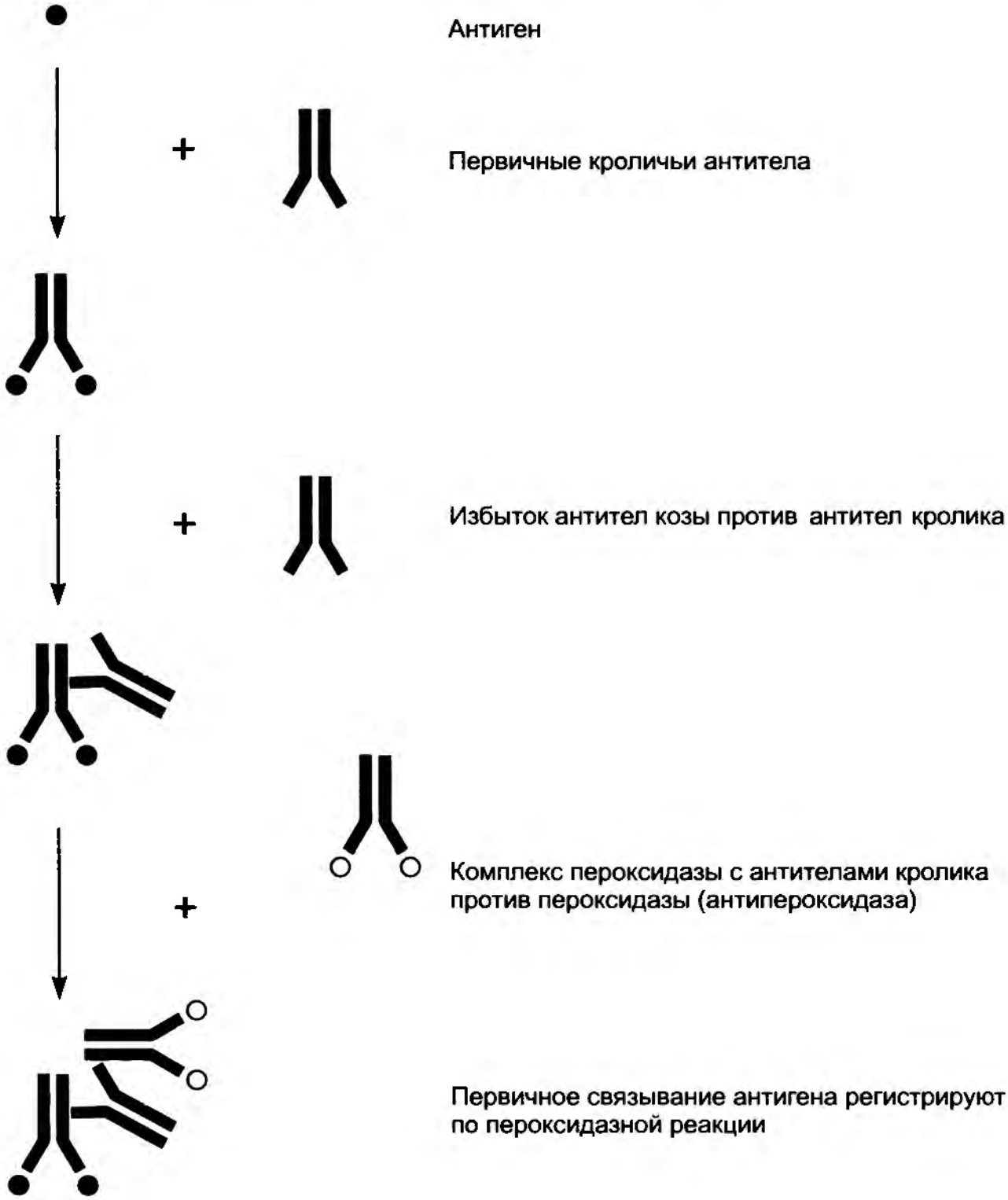


Рис. 7.27. Схема анализа с применением комплекса пероксидаза–антипероксидаза (темный кружок — антиген, светлый кружок — пероксидаза)

ными или кроличьими антителами и комплексом пероксидазы с антителами (мыши или кролика) против пероксидазы (антипероксидаза). Созданы также комплексы щелочной фосфатазы с анти-щелочной фосфатазой. Преимущество метода состоит в отсутствие повреждения антител и(или) ферментов в процессе химического связывания. Существуют также системы, основанные на реакциях антииммуноглобулинов и биотина–авидина. Подобные системы амплификации сигнала позволяют достичь большого повышения чувствительности по сравнению со стандартными непрямыми методами анализа.

7.8.3 Иммунофлуоресцентные методы

В начале своего развития иммуногистохимия основывалась на методах детекции антител, меченных флуоресцентной меткой (разд. 7.5.3). Использование таких антител значительно возросло в последнее время в связи с появлением методов проточной цитофлуориметрии (разд. 16.3.2), позволяющих анализировать отдельные клетки в суспензии по наличию на их поверхности специфических антигенов (разд. 7.8.5), а также с расширением возможностей конфокальной микроскопии, в которой стандартные источники света были заменены лазером, что позволяет анализировать срезы тканей или клетки на разной глубине и создавать их трехмерные изображения. Различные флуорофоры испускают свет в различных областях ультрафиолетового диапазона, поэтому использование подходящих фильтров позволяет осуществлять иммуноокрашивание одного и того же среза ткани или образца клеток с помощью двух, трех или даже четырех различных антител, каждое из которых связано со своим флуорофором. Такие процедуры двойного и тройного окрашивания иногда требуют применения конъюгатов первичных антител, поскольку, например, конъюгированные с флуоресцеином антитела кролика против мыши не могут различать мышиных моноклональных антител различной специфичности.

Выбор флуоресцентной метки зависит от источника света, системы детекции, а также личного вкуса исследователя. Источником света может служить вольфрамовая, кварцево-галогенная или ртутная дуговая лампа — для флуоресцентного микроскопа, аргоновый или криптон-аргоновый лазер — для проточной цитометрии.

Методы с применением антител с флуоресцентной меткой осуществляются просто и быстро, а также характеризуются высокой чувствительностью. Их самым большим недостатком является необходимость флуоресцентного микроскопа, а также то, что флуоресцентное излучение, особенно излучение флуоресцеина, затухает при длительном рассматривании; чтобы этого избежать к образцу добавляют сильный восстановитель типа 1,4-диазабицикло-2,2,2-октана. Подобные агенты, как полагают, предотвращают распад флуоресцеина в результате его взаимодействия с белком. Еще одной проблемой, с которой иногда приходится сталкиваться, является самопроизвольное испускание света некоторыми компонентами тканей.

7.8.4 Кэппинг

Важной особенностью иммуноокрашивания живых клеток, особенно лимфоцитов, является агрегация антигенов клеточной поверхности в результате образования перекрестных сшивок посредством интактных антител. Такие образования в конечном итоге формируют своеобразный колпачок (кэп — *от англ.* cap) на одном из полюсов клетки, который впоследствии сбрасывается или подвергается эндоцитозу. Образование таких кэпов (**кэппинг**) можно наблюдать при использовании антител с несколькими типами флуоресцентных меток; это дает информацию об ассоциации моле-

кул, несущих различные антигенные маркеры. Образование кэпов можно предотвратить, если проводить иммуноокрашивание при 4 °С или в присутствии азида натрия, что не допускает изменения молекул клеточной поверхности, либо путем использования одновалентных Fab-фрагментов, что позволяет изучать начальное связывание антител с антигенами клеточной поверхности.

7.8.5 Проточная цитометрия

Недостатком анализа иммуноокрашивания с помощью обычной микроскопии является отсутствие возможности проводить надежные количественные определения. Можно оценивать долю окрашенных клеток в популяции, проводя расчеты вручную, при этом точность оценки зависит от общего числа учтенных клеток и доли меченых клеток.

Эти ограничения преодолены в методе проточной цитофлуориметрии. Суспензия клеток, меченных конъюгированными с флуорофором антителами, в виде струи жидкости проходят пучок света от лазера. При попадании света на клетку наблюдается флуоресцентное излучение и рассеяние света. Сигналы собираются в коллекторе цитофлуориметра, обрабатываются там и для каждой клетки представляются в виде количественной информации — интенсивности флуоресценции и светорассеивания. Прямое светорассеяние отражает размеры клетки, боковое рассеяние связано с гранулярностью клетки (наличием внутриклеточных гранул, крупных органелл, ядер). Пример получаемых результатов представлен на рис. 7.28. Таким способом удается быстро проанализировать несколько тысяч клеток, например, путем определения доли связанных с антителами клеток или интенсивности флуоресценции. В проточных цитофлуориметрах клетки сортируются по определенным параметрам, таким как интенсивность флуоресценции и размер (после иммуноокрашивания с помощью меченных флуоресцентной меткой антител клетки обычно сохраняют жизнеспособность).

Существует много флуорофоров для проточной цитометрии, где спектры излучения не перекрываются, что позволяет одновременно регистрировать свет на разной длине волны. Таким образом, можно использовать одновременно несколько антител с разными флуоресцентными метками. Часто для такого анализа напрямую используют конъюгаты моноклональных антител. Это позволяет одновременно использовать несколько флуоресцентных меток (см. разд. 7.8.3 и 7.5.3).

Кроме того, конъюгаты антииммуноглобулинов, применяемые в непрямых иммуноцитохимических методах анализа, могут либо напрямую связываться с иммуноглобулинами на поверхности лимфоцитов, либо вызывать агглютинацию клеток, покрытых первичными антителами. (Молекула IgG двухвалентная, так что она способна связывать два первичных антитела, каждое из которых связано с отдельной клеткой; в результате клетки оказываются связаны между собой.) Существует большой диапазон фирменных конъюгатов моноклональных антител, полученных против различных маркеров клеточной поверх-

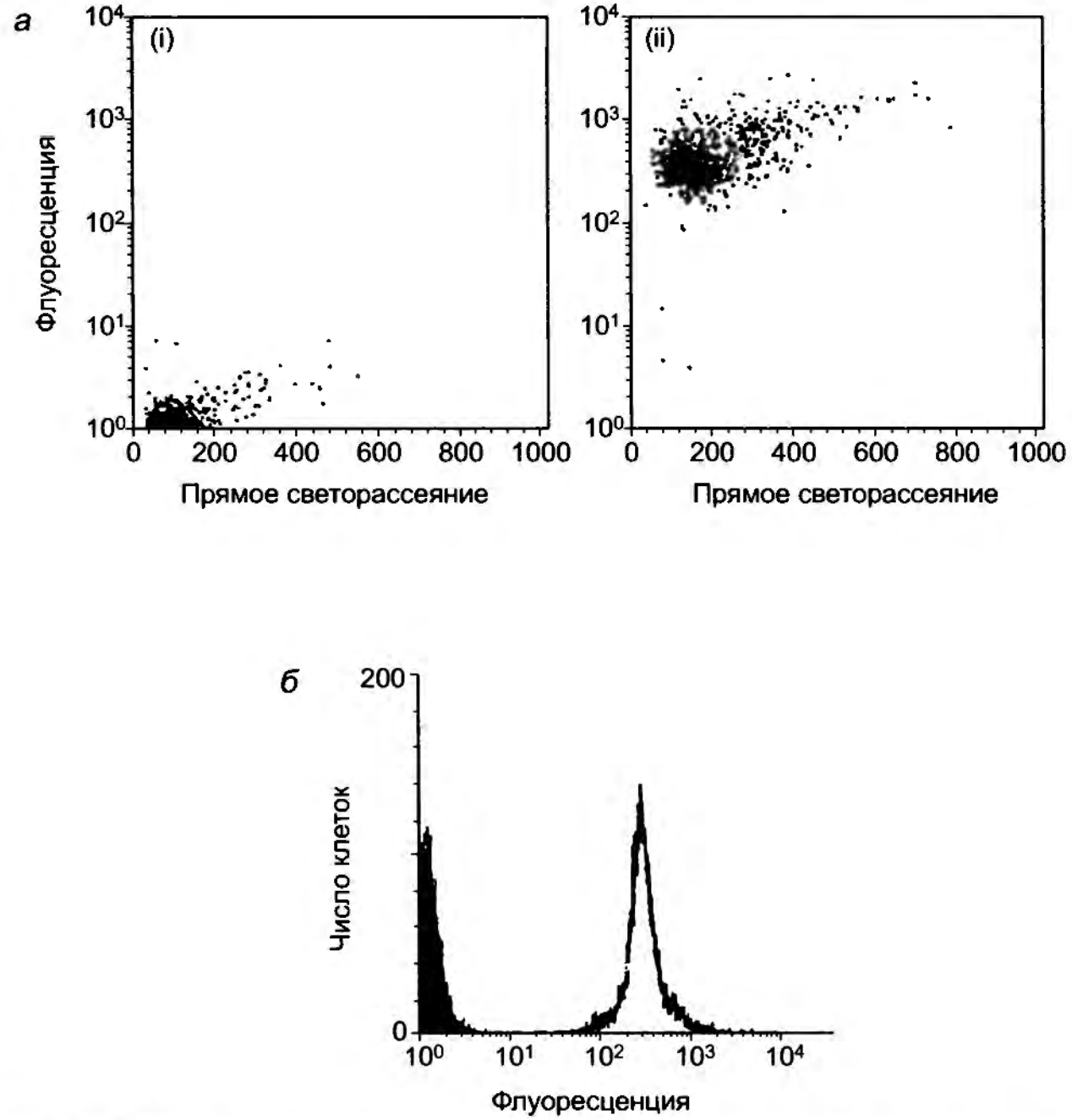


Рис. 7.28. Примеры представления результатов проточной цитометрии. *а* — эритроциты (красные клетки крови), окрашенные с помощью меченных флуоресцентной меткой мышиных моноклональных антител против гемоглобина (ii) или с помощью не имеющих отношения к гемоглобину меченных флуоресцентной меткой мышиных моноклональных антител (i). Каждая точка соответствует отдельному эритроциту. По оси ординат отложена интенсивность флуоресценции, по оси абсцисс — прямое светорассеяние (т. е. размер клеток). Эритроциты плохо окрашивались с помощью посторонних антител (i), но практически все клетки удалось покрасить с помощью антител против гемоглобина (ii). *б* — те же результаты, представленные в виде гистограммы: число клеток отложено по оси ординат, интенсивность флуоресценции — по оси абсцисс

ности, таких как кластеры дифференцировки (CD, cluster of differentiation), которые характерны для различных популяций клеток крови. Все это позволяет проводить анализ различных популяций клеток организма, например Т- и В-лимфоцитов. При иммуноокрашивании поверхностных антигенов живых клеток для проточной цитометрии следует предпринять определенные меры с целью предотвращения неспецифического связывания антител с Fc-рецепторами, например, на

лейкоцитах. Для этого данные участки связывания либо блокируют неиммунной сывороткой с высоким уровнем иммуноглобулинов, либо используют $F(ab')_2$-фрагменты антител.

7.8.6 Иммуноэлектронная микроскопия

Детали клеточного строения, которые не удается рассмотреть с помощью обычного микроскопа, можно попытаться увидеть с помощью электронного микроскопа, поскольку длина волны электронов меньше, чем у видимого или ультрафиолетового света. В иммуноэлектронной микроскопии для окрашивания ультратонких срезов тканей или клеток применяют антитела, меченные электронно-плотными реагентами, такими как золото или ферритин (железосодержащий белок), либо пероксидазой хрена, которая при взаимодействии с определенными субстратами может образовывать электронно-плотные продукты.

7.9 АФФИННОСТЬ И АВИДНОСТЬ

Определение аффинности антител бывает необходимо для предсказания и/или объяснения их иммунохимических свойств. **Аффинность** определяется как константа равновесия реакции взаимодействия одновалентного антитела с одновалентным антигеном, т. е. с антигенной детерминантой. Поскольку антитела обычно бывают двухвалентными или поливалентными, а антигены часто содержат более одной антигенной детерминанты, данную концепцию применяют довольно редко. Под **авидностью** обычно понимают константу равновесия взаимодействия антигена и антитела в целом, так что в это понятие включен фактор аффинности и, кроме того, дополнительные факторы, такие как валентность связывания и др. Термины аффинность и авидность иногда заменяют соответственно терминами «внутренняя аффинность» и «функциональная аффинность», которые являются гораздо более наглядными.

7.9.1 Определение аффинности и авидности

Аффинность одновалентного антитела к его эпитопу математически можно описать в виде константы комплексообразования:

$$K_a = \frac{[АгАт]}{[Аг][Ат]}$$

где K_a — константа комплексообразования, [Аг] — концентрация антигена, [Ат] — концентрация антител, [АгАт] — концентрация комплекса антиген–антитело.

На практике это означает, что все компоненты, участвующие в связывании, должны быть абсолютно чистыми, а реакция происходит в гомогенном растворе. Подобные условия редко выполняются в иммунохимических методах анализа, в том числе при биохимических исследованиях. Однако расчет относительной аффинности антител может быть полезен

для предсказания возможностей их использования в иммунохимическом анализе (см. также разд. 16.2.1).

7.10 ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПЛАЗМОННЫЙ РЕЗОНАНС В ИММУНОХИМИИ

Явление поверхностного плазмонного резонанса (ППР; разд. 16.3.2) позволяет исследовать процессы связывания на основании анализа оптических свойств поверхности тонких покрытых золотом частичек стекла. Изложим кратко физические основы метода. Пучок поляризованного света подвергается полному внутреннему отражению покрытой металлом частицей, помещенной на стеклянную призму. Угол отражения меняется при связывании на металлической пленке каких-либо веществ, причем изменение угла отражения пропорционально *массе* связанного с поверхностью вещества. Существуют специальные приборы, где ППР использован в иммунохимическом анализе. Биосенсорная система Biacore, возможно, лучше всего подходит для решения общих иммунохимических задач; ее можно запрограммировать для различных применений и выполнять анализ в автоматическом режиме. В данной системе используются частицы, покрытые пленкой декстрана, на которой антиген или антитело можно иммобилизовать путем химической реакции. Раствор анализируемого антигена (если иммобилизованы антитела) или антитела (если иммобилизованы антигены) пропускают над поверхностью пленки и измеряют связывание в непрерывном режиме по изменению угла отражения света, падающего на призму. Полученные значения прямо пропорциональны массе связанного вещества, что можно использовать для определения сравнительного содержания антигена или антитела в образцах, а также для расчета параметров взаимодействия антигенов и антител, например констант образования и диссоциации комплекса антиген–антитело.

Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса достаточно быстрый (измерения занимают несколько минут), не требует мечения антигенов и антител или использования антииммуноглобулинов и может быть адаптирован для решения широкого круга задач. Метод не очень чувствителен, например, по сравнению с иммуноанализом, но может быть использован при изучении взаимодействий, характеризующихся очень низкой аффинностью.

7.11 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

DABBS, D.J. (2002) *Diagnostic Immunohistochemistry*. Churchill Livingstone, New York. Хороший обзор возможностей клинического применения иммуногистохимических методов.

HAYAT, M.A. (2002) *Microscopy, Immunohistochemistry and Antigen Retrieval Methods: For Light and Electron Microscopy*. Plenum Press, London. Авторитетный источник информации по всем аспектам применения иммунологических методов в микроскопическом и гистохимическом анализе.

HERMANSON, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press Inc., London and New York. Очень полное и подробное описание большого числа методов получения меченых конъюгатов биологических молекул.

JOHNSTONE, A.P. and THORPE, R. (1996) *Immunochemistry in Practice*, 3rd edn. Blackwell Science, Oxford. Подробные протоколы многих иммунохимических методов с изложением их научных основ.

JOHNSTONE, A.P. and TURNER, M.W. (eds.) (1997) *Immunochemistry — A Practical Approach*. IRL Press, Oxford. В книге есть главы, посвященные многим иммунохимическим методам.

LACHMANN, O.J., PETERS, D.K., and ROSENS, F.S. (eds.) (1992) *Clinical Aspects Of Immunology*, 5th edn. Blackwell Science, Oxford. Трехтомное издание. Излагаются многие аспекты клинической и теоретической иммунологии.

ROITT, I.M. (2001) *Essential Immunology*, 10th edn. Blackwell Science, Oxford. Прекрасный учебник по общим вопросам иммунологии.

Глава 8

Структура белков. Функциональный анализ и методы очистки

8.1 ИОННЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Почти все белки состоят из 20 аминокислот, различающихся размером молекул, формой, зарядом и химической активностью; каждой аминокислоте соответствует по крайней мере один кодон в генетическом коде (разд. 5.3.5). Из этих 20 аминокислот 19 представлены α-аминокислотами (это означает, что аминогруппа и карбоксильная группа присоединены к атому углерода, соседнему с карбоксильной группой) с общей формулой $RCH(NH_2)COOH$, где R — алифатическая, ароматическая или гетероциклическая группа. Единственное исключение — пролин; в этой иминокислоте группа NH входит в состав пятичленного кольца. Все обнаруженные в белках аминокислоты, за исключением простейшей аминокислоты глицина (R = H), содержат асимметрический атом углерода и, следовательно, обладают оптической активностью; в белках все аминокислоты имеют L-конфигурацию.

Для обозначения входящих в состав белков аминокислот используют либо трехбуквенный (обычно соответствует первым трем буквам названия аминокислоты), либо однобуквенный символ (некоторые соответствуют первой букве названия; см. табл. 8.1).

Поскольку аминокислоты содержат как аминогруппу, так и карбоксильную группу, они ионизованы при всех значениях pH, т. е. нейтральная молекула, описываемая общей формулой, не существует в растворе ни при каких значениях pH. Схематически это можно показать следующим образом:

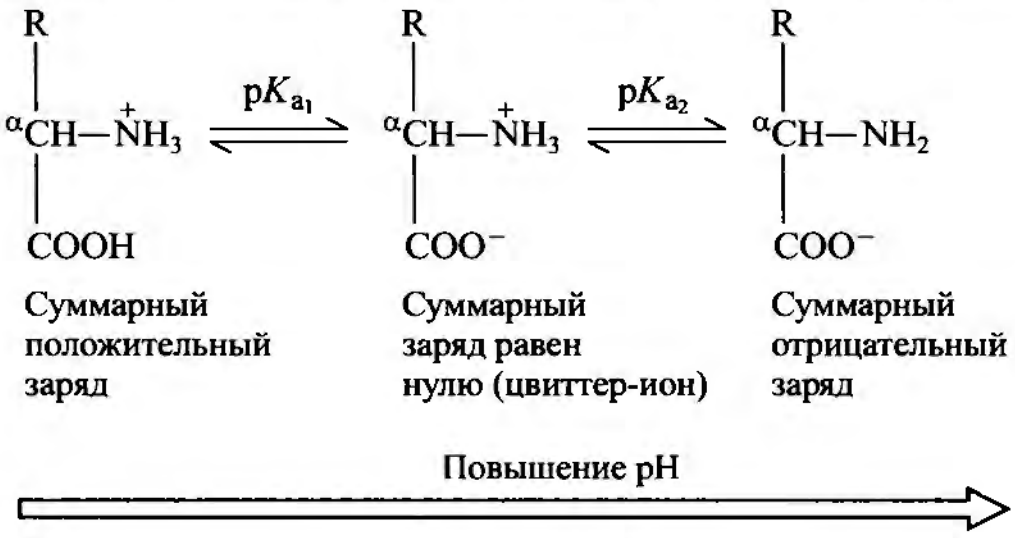


Таблица 8.1. **Обозначения аминокислот**

Аминокислота	Трехбуквенный символ	Однобуквенный символ
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

Таким образом, при низких значениях pH аминокислоты существуют в виде катионов, а при высоких значениях pH — в виде анионов. При определенном промежуточном значении pH каждая аминокислота имеет нулевой суммарный заряд, хотя находится в ионизованном состоянии (так называемый цвиттер-ион). Было показано, что в кристаллическом состоянии и в водном растворе аминокислоты преимущественно существуют именно в форме цвиттер-ионов. В результате они обладают физическими свойствами, характерными для ионных соединений: высокими температурами плавления и кипения, хорошей растворимостью в воде и плохой растворимостью в органических растворителях, таких как эфиры и хлороформ. Величина pH, при которой в водном растворе преобладают цвиттер-ионы, называется **изоионной точкой**, поскольку при этом число отрицательных зарядов молекулы, возникающих в результате ионизации карбоксильных групп, равно числу положительных зарядов, возникающих благодаря принятию протона аминогруппой. В случае аминокислоты это значение совпадает с **изоэлектрической точкой** (pI), поскольку молекула с нулевым

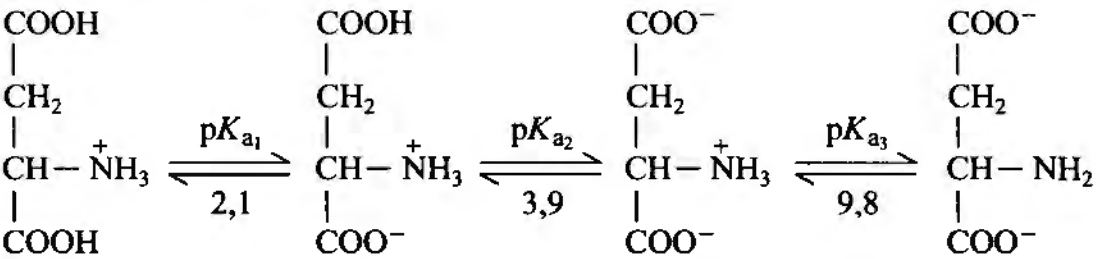
суммарным зарядом неподвижна в электрофоретическом поле. Для каждой аминокислоты pH изоионной точки связан с константой кислотности pK_a следующим выражением:

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} \qquad (8.1)$$

где pK_{a1} и pK_{a2} — отрицательные логарифмы констант кислотной диссоциации K_{a1} и K_{a2} (разд. 1.4.2).

В случае глицина $pK_{a1} = 2{,}3$ и $pK_{a2} = 9{,}6$, так что изоионная точка наступает при pH 6,0. При pH < 6,0 в растворе присутствуют катионы и цвиттер-ионы, причем их соотношение определяется уравнением Хендерсона–Хассельбаха (разд. 1.4.2), а при pH > 6,0 в растворе присутствуют анионы и цвиттер-ионы.

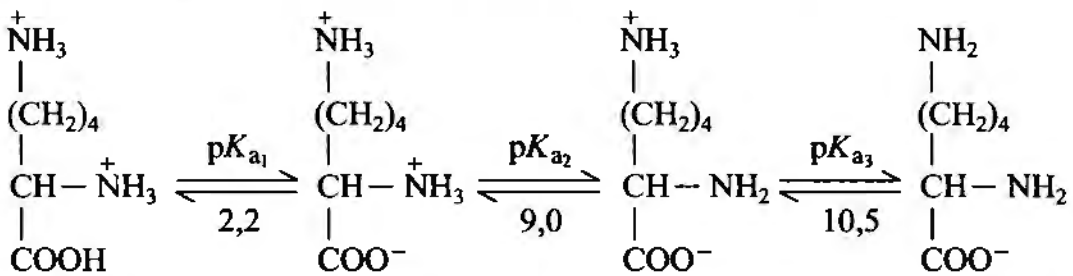
Для кислых аминокислот, таких как аспарагиновая кислота, уравнение ионизации выглядит несколько иначе, что связано с наличием второй карбоксильной группы:



Катион (один суммарный положительный заряд) | Цвиттер-ион (pH 2,77 – изоионная точка) | Анион (один суммарный отрицательный заряд) | Анион (два суммарных отрицательных заряда)

В данном случае область значений pH, где в водном растворе преобладают цвиттер-ионы, определяется константами pK_{a1} и pK_{a2}, а изоэлектрическая точка равна среднему алгебраическому pK_{a1} и pK_{a2}.

В случае основной аминокислоты лизина уравнение ионизации имеет другой вид, а изоэлектрическая точка равна среднему алгебраическому pK_{a2} и pK_{a3}:



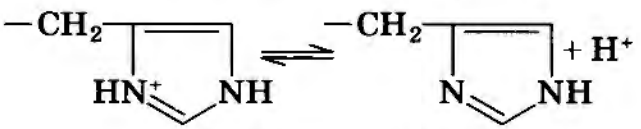
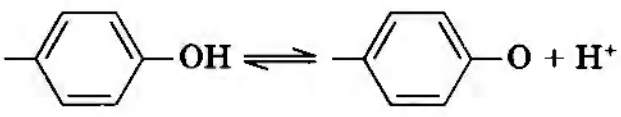
Катион (два суммарных положительных заряда) | Катион (один суммарный положительный заряд) | Цвиттер-ион (pH 9,47 – изоионная точка) | Анион (один суммарный отрицательный заряд)

Некоторые аминокислоты имеют в боковой цепи не дополнительную карбоксильную или аминогруппу, а совсем другую группу, которая способна к ионизации при определенном значении pH. Это может быть фе-

нольная (тирозин), гуанидиновая (аргинин), имидазольная (гистидин) или сульфгидрильная группа (цистеин) (табл. 8.2). Понятно, что состояние ионизации разных аминокислот (кислых, основных, нейтральных) при конкретном значении pH будет сильно различаться. Более того, даже среди близких по характеру ионизации аминокислот имеют место некоторые различия, что связано со свойствами R-группы. Эти различия используются для разделения смесей аминокислот (например, полученных в результате гидролиза белка) методом электрофореза и ионообменной хроматографии (разд. 8.4.2).

Белки образуются в результате конденсации α-аминогруппы одной аминокислоты с α-карбоксильной группой другой аминокислоты (разд. 8.2). Поэтому в белке все аминогруппы и карбоксильные группы в α-положении, за исключением двух концевых аминокислот, вовлечены в образование пептидных связей и ионизоваться не могут. Напротив, аминогруппы, карбоксильные, имидазольные, гуанидиновые, фенольные и сульфгидрильные группы в боковых цепях по-прежнему способны к ионизации. Белки формируются таким образом, что большая часть этих ионизируемых групп располагается снаружи молекулы, где они имеют возможность взаимодействовать с окружающей водной средой. Некоторые группы локализованы внутри молекулы белка и могут участвовать в электростатических взаимодействиях, стабилизирующих пространственную структуру белка. Соотношение положительно и отрицательно

Таблица 8.2. **Функциональные группы в белках, способные к ионизации**

Функциональная группа	Схема ионизации	Приблизительное значение pK_a
N-концевая α-аминогруппа	$-NH_3 \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	8,0
C-концевая α-карбоксильная	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3,0
Asp-β-карбоксильная	$-CH_2COOH \rightleftharpoons -CH_2COO^- + H^+$	3,9
Glu-γ-карбоксильная	$-(CH_2)_2COOH \rightleftharpoons -(CH_2)_2COO^- + H^+$	4,1
His-имидазольная		6,0
Cys-сульфгидрильная	$-CH_2SH \rightleftharpoons -CH_2S^- + H^+$	8,4
Tyr-фенольная		10,1
Lys-ε-аминогруппа	$-(CH_2)_4\overset{+}{N}H_3 \rightleftharpoons -(CH_2)_4NH_2 + H^+$	10,3
Arg-гуанидиновая	$-NH-C(=NH_2^+)-NH_2 \rightleftharpoons -NH-C(=NH)-NH_2 + H^+$	12,5

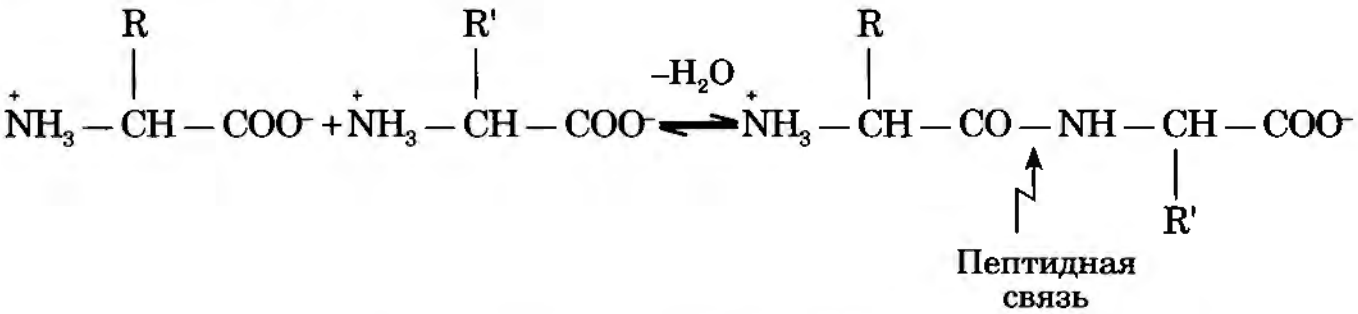
заряженных групп в белке влияет на его физические свойства, такие как растворимость в воде и электрофоретическая подвижность.

В отличие от аминокислот для белков изоионная и изоэлектрическая точки не совпадают. Ведь, по определению, изоионная точка — это значение pH, при котором молекула белка несет на себе одинаковое количество положительных и отрицательных зарядов, образующихся соответственно в результате присоединения протонов к основным группам и диссоциации кислотных групп. Изоэлектрическая точка соответствует значению pH, при котором белок неподвижен в электрическом поле. Для экспериментального определения электрофоретической подвижности белка его растворяют в буферной среде, содержащей катионы и анионы со сравнительно небольшой молекулярной массой, которые способны связываться с ионизованной молекулой белка. Таким образом, наблюдаемый в изоэлектрической точке баланс зарядов до некоторой степени определяется тем, что при данном pH связано больше подвижных катионов (анионов), чем анионов (катионов). Это может маскировать существующее неравенство зарядов на самой молекуле белка.

На практике молекулы белка всегда исследуют в буферных растворах, так что важное значение имеет именно их изоэлектрическая точка. В этой точке, в частности, белок имеет самую низкую растворимость, поскольку в таких условиях достигается максимальная возможность для притяжения противоположно заряженных групп соседних молекул и, как следствие, увеличивается вероятность образования агрегатов и преципитации.

8.2 СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

Белки образуются в результате конденсации α-аминогруппы одной аминокислоты (или иминогруппы пролина) с α-карбоксильной группой другой аминокислоты, что сопровождается потерей молекулы воды и образованием **пептидной связи**.



Последовательная конденсация множества молекул аминокислот приводит к образованию неразветвленной полипептидной цепи. По договоренности, началом цепи считают N-концевую аминокислоту, а ее концом — С-концевую аминокислоту (биосинтез белка протекает именно в этом направлении). Полипептидные цепи содержат от 20 до 2000 аминокислотных остатков, т. е. относительные молекулярные массы полипептидов лежат в диапазоне от 2000 до 200 000. Большинство белков имеют относительные молекулярные массы от 20 000 до 100 000. Не существует четкого разграничения между крупными пептидами и белками. Обычно аминокислотные цепи, содержащие менее 50 остатков, называют **пептидами**, а более

длинные — **белками**. Большинство белков состоит из многих сотен аминокислотных остатков (пример очень маленького белка — рибонуклеаза, состоящая всего из 103 аминокислотных остатков), а многие биологически активные пептиды содержат 20 аминокислотных остатков и даже меньше, например окситоцин (9 остатков), вазопрессин (9), энкефалины (5), гастрин (17), соматостатин (14), лютеинизирующий гормон (10).

Под **первичной структурой** белка понимают последовательность аминокислотных остатков, которая определяется последовательностью нуклеотидных оснований соответствующего гена. Первичная структура отражает аминокислотный состав белка (содержание каждой из 20 возможных аминокислот).

Пептидные связи, соединяющие между собой соседние аминокислотные остатки, очень прочные и четыре атома O, C, N, H лежат в одной плоскости, так что вращение вокруг связи азот–углерод невозможно. Дело в том, что в результате делокализации неподеленной пары электронов на атоме азота данная связь представляет собой нечто среднее между одинарной и двойной связями. Это свойство в сочетании с тетраэдрической геометрией связей вокруг каждого α-атома углерода оказывает определяющее влияние на трехмерную структуру полипептидной цепи.

Вторичная структура белка определяет строение отдельных участков полипептидной цепи, характеризующихся определенным способом укладки и образующихся благодаря водородным связям. Наиболее распространенные варианты вторичной структуры — α-спирали и β-слои. Некоторые из 20 аминокислот (такие, как пролин, изолейцин, триптофан и аспарагин) препятствуют образованию α-спиралей. В некоторых белках до 70% последовательности организовано во вторичные структуры, а в других белках таких структур нет вовсе.

Третичная структура белка отражает укладку полипептидной цепи в пространстве (пространственную организацию белковых молекул). Эта структура существует за счет электростатического притяжения противоположно заряженных групп (NH_3^+, COO^-), слабых вандерваальсовых сил, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и иногда **дисульфидных мостиков** (–S—S–), образующихся при окислении близко расположенных сульфгидрильных групп (–SH) остатков цистеина (рис. 8.1). Третичная структура белков такова, что внутри молекулы белка обычно сконцентрированы неполярные остатки **гидрофобных аминокислот**, таких как валин, лейцин и фенилаланин. Полярные ионизованные **гидрофильные остатки** обычно обращены наружу, где они контактируют с водным раствором. Однако на внешней поверхности некоторых белков также есть гидрофобные остатки, причем их наличие играет важную роль при фракционирования при помощи сульфата аммония (разд. 8.3.4) и гидрофобной хроматографии (разд. 8.3.4 и 11.4.3).

Понятие **четвертичной структуры** относится лишь к олигомерным белкам, представляющим собой комплексы двух или большего числа полипептидных цепей, которые удерживаются вместе за счет электростатических взаимодействий, вандерваальсовых сил и иногда дисульфидных мостиков. Таким образом, дисульфидные мостики могут существовать как

Рис. 8.1. Образование дисульфидного мостика

внутри одной полипептидной цепи, так и связывать между собой разные полипептидные цепи. Отдельные цепи олигомерного белка называют **субъединицами**. Субъединицы белка могут быть как идентичными, так и разными, например гемоглобин состоит из двух α- и двух β-цепей, а лактатдегидрогеназа — из четырех почти идентичных цепей.

По традиции все белки относят к одной из двух групп — **глобулярных** или **фибриллярных** белков. Глобулярные белки имеют почти сферическую форму, обычно хорошо растворимы в воде и могут содержать α-спирали, β-слои и участки, где вторичная структура отсутствует. Ферменты, транспортные белки и иммуноглобулины относятся к глобулярным белкам. К фибриллярным белкам относятся структурные белки; они обычно плохо растворяются в воде, имеют протяженную волокнистую структуру либо полностью спирального, либо полностью слоистого строения. В качестве примеров можно привести коллаген волос, фиброин шелка и коллаген. **Нативной структурой** белка называют его биологически активную форму.

Процесс **денатурации** белка приводит к потере его биологической активности, ухудшению растворимости в воде и повышенной чувствительности к протеолитическому гидролизу. Денатурация может быть вызвана нагреванием или воздействием щелочных или кислотных агентов, детергентов, органических растворителей и катионов тяжелых металлов, таких как ртуть и свинец. Денатурация сопровождается нарушением пространственной организации (третичной структуры) и приводит к контакту с водным окружением тех многочисленных гидрофобных групп, которые в нативном состоянии располагаются внутри молекулы белка.

Специфическая трехмерная структура ферментов характеризуется сближением в пространстве некоторых аминокислотных остатков, образующих так называемый активный, или каталитический, центр. Ферменты с олигомерной структурой могут иметь несколько таких центров. Некоторые ферменты, кроме того, обладают одним или несколькими регуляторными участками. Методом рентгеновской кристаллографии было показано, что активный центр в ферментах часто расположен в углублении, выстланном остатками гидрофобных аминокислот, но содержащем несколько полярных остатков. Связывание субстрата в активном центре и его дальнейшее превращение в продукт требует участия различных аминокислотных остатков.

Олигомерные ферменты, существующие в виде нескольких форм, называют **изоферментами** или **изозимами** (разд. 15.1). Их существование объясняется наличием нескольких генов, кодирующих похожие, но неидентичные структуры. Один из наиболее известных примеров — лактатдегидрогеназа, которая осуществляет обратимые взаимопревращения пирувата и лактата. Этот фермент представляет собой тетрамер, существующий в виде пяти форм (от ЛДГ1 до ЛДГ5), которые образуются в результате перестановки двух типов субъединиц (Н и М), различающихся одной-единственной аминокислотой:

H_4	ЛДГ1
H_3M	ЛДГ2
H_2M_2	ЛДГ3
HM_3	ЛДГ4
M_4	ЛДГ5

Все изоферменты катализируют одну и ту же реакцию, но с разными константами K_m и V_{max}, имеют разную термостабильность и электрофоретическую подвижность. Часто различается распределение изоферментов в тканях организма, например у человека ЛДГ1 — доминирующая форма фермента в сердечной мышце, а ЛДГ5 — в печени и мышцах. Эти различия используются для диагностики специфических повреждений органов, например инфаркта миокарда.

8.2.1 Посттрансляционная модификация

Белки синтезируются на рибосомах; по мере выхода растущей полипептидной цепи из рибосом она сразу приобретает свою нативную трехмерную структуру. Однако формирование структуры белка не этом не завершается. Многие белки претерпевают изменения после того, как покинут рибосомы, некоторые аминокислотные остатки модифицируются путем присоединения дополнительных химических групп; этот процесс называют **посттрансляционной модификацией**. Изменения при такой модификации могут быть достаточно существенными, например добавление углеводных цепей с образованием гликопротеинов (см. разд. 8.4.4), при этом конечный продукт может содержать до 40% углеводов. Менее драматичное, но также очень важное изменение состоит в присоединении гидроксильной группы к пролину с образованием гидроксипролина (обнаружен в структуре коллагена) или в фосфорилировании одной или нескольких аминокислот (тирозина, серина или треонина). Известно много случаев, когда присоединение одной-единственной фосфатной группы (под действием фермента киназы) может активировать молекулу, а ее удаление (под действием фосфорилазы) — инактивировать молекулу. Реакции фосфорилирования белков играют важнейшую роль в передаче сигналов в клетке (разд. 16.5 и 16.6). Еще один пример — посттрансляционная модификация остатка пролина в факторе транскрипции HIF (α-субъединица фактора, индуцируемого при гипоксии), который опо-

средует клеточные механизмы при кислородной недостаточности. Таким образом, до осуществления посттрансляционной модификации многие белки не существуют в окончательном, активном состоянии. Известно более 200 видов посттрансляционной модификации в клетках микроорганизмов, растений и животных. Для изучения подобных процессов применяется метод масс-спектрометрии (см. разд. 9.5.6).

8.3 ОЧИСТКА БЕЛКОВ

8.3.1 Введение

На первый взгляд выделение и очистка *одного* белка из гомогената клеток или тканей, обычно содержащего 10 000–20 000 различных белков, — весьма трудная задача. Однако на практике для выделения конкретного белка требуются лишь четыре (в среднем) различные стадии очистки. А в отдельных исключительных случаях удается выделять белок всего лишь в результате одной хроматографической стадии очистки. Требуемая степень чистоты белка определяется дальнейшими задачами и, возможно, для каких-то целей вовсе не нужен полностью очищенный 100%-й белок. На самом деле совсем не просто дать определение «чистого» белка. Теоретически белок следует называть чистым, если в его препарате содержится лишь один вид белка, хотя на практике достичь 100%-й чистоты практически невозможно. К счастью, многие исследования можно проводить с белком, содержащим 5–10% белковых примесей. Такие возможности необходимо учитывать при исследованиях, чтобы избежать потерь целевого белка, которые неизбежно происходят на каждой стадии очистки. Дополнительная (и вовсе не обязательная) стадия очистки, которая повысит чистоту препарата, скажем, от 90 до 98%, может привести к тому, что полученного белка не хватит для дальнейших исследований. В некоторых случаях лучше иметь очищенный на 90% белок, но в достаточном для работы количестве!

Например, при количественном определении аминокислотной последовательности вполне подходит белковый препарат 90%-й чистоты; при этом необходимо убедиться, что найденная последовательность не относится к белковой примеси. Аналогичным образом, при иммунизации грызунов с целью получения клеток печени для выделения моноклональных антител (разд. 7.2.3) вполне достаточно 50%-й чистоты препарата. Если белок вызывает иммунный ответ, то совсем не важно, что на белки из примеси также вырабатываются антитела. Для определения кинетических параметров фермента можно использовать сравнительно мало очищенные препараты при условии отсутствия в них конкурирующих активностей. В то же время для получения в животных специфических поликлональных антител (см. разд. 7.2.3) в качестве антигена следует использовать высокоочищенный белок, в противном случае иммуногенные белковые примеси будут приводить к возникновению дополнительных антител. Белки, имеющие терапевтическое применение, должны быть абсолютно чистыми, чтобы удовлетворять установленным требова-

ниям безопасности. Короче говоря, степень очистки белка определяется дальнейшими исследованиями.

8.3.2 Определение концентрации белка

Необходимость определить концентрацию белка в растворе возникает регулярно в процессе очистки белка. Единственный действительно точный метод определения концентрации белка состоит в проведении кислотного гидролиза образца с последующим аминокислотным анализом гидролизата (см. разд. 8.4.2). Однако данная процедура отнимает довольно много времени, особенно если необходимо проанализировать целый ряд образцов. К счастью, на практике весьма редко возникает необходимость знать концентрацию с точностью до десятых, зато существуют другие, гораздо более быстрые методы сравнительно точного определения концентрации белка. Большая часть этих методов (см. ниже) — колориметрические: аликвота образца реагирует с определенным реагентом, приводя к образованию окрашенного продукта. Количество этого окрашенного продукта затем определяют спектрофотометрическим методом, а количество белка находят по градуировочной кривой. Ни один из таких методов не дает абсолютных значений, поскольку, как будет обсуждаться далее, развитие окраски в определенной степени зависит от аминокислотного состава белка. На результаты колориметрического анализа, кроме того, влияет наличие простетических групп (например, углеводной природы). Многие исследователи для построения градуировочной кривой используют бычий сывороточный альбумин (БСА), как достаточно дешевый, хорошо очищенный и всегда доступный. Однако следует помнить, что аминокислотный состав БСА отличается от аминокислотного состава анализируемого белка, так что концентрации белков, найденные с помощью такой градуировочной кривой, лишь приблизительные.

Поглощение в ультрафиолетовом диапазоне

Максимум поглощения остатков ароматических аминокислот тирозина и триптофана в белках приходится на длину волны 280 нм. Поскольку содержание этих аминокислот в белках различно, различаются и коэффициенты экстинкции отдельных белков. Однако для большинства белков коэффициент экстинкции находится в диапазоне 0,4–1,5. В связи с этим для смеси белков со вполне удовлетворительной точностью можно сказать, что раствор с поглощением 1,0 при 280 нм (A_{280}) в кювете с длиной светового пути 1 см имеет концентрацию белка приблизительно 1 мг/см^3. Данный метод довольно чувствителен, позволяет определять концентрацию вплоть до 10 мкг/см^3 и, в отличие от колориметрических методов, не приводит к потере белка, т. е. после измерения белок из кюветы можно использовать далее. Это особенно важно в тех случаях, когда белка мало и выбрасывать его — непозволительная роскошь. Однако на результаты измерения влияют вещества, поглощающие при 280 нм. В эту категорию веществ попадают нуклеиновые кислоты, поглощение которых при этой длине волны в 10 раз превосходит поглощение белков. В результате присутствие даже очень

небольшого количества нуклеиновой кислоты значительно исказит результат определения. Разрешить данную проблему можно, если проводить измерения при двух длинах волн — 260 и 280 нм и ввести поправку:

$$\text{Белок (мг/см}^{-3}) = 1{,}55A_{280} - 0{,}76A_{260}$$

Большим преимуществом данного метода является его недеструктивный характер и возможность непрерывного проведения измерений, например определение концентрации белка в элюате после проведения хроматографии.

Еще большей чувствительности можно достичь, если измерять поглощение ультрафиолетового света пептидными связями. Пептидная связь сильно поглощает в дальней ультрафиолетовой области с максимумом поглощения около 190 нм. Однако из-за того, что на этой длине волны поглощает кислород, а обычные спектрофотометры в этой области обладают низкой чувствительностью, измерения обычно проводят при 205 или 210 нм. Раствор большинства белков с концентрацией 1 мкг/см^3 имеет коэффициент экстинкции около 30 при 205 нм и около 20 при 210 нм. Понятно, что при этих длинах волн измерения в 20–30 раз более чувствительны, чем при 280 нм, что позволяет определять концентрации белков менее 1 мкг/см^3. Недостатком работы в этом диапазоне длин волн является то, что ряд буферов и их компонентов, часто используемых при работе с белками, также сильно поглощают в этой области, так что работать при таких условиях не всегда удобно.

Все современные системы для колоночной хроматографии (такие как FPLC или ВЭЖХ) имеют встроенные детекторы, работающие в различных диапазонах длин волн, которые позволяют следить за концентрацией белка в элюате.

Метод Лоури (метод Фолина–Чиокальто)

Ранее это был самый распространенный метод определения концентрации белка, но сегодня его вытесняют другие, более чувствительные методы (см. ниже). Метод Лоури достаточно чувствителен и позволяет определять белок в концентрации до 10 мкг/см^3; чувствительность этого метода практически одинакова для разных белков. При смешивании реактива Фолина (смесь вольфрамата, молибдата и фосфата натрия) с раствором сульфата меди и раствором белка появляется сине-пурпурная окраска, интенсивность которой можно измерить при 660 нм и благодаря этому провести количественное определение белка. Как и в других колориметрических методах, нужно следить за тем, чтобы в растворе отсутствовали мешающие вещества. В методе Лоури мешают Tris, такие цвиттер-ионные буферы как Pipes и Hepes, а также ЭДТА. Метод Лоури основан на двух реакциях: **биуретовой реакции** в щелочной среде — взаимодействие между пептидными связями белков и Cu^{2+} с образованием Cu^{+}, который далее вступает в реакцию с реагентом Фолина, и **реакции Фолина–Чиокальто**, которая изучена не до конца, но по сути заключается в восстановлении фосфомолибдовольфрамата до молибденовой сини за счет катализируемого медью окисления ароматических аминокислот. Образующееся в результате устойчивое синее окрашивание в определенной степени зависит от содержания в белке остатков тирозина и триптофана.

Метод с бицинхониновой кислотой

Этот метод имеет сходство с методом Лоури — здесь также происходит превращение Cu^{2+} в Cu^{+} в щелочной среде. Далее Cu^{+} вступает в реакцию с бицинхониновой кислотой, в результате чего развивается интенсивная пурпурная окраска с максимумом поглощения при 562 нм. Метод более чувствителен, чем метод Лоури, так что удается определять белок вплоть до концентрации 0,5 мкг/см^3, но, что более важно, результаты определения данным методом меньше зависят от присутствия веществ, мешающих в методе Лоури. В этой связи популярность данного метода возрастает.

Метод Бредфорд

Метод основан на связывании белком красителя кумасси бриллиантового синего. При низких значениях pH свободный краситель имеет два максимума поглощения: при 470 и 650 нм, но максимум поглощения связанного с белком красителя приходится на 595 нм. Практическим преимуществом метода является простота приготовления реагента, а также быстрота развития окраски и ее устойчивость. Хотя метод позволяет определять до 20 мкг белка/см^3, этот метод является лишь относительным, поскольку количество связанного красителя зависит от содержания в белке основных аминокислот — аргинина и лизина. Это усложняет выбор стандартов. Кроме того, многие белки плохо растворяются в кислой реакционной среде.

Метод Кьельдаля

Это химический метод определения азота в любых веществах. Его обычно не используют для анализа очищенных белков или мониторинга хроматографического разделения, но часто применяют при анализе сложных твердых образцов и микробиологических образцов на содержание в них белка. Образец подвергают разложению при кипячении с концентрированной серной кислотой в присутствии сульфата натрия, который добавляют (для повышения температуры кипения реакционной смеси и медного или селенового катализатора. В результате весь органический азот переходит в аммиак, который связывается в сульфат аммония. Завершение полного разложения образца обычно определяют по образованию прозрачного раствора. Аммиак высвобождается при добавлении избытка гидроксида натрия и удаляется путем перегонки с водяным паром в специальном аппарате для отгонки аммиака. Его собирают в раствор борной кислоты и титруют стандартной соляной кислотой по индикатору метиленовому синему. Данный процесс можно вести в автоматическом режиме в специальном аппарате. В другом варианте для прямого определения содержания ионов аммония в гидролизате можно использовать селективный электрод (разд. 1.5.2). Хотя метод Кьельдаля — точный и воспроизводимый метод определения азота, измерение количества белка в исходном образце затрудняется из-за вариабельности содержания азота в различных белках и из-за присутствия азота в таких примесях, как ДНК. На практике содержание азота в белках обычно составляет 16% масс.

Пример 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА**

Вопрос Приготовили серию разведений бычьего сывороточного альбумина (БСА) и взяли по 0,1 см^3 каждого из растворов для анализа по методу Бредфорд. В каждом случае определяли повышение поглощения при 595 нм по отношению к соответствующему контрольному раствору. Результаты измерений представлены в таблице.

Концентрация БСА, мг/см^3	A_{595}
1,5	1,40
1,0	0,97
0,8	0,79
0,6	0,59
0,4	0,37
0,2	0,17

В том же анализе поглощение белкового экстракта A_{595} из клеток *E. coli* (0,1 см^3) составило 0,84. Какова концентрация белка в экстракте *E. coli*?

Ответ График зависимости A_{595} от концентрации БСА имеет линейный вид. Из графика находим, что при A_{595} = 0,84 концентрация белка в экстракте клеток *E. coli* составляет 0,85 мг/см^3.

8.3.3 Разрушение клеток и получение грубого экстракта

На первой стадии выделения любого белка, естественно, необходимо разрушить исходную ткань, чтобы высвободить белки из клеток. Способ разрушения ткани зависит от типа клеток (см. ниже), но в первую очередь следует задуматься о составе буфера для экстракции белка.

Буфер для экстракции белков

Обычно буферы для экстракции белков имеют ионную силу 0,1–0,2 М и pH 7,0–8,0, что близко к условиям в клетке. Чаще всего применяют Tris или фосфатный буфер. Кроме того, буфер может содержать множество различных добавок.

- *Антиоксиданты.* Внутри клетки белки находятся в строго восстановительных условиях, а после разрушения клетки попадают в более окисленную среду. Большинство белков имеют несколько сульфгидрильных групп (из остатка цистеина), способных окисляться с образованием внутри- и межмолекулярных дисульфидных мостиков. Чтобы этого избежать, в буфер часто добавляют восстанавливающие агенты, такие как дитиотрейтол, β-меркаптоэтанол, цистеин или восстановленный глутатион.
- *Ингибиторы ферментов.* Как только клетка разрушена, ее содержимое может подвергаться воздействию протеолитических ферментов (например, из лизосом), которые в интактной клетке были специальным образом упакованы и действие которых строго контролировалось. Эти ферменты способны разрушить белки, в том числе и целевой белок. Для

ослабления нежелательного протеолиза экстракцию и все стадии очистки проводят при 4 °С в присутствии ингибиторов протеаз. Каждый ингибитор специфичен к определенному типу протеаз — сериновых, тиоловых, аспартат-протеаз и металлопротеаз. Среди часто применяемых ингибиторов можно назвать ингибиторы сериновых протеаз диизопропилфторфосфат (DFP), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и тозилфенилаланинхлорметилкетон (TPCK), ингибиторы тиоловых протеаз иодоацетат и цистатин, ингибитор аспарат-протеазы пепстатин, ингибиторы металлопротеаз ЭДТА и 1,10-фенантролин, ингибиторы экзопептидаз амастатин и бестатин.

- *Субстраты и кофакторы ферментов.* При выделении ферментов в стартовый буфер часто добавляют небольшое количество субстрата, поскольку связывание субстрата в активном центре фермента может стабилизировать фермент. Кроме того, добавляют и кофакторы ферментов, которые могут быть потеряны в процессе очистки. Все это позволяет измерять активность фермента на различных этапах выделения, например в хроматографических фракциях.
- *ЭДТА.* Этот реагент добавляют в буфер для связывания ионов двухвалентных металлов, которые могут реагировать с тиогруппами белков, образуя меркаптиды:

$$R — SH + Me^{2+} \rightarrow R — S — Me^{+} + H^{+}$$

- *Поливинилпирролидон (ПВП)* часто добавляют в буфер при экстракции белков из растительных тканей. Растения содержат довольно много фенольных производных (как мономерных — типа *n*-гидроксибензойной кислоты, так и полимерных — типа таннинов), способных связываться с ферментами и другими белками путем гидрофобных и ионных взаимодействий, а также водородных связей, что может приводить к выпадению белка в осадок. Фенольные производные, кроме того, легко окисляются (главным образом под действием эндогенных фенолоксидаз) с образованием хинонов, которые являются очень активными веществами и могут реагировать с реакционноспособными группами белка, вызывая образование перекрестных сшивок, агрегатов и осадка. Нерастворимый ПВП (имитирующий полипептидную цепь) связывает фенольные соединения, которые затем легко удаляются при центрифугировании. Для снижения активности фенолоксидаз и предотвращения образования хинонов в буфер также добавляют тиосоединения (в качестве восстанавливающих агентов).
- *Азид натрия.* В буфер, который предполагается хранить продолжительное время, добавляют антибактериальные и противогрибковые агенты в низких концентрациях. Азид натрия часто используют в качестве **бактериостатического средства**.

Мембранные белки

Связанные с мембраной белки (обычно гликопротеины) требуют особых условий выделения, поскольку при обычной процедуре разрушения клеток они не высвобождаются. Существует два класса мембранных белков.

Периферические мембранные белки связаны лишь с поверхностью клетки, обычно за счет электростатических взаимодействий и водородных связей. Обычно эти белки имеют гидрофильную природу и их относительно легко экстрагировать либо путем повышения концентрации соли в буфере (например, добавляя 1 M NaCl), либо путем изменения pH (до 3–5 или 9–12). После экстракции такие белки можно подвергать очистке в соответствии со стандартной хроматографической схемой выделения. **Интегральные мембранные белки** глубоко внедрены в мембрану. Они обязательно имеют протяженные гидрофобные участки (именно эти участки внедрены в мембрану и связаны с липидными слоями) и характеризуются слабой растворимостью в водных растворах. Следовательно, после экстракции в полярную водную среду необходимо создать условия для поддержания таких белков в растворенном состоянии. Для этого в экстрагирующий буфер обычно добавляют детергент. Выбор детергента часто осуществляется экспериментальным путем; среди ионных детергентов можно назвать додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметиламмония (CTAB) и CHAPS, а среди неионных детергентов — Triton X-100 и Nonidet P-40.

После экстракции интегральные мембранные белки можно подвергать очистке с помощью обычных хроматографических методов, таких как гельфильтрация, ионообменная или аффинная хроматография (с помощью лектинов). Однако в любом случае во все буферы необходимо добавлять детергент для поддержания белков в растворенном состоянии. Количество детергента в процессе очистки обычно в 10–100 раз ниже того, что использовалось при экстракции белка (чтобы минимизировать влияние детергента на ход хроматографического разделения).

Разрушение клеток

Во всех случаях, за исключением тех, когда белок выделяют из внеклеточных жидкостей (таких, как кровь), очистку белка следует начать с разрушения клеток или тканей, чтобы перевести содержимое клетки в подходящий буфер. Таким образом, этот первичный экстракт является отправной «точкой» для очистки белка. В качестве исходного материала лучше выбирать ткани или клетки, содержащие максимальное количество целевого белка. Этим исходным материалом может быть микробная культура, растительная или животная ткань. Ранее по возможности предпочтение отдавалось тканям млекопитающих, поскольку из них можно получить большее количество материала. Однако теперь, когда существует возможность клонировать и экспрессировать в клетках дрожжей или бактерий гены белков из любого источника, все большее число методик очистки начинается с получения лизата микробных клеток. Ниже перечислены методы разрушения клеток. Выбор метода в каждом конкретном случае определяется природой клеточной стенки/мембраны, которую предстоит разрушить.

Клетки млекопитающих имеют диаметр ~10 мкм и заключены в плазматическую мембрану, лишь до некоторой степени укрепленную цито-

скелетом. Эти клетки непрочные и легко разрушаются при приложении силы сдвига.

Растительные клетки имеют диаметр ~100 мкм; их плазматическая мембрана окружена довольно прочной клеточной стенкой, состоящей из комплексов углеводов и лигнина или смолы. Хотя плазматическая мембрана защищена этим внешним слоем, большой размер клеток делает их чувствительными к воздействию силы сдвига.

Бактерии имеют диаметр от 1 до 4 мкм и обычно окружены чрезвычайно прочной клеточной стенкой. В зависимости от того, окрашивается бактериальная клетка по методу Грама (смесью кристаллического фиолетового и иода) или нет, клетки бактерий подразделяют на **грамположительные** и **грамотрицательные**. У грамположительных бактерий (рис. 8.2) плазматическая мембрана окружена плотным слоем пептидогликана толщиной 20–50 нм, который окрашивается по методу Грама. Плазматическая мембрана грамотрицательных бактерий (например, *Escherichia coli*) окружена тонким слоем пептидогликана (2–3 нм), но зато клетка имеет еще одну внешнюю мембрану, состоящую из липополисахаридов. Полимерные отрицательно заряженные липополисахариды взаимодействуют между собой через двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+}. Некоторые грамотрицательные бактерии секретируют белки в **периплазматическое пространство**.

Грибы и дрожжи. Нитчатые грибы и дрожжи имеют жесткую клеточную стенку, на 80–90% состоящую из полисахаридов. У низших грибов и дрожжей основными полисахаридами являются маннан и глюкан, у нитчатых

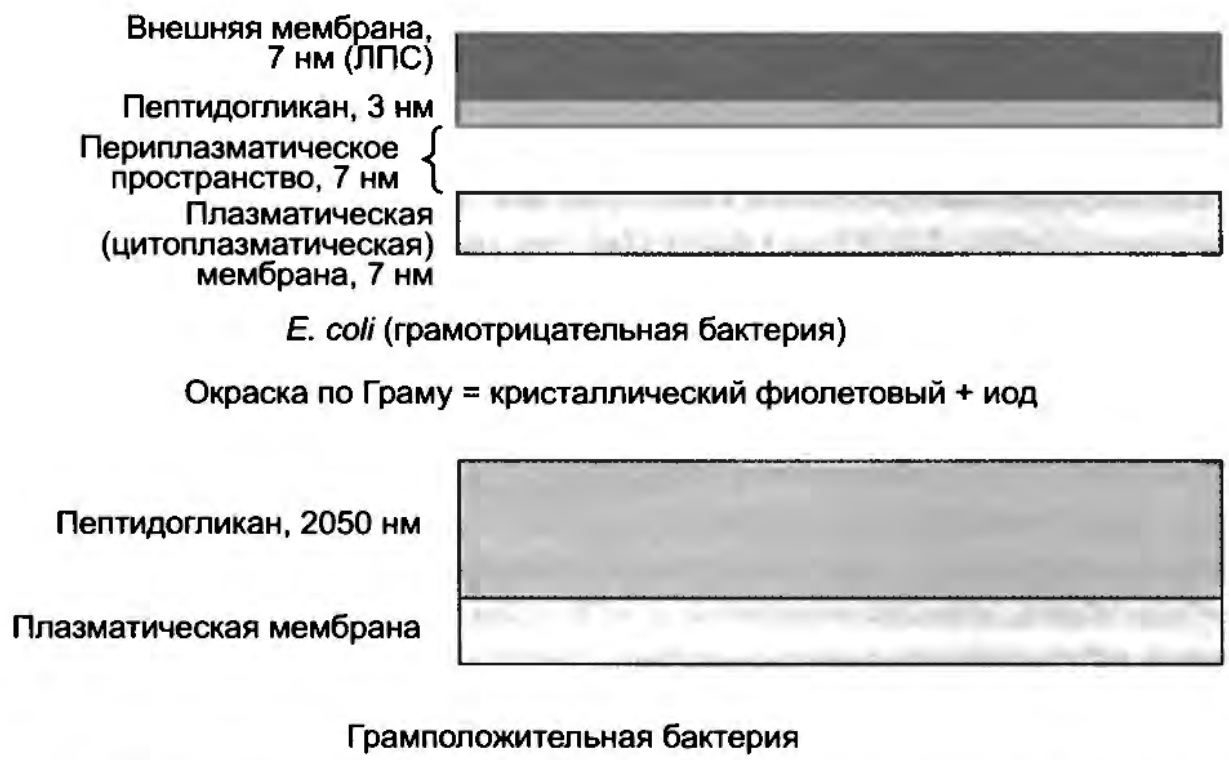


Рис. 8.2. Строение клеточной стенки грамположительной и грамотрицательной бактерий; ЛПС — липополисахарид

грибов — хитин с перекрестными сшивками из глюкана. Клеточная стенка дрожжей, кроме того, содержит небольшое количество гликопротеинов; между клеточной стенкой и клеточной мембраной дрожжей имеется периплазматическое пространство.

Методы разрушения клеток

Блендеры. Существуют специальные блендеры для разрушения клеток, хотя для этой цели можно использовать обычный кухонный блендер. Данный способ идеально подходит для разрушения тканей млекопитающих и растений под действием силы сдвига. Ткань разрезают на мелкие кусочки и измельчают блендером в буфере (для разрушения ткани достаточно одной минуты), а затем центрифугируют для удаления дебриса. Метод не подходит для бактерий и дрожжей, но разрушения этих клеток можно достичь, если измельчать их в блендере в присутствии мелких стеклянных шариков — в своеобразной **шаровой мельнице**. Мембраны клеток, попадающих между сталкивающимися шариками, физически разрываются под действием силы сдвига.

Растирание с абразивными материалами. Бактериальные и растительные клетки можно разрушить, растирая их пестиком в ступке с песком или глиноземом и небольшим количеством буфера — клеточные стенки разрываются под действием абразивного материала. Однако этот метод пригоден лишь для небольших количеств образца. Крупномасштабным механическим вариантом данного метода является использование мельницы Dyno-mill. Мельница состоит из камеры со стеклянными шариками и несколькими вращающимися лопастными дисками. Клетки разрываются, попадая в пространство между сталкивающимися шариками. Лабораторная модель этой мельницы объемом 600 мл может обрабатывать до 5 кг бактерий за час.

Прессы. Прессы типа **френч-прессов** или более крупномасштабной версии Manton-Gaulin Press прекрасно подходят для разрушения микробных клеток. Суспензия клеток (около 50 мл) продавливается под высоким давлением (10 000 ПСИ* ≈ 1450 кПа) сквозь небольшие отверстия насосом пистонного типа. Разрушение происходит в результате действия сил сдвига при продавливании клеток сквозь маленькие отверстия, а также из-за быстрого падения давления при выходе клеток из отверстий — ранее прижатые друг к другу клетки быстро высвобождаются и лопаются. Для достижения полного лизиса всех клеток обычно требуется несколько пассажей, но при правильном контроле удается селективно выделить белки из периплазматического пространства. Варианты данного метода — X-Press и Hughes Press; сквозь отверстия продавливают замороженную пасту из клеток и абразивного материала. Кристаллы льда и абразивное вещество способствуют разрушению клеток.

---

* ПСИ — аббревиатура для единицы давления «фунт на квадратный дюйм», 1 ПСИ = 0071 кг/см^2. — *Прим. перев.*

Ферментативные методы. Фермент лизоцим, выделенный из куриного белка, расщепляет пептидогликаны. Таким образом, состоящая из пептидогликана клеточная стенка грамположительных бактерий (рис. 8.2) может быть удалена под действием лизоцима. Если осуществлять процесс в подходящем буфере, то после разрушения клеточной стенки клеточная мембрана сама разорвется из-за осмотического эффекта буфера.

Грамотрицательные бактерии также можно разрушить с помощью лизоцима, однако при этом необходимо присутствие ЭДТА (для удаления Ca^{2+}; в результате дестабилизируется внешний липополисахаридный слой) и неионного детергента (для солюбилизации клеточной мембраны). Подобное воздействие делает внешнюю мембрану проницаемой для лизоцима, который может атаковать слой пептидогликана. При выполнении данной процедуры в изотоническом буфере (чтобы не допустить разрушения цитоплазматической мембраны) можно селективным образом выделить белки из периплазматического пространства.

Для разрушения клеточной стенки дрожжей также используют ферменты, а для плазматические мембраны разрушают под действием осмотического шока или сравнительно небольшого физического усилия. Использование только одного фермента позволяет селективно выделять белок из периплазматического пространства. В качестве ферментных препаратов чаще всего применяют зимолиазу или литиказу; основной активностью обоих препаратов является β-1,3-глюканазная активность в сочетании с протеолитической активностью, специфической для клеточной стенки дрожжей. Для разрушения нитчатых грибов обычно используют хитиназу. Ферментативные методы обычно применяют в лабораторных условиях, для крупномасштабных процессов они слишком дороги.

Ультразвук. Этот метод идеально подходит для обработки суспензии клеточных культур или микробных клеток. Зонд ультразвукового аппарата погружают в суспензию клеток и обрабатывают ее звуковой волной высокой частоты (> 20 кГц) в течение 30–60 с. Звуковая волна разрушает клетки путем создания сил сдвига и зон **кавитации**. Зоны кавитации — это области быстро сменяющегося сжатия и разрежения. Появляющиеся в буфере пузырьки газа находятся под давлением, но распространяющаяся при их декомпрессии ударная волна разрушает клетки. Этот метод пригоден для обработки относительно небольших объемов суспензии (50–100 мл). Поскольку при обработке клеток ультразвуком выделяется довольно много тепла, при проведении разрушения клеток образец необходимо держать в ледяной бане.

8.3.4 Методы фракционирования

Мониторинг очистки белка

Как мы увидим далее, очистку белка невозможно себе представить без хроматографического разделения, а результатом каждой хроматографической стадии является довольно большое количество пробирок (фракций), содержащих буфер и раствор сошедшего с колонки белка. Для построения профиля элюирования белка (графика зависимости концентрации белка от номера пробирки) необходимо определить содержание белка в каждой про-

бирке. Методы количественного определения белка описаны в разд. 8.3.2. Кроме того, необходимо подобрать метод обнаружения целевого белка для того, чтобы объединить все содержащие его фракции и приступить к дальнейшей очистке. Если речь идет об очистке фермента, то сделать это довольно просто, поскольку нужно лишь измерить активность фермента в каждой пробирке (разд. 15.2.2).

Для белков, не имеющих легко детектируемой биологической активности, следует найти другой подход. Если существуют антитела против целевого белка, следует нанести образец из каждой пробирки на нитроцеллюлозную мембрану и провести дот-блот-анализ (разд. 5.9.2) для обнаружения белка. Кроме того, белок можно обнаружить с помощью метода ELISA или радиоиммуноанализа (разд. 7.7). Если антител к целевому белку нет, следует провести электрофоретическое разделение в геле всех хроматографических фракций; целевой белок можно идентифицировать по наличию полосы с соответствующей молекулярной массой (разд. 10.3.1).

Альтернативный подход, который применяют к клонированным генам, заключается в экспрессии целевого белка в виде слитого белка, т. е. соединенного короткой пептидной последовательностью с другим белком. Этот подход может помочь в проведении очистки белка (см. разд. 8.3.5) и, кроме того, может оказаться чрезвычайно полезным для мониторинга очистки белка, не имеющего легко определяемой активности. Если второй белок является ферментом, его легко детектировать (в частности, можно использовать простой колориметрический метод; например, если этот белок — β-галактозидаза, целевой белок находят по наличию β-галактозидазной активности).

Результат той или иной стадии очистки оценивают по возрастанию удельной активности; **удельной активностью фермента** называется отношение общей активности препарата к концентрации белка в нем:

$$\text{Удельная активность} = \frac{\text{общая ферментативная активность фракции}}{\text{количество белка во фракции}}$$

Определение ферментативной активности основано на кинетических закономерностях и требует применения подходящего аналитического метода (см. разд. 15.2.2).

Количество фермента во фракции или в образце традиционно выражают не в единицах массы или в молях, а в единицах, связанных со скоростью катализируемой этим ферментом реакции. Международная единица ферментативной активности (МЕ) определяется как количество фермента, превращающего 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин при определенных условиях (обычно при 25 или 30 °С и при оптимальном pH). В единицах СИ единица активности фермента равна количеству фермента, превращающего 1 моль субстрата в продукт за 1 с. Эта величина называется каталом (кат): 1 кат = $6 \cdot 10^7$ МЕ, 1 МЕ = $1{,}7 \cdot 10^{-8}$ кат. Активность некоторых ферментов, в частности тех, чьим субстратом является макромолекула с неизвестной молекулярной массой (амилаза, пепсин, РНКаза, ДНКаза), нельзя выразить ни в одной из названных единиц. В подобных случаях используют единицы, основанные на наблюдаемом изменении химического или физического свойства субстрата.

Таким образом, стадия очистки считается успешной, если после ее проведения удельная активность фермента выше, чем была до нее. Степень очистки определяют следующим образом:

$$\text{Степень очистки} = \frac{\text{удельная активность фракции}}{\text{исходная удельная активность}}$$

Кроме того, каждая стадия очистки характеризуется еще и выходом продукта. Бессмысленно стремиться к повышению удельной активности, теряя при этом 95% искомого белка. Выход продукта на конкретной стадии описывается следующим выражением:

$$\text{Выход} = \frac{\text{активность фермента во фракции}}{\text{активность фермента в исходном образце}}$$

Выход 70% и выше на каждой стадии очистки считается вполне приемлемым. В табл. 8.3 показаны изменения удельной активности и выхода препарата в процессе очистки.

Предварительная очистка

Первичный экстракт, полученный в результате разрушения клеток и тканей и называемый **гомогенатом**, неизбежно содержит нерастворимые вещества. Например, в случае тканей млекопитающих эти нерастворимые вещества представляют собой не полностью гомогенизированную соединительную или сосудистую ткань, а небольшие фрагменты неразрушенной ткани. Их проще всего удалить путем фильтрации через двойной слой марли или путем центрифугирования на малой скорости (5000 ***g***). Плавающие на поверхности капли жира можно удалить фильтрацией через стекловату или марлю. Однако полученный раствор все еще мутный из-за находящихся в нем органелл и мелких фрагментов, размер которых слишком мал, чтобы их удавалось отделить механическим способом. Часто наличие подобных частиц не мешает ходу очистки, поскольку они удаляются на первой же стадии выделения белка, например при высаливании. Но если нужно, их можно предварительно удалить осаждением с помощью таких материалов, как Celit (цеолит с большой площадью поверхности, позволяющей захватывать мелкие частицы), адсорбент на основе целлюлозы Cell Debris Remover (CDR), а также целого ряда флокулянтов типа крахмала, смол, таннинов или полиаминов; образующийся осадок удаляют путем центрифугирования или фильтрации.

Понятно, что клеточный экстракт содержит не только белки, но также большое количество других молекул: ДНК, РНК, углеводов и липидов, а также различных низкомолекулярных метаболитов. Небольшие молекулы обычно удаляются позднее при проведении диализа или разделения на основании молекулярных масс компонентов (например, гель-фильтрации), так что о них мы на данном этапе говорить не будем. А вот на отделение таких макромолекул, как нуклеиновые кислоты и полисахариды, следует обратить особое внимание. Особенно это важно в случае экстрактов бактериальных клеток, которые обладают повышенной вязкостью из-за наличия в растворе хромосомной ДНК, так что часто экстракты микробных клеток

Таблица 8.3. **Пример схемы выделения белка**

Фракция	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общий белок, мг	Активность[а], МЕ/мл	Общая активность, МЕ	Удельная активность, МЕ/мг	Степень очистки	Общий выход[в], %
Гомогенат	8500	40	340 000	1,8	15 300	0,045	1	100
45–70% $(NH_4)_2SO_4$	530	194	103 000	23,3	12 350	0,12	2,7	81
СМ-целлюлоза	420	19,5	8 190	25	10 500	1,28	28,4	69
Аффинная хроматография	48	2,2	105,6	198	9500	88,4	1964	62
DEAE-сефароза	12	2,3	27,6	633	7600	275	6110	50

[а] МЕ — международная единица, соответствующая количеству фермента, образующему 1 мкмоль продукта в минуту при стандартных условиях

[б] Степень очистки = удельная активность фракции/удельная активность гомогената

[в] Общий выход = общая активность фракции/общая активность гомогената

Воспроизводится из *Methods in Molecular Biology*, **59**, *Protein Purification Protocols*, ed. S. Doonan (1966), Humana Press Inc. Totowa, NJ.

бывает очень трудно разделять путем центрифугирования. Иногда в экстракционный буфер добавляют ДНКазу I, что позволяет несколько уменьшить вязкость раствора; образующиеся при этом более мелкие фрагменты ДНК удаляются позднее при диализе или гель-фильтрации. Аналогичным образом, для удаления РНК можно использовать РНКазу. Кроме того, ДНК и РНК можно отделить путем осаждения с протаминсульфатом. Протаминсульфат представляет собой смесь небольших основных (т. е. положительно заряженных) белков, естественная функция которых состоит в связывании ДНК в головке сперматозоида. Протамины обычно выделяют из органов рыб, являющихся отходами при производстве рыбных консервов. Эти положительно заряженные белки связывают отрицательно заряженные фосфатные группы нуклеиновых кислот, нейтрализуя заряды на молекулах ДНК и РНК, в результате чего те выпадают в осадок. Таким образом, добавление к клеточному экстракту раствора протамина приведет к осаждению большей части молекул ДНК и РНК, которые затем можно удалить путем центрифугирования. Еще один путь — использование полиэтиленимина (синтетического длинноцепочечного положительно заряженного полимера с молекулярной массой 24 кДа). Он также связывает фосфатные группы нуклеиновых кислот и действует очень эффективно, вызывая почти мгновенное осаждение ДНК и РНК. В случае экстрактов бактериальных клеток могут возникнуть сложности в связи с наличием углеводной оболочки, которая может мешать осаждению белков. В подобных случаях следует полностью осадить весь белок с помощью сульфата аммония (см. ниже); при этом углеводы остаются в растворе. Далее белок отделяют путем центрифугирования и вновь растворяют в буфере. Если для разрушения клеток применяют лизоцим в сочетании с детергентом (см. разд. 8.3.3), подобной проблемы не возникает, так как углеводная оболочка разрушается под действием лизоцима.

Осветленный клеточный экстракт можно использовать для разделения белков. Концентрация белка в таком экстракте обычно довольно низкая и основным загрязняющим компонентом в смеси можно считать (!) воду. Начальные стадии очистки часто основаны на различной растворимости веществ. Подобные методы легко применить к большим объемам жидкости; кроме того, после их проведения получаются более концентрированные растворы белка. На данном этапе удаляются те белки, которые сильно отличаются от целевого белка по своим физико-химическим характеристикам, а в более концентрированном виде остаются белки, близкие по свойствам. Следовательно, на следующих стадиях очистки потребуются методы с более высоким разрешением для разделения этих похожих белков. В качестве таких методов всегда используют хроматографию. Какие именно применить методы и в каком порядке, обычно удается установить лишь экспериментальным путем. Если вы читаете статью, в которой на четырех страницах изложена трехстадийная схема очистки белка, реализуемая за четыре дня, то знайте, что за созданием этой схемы стоят месяцы тяжелой работы!

Все методы разделения основаны на тех же свойствах, по которым белки отличаются друг от друга. Эти свойства и соответствующие методы разделения описаны далее.

Пример 2 ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Вопрос Первая стадия выделения аспартатаминотрансферазы (ААТ) состояла в получении гомогената сердечной мышцы свиньи. Клеточный дебрис удаляли путем фильтрации, а нуклеиновые кислоты осаждали полиэтиленимином. Объем фильтрата (раствор А) 2 дм^3. Аликвоту экстракта (50 мм^3) добавили к 3 см^3 буфера в кювете с длиной светового пути 1 см; поглощение раствора при 280 нм составило 1,7.

1) Определите приблизительную концентрацию белка в экстракте и общее содержание в нем белка.
2) Одна единица активности ААТ соответствует количеству фермента, которое вызывает изменение оптической плотности при 260 нм в 3 см^3 раствора субстрата на 0,1 за 1 мин. Для определения активности фермента 100 мм^3 экстракта добавили к 3 см^3 раствора субстрата и зарегистрировали изменение поглощения 0,08 мин$^{-1}$. Определите количество единиц активности ААТ в 1 см^3 раствора А и общее количество единиц активности в экстракте.
3) Исходный экстракт (раствор А) далее подвергали разделению путем осаждения с помощью сульфата аммония. Собрали фракции, осаждающиеся в диапазоне от 50 до 70% насыщения, и растворили в 120 см^3 буфера (раствор Б). Раствор Б (5 мм^3) добавили к 3 см^3 буфера и измерили поглощение при 280 нм в кювете с длиной светового пути 1 см; получили значение 0,89. Определите концентрацию белка и общее содержание белка в растворе Б.
4) Раствор Б объемом 20 мм^3 использовали для определения активности ААТ, при этом поглощение изменялось на 0,21 за 1 мин. Определите количество единиц ААТ в 1 см^3 раствора Б и общее количество единиц фермента в растворе Б.
5) Используя ответы 1–4 определите удельную активность ААТ в растворах А и Б.
6) Используя ответ 5, определите степень очистки, достигнутую в результате осаждения сульфатом аммония.
7) Определите выход ААТ на стадии осаждения сульфатом аммония.

Ответ 1) В приближении что раствор белка с концентрацией 1 мг/см^3 имеет поглощение 1,0 при 280 нм в кювете с длиной светового пути 1 см; можно рассчитать, что концентрация белка *в кювете* составляет ~1,7 мг/см^3. Поскольку 50 мкл (0,05 см^3) раствора А добавили в 3,0 см^3 раствора, следовательно, образец раствора А разбавлен в 3,05/0,05 = 61 раз.

Отсюда концентрация белка в растворе А составляла 61 · 1,7 = 104 мг/см^3. Было получено 2 дм^3 (2000 см^3) раствора А, следовательно, общее количество белка в растворе А составляло 2000 · 104 = 208 000 мг или 208 г.

2) Поскольку 1 МЕ ферментативной активности вызывает изменение поглощения 0,1 в минуту, в кювете было 0,08/0,1 = 0,8 МЕ. Эти 0,8 МЕ взяты из 100 мм^3 раствора А. Следовательно, в 100 мм^3 раствора А было 0,8 МЕ. Таким образом, в 1 см^3 раствора А содержится 8,0 МЕ. Было получено 2000 см^3 раствора А, что составило активность 2000 · 8,0 = 16 000 МЕ.

3) Используя тот же подход, что и в ответе 1, найдем концентрацию белка в растворе Б: 3,005/0,005 · 0,89 = 601 · 0,89 = 535 мг/см^3. Следовательно, общее количество белка в растворе Б составило 120 · 535 = 64 200 мг.
4) Используя тот же подход, что и в ответе 2, находим активность фермента в кювете: 0,21/0,1 = 2,1 МЕ. Всего раствора фермента 20 мм^3. Следовательно, в 20 мм^3 раствора Б содержалось 2,1 МЕ, а в 1 см^3 раствора Б — 1,0/0,02 · 2,1 = 105 МЕ. Общая активность в 120 см^3 раствора Б составляет 120 · 105 = 12 600.
5) Удельная активность раствора А: 16 000/208 000 = 0,077 МЕ/мг. Удельная активность раствора Б: 12 600/64 200 = 0,197 МЕ/мг.
6) Степень очистки: 0,197/0,077 = 2,6.
7) Выход: (12 600/16 000) · 100% = 79%.

Стабильность. **Фракционирование путем денатурации** основано на различии в чувствительности белков к нагреванию. Трехмерная (третичная) структура белка сохраняется за счет многих взаимодействий: главным образом гидрофобных взаимодействий, водородных связей и иногда дисульфидных мостиков. Когда говорят, что белок денатурировал, под этим подразумевают, что эти взаимодействия были тем или иным образом разрушены, а белковая цепь развернулась, образуя нерастворимую, «денатурированную» конформацию. Один из простейших способов денатурации белка в растворе — нагревание. Однако разные белки денатурируют при разных температурах в зависимости от их термостабильности, которая, в свою очередь, определяется числом связей, поддерживающих третичную структуру белка. Если целевой белок отличается высокой термостабильностью, весьма эффективно для предварительной очистки нагревать экстракт до такой температуры, при которой целевой белок еще стабилен, а многие другие белки денатурируют. Температуру денатурации выделяемого белка предварительно определяют в отдельном эксперименте. После того как эта температура определена, менее устойчивые к нагреванию белки удаляют, нагревая экстракт в течение 15–30 мин при температуре на 5–10 градусов ниже этого значения. Затем денатурированные белки удаляют путем центрифугирования. В присутствии субстрата, продукта или конкурентного ингибитора фермент обычно еще более устойчив к нагреванию, что позволяет дополнительно поднять температуру с целью денатурации балластных белков. Аналогичным образом, белки по-разному реагируют на экстремальные значения pH (ниже 3 и выше 10). Чувствительность выделяемого белка к экстремальным значениям pH определяют в предварительном эксперименте, а затем весь белковый экстракт доводят до pH, которое отстает как минимум на единицу от того значения, при котором данный белок денатурирует. Более чувствительные белки денатурируют и их удаляют путем центрифугирования.

Растворимость. Белки различаются по количеству заряженных, полярных и гидрофобных аминокислот на их поверхности. Заряженные и полярные группы на поверхности молекулы белка окружены сольватной оболочкой из молекул воды, что способствует лучшей растворимости бел-

ка, а гидрофобные группы, напротив, маскируются молекулами воды, связанными в этих областях. Поскольку растворимость белка напрямую связана с сольватацией заряженных и полярных групп на его поверхности, следовательно, при определенных условиях белки имеют различную растворимость. В частности, при очистке белков используют тот факт, что белки по-разному выпадают в осадок при добавлении в раствор солей или органических растворителей. Необходимо подчеркнуть, что данный метод позволяет выделить в осадок нативный (т. е. активный) белок, который в результате агрегации становится нерастворимым; в данном случае денатурации белка не происходит.

Для **фракционирования с помощью солей** часто используют сульфат аммония. При добавлении соли в раствор белка ионы, на которые диссоциируют соль в растворе, приобретают сольватную оболочку из молекул воды. По мере увеличения концентрации соли уменьшается количество свободных молекул воды. В какой-то момент для сольватации начинают использоваться и те молекулы воды, которые находились в контакте с гидрофобными участками на поверхности молекул белка (понятно, что молекулы воды, создающие сольватную оболочку вокруг полярных групп на поверхности молекулы белка, удерживаются электростатическими связями гораздо прочнее). В результате молекулы воды оставляют открытыми гидрофобные участки белков и связываются с ионами соли. По мере увеличения концентрации сульфата аммония возрастает число открытых гидрофобных областей на поверхности молекулы белка. Открытые гидрофобные области вступают между собой во взаимодействие, что приводит к агрегации белков и их осаждению. Понятно, что первыми выпадают в осадок те белки, на поверхности которых больше гидрофобных остатков. Образующиеся агрегаты состоят из смеси белков. Отдельные идентичные молекулы не ищут друг друга для контакта: агрегаты возникают из-за взаимодействия ближайших гидрофобных участков любых молекул. Однако многие белки выпадают в осадок в достаточно узком диапазоне концентрации соли, так что данный метод часто используют для получения обогащенной фракции конкретного белка.

Фракционирование с помощью органических растворителей основано на различии в растворимости белков в водных растворах, содержащих смешивающиеся с водой органические растворители, такие как этанол, ацетон и бутанол. Добавление органического растворителя приводит к «разбавлению» воды (к уменьшению диэлектрической проницаемости); в то же время молекулы воды используются для гидратации молекул органического растворителя. В результате вода удаляется из сольватационной сферы заряженных и полярных групп на поверхности белка, так что они оказываются открытыми. Агрегация белков при этом обусловлена ионными взаимодействиями между молекулами. По мере добавления органического растворителя белки выпадают в осадок последовательно, в порядке уменьшения числа заряженных групп на их поверхности.

Для **фракционирования** белков можно также **использовать органические полимеры**. Этот метод по своей сути аналогичен описанному выше методу, но для его реализации требуется меньшее количество осади-

теля; кроме того, в данном случае снижается вероятность денатурации белка. Чаще всего для осаждения применяют полиэтиленгликоль (ПЭГ), относительная молекулярная масса которого лежит в диапазоне 6000–20 000.

В качестве примера рассмотрим фракционирование белков при осаждении сульфатом аммония. Как упоминалось выше, по мере добавления сульфата аммония к белковому экстракту некоторые белки начинают агрегировать и выпадать в осадок. При увеличении концентрации соли выпадают в осадок и другие белки. В предварительном эксперименте концентрацию сульфата аммония повышают постепенно от 10% до 20%, 30% и т. д. Образующийся на каждой стадии осадок отделяют путем центрифугирования, растворяют в буфере и анализируют на наличие целевого белка. Таким образом удается определить условия, при которых данный белок наилучшим образом отделяется от остальных белков, присутствующих в смеси. В примере, приведенном в табл. 8.3, исходный гомогенат осаждали 45%-м сульфатом аммония, осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали. К супернатанту добавляли 70%-й сульфат аммония, осадок отбирали, растворяли в буфере и сохраняли, а супернатант, полученный на данной стадии, отбрасывали. Таким образом удалось очистить искомый белок в 2,7 раза. При этом было удалено значительное количество (237 г) балластного белка и удалось сохранить достаточно большое количество (81%) целевого фермента, т. е. выход на данной стадии был хороший. Фракцию удалось в значительной степени обогатить целевым белком и при этом получить концентрированный образец.

Фракционирование осаждением в изоэлектрической точке основано на том факте, что белки обладают наименьшей растворимостью вблизи их изоэлектрической точки. При таком значении pH количество отрицательных и положительных зарядов на молекуле белка совпадает; следовательно, отталкивание между молекулами в этих условиях минимальное. При сближении белков противоположно заряженные группы взаимодействуют и белки начинают агрегировать. Данный принцип можно использовать как для удаления балластных белков (путем доведения pH до их изоэлектрической точки), так и для выделения целевого белка (путем доведения pH до изоэлектрической точки). На практике чаще используют первый путь, поскольку при осаждении неминуемо происходит денатурация некоторой части белка.

Наконец, в некоторых случаях при выделении белков из клеток *E. coli* используют **особенности растворимости белков**. В ранних работах по получению гетерологичных белков из клеткак *E. coli* было отмечено, что хотя уровень экспрессии клонированного белка часто достигал 40% от общего клеточного белка, целевой белок агрегировал с образованием нерастворимых частиц, названных тельцами включения. Сначала этот факт рассматривали как основное препятствие на пути получения белков в клетках этого организма, поскольку тельца включения представляют собой смесь мономерных и полимерных денатурированных белков, образующихся в результате частичного или неправильного фолдинга, возможно, из-за восстановительных условий в цитоплазме *E. coli*. Однако вскоре стало ясно, что данное явление можно использовать для очистки белка. Тельца вклю-

чения отделяют от преобладающей массы белков бактериальной цитоплазмы просто путем центрифугирования. Полученные таким образом тельца включения затем переводят в раствор и денатурируют, а затем дают белкам возможность принять их активную, нативную конфигурацию. Обычно для этого тельца включения нагревают в 6 М гуанидингидрохлориде (для денатурации белка) в присутствии восстановителя (для разрыва дисульфидных связей). Денатурированный белок затем либо разбавляют буфером, либо подвергают диализу против буфера; при этом белок медленно принимает нормальную конфигурацию (рефолдинг). Хотя методы рефолдинга успешны не на 100%, при таком подходе часто удается получить белок, очищенный на 50% и более.

После проведения предварительной стадии очистки одним из предложенных здесь методов следует переходить к более мощным методам хроматографического разделения. Хроматографические методы, применяемые при очистке белков, перечислены в табл. 8.4, а некоторые наиболее распространенные методы обсуждаются ниже. Отдельные практические детали каждого метода изложены в гл. 11.

Заряд. Белки отличаются друг от друга по содержанию в них заряженных аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой кислоты, лизина, аргинина и гистидина). Следовательно, при определенном значении pH суммарный заряд разных белков различается. Это свойство белков используется в ионообменной хроматографии (разд. 11.6), где целевой белок связывается с твердым носителем, имеющем противоположно заряженные группы (ионообменная смола). Белки с тем же зарядом, что и носитель, проходят сквозь колонку, не связываясь с носителем, а связанные белки (в том числе и выделяемый белок) постепенно смывают с колонки с помощью буфера с возрастающей концентрацией соли или с изменяющимся pH. Ионы соли конкурируют с белком за связывание с носителем, так что наиболее слабозаряженные белки сходят с колонки при меньшем содержании соли, а наиболее сильнозаряженные — при более высокой ионной силе.

Белок характеризуется изоэлектрической точкой p*I* — это значение pH, когда суммарный заряд молекул и белка равен нулю. Разные белки имеют изожлектрические точки пои разных значениях pH (разд. 8.1). Различие в значениях p*I* используется в методе хроматофокусирования (разд. 11.6.3).

Размер. Различия в размерах белков используются в методе эксклюзионной хроматографии (иначе называемой гель-фильтрацией). Среда для проведения гель-фильтрации состоит из набора гранул, между которыми имеются поры разного размера, возникающие из-за разного количества перекрестных сшивок. Процесс разделения основан на способности или неспособности белков проникать в поры определенного размера, которая зависит от размера белка (разд. 11.7). Разрешение данного метода ограничено, но он может быть использован для разделения крупных и мелких белков и, следовательно, наиболее полезен в тех случаях, когда

Таблица 8.4. **Наиболее часто используемые методы хроматографического разделения белков**

Метод	Используемое свойство	Емкость	Разрешение	Практические замечания	Дополнительная информация
Гидрофобная хроматография	Гидрофобность	Высокая	Среднее	Можно разделять образцы с высоким содержанием соли, например после осаждения сульфатом аммония. Фракции имеют разные значения pH и/или ионной силы. Выход средний. Обычно применяют на начальных стадиях очистки. Результат непредсказуем.	Раздел 11.4.3
Ионообменная хроматография	Заряд	Высокая	Среднее	Ионная сила образца должна быть низкой. Фракции имеют разные значения pH и/или ионной силы. Выход средний. Обычно применяют на ранних стадиях очистки.	Раздел 11.6
Аффинная хроматография	Биологическая функция	Средняя (метод ограничен высокой стоимостью)	Высокое	Ограничения накладываются доступностью иммобилизованного лиганда. При элюировании белок может быть денатурирован. Выход от низкого до среднего. Обычно используется на заключительных этапах очистки.	Раздел 11.8
Хроматография с красителями в качестве лигандов	Структура и гидрофобность		Высокое	Необходимо для начального скрининга красителей-лигандов.	Раздел 11.8.6
Хроматофокусирование	Заряд и p*I*	Высокая–средняя	Высокое–среднее	Ионная сила образца должна быть низкой. Фракции содержат амфолиты.	Раздел 11.6.3
Ковалентная хроматография	Тиоловые группы	Средняя–низкая	Высокое	Подходит для белков, содержащих тиоловые группы. Ограничения накладываются стоимостью и продолжительностью (3 ч) регенерации.	Раздел 11.8.7
Металл-хелатная хроматография	Имидазольная, тиоловая и триптофановая группы	Средняя–низкая	Высокое	В литературе описано всего лишь несколько примеров. Дорого.	Раздел 11.8.5
Эксклюзионная хроматография	Размер молекул	Средняя	Низкое	Обычно используется на заключительных стадиях очистки. Может дать информацию о молекулярной массе белка. Подходит для обессоливания препарата белка.	Раздел 11.7

выделяемый белок отличается особенно большим или малым размером. Метод также используют для определения относительной молекулярной массы белка (разд. 11.7.2) и для концентрирования или обессоливания раствора белка (разд. 11.7.2).

Сродство. Некоторые белки связываются специфическим образом с небольшими молекулами. Это свойство используется при проведении аффинной хроматографии, в которой небольшие молекулы (лиганды) иммобилизованы на нерастворимом носителе. При пропускании смеси белков через колонку лиганд связывает целевой белок и удерживает его на носителе, тогда как остальные белки проходят. Связавшийся белок затем можно смыть с колонки путем изменения pH, повышения ионной силы или раствором с высоким содержанием свободного лиганда. Например, белок конканавалин А прочно связывается с глюкозой. Поэтому аффинную колонку с глюкозой в качестве лиганда используют для связывания конканавалина А, а затем белок смывают с колонки раствором с высокой концентрацией глюкозы. Лектины (разд. 11.8.3) являются особенно удобными лигандами для очистки гликопротеинов с помощью аффинной хроматографии. Метод аффинной хроматографии детально обсуждается в разд. 11.8.

Гидрофобность. Белки различаются по количеству гидрофобных аминокислотных остатков на их поверхности. Это различие может быть использовано для фракционирования солями (см. выше), но также в методе гидрофобной хроматографии (разд. 11.4.3). Типичным материалом для изготовления носителей является фенил-сефароза, в которой фенильные группы связаны с нерастворимой сефарозой. Смесь белков наносят на колонку в растворе с высокой концентрацией соли (чтобы обеспечить доступность гидрофобных участков белков); при этом возникают гидрофобные взаимодействия между фенильными группами смолы и гидрофобными участками белков. Затем связавшиеся белки смывают путем снижения концентрации соли; они сходят с колонки в порядке возрастания гидрофобности. Однако некоторые особенно гидрофобные белки не удается смыть даже при полном отсутствии соли. В данном случае в буфер для элюирования необходимо добавить небольшое количество смешивающегося с водой органического растворителя, такого как пропанол или этиленгликоль. Эти вещества конкурируют с белками за связывание с гидрофобной матрицей, в результате чего все оставшиеся на колонке белки смываются с колонки.

8.3.5 Генно-инженерные методы для облегчения выделения белков

Методы генной инженерии позволяют не только клонировать белок и увеличить его выход, но одновременно с этим облегчить его выделение благодаря определенным манипуляциям с геном белка до его экспрессии. Эти манипуляции проводят либо с целью обеспечения секреции белка из клетки, либо для облегчения процедуры очистки.

Секреция белка

Клонирование и экспрессия белка в микробных или эукариотических клетках имеет ряд преимуществ, в том числе, позволяет обеспечить секрецию белка из клетки. Выделение секретируемого белка осуществить легче по целому ряду причин.

- *Облегчается процесс очистки*, поскольку в среде содержится меньше примесных белков, чем в экстракте, полученном при разрушении клетки и содержащем все внутриклеточные белки.
- *Предотвращается внутриклеточная деградация клонированного белка.* Многие клонированные белки воспринимаются клеткой как «чужеродные» и подвергаются расщеплению протеазами. При секреция белка эти процессы можно минимизировать.
- *Снижается внутриклеточная концентрация токсичного белка.* Некоторые клонированные белки токсичны для клетки, в которой они производятся, поэтому клетка может синтезировать лишь ограниченное количество такого белка, а затем погибает. Секреция белка предотвращает гибель клетки и способствует тем самым продолжению синтеза белка.
- *Возможна посттрансляционная модификация белка.* Чаще всего посттрансляционная модификация белков осуществляется в процессе их секреции. Такая модификация, например гликозилирование (разд. 8.4.4), необходима для образования полноценного белка. В прокариотических клетках гликозилирования не происходит, поэтому многие белки приходится экспрессировать в эукариотических клетках (например, в дрожжах), а не в бактериях. Для секретируемого белка его окончательное назначение определяется наличием короткой аминокислотной последовательности (**сигнальной последовательности**), обычно расположенной на N-конце белковой цепи. Белки, предназначенные для присоединения к мембране или для выхода наружу, проходят через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи; сигнальная последовательность отщепляется протеазами перед его секрецией. Например, секреция человеческого γ-интерферона в дрожжах *Pichia pastoris* была обеспечена сигнальной последовательностью нативного белка. Кроме того, известен ряд сигнальных последовательностей дрожжей (например, сигнальная последовательность α-фактора), которые можно использовать для обеспечения секреции белков, клонированных в дрожжевых клетках.

Слитые белки

Данный подход подразумевает присоединение определенного гена к гену того белка, который нужно выделить; в результате подобной процедуры образуется слитый белок (связанный с этим вторым белком, называемым тагом). Как показано ниже, второй белок необходим для селективного выделения слитого белка из клеточного экстракта. Далее следует расщепить слитый белок и отделить целевой белок от ненужного. Понятно, что аминокислотная последовательность, соединяющая два белка, должна легко

расщепляться химическим или ферментативным способом. Ниже представлены примеры различных слитых белков, сконструированных для облегчения процедуры очистки.

Flag представляет собой короткую последовательность гидрофобных аминокислот, которую присоединяют к N-концу белка; выделение белка осуществляют методом иммуноаффинной хроматографии.

Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-белок

Существуют моноклональные антитела против *Flag*, соединенные с твердым носителем, что позволяет использовать их для аффинной хроматографии. Клеточный экстракт, содержащий белок, слитый с *Flag*, пропускают через колонку. При этом антитела связываются с «конструкцией» *Flag*–белок, а все остальные белки смываются. Данную процедуру проводят в присутствии ионов кальция, поскольку связывание *Flag* с антителами зависит от наличия ионов кальция. После отмывки с колонки всего несвязанного белка слитый белок элюируют, пропуская через колонку раствор ЭДТА, который связывает ионы кальция. Наконец, *Flag* удаляют с помощью фермента энтерокиназы, которая узнает приведенную ниже последовательность и расщепляет ее у остатка лизина со стороны С-конца:

N-Asp-Asp-Asp-Lys-C

С использованием такого подхода был клонирован и экспрессирован в дрожжах колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ), который затем был очищен в одну стадию. ГМ-КСФ экспрессировался в клетках в виде последовательности (сигнальный пептид)–*Flag*–белок. В качестве сигнальной последовательности использовалась сигнальная последовательность белка наружной клеточной мембраны Omp A. Последовательность *Flag*–белок секретировалась в периплазму, слитый белок выделяли, а *Flag* отщепляли, как было описано выше.

Глутатион-S-трансфераза. В данном методе целевой белок экспрессируют в виде слитого белка с ферментом глутатион-S-трансферазой. Клеточный экстракт пропускают через колонку, заполненную шариками агарозы, связанными молекулами глутатиона. При этом фермент связывается с глутатионом. После удаления всего несвязанного белка слитый белок смывают с колонки с помощью восстановленного глутатиона. Слитый белок расщепляют человеческим тромбином, который узнает специфическую последовательность линкера.

Белок А. Как описано в разд. 7.3.4, белок А связывается с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG). Целевой белок клонируют как слитый с геном белка А, а слитый белок очищают методом аффинной хроматографии на колонке с IgG-сефарозой. Связанный слитый белок затем смывают либо буфером с высоким содержанием соли, либо с низким значением pH. В этих условиях связь между молекулами IgG и слитого белка разрывается.

В конечном итоге белок А отделяют, обрабатывая 70%-й (об/об) муравьиной кислотой в течение двух суток, в результате чего происходит разрыв лабильной связи Asp–Pro в линкерной области.

Поли(аргинин). Присоединяют к С-концу целевого белка нескольких остатков аргинина. Модифицированный белок несет несколько положительных зарядов (при нейтральном pH). Клеточный экстракт можно разделять на фракции с помощью катионообменной хроматографии. Связавшиеся с колонкой белки последовательно смывают градиентом соли, причем поли(Arg)-содержащий белок сходит с колонки последним, поскольку несет большой положительный заряд. Последовательность поли(Arg) затем удаляют, инкубируя белок с ферментом карбоксипептидазой В. Этот фермент представляет собой экзопротеазу, которая последовательно удаляет с С-конца белка остатки аргинина и лизина. Остатки аргинина удаляются с С-конца белка до тех пор, пока фермент не встретит «нормальный» (не аргинин) С-концевой остаток белка.

8.4 МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРОЕНИЯ БЕЛКА

8.4.1 Относительная молекулярная масса

Существует три метода определения относительной молекулярной массы белка M_r. Два описанных здесь метода быстрые и простые в исполнении, с их помощью можно определить относительную молекулярную массу белка с точностью до 5–10%. Во многих случаях, когда необходимо лишь приблизительно оценить молекулярную массу, эти методы вполне пригодны. Третий метод — это масс-спектрометрия, который требует специального дорогого оборудования и позволяет проводить анализ с точностью до 0,001%. Такая точность необходима, например, при анализе модификаций белка после завершения синтеза.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-ПААГ-электрофорез)

В данном варианте электрофореза (см. разд. 10.3.1) белки разделяются на основании формы (размера) молекулы, которая, в свою очередь, связана с относительной молекулярной массой. Набор белков с известными молекулярными массами (так называемые маркеры) наносят в лунку, расположенную по соседству с той, в которую помещают белок с неизвестной молекулярной массой. Измеряют расстояние, пройденное в геле каждым из маркерных белков, и строят градуировочную кривую в координатах $\lg M_r$ — расстояние. Измеряют также расстояние, пройденное белком с неизвестной массой, и по градуировочной кривой определяют M_r целевого белка. Метод подходит для определения массы белка в диапазоне от 10 000 до 300 000. Метод прост в исполнении и требует совсем небольших количеств исследуемого материала. При окрашивании белка

серебром (разд. 10.3.7) необходим лишь 1 нг белка. На практике именно этот метод чаще всего применяют для определения молекулярной массы белка.

Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация)

При проведении эксклюзионной хроматографии на колонке с определенным массовым диапазоном фракционируемых белков объем буфера, необходимый для элюирования конкретного белка, в значительной степени зависит от размера белка, причем между относительными молекулярными массами белков и объемом элюирующего буфера существует логарифмическая зависимость (разд. 11.7.3). Если откалибровать колонку с помощью набора белков с известными M_r, можно определить M_r анализируемого белка. Обычно с этой целью используют систему ВЭЖХ и колонки размером 1 × 30 см, набитые пористыми шариками из кремнезема. При скорости потока около 1 см^3/мин уже за 12 минут можно провести разделение и получить четкие, хорошо различимые пики. Строят линейный градуированный график в координатах $\lg M_r$ от K_d для маркерных белков. Расчет K_d проводят по формуле:

$$K_d = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

где V_o — объем буфера, с которым с колонки сходят не проникающие в поры белки (исключенный объем), V_t — объем буфера, с которым выходят малые молекулы, способные проникать во все поры (внутренний объем), а V_e — объем буфера, с которым выходит маркерный белок. Данный метод позволяет определять молекулярные массы с точностью до 10%.

Масс-спектрометрия

Методы ионизации электроспреем (ESI; разд. 9.2.4) или матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI; разд. 9.3.7) позволяют получить ионы белковых молекул и точно определить их молекулярные массы с помощью масс-спектрометрии. Метод ESI применяют для получения ионов из молекул с молекулярной массой до 100 кД, а MALDI — для получения ионов белков с массой до 200 кД. В любом случае для проведения анализа требуется лишь несколько пикомолей вещества. Например, для $\alpha\beta_2$-кристаллина найдено значение молекулярной массы 20 200 ± 0,9, что соответствует расчетной молекулярной массе (20 201). Однако при увеличении количества анализируемого белка примерно на 10% было получено значение 20 072,2. Это означает, что некоторая часть молекул очищенного белка потеряла N-концевую аминокислоту (лизин). Расчетное значение молекулярной массы без концевого лизина составляет 20 072,8. Очевидно, что масс-спектрометрия позволяет определять молекулярные массы белков и пептидов с высокой точностью; метод можно использовать для обнаружения небольших изменений в базовой структуре белка.

8.4.2 Анализ аминокислотного состава

Для того чтобы определить, какие именно аминокислоты из 20 возможных входят в состав конкретного белка и в каком количестве, белок подвергают гидролитическому расщеплению до аминокислот, которые далее идентифицируют хроматографически. Гидролиз проводят путем нагревания белка в 6 М соляной кислоте при 110 °С под вакуумом в течение 14 ч. К сожалению, при этом происходит химическая модификация остатков аспарагина, глутамина и триптофана. Аспарагин и глутамин превращаются соответственно в аспарагиновую и глутаминовую кислоты, а триптофан полностью разрушается, так что его лучше определять в негидролизованном белке спектрофотометрическим методом.

Образующиеся в результате гидролиза аминокислоты разделяют хроматографическим методом и определяют их содержание путем постколоночной дериватизации с соответствующим реагентом. Для этого сходящий с колонки элюат в автоматическом режиме смешивают с реагентом, который взаимодействует с аминогруппами аминокислот, приводя к образованию окрашенного или флуоресцирующего продукта. Затем элюат поступает в детектор (колориметр или флуориметр); каждая аминокислота регистрируется как отдельный пик, а площадь пика пропорциональна содержанию соответствующей аминокислоты. Прибор, предназначенный для анализа смесей аминокислот данным методом, называют аминокислотным анализатором. В ранних исследованиях разделение аминокислот достигалось методом ионообменной хроматографии на колонке с сульфатированным полистиролом, а в качестве реагента использовался нингидрин; метод позволял определять до 50–100 пмоль аминокислоты. Позднее в качестве реагентов стали использовать *о*-фталевый альдегид (рис. 8.3) и флуорескамин (оба образуют флуоресцентные продукты), поскольку с их помощью удается определять аминокислоты на уровне 10 пмоль.

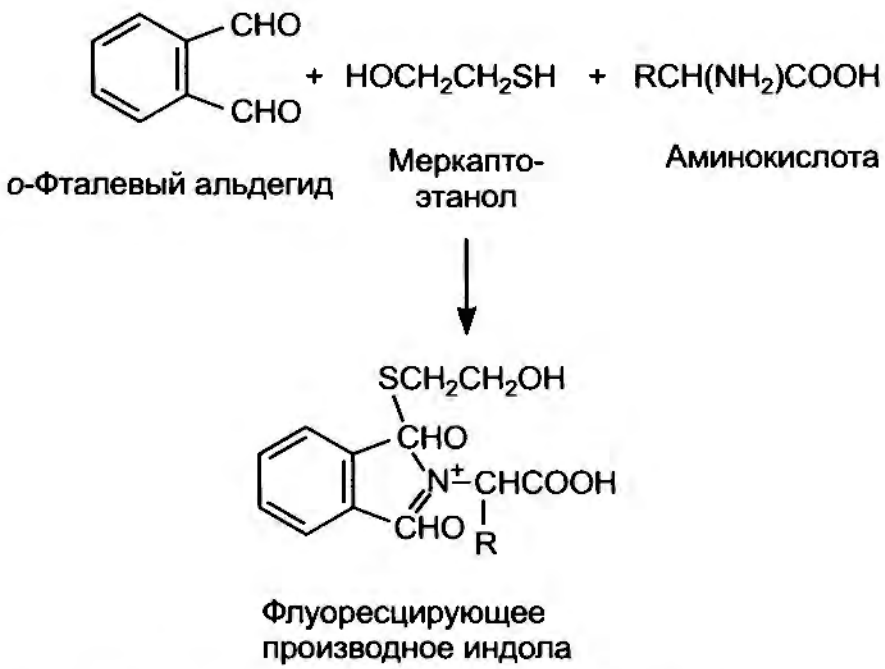


Рис. 8.3. Взаимодействие аминокислот с *о*-фталевым альдегидом с целью пред- и постколоночной дериватизации

В последние годы вместо ионообменного разделения аминокислот в гидролизате применяют метод предколоночной дериватизации с последующим разделением аминокислот с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. В данном методе белковый гидролизат сначала обрабатывают реагентом, который (1) реагирует с аминогруппами аминокислот, (2) имеет гидрофобные свойства, что позволяет разделять образующиеся продукты с помощью обращенно-фазовой хроматографии, и (3) легко детектируется по поглощению в ультрафиолетовой области или по флуоресценции. Чаще всего в качестве таких реагентов применяют *о*-фталевый альдегид (см. рис. 8.3) и 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимидкарбамат, образующие флуоресцирующие продукты, а также фенилизотиоцианат, образующий фенилтиокарбамильное производное, которое детектируют по поглощению при 254 нм. Время анализа составляет всего лишь около 20 мин при очень хорошей чувствительности, которая составляет 1 пмоль аминокислоты и даже ниже.

8.4.3 Определение первичной структуры

Многие годы аминокислотную последовательность белков определяли, исключительно используя образцы очищенного белка. Это означало, что определение аминокислотной последовательности было возможно лишь для тех белков, которые удавалось выделить в достаточном количестве. Знание полной аминокислотной последовательности белка было и остается необходимым условием для определения его трехмерной структуры и, следовательно, для понимания его функций. Однако сегодня биохимики обычно ограничиваются определением довольно короткой аминокислотной последовательности либо на N-конце, либо в середине белка. Эти данные получают путем секвенирования пептидов, образующихся при расщеплении исходного белка. Результаты секвенирования обычно используют при решении одной из трех следующих задач.

- Анализ баз данных с целью выяснить, был ли данный белок выделен ранее, и таким образом идентифицировать его. При этом надо сопоставлять очень короткие фрагменты (от трех до пяти остатков) — таги. Решение такой задачи представлено в разд. 9.5.2.
- Поиск гомологичных последовательностей с помощью баз данных для идентификации функций белка. Например, если такой анализ выявил значительную гомологию с аминокислотной последовательностью известной тирозинкиназы, это означает, что данный белок также является тирозинкиназой.
- Последовательность предполагается использовать для синтеза олигонуклеотидных зондов для отбора клонов из библиотеки кДНК. Таким путем можно выделить ген, кодирующий данный белок, определить его нуклеотидную последовательность и, следовательно, аминокислотную последовательность белка. Определение аминокислотной последовательности белка этим методом менее трудоемко и гораздо быстрее выполняется, чем аналих полной аминокислотной последовательности самого белка.

Еще одной областью применения результатов секвенирования белка является биофармацевтическая промышленность — для контроля качества продукции. Многие фармацевтические компании производят белковые препараты, например пептидные гормоны, антитела, ферменты и т. д.; синтетические пептиды также необходимо анализировать для подтверждения их идентичности. Для структурного анализа таких препаратов, в частности для идентификации отдельных участков и характера постсинтетических модификаций, необходимо определение аминокислотной последовательности.

Секвенирование по методу Эдмана

В 1950 г. Пер Эдман опубликовал химический метод последовательного удаления аминокислотных остатков от N-конца пептида или белка. Эта последовательность реакций стала известна как деградация по Эдману; спустя 50 с лишним лет этот метод остается самым эффективным химическим методом последовательного отщепления аминокислотных остатков от полипептидной цепи. Реакция происходит в три стадии (см. рис. 8.4):

- *Образование производного.* На этом этапе фенилизотиоцианат (ФИТЦ) взаимодействует с аминогруппой, образуя фенилтиокарбамильное (ФТК) производное белка. Реакцию проводят в атмосфере аргона, чтобы избежать окисления серы в молекуле ФИТЦ. После завершения реакции ФТК-производное тщательно отмывают с помощью органического растворителя (например, бензола), чтобы экстрагировать остатки ФИТЦ и побочные продукты, а затем высушивают в вакууме.
- *Реакция расщепления.* После высушивания ФТК-производное обрабатывают безводной кислотой (например, гептафтормасляной кислотой). Это приводит к расщеплению ФТК-производного по пептидной связи соседней с ФТК. В результате высвобождается исходный N-концевой аминокислотный остаток в форме 2-анилино-5-тиазолинонового производного, а исходная полипептидная цепь укорачивается на одну аминокислоту. После завершения реакции кислоту удаляют под вакуумом, а тиазолиноновое производное отделяют от пептидной цепи с помощью органического растворителя, который затем выпаривают.
- *Реакция конверсии.* Поскольку тиазолинон является производным N-концевой аминокислоты, его в принципе можно использовать для идентификации аминокислоты. Однако на практике этого не делают, так как тиазолиноны довольно неустойчивы. Более устойчивое производное — 3-фенил-2-тиогидантоин (ФТГ) — получают путем нагревания тиазолинона в 1 М HCl при 80 °С в течение 10 мин. Это производное аминокислоты является конечным продуктом одного цикла реакции Эдмана; его легко идентифицировать с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Например, если обнаружен ФТГ-аланин, это означает, что первым аминокислотным остатком в белке был аланин. Оставшаяся полипептидная цепь может вновь вступать в цикл реакций Эдмана. В конце цикла выделяют и идентифицируют очередное ФТГ-производное. Таким образом определяют аминокислотную последовательность белка. Теоретически в результате серии реакций можно определить пол-

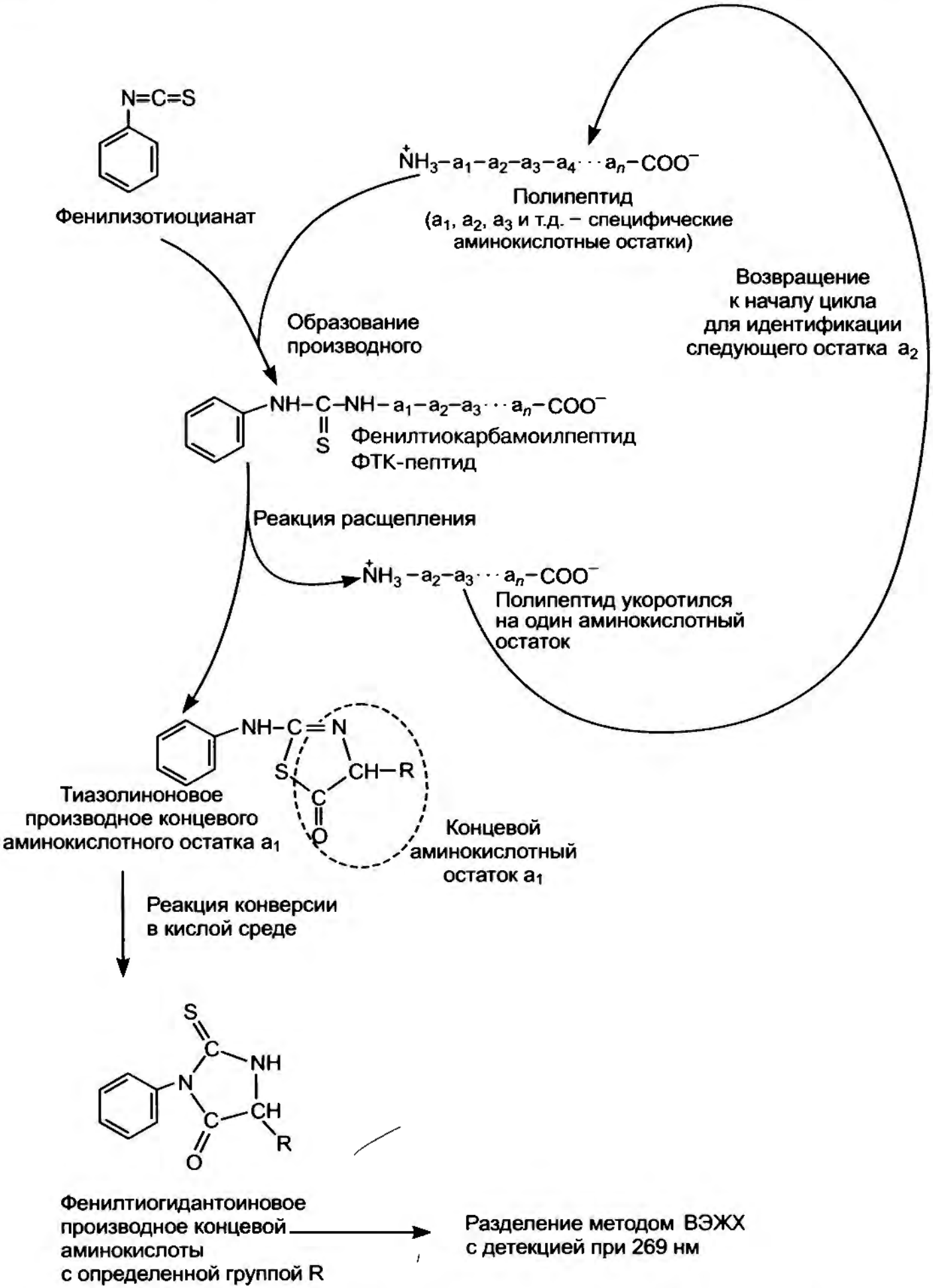


Рис. 8.4. Метод Эдмана для определения аминокислотной последовательности (от a_1 до a_n) полипептида. В результате каждого цикла высвобождается N-концевой аминокислотный остаток в форме фенилтиогидантоинового производного, которое затем идентифицируют хроматографическим методом с использованием набора стандартов

ную аминокислотную последовательность белка или пептида, однако на практике это невозможно, поскольку выход каждого цикла реакций Эдмана составляет лишь 96–98%. Поэтому через несколько циклов выход ФТГ-аминокислоты очень сильно уменьшается, а фоновый уровень ФТГ-производных увеличивается. Данный метод позволяет достоверно определить ~20–40 аминокислотных остатков, а этого обычно достаточно для решения тех задач, о которых говорилось выше.

Цикл реакций Эдмана всегда осуществляют в полностью автоматическом режиме, включая введение образца в колонку (обращенно-фазовая ВЭЖХ) и идентификацию ФТГ-производного. Обычно в анализатор вводят пробу и оставляют прибор работать на ночь, так что на следующее утро результаты уже готовы. Образцы раствора белка высушивают на небольших дисках из стекловолокна и вводят в реакционную камеру анализатора. Белок покрывает очень большую поверхность (все волокна, из которых состоит диск). Следовательно, даже если белок денатурирует в жестких условиях реакции Эдмана, нерастворимый белок остается на диске в виде очень тонкой пленки, что обеспечивает высокую реакционную способность на каждой стадии. В анализаторах можно секвенировать даже образцы белков, перенесенных на мембрану из геля. После переноса (например, из двумерного геля) отдельное пятно белка вырезают из мембраны и помещают в реакционную ячейку. Для этой процедуры нужна специальная мембрана (поливинилидендифторид), ПВДФ), поскольку обычные нитроцеллюлозные мембраны не выдерживают контакта с реагентами, применяемыми при проведении реакции Эдмана. Сегодня для выполнения секвенирования требуется лишь 10–100 нг белка, причем чувствительность метода ограничена только чувствительностью определения ФТГ-производных по поглощению в УФ-диапазоне.

Расщепление белков на более короткие пептиды

Для определения аминокислотной последовательности по методу Эдмана необходимо, чтобы на N-конце была свободная аминогруппа, способная реагировать с ФИТЦ. Однако в 50–70% всех белков N-концевая группа заблокирована формильной, ацетильной или ацильной группой. Определение N-концевой аминокислоты в таких белках невозможно, поэтому их расщепляют на пептидные фрагменты, один или несколько из них очищают и определяют его аминокислотную последовательность. По изложенным выше причинам обычно совершенно не важно, относится ли анализируемая последовательность к N-концу белка или к любому другому его участку. Для расщепления белка на фрагменты используют химические и ферментативные методы (табл. 8.5). К химическим методам относится расщепление с помощью бромциана, расщепляющего пептидную цепь по остаткам метионина, и N-бромсукцинимида, расщепляющего цепь по остаткам триптофана. Метионин довольно редко встречается в белках, триптофан — еще реже, так что при расщеплении белков этими реагентами образуются довольно протяженные фрагменты. К ферментативным методам относится расщепление трипсином, который производит

Таблица 8.5. **Специфическое расщепление полипептидов**

Реагент	Специфичность
Ферментативное расщепление	
Химотрипсин	Гидрофобные аминокислотные остатки, такие как Phe, Try, Tyr, Leu, с С-конца
Эндопротеиназа Arg-C	Аргинин с С-конца
Эндопротеиназа Asp-N	Остатки Asn или цистеина с N-конца
Трипсин	Остатки аргинина и лизина с С-конца; связи Arg-Pro и Lys-Pro расщепляются плохо
Эндопротеиназа Glu-C	Остатки Gln и некоторые остатки Asn с С-конца
Эндопротеиназа Lys-C	Остатки лизина с С-конца
Термолизин	Остатки гидрофобных аминокислот (кроме Trp) с N-конца
Химическое расщепление	
BNPS-скатол N-Бромсукцинимид *o*-Иодозобензоат	Остатки триптофана с С-конца
Бромциан	Остатки метионина с С-конца
Гидроксиламин	Связь аспарагин–глицин
2-Нитро-5-тиоцианбензоат	Остатки цистеина с N-конца

разрыв со стороны С-конца у остатков аргинина и лизина, эндопротеиназой Arg-C, расщепляющей белок с С-конца у остатка аргинина, и эндопротеиназой Glu-C, расщепляющей белок с С-конца у остатка глутамата и иногда аспартата. Для выбора метода расщепления полезно знать аминокислотный состав белка (разд. 8.4.2); понятно, что лучше расщеплять белок по тем аминокислотам, которые встречаются относительно редко, поскольку в результате получается небольшое количество крупных фрагментов, а не сложная смесь коротких пептидов. Смесь продуктов разделяют с помощью обращенно-фазовой хроматографии. На первый взгляд может показаться странным разделение пептидов, которые обязательно содержат значительную долю заряженных и полярных групп, с помощью метода, основанного на гидрофобных свойствах. Однако в тех стандартных условиях, в которых происходит разделение, полярные группы экранированы и все пептиды имеют гидрофобные свойства. Перед проведением хроматографического разделения пептиды часто растворяют в 1%-й (об/об) трифторуксусной кислоте. При этом карбоксильные группы белка (С-концевая, а также боковые группы всех остатков аспарагиновой и глутаминовой кислоты) переходят в протонированную форму, так что исходный заряд этих групп маскируется. Все положительно заряженные группы (N-концевая аминогруппа, а также боковые группы всех остатков лизина, гистидина и аргинина) взаимодействуют с трифторацетатом (CF_3COO^-), что маскирует положительный заряд и придает этим группам гидрофобные свойства. В результате все пептидные фрагменты представляет собой незаряженные гидрофобные молекулы (причем боковые цепи

всех гидрофобных остатков — Leu, Tyr, Phe и др. — также вносят свой вклад в общую гидрофобность молекулы). Далее все пептиды связываются на колонке и последовательно смываются в порядке возрастания гидрофобности в линейном градиенте ацетонитрила, конкурирующего за гидрофобные взаимодействия с носителем.

Масс-спектрометрия

Необходимым требованием метода масс-спектрометрии (МС) является получение ионов анализируемого вещества в газовой фазе, поэтому долгое время МС использовалась для анализа небольших ($M_r < 500$) неполярных молекул. Однако с развитием методов ионизации, таких как использование бомбардировки быстрыми атомами (FAB), ESI и MALDI (гл. 9), масс-спектрометрический анализ крупных заряженных молекул — белков и полипептидов — стал рутинной процедурой, особенно после появления небольших по размеру (и более дешевых) настольных масс-спектрометров. Хотя метод Эдмана по-прежнему используется для анализа структуры белка, для определения аминокислотной последовательности применяют метод МС. Кроме того, МС позволяет напрямую определять последовательность белков с заблокированным N-концевым остатком. При расщеплении полипептидов в большинстве случаев разрыв происходит по пептидной связи (хотя возможны и другие варианты расщепления — внутри аминокислотных остатков, вторичное расщепление и др., что усложняет проведение анализа). Таким образом, все пептидные фрагменты отличаются друг от друга на один аминокислотный остаток. На основании этого легко вывести аминокислотную последовательность целевого пептида. Кроме того, если имеет место модификация в боковой цепи, это легко обнаружить по изменению массы фрагмента. Более детально определение аминокислотной последовательности пептидов и белков с помощью МС описано в разд. 9.3. Для определения аминокислотной последовательности в последнее время все чаще применяют также метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Фрагменты белка (например, после расщепления трипсином) разделяют методом МС. В первом анализаторе выбирают ион, соответствующий определенному пептиду, и приводят в столкновение с атомами аргона для образования ионов фрагментов. Образовавшиеся ионы затем разделяют в соответствии с их массами во втором анализаторе, идентифицируют, и определяют аминокислотную последовательность (см. разд. 9.3).

Еще один метод, называемый **ступенчатым секвенированием** (разд. 9.5.5) представляет собой комбинацию метода Эдмана и МС. Реакцию Эдмана проводят с использованием смеси ФИТЦ и фенилизоцианата (ФИЦ; около 5% от концентрации ФИТЦ). В белке N-концевые аминогруппы, реагирующие с ФИЦ, эффективно заблокированы и не отщепляются на стадии кислотного гидролиза. В результате около 5% белка в каждом цикле заблокировано. После 20 или 30 циклов реакции Эдмана образуется набор пептидов, различающихся друг от друга на одну аминокислоту. Определение массы каждого из этих пептидов методом ESI или MALDI позволяет идентифицировать эту отщепленную аминокислоту.

Обнаружение дисульфидных связей

В белковых молекулах, содержащих более одного остатка цистеина, важно уметь определять дисульфидные мостики между остатками цистеина. Чаще всего с этой целью применяют МС (разд. 9.5.6). Нативный белок с интактными дисульфидными связями расщепляют при помощи фермента (например, трипсина) с образованием нескольких небольших пептидных фрагментов. Тот же эксперимент проделывают с белком, предварительно обработанным дитиотрейтолом (ДТТ), который разрушает дисульфидные связи. Спектры MALDI обработанного трипсином белка до и после обработки ДТТ позволяют идентифицировать пептиды, связанные дисульфидным мостиком. Связанные пептиды из нативного белка в спектре восстановленного белка отсутствуют, а вместо них появляются два новых пептидных фрагмента с меньшей молекулярной массой. Если точно известны молекулярные массы обоих пептидов, участок расщепления ферментом и аминокислотная последовательность белка, идентификация этих двух пептидов не представляет большой сложности. Если масса двух пептидов, соединенных дисульфидной связью, равна M, а масса каждого из них в отдельности — A и $Б$, то $A + Б = M + 2$. Две единицы массы возникают из-за того, что при восстановлении дисульфидной связи каждый остаток цистеина становится тяжелее на +1:

$$-S-S- \xrightarrow{2H} -SH + HS-$$

Профиль гидрофобности

После определения аминокислотной последовательности белка иногда осуществляют анализ распределения в этой последовательности гидрофобных групп. Так называемый **профиль гидрофобности** представляет собой зависимость средней гидрофобности аминокислотного остатка от номера этого остатка. Усреднение производится по определенному алгоритму путем оценки средней гидрофобности в рамках окна, перемещающегося по всей последовательности от одного остатка к другому. В результате получают серии кривых, на основании которых выявляют наиболее и наименее гидрофобные области аминокислотной последовательности. В случае мембранных белков такие профили позволяют идентифицировать участки, которые, возможно, локализованы в мембране. Например, при анализе белка тилакоидной мембраны было обнаружено семь областей, содержащих последовательности из 20–28 преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков, ограниченных с каждой стороны гидрофильными остатками. Эти области соответствуют спиральным участкам белка, пронизывающим мембрану.

В мембранных белках, участвующих в формировании проводящих воду каналов, трансмембранные участки содержат и гидрофильные остатки. В порах располагаются **амфипатические α-спирали**, полярные участки которых выстилают канал, а гидрофобные участки взаимодействуют с мембранными липидами. Для обнаружения подобных областей требуются более сложные алгоритмы, поскольку такие спирали не всегда выявляются простым анализом гидрофобности.

8.4.4 Гликопротеины

Гликопротеины образуются в результате ковалентного присоединения углеводных цепей (гликанов) как линейной, так и разветвленной структуры к различным участкам полипептидного остова белка. Этот тип посттрансляционной модификации осуществляют цитоплазматические ферменты в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Количество полисахаридов, связанных с конкретным белком, может варьировать от нескольких процентов до 60% масс. и более. Гликопротеины в основном обнаруживаются в сыворотке крови и в клеточных мембранах. Основными функциями углеводной части гликопротеинов являются стабилизация структуры белка, защита белка от разрушения протеазами, контроль времени жизни белка в крови, физическое поддержание структуры и целостности тканей, участие в адгезии клеток и межклеточных взаимодействиях, а также в связывании лигандов с рецепторами.

Среди основных типов конъюгатов белков с углеводами можно выделить следующие:

- N-связанные;
- O-связанные;
- связанные с гликозилфосфатидилинозитом (GPI).

N-Связанные гликаны всегда присоединяются к боковой цепи аспарагина (рис. 8.5), находящегося в составе консенсусной последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X — любая аминокислота, за исключением пролина. O-Гликозилирование имеет место тогда, когда углевод присоединяется к гидроксильной группе серина или треонина (рис. 8.5). Однако в данном случае не существует никакой консенсусной последовательности, как для N-гликозилирования. Связанные с GPI мембранные «якоря» обнаружены относительно недавно. Они представляют собой сложные гликофосфолипиды, связанные ковалентной связью с различными белками, располагающимися на внешней стороне плазматической мембраны. Функция этих якорей состоит в обеспечении стабильной связи белка с двойным липидным слоем мембраны (подробнее эта группа гликопротеинов здесь не обсуждается).

Определение структуры O- и N-связанных олигосахаридов представляет определенный интерес, поскольку гликозилирование может влиять как на продолжительность жизни, так и на функции белка. Особенно это важно для производства рекомбинантных гликопротеинов, применяемых в терапевтических целях, поскольку необходимо быть уверенным в правильности структуры углеводной части молекулы. Следует отметить, что в клетках прокариот гликозилирования не происходит, поэтому гены гликопротеинов клонируют в клетках эукариот. **Гликозилирование** белка — это сложная проблема. Один гликопротеин от другого отличаются участком гликозилирования (например, только около 30% консенсусных последовательностей для N-гликозилирования связано с полисахаридами; очевидно, определенную роль играет также вторичная структура белка на этом участке), типом связи между аминокислотой и углеводом, составом углеводных цепей, а также последовательностями углеводных цепей и типами связей в них.

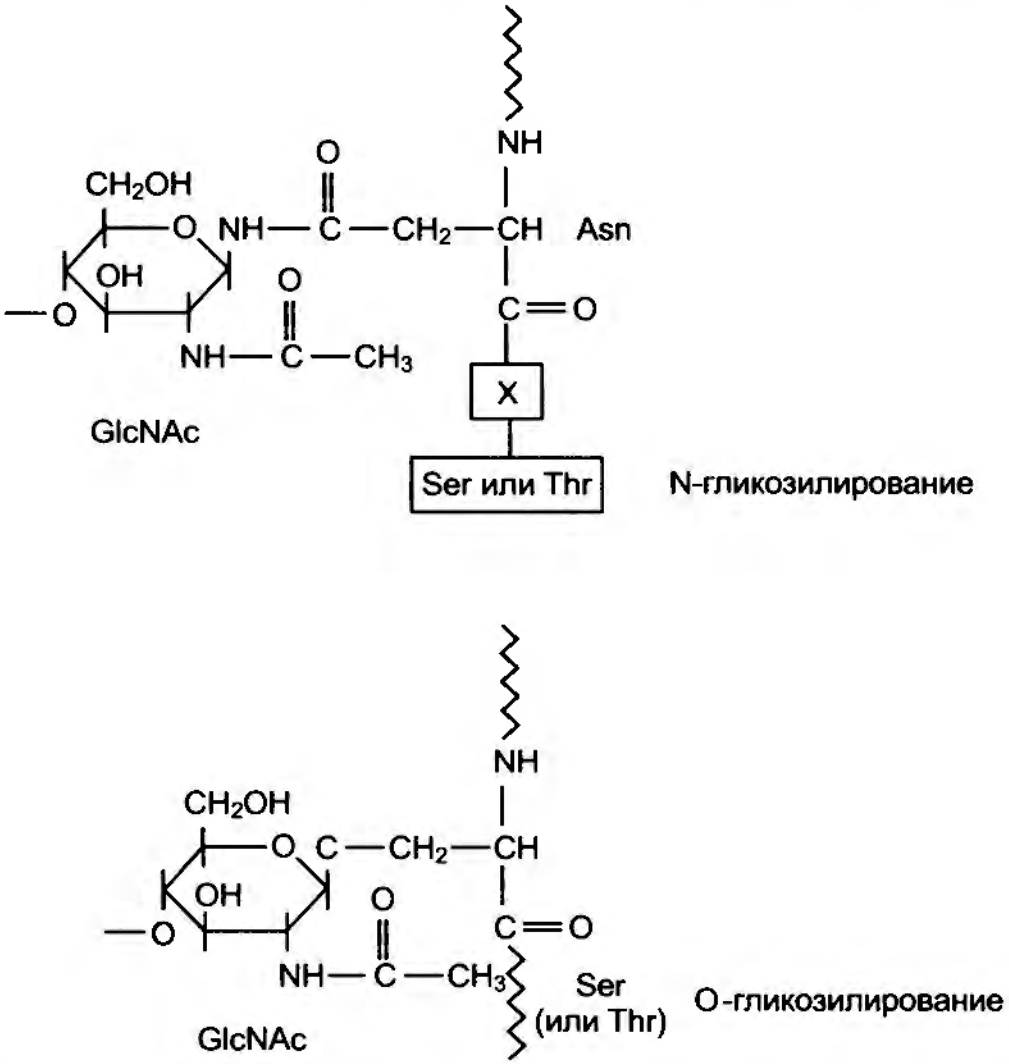


Рис. 8.5. Два типа связывания олигосахаридов, обнаруженные в гликопротеинах

В гликопротеинах млекопитающих обнаружено восемь основных типов мономерных звеньев, хотя изредка встречаются и другие варианты сахаров. Эти мономерные звенья представлены N-ацетилнейраминовой кислотой (NeuNAc), N-гликолилнейраминовой кислотой (NeuGc), D-галактозой (Gal), N-ацетил-D-глюкозамином (GlcNac), N-ацетил-D-галактозамином (GalNAc), D-маннозой (Man), L-фукозой (Fuc) и D-ксилозой (Xyl). Еще более усложняет картину тот факт, что в любой популяции молекул очищенного гликопротеина всегда имеет место определенная гетерогенность структуры углеводной части (**гликоформы**). При этом возможно существование молекул с более разветвленными боковыми цепями сахаров, укороченной углеводной цепью и наличием дополнительных углеводных цепей. Понятно, что полное определение характера гликозилирования белка представляет собой довольно трудоемкую задачу. Тем не менее ход анализа довольно прост и понятен и в общих чертах описан ниже.

В первую очередь следует выяснить, является ли очищенный белок гликопротеином. Полосы гликопротеина в геле (например, после проведения SDS-электрофореза в полиакриламидном геле) можно выявить с помощью катионных красителей, таких как алциан синий, который связывается с отрицательно заряженной боковой цепью гликозаминогликана, или с помощью периодной кислоты и реагента Шиффа; при этом

углеводы сначала окисляются под действием периодной кислоты, а затем окрашиваются реагентом Шиффа. Хотя оба метода специфичны для углеводов (т. е. негликозилированные белки с их помощью не окрашиваются), оба они имеют низкую чувствительность. Более чувствительный и более информативный метод состоит в использовании специфических углевод-связывающих белков, называемых лектинами. Реакцию с лектинами (несущими ферментативную метку) можно проводить с полосой белка на мембране после переноса из геля, дот-блотом образца гликопротеина или гликопротеином, связанным на стенках микротитровального планшета. Лектины, связавшиеся с гликопротеинами, можно идентифицировать по наличию ферментативной активности. Повторяя эксперимент с набором различных лектинов, можно не только подтвердить наличие гликопротеина, но и идентифицировать имеющиеся остатки сахаров. После подтверждения гликозилирования белка обычно выполняют ряд следующих процедур.

- *Качественная и количественная оценка различных типов моносахаридов*. Моносахариды высвобождаются путем гидролиза в растворе HCl в метаноле при 80 °C в течение 18 ч. Отдельные моносахариды разделяют и определяют методом количественной газовой хроматографии.
- *Расщепление протеазами с образованием гликопептидов*. Обычно выбирают протеазы, расщепляющие гликопротеин на пептиды и гликопептиды размером от 5 до 15 аминокислотных остатков. Гликопептиды затем фракционируют с помощью ВЭЖХ и определяют их N-концевую последовательность для идентификации участка гликозилирования.
- *Построение олигосахаридного профиля*. Цепи олигосахаридов отщепляют от полипептидного остова либо химическим путем, например гидразинолизом, для высвобождения N-связанных олигосахаридов, либо ферментативным путем с помощью пептид-N-глюкозидазы F (PNG-азы F), которая отщепляет сахара, связанные с аспарагином, или эндо-α-N-ацетилгалактозаминидазы, отщепляющей O-связанные гликаны. Олигосахариды затем разделяют с помощью ВЭЖХ или с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии.
- *Анализ структуры каждого очищенного олигосахарида*. Данный анализ подразумевает определение состава, последовательности и природы связей в каждом из очищенных олигосахаридов. Детальное обсуждение этого типа анализа выходит за рамки данной книги. Скажем только, что для его проведения используются такие методы, как FAB–MC, газовая хроматография–MC, анализ с помощью лектинов после частичного высвобождения сахаров и ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

8.4.5 Третичная структура

Чаще всего трехмерную структуру белка определяют методом рентгеновской кристаллографии. Мы не будем подробно останавливаться на теоретических принципах и методологии этого метода анализа, поскольку для

их изложения необходимо детальное математическое описание метода и алгоритмы компьютерного анализа большого количества получаемых данных. Поэтому ниже представлено лишь краткое и несколько упрощенное описание метода без упоминания тех проблем и подводных камней, с которыми сталкивается исследователь при определении третичной структуры белка.

- Понятно, что первым этапом анализа является получение кристалла белка (кристалл — это трехмерная решетка, образуемая молекулами белка). Для получения кристалла требуется препарат белка наивысшей возможной степени очистки, поскольку в отсутствие примесей вероятность кристаллизации — образования строго упорядоченной структуры — гораздо выше. Поскольку до сих пор физическая модель кристаллизации не до конца понятна, подход к получению кристаллов белка обычно эмпирический. Тем не менее все методы кристаллизации основаны на варьировании тех физических параметров, которые влияют на растворимость белка: pH, ионная сила, температура, наличие осаждающих агентов. Экспериментаторы обычно каждый раз подбирают метод кристаллизации для каждого конкретного белка. Сначала приходится выявить, при каких условиях белок вообще может начать кристаллизоваться и затем путем тонких вариаций этих условий уже и получают кристалл. Зародыши кристаллов образуются в результате удачных столкновений молекул в крупных агрегатах, а вероятность образования подобных агрегатов выше в насыщенных растворах. Понятно, что насыщенный раствор белка должен содержать по крайней мере миллиграммы этого белка. Часто это и есть главная проблема. К счастью, методы генной инженерии позволяют получать очень высокий выход многих клонированных белков. Ниже приведем несколько методов, применяемых при выращивании кристаллического белка.
  А) *Равновесный диализ*. Пересыщенный раствор белка получают при диализе против раствора осадителя или путем постепенного изменения pH или ионной силы. Часто из-за ограниченного количества белка данную процедуру проводят в малом объеме (менее 50 мм^3), для чего разработаны специальные микротехнологии.
  Б) *Диффузия паров летучих веществ*. Метод основан на равновесии в паровой фазе для получения пересыщенного раствора. В методе «висящей» капли на дно стакана помещают осадитель, стакан закрывают часовым стеклом, на внутренней поверхности которого находится капля концентрированного раствора белка. За счет диффузии паров осадителя происходит возрастание его концентрации в висящей капле раствора белка. Поскольку для работы необходимы малые объемы вещества, он хорошо подходит для скрининга различных условий кристаллизации.

  Размер образующихся кристаллов не всегда достаточен для проведения анализа. В таком случае мелкие кристаллы помещают в пересыщенный раствор белка и получают кристаллы большего размера.

- Полученный кристалл (чрезвычайно хрупкий!) кладут в кварцевую или стеклянную капиллярную пробирку, на один из концов которой помещают каплю маточного раствора (раствора, из которого произошла кристаллизация) или стабилизирующего раствора, чтобы предотвратить высыхание кристалла. Затем пробирку запаивают; кристаллы в пробирке подвергают рентгеновскому анализу. Поскольку длина волны рентгеновских лучей сравнима с расстоянием между атомами в кристалле, он служит в качестве дифракционной решетки. Рентгеновские лучи преломляются и интерферируют как в фазе, так и в противофазе и дают дифракционную картину, как показано на рис. 8.6. Современ-

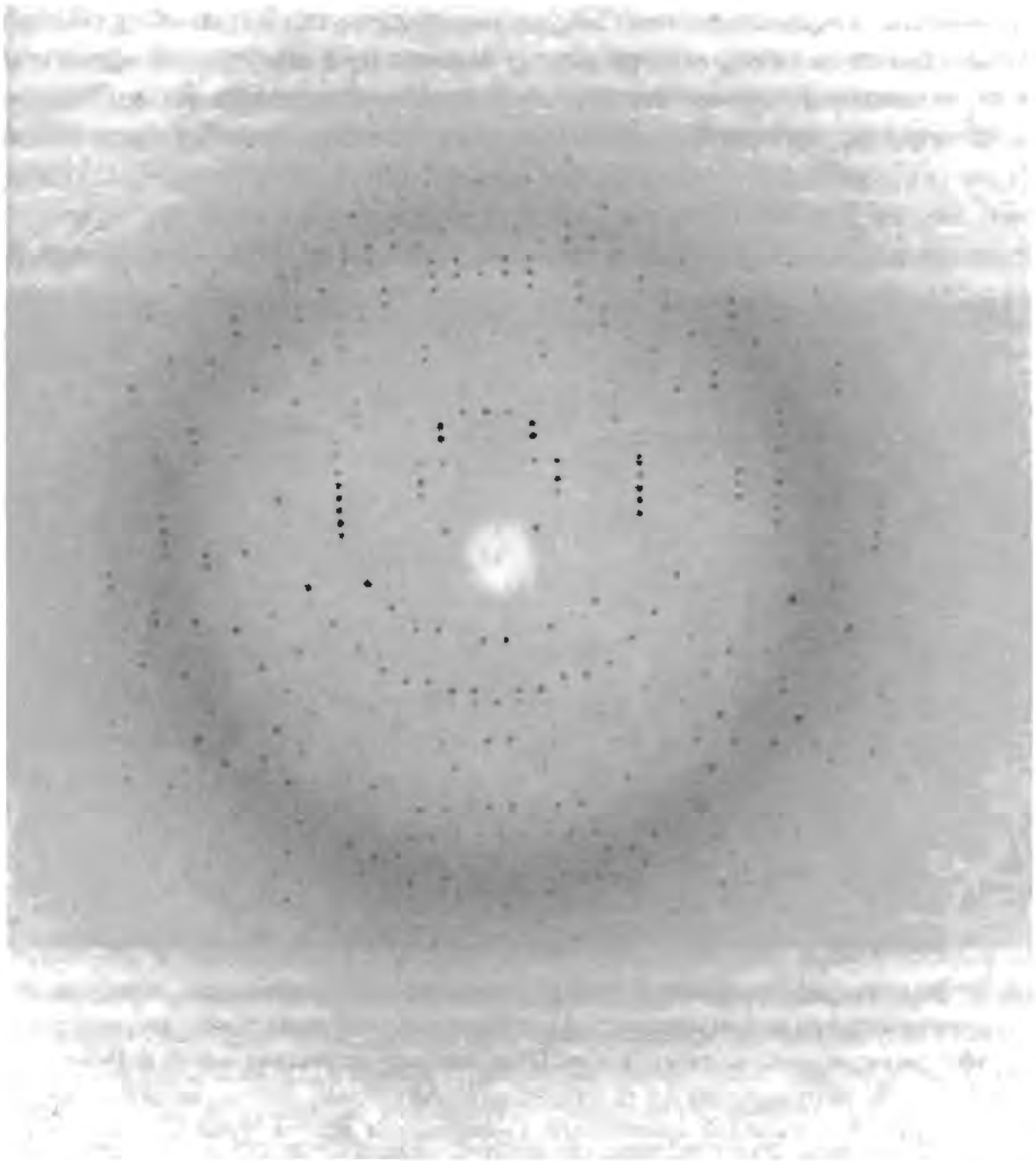


Рис. 8.6. Рентгеновская дифракция на кристалле комплекса тимидинкиназы вируса простого герпеса типа 1 с субстратом дезокситимидином (разрешение 2 Å). Фотография любезно предоставлена Джоном Н. Чампнессом, Мэтью С. Беннеттом и Марком Р. Сандерсоном из Королевского колледжа в Лондоне

ные методы обработки полученных результатов очень сложные. Ранее дифракцию рентгеновских лучей анализировали с помощью обычных дифрактометров, промеряя проявленную и высушенную фотопленку. Такая обработка результатов занимает много недель. Современные детекторы поверхности анализируют такие данные за 24 ч.

- К сожалению, одной дифракционной картины недостаточно для определения структуры кристалла. Для каждого дифракционного максимума нужно измерить **амплитуду** и **фазу**. Однако фазу нельзя найти из экспериментов по дифракции, так что для ее расчета проводят дополнительные эксперименты. Чаще всего с этой целью используют **метод изоморфного замещения**. Для его проведения требуются как минимум еще два кристалла белка, каждый из которых получен в присутствии ионов одного из тяжелых металлов (например, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Mn^{2+}). Сравнение дифракционной картины, полученной при облучении кристалла белка, с теми, которые получаются при облучении кристаллов с включениями ионов металлов, позволяет определить фазу. Теперь для получения кристаллов с включенными тяжелыми металлами целевой

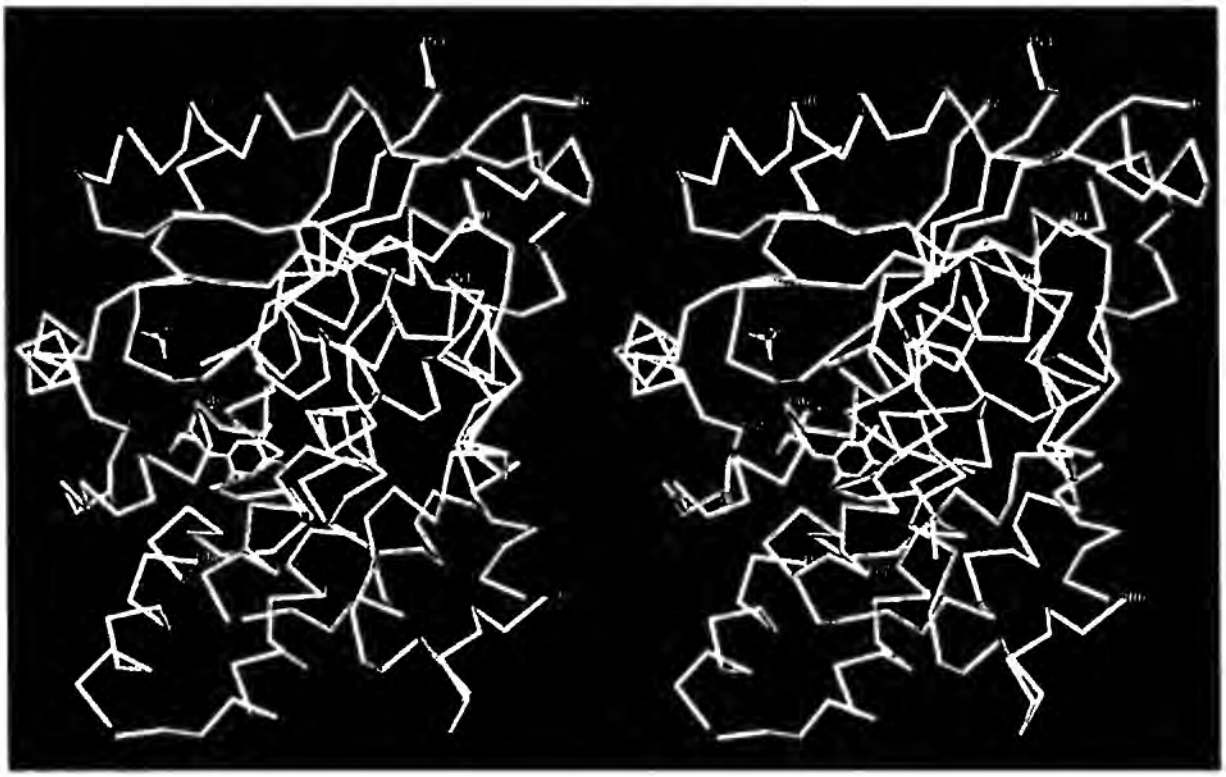


Рис. 8.7. Стереопара: углеродный скелет тимидинкиназы из вируса простого герпеса типа 1, полученный при кристаллографическом анализе комплекса фермента с одним из его субстратов — дезокситимидином. Фермент представляет собой α–β-белок, пятиугольный β-слой, окруженный 14 α-спиралями. Активный центр, занятый дезокситимидином, окружен четырьмя спиралями, С-концевым фрагментом β-слоя и коротким flap-сегментом. Сульфат-ион занимает место β-фосфата отсутствующего косубстрата АТФ. Короткие отсутствующие участки соответствуют тем областям, для которых данные рентгеновского анализа не могли быть интерпретированы. Фотография любезно предоставлена Джоном Н. Чампнессом, Мэтью С. Беннеттом и Марком Р. Сандерсоном из Королевского колледжа в Лондоне

белок клонируют в клетках ауксотрофа по метионину, а затем выращивают этот штамм на среде с селенметионином (селенсодержащий аналог метионина). В результате селен встраивается в метионин белка, так что после очистки и кристаллизации белка в его структуре содержится селен.

- Данные по дифракции обрабатываются компьютером для создания **карты электронной плотности**. Затем на эту карту методом компьютерной графики наносят известную аминокислотную последовательность белка. В результате получают модель трехмерной структуры белка (рис. 8.7). Какое-то время назад существовало предположение, что трехмерное изображение структуры, полученное на основании анализа строго зафиксированных молекул в кристалле, может отличаться от той структуры, которую молекулы имеют в растворе. Это подозрение было эффективно устранено, например, путем демонстрации реакции превращения субстрата, введенного в кристалл фермента (в кристалле сохраняется достаточное количество жидкости, чтобы субстрат оставался в растворенном виде). Теперь стало возможным определять структуру белка в растворе методом ЯМР. В настоящее время этот метод позволяет определять структуру белка с молекулярной массой до 20 000 кД, но нет сомнений, что через какое-то время появится возможность анализировать и более крупные белки. Хотя длительной стадии приготовления кристаллов белка теперь удается избежать, процесс обработки данных не менее долгий и сложный, чем при рентгеновской кристаллографии.

8.5 ПРОТЕОМИКА. ФУНКЦИИ БЕЛКА

Для того чтобы полностью понять механизм работы клетки, необходимо установить роль каждого клеточного белка. При лечении и диагностировании некоторых заболеваний человека (например, злокачественных образований) также следует изучать те изменения, которые происходят с белковыми компонентами клетки. Почти любое лекарство действует на определенный белок. Казалось бы, завершение работы в рамках проекта «Геном человека» должно было положить конец непосредственному анализу каждого отдельного белка, поскольку аминокислотная последовательность любого белка может быть теперь выведена на основании последовательности ДНК. Однако это не так по целому ряду причин.

- Во-первых, хотя в организме в клетках каждого типа присутствует одна и та же ДНК, в разных тканях экспрессируются разные наборы генов и, следовательно, белковый состав клеток разного типа различается. Так, некоторые белки обнаружены практически во всех клетках (так называемые «гены домашнего хозяйства»; например белки, участвующие в гликолизе), но в то же время клетки почек, печени, головного мозга и т. д. содержат специфические белки, встречающиеся только в этих тканях и необходимые для их функционирования. Следовательно, только изучение белкового состава клетки может дать ответ на вопрос, какие белки там действуют.

- Во-вторых, теперь стало ясно, что одна и та же последовательность ДНК (ген) может кодировать несколько белков. Это достигается следующими путями:
  1) Альтернативный сплайсинг мРНК.
  2) Вариации трансляции стоп-кодонов и стартовых кодонов.
  3) Сдвиг рамки считывания, приводящий к трансляции разных наборов триплетов и поэтому к образованию совершенно различных белков.
  4) Посттрансляционная модификация. Последовательность генома определяет аминокислотную последовательность белка, но ничего не говорит о его посттрансляционной модификации (разд. 8.2.1 и 9.5.3), которая может происходить после синтеза полипептидной цепи на рибосомах. В результате фосфорилирования, гликозилирования и других реакций одной и той же полипептидной цепи могут образовываться до 10 вариантов продуктов.

Результатом перечисленных выше процессов является то, что набор содержащихся в организме человека белков во много раз сложнее, чем геном. На основании последовательности генома человека можно предсказать существование 30 000–40 000 генов (и, следовательно, белков), тогда как оценки реального числа белков в клетках человека дают 200 000 и даже более. Пришлось отказаться от формулы «один ген — один белок».

Все сказанное выше должно убедить специалиста в необходимости проводить анализ белкового состава клетки и разбираться с функциями каждого отдельного клеточного белка. Возникшие в последние годы новые методы (обсуждаемые ниже) сильно расширили наши возможности в изучении белковых компонентов клетки и привели к появлению нового термина **протеом**. В настоящее время выделилось отдельное научное направление — **протеомика**. Ее цель состоит в идентификации каждого клеточного белка, определении его количества и его функций в клетке.

Предыдущие разделы данной главы, а также гл. 11 посвящены традиционным, но по-прежнему действенным подходам к изучению белков, которые заключаются в выделении отдельных белков из клеток и тканей и их очистке, в результате чего становится возможным проводить анализ структуры и функций очищенного белка. Протеомика основана на другом подходе, позволяющем увидеть и проанализировать значительную часть всего белкового содержимого клетки в одну стадию. Такие возможности открываются в связи с появлением новых методов и технологий, развивающихся параллельно с масс-спектрометрическими методами анализа белка, которые способствуют бурному прогрессу химии белка. Главный метод, используемый в протеомике — двумерный (2D) электрофорез (см. разд. 10.3). Хотя 2D-электрофорез остается основным методом протеомики, само развитие этой науки способствовало возникновению новых методов анализа белка.

8.5.1 2D-Электрофорез

Двумерный электрофорез нашел широкое применение при изучении экспрессии генов в различных биологических состояниях, например в здоровых и пораженных тканях. С этой целью необходимо провести 2D-электрофорез экстракта больной ткани (например, ткани печени при раке печени) и сравнить результат с данными 2D-электрофореза экстракта нормальной ткани. Если обнаруживается, что какой-то белок присутствует (или наоборот отсутствует) в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками, следует идентифицировать этот белок и понять, почему ген данного белка экспрессируется (или не экспрессируется) при данном заболевании. Таким образом можно попытаться установить молекулярные основы заболевания. Данный подход можно применить при изучении любого патологического процесса, например артрита, болезней почек, дефекта сердечного клапана и т. д., если только возможно провести сравнение нормальных и пораженных тканей.

В благоприятных условиях на двумерном геле большого формата можно идентифицировать до 5000 белковых пятен. Поэтому 2D-электрофорез является удобным инструментом для анализа изменения характера экспрессии значительной доли клеточных белков, а не одного или двух, как это позволяли делать ранее существовавшие методы. Потенциальные возможности протеомики очень велики. Сначала необходимо получить 2D-карту белков, экспрессирующихся в данном организме, ткани или клетке в «нормальных» условиях. Эта карта и полученные на ее основе данные могут использоваться для сравнения с аналогичными данными, полученными для «аномальных» или подвергающихся какому-либо воздействию организмов, тканей или клеток. Так, кроме сравнения здоровых и поврежденных тканей метод позволяет производить следующие виды анализов:

- оценивать медикаментозное лечение или действие токсинов на клетки;
- наблюдать за изменением белкового состава клетки на разных стадиях развития тканей;
- наблюдать за ответом на внеклеточные стимулы, такие как гормоны или цитокины;
- сравнивать патогенные и непатогенные штаммы бактерий;
- сравнивать состав сывороточных белков здорового человека с соответствующим составом белков у пациентов с болезнью Альцгеймера или онкологическим заболеванием с целью выявления белков, которые могли бы служить в качестве диагностических маркеров заболевания.

Например, при изучении токсического действия лекарств на клетки печени можно сравнить результаты 2D-электрофореза белков «поврежденной» печени с 2D-картой белков печени в норме и выявить те изменения, которые происходят в результате приема лекарств.

К счастью, существует ряд коммерческих программ для обработки двумерных гелей, которые совместимы с персональными компьютерами и позволяют извлекать из электрофоретической картины необходимую качественную и количественную информацию, а также сравнивать между собой два двумерных геля (см. ниже). С помощью компьютерных программ были созданы многочисленные базы данных по экспрессии белков в различных типах клеток и тканей. Например, существует серия баз данных 2DE, называемая **SWISS-2D PAGE**, которая поддерживается госпиталем при Женевском университете и доступна на сайте http://au.expasy.org/ch2d/. В результате в каждой исследовательской лаборатории появляется возможность сравнивать собственные 2D-данные с данными, полученными в других лабораториях.

Для сравнения двух двумерных гелей используют многочисленные компьютерные программы, разработанные специально для этой цели.

Одна из наиболее интересных программ — **Flicker program** (htt://popen2dprot.sourceforge.net/Flicker). Она позволяет наложить друг на друга два геля, при этом совпадающие пятна будут выглядеть как фиксированные точки, а те, что есть лишь на одном из гелей, будут появляться в виде **вспышек** (отсюда название программы: *от англ.* flicker — мерцание, вспышка). После сравнения гелей необходимо идентифицировать специфические белки. В большинстве случаев для этого используют метод **пептидного масс-фингерпринтинга**. Нужные пятна вырезают из гелей и инкубируют в растворе трипсина, который расщепляет полипептидную цепь у каждого остатка аргинина и лизина со стороны С-конца. В результате белок превращается в набор пептидов, которые далее анализируют методом MALDI-MC (см. разд. 9.3.7) и определяют молекулярные массы всех фрагментов. Получаемый набор значений молекулярных масс высокоспецифичен для каждого конкретного белка, поскольку никакой другой белок при расщеплении трипсином не может дать абсолютно идентичного набора фрагментов. Используя компьютерные программы Mascot или Protein Prospector (разд. 9.7.2), экспериментальный набор значений молекулярных масс сравнивают с молекулярными массами фрагментов, полученных при обработке трипсином известных белков (или со значениями для фрагментов, предсказанных на основании нуклеотидной последовательности). Если обнаружено совпадение с белком из базы данных, конкретный белок можно считать идентифицированным.

Впрочем, иногда результаты масс-фингерпринтинга пептидов оказываются неоднозначными. В подобных случаях требуется определить аминокислотную последовательность участка одного из пептидов. Для этого используют тандемную масс-спектрометрию (разд. 9.3.3), при которой один из пептидов, выделенных для масс-фингерпринтинга, расщепляется во втором анализаторе, а на основании характера фрагментации можно определить аминокислотную последовательность (при масс-спектрометрии происходит расщепление полипептидной цепи по пептидным связям, так что разница в массах образующихся фрагментов соответствует массе специфического аминокислотного остатка; разд. 9.5.5). Полученная последовательность фрагмента затем используется для по-

иска идентичной последовательности белка в базе данных. Существуют базы данных, в которых хранится информация обо всех белках из различных видов организмов. Такие базы данных можно разделить на две категории: 1) простые собрания последовательностей, выведенных главным образом на основании последовательностей ДНК (например, база данных Tr EMBL); 2) аннотированные базы данных, в которых кроме самих последовательностей можно найти дополнительную, представленную специалистом-биологом информацию, основанную на опубликованных данных (например, база данных SWISS-PROT).

Пример представления результатов анализа приведен на рис. 8.8. Лизат клеток ($2 \cdot 10^6$) крысы с базофильным лейкозом разделяли методом двумерного электрофореза; для анализа было выбрано пятно 2. Белок из этого пятна расщепляли трипсином *in situ* и выделяли образующиеся пептиды. Образцы анализировали методом тандемной МС, используя тройной квадрупольный масс-анализатор (ESI-MC^2). Было обнаружено несколько ионов пептидов. Один из них (*m/z* 890) выбрали для дальнейшего анализа и с помощью квадрупольного масс-спектрометра разложили на фрагменты с *m/z* в диапазоне от 595,8 до 1553,6 (рис. 8.8). Ионы с *m/z* 1002,0, 1116,8, 1280,0, 1466,2 и 1553,6, по-видимому, относились к серии ионов Y-типа (см. рис. 8.8), поскольку появлялись при более высоких значениях

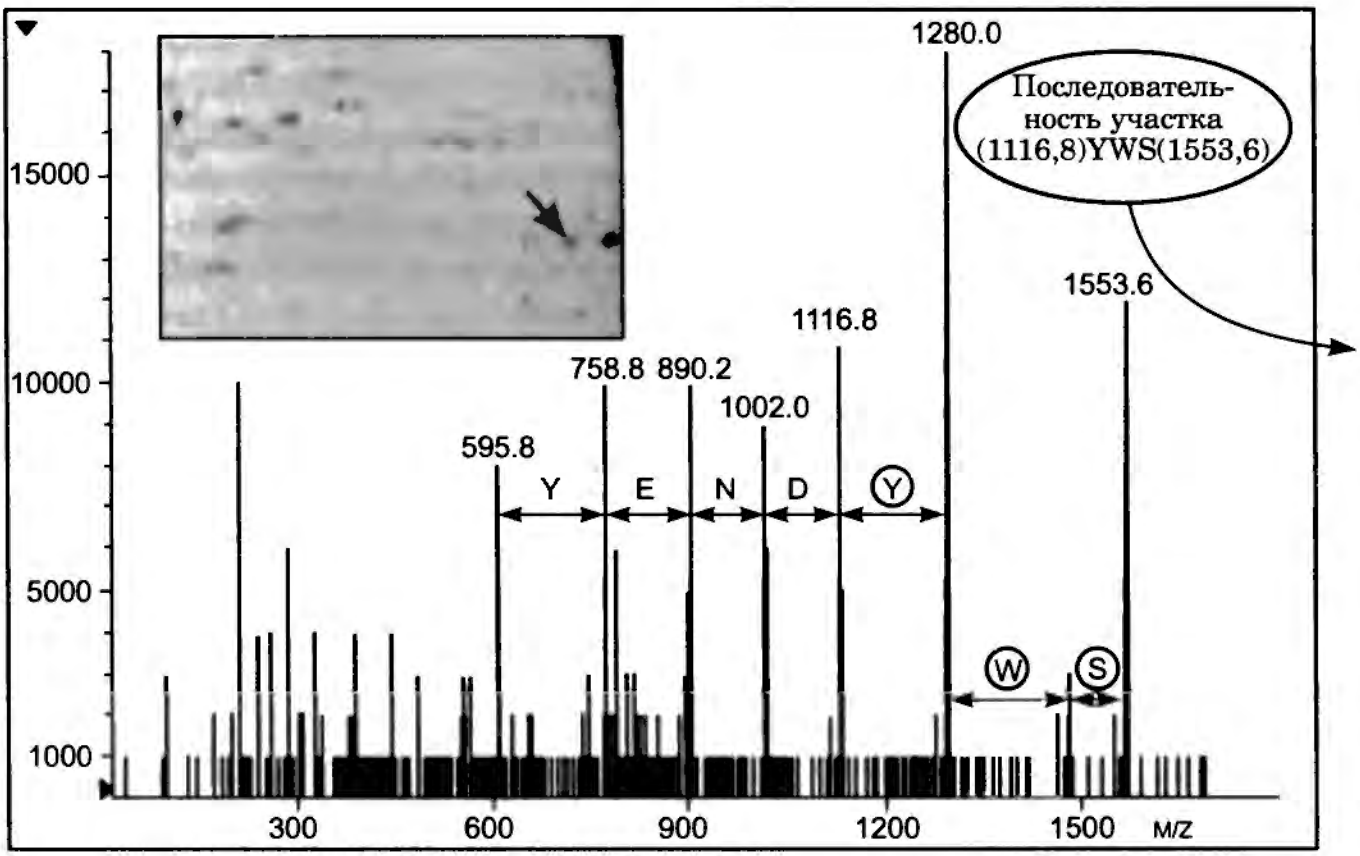


Рис. 8.8. Наноспрей-MC^2 спектр пептида с *m/z* 890 из пятна 2 клеток крысы с базофильным лейкозом: определение участка последовательности. По оси Y можно определить величину относительной интенсивности. Фотография любезно предоставлена лабораторией Glaxo SmithKline, Стевенэйдж, Великобритания

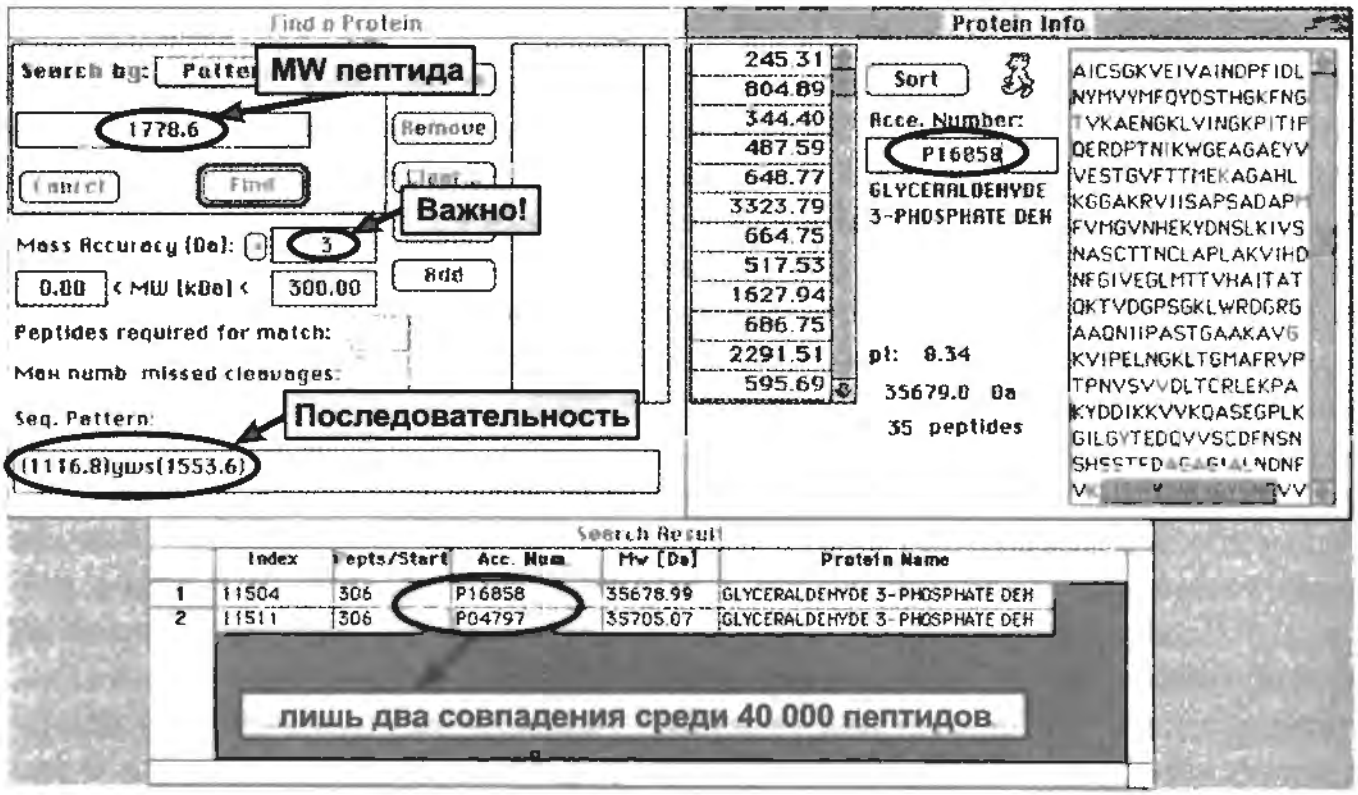


Рис. 8.9. Форма для ввода данных (PeptideSearch™) и поиск на основании результатов, полученных методом ESI-MC/MC для *m/z* 890 из пятна 2 клеток крысы с базофильным лейкозом. Фотография любезно предоставлена лабораторией Glaxo SmithKline, Стевенэйдж, Великобритания

m/z, чем предшественник с *m/z* 890. Расстояние между двумя соседними ионами Y непосредственно соответствует аминокислотному остатку, поскольку два фланкирующих иона Y возникают в результате расщепления двух соседних амидных связей. Следовательно, зная молекулярные массы 20 обычно встречающихся аминокислот, можно определить наличие определенного остатка в любой точке пептидной последовательности. Положение аминокислотного остатка определяют по значению *m/z* для двух ионов. Определив несколько аминокислотных остатков, удалось воспроизвести последовательность аминокислот, которая в данном случае соответствовала YWS (при записи однобуквенными символами). Далее по базам данных осуществляли поиск пептида массой 1778 Д с расположением наименьшего Y иона при *m/z* (1116,8), с последовательностью YWS и с расположением наибольшего Y иона при *m/z* 1153,6. Такую последовательность можно записать в виде (1116,8)YWS(1553,6).

Поиск по базе данных SWISS-PROT (рис. 8.9) выявил лишь два «попадания» среди 40 000 полипептидов. По всей вероятности, данный белок представляет собой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Полная последовательность пептида следующая: LISWYDNEYGYSNR; анализ фрагментов с помощью MC/MC дал прекрасный результат. Другие пептиды из образца можно проанализировать таким же образом, подтвердив тем самым идентичность белка.

Одним из вариантов двумерного электрофореза является **разностный гель-электрофорез** (DIGE). Этот метод также позволяет сравнивать белковые компоненты двух сходных смесей, но в данном случае приходится проводить лишь один электрофорез, а не два. Каждый из двух сравниваемых образцов обрабатывают одним из двух различных, но схожих по структуре флуоресцентных красителей (cy3 и cy5). Красители реагируют с аминогруппами, так что каждый белок оказывается связанным с флуоресцентной меткой по остаткам лизина и N-концевой аминогруппе. Затем два образца смешивают и наносят *на один и тот же* двумерный гель. В результате каждый белок из первого образца накладывается на соответствующий белок из другого образца. Сканирование геля при двух длинах волн, возбуждающих молекулы двух красителей, позволяет выявить те точки, в которых сосредоточен только один краситель. Большая часть белковых пятен будет, естественно, флуоресцировать на обеих длинах волн. Если же в одном из пятен присутствует лишь один краситель, это говорит о том, что соответствующий белок присутствует лишь в одном образце, а по длине волны флуоресценции можно определить, в каком именно из образцов он есть.

8.5.2 Метод изотопно-кодированной аффинной метки

В методе **изотопно-кодированной аффинной метки** (isotope-coded affinity tags, ICAT) для идентификации сложных белковых смесей используют не двумерный гель, а масс-спектрометрию. Как и двумерный электрофорез (разд. 8.5.1), данный метод применим для поиска различий в составе белков в опухолевой и нормальной тканях. Для этого необходимы две белковые последовательности, которые идентичны во всем, но немного различаются по молекулярным массам: одна последовательность поэтому называется «тяжелой», а другая — «легкой». Обе последовательности содержат 1) химические группы, реагирующие с аминокислотой цистеином, 2) биотиновую группу. В обеих молекулах эти группы соединены между собой через линкерный участок, но в одном случае линкер содержит восемь атомов водорода, а в другом — восемь атомов дейтерия. Понятно, что разница в молекулярных массах последовательностей составляет 8 Да (см. рис. 9.26). В один клеточный экстракт из опухолевых клеток добавляют одну последовательность, в результате чего она связывается со всеми остатками цистеина во всех белках, а во второй экстракт из нормальных клеток — вторую последовательность, получая в принципе тот же результат. Затем оба модифицированных образца обрабатывают трипсином, образуются смеси пептидов, в которых все остатки цистеина связаны с биотинилированной последовательностью. Затем экстракты соединяют и наносят на колонку для аффинной хроматографии, содержащую авидин. При смывании с колонки смесь разделится на пары идентичных пептидов (полученных из идентичных белков), причем молекулярные массы парных пептидов будут различаться на 8 Да.

При анализе полученных пептидных смесей методом жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии получают также набор из парных

сигналов, различающихся на 8 Да. По этим данным можно обнаружить, что какой-то пептид преобладает в смеси. Если содержание белков в сравниваемых образцах было одинаковым, большинство парных сигналов имеет одинаковую интенсивность. Однако пептиды, образованные из белков, которых в одной из смесей было больше (или меньше), будут давать в каждой паре более сильный (или более слабый) сигнал. Последующий анализ каждой из таких пар методом тандемной масс-спектрометрии позволит получить некоторую последовательность, на основании которой можно идентифицировать данный белок. Более подробно метод обсуждается в разд. 9.6.2.

8.5.3 Функциональный анализ белков

На основании экспериментальных данных, полученных с помощью различных методов исследования (в том числе описанных выше), можно определить полную (или часть) аминокислотную последовательность анализируемого белка. Следующий этап состоит в определении функций и роли этого белка в организме. Сначала следует провести поиск гомологичных белков в базах данных (**метод гомологий**). Для этого применяют программы BLAST или PSI-BLAST. Если найден гомологичный белок с известной функцией, неважно выделен ли он из того же или из другого источника, это обязательно указывает на функцию анализируемого белка. Однако данный подход не всегда возможен. Например, когда в 1996 г. была определена полная нуклеотидная последовательность генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, было идентифицировано 6000 генов. Из них 2000 были известные на тот момент гены дрожжевых белков, 2000 имели гомологии с известными последовательностями, так что их функции можно было определить методом гомологий, но оставшиеся 2000 не имели никаких гомологий с известными генами, т. е. представляли собой «новые», ранее не изученные гены. В таком случае приходится прибегать к другим методам, позволяющим определить функции белка. Назовем некоторые из них:

- *Анализ филогенетических профилей* позволяет идентифицировать другие белки с таким же филогенетическим профилем (т. е. с тем же характером присутствия или отсутствия), что и у анализируемого белка. Если такие белки найдены, считают, что данный белок вовлечен в тот же клеточный процесс, что и эти белки (говорят, что между белками имеется функциональная связь). Это дает ключ к разгадке роли белка в клетке. Лежащий в основе данного метода принцип гласит, что два белка должны одновременно наследоваться новым видом организма только в том случае, только если между ними существует функциональная связь. На момент написания данной книги было определено уже свыше 100 геномных последовательностей, к которым можно применить данный метод анализа. На рис. 8.10 представлен упрощенный пример, в котором анализируется всего лишь пять геномов.
- *Анализ соседствующих генов*. Если выясняется, что в нескольких разных геномах два гена соседствуют, можно предположить существова-

	A	B	C	D	E
P1	1	1	1	0	0
P2	0	0	1	1	1
P3	1	0	1	1	0
P4	0	1	1	0	1
P5	1	1	1	0	1
P6	0	1	1	0	1
P7	1	0	0	1	0
P8	1	0	1	1	0

Рис. 8.10. Анализ филогенетических профилей. Показано пять геномов — от A до E (например, *E. coli*, *S. cerevisiae* и т. д.). Единица означает присутствие, а нуль — отсутствие в данном геноме белков P1–P8. Видно, что белки P3 и P8 имеют одинаковый филогенетический профиль и, следовательно, могут иметь функциональную связь. Аналогичным образом, белки P4 и P6 функционально связаны между собой

ние функциональной связи между соответствующими белками. Это предположение основано на наблюдении, что функционально связанные гены в прокариотах часто организованы в форме оперонов (например, *lac*-оперон). Хотя у эукариотов опероны встречаются редко, однако гены белков, вовлеченных в один и тот же биологический процесс (метаболический путь) в клетке, имеют тенденцию располагаться в геноме поблизости друг от друга (т. е. соседствовать, например, на участке из не более 500 п.н.). Поэтому если два гена встречаются рядом в нескольких геномах, можно предположить наличие функциональной связи между продуктами этих генов. Метод наиболее широко используется для микробных геномов, однако до некоторой степени он применим и для клеток человека, в которых также встречаются кластеры генов, напоминающие опероны. Например, с помощью данного метода была установлена функциональная связь между восемью ферментами пути биосинтеза аргинина в *Mycobacterium tuberculosis*.

- *Анализ слияния генов*. Метод основан на наблюдении, что некоторые гены могут существовать отдельно в одном организме, но быть слитыми в единый полифункциональный ген в другом организме. Существование белкового продукта слитого гена (в котором две функции белка взаимозависимы, поскольку связаны с частями одной молекулы) указывает на

возможность взаимодействия двух отдельных белков и в первом организме. Предполагается, что слияние генов призвано снизить сложность регуляции генов.

- *Белок-белковые взаимодействия*. Еще один подход к определению функции белка основан на анализе белок-белковых взаимодействий, которым посвящен следующий раздел.

8.5.4 Белок-белковые взаимодействия

Сложное переплетение внутриклеточных процессов (сигнальные пути, биосинтетические пути и т. д.) безусловно подразумевает наличие взаимодействий между внутриклеточными белками и другими молекулами. Известно, что в клетке белки не находятся в изоляции; вовлеченные в один внутриклеточный процесс белки тесно взаимодействуют, образуя так называемый **биомодуль**. Поэтому, если обнаружено взаимодействие между новым белком и каким-то хорошо известным белком, напрашивается вывод о некоторой связи их функций. Например, если показано, что новый белок взаимодействует с одним или несколькими белками, вовлеченными в биосинтез аргинина, понятно, что новый белок также участвует в данном процессе. Этот подход позволил идентифицировать сети белковых взаимодействий в различных организмах, которые собраны в **базе данных о взаимодействии белков** (DIP4; http://dip.doe-mbi.ucla.edu). Учитывая современную тенденцию создания терминов, оканчивающихся на «ом», некоторые называют подобные карты белковых взаимодействий «**интерактомом**».

Одним из наиболее распространенных методов изучения белок-белковых взаимодействий является применение **дрожжевой двухгибридной системы (Y2H)**, которая использует модульную структуру **факторов транскрипции**. Ген фактора транскрипции GAL4 имеет кодирующие участки для двух доменов — ДНК-связывающего домена и *транс*-активирующего домена. В разных клетках дрожжей экспрессируют два домена, но связанных с разными белками (один — новый анализируемый белок, а второй — белок, с которым он может взаимодействовать). Затем осуществляют слияние этих клеток с образованием диплоидных клеток. Два этих белка часто называют **приманкой** (bait) и **добычей** (prey). Если в диплоидной клетке белок-приманка и белок-добыча взаимодействуют друг с другом, происходит соединение двух доменов фактора транскрипции, который может проявлять активность и связываться с промотором репортерного гена (например, гена *his*), индуцируя его экспрессию. Появление клеток, в которых экспрессируется продукт репортерного гена, говорит о взаимодействии белков приманка–добыча. На практике после слияния клеток производят отбор на дефицитной среде (в данном случае — на среде без гистидина), так что выживать могут только клетки, в которых экспрессируются взаимодействующие белки (поскольку они способны синтезировать гистидин). Если такое взаимодействие обнаружено, идентифицируют две взаимодействующие **открытые рамки считывания** путем секвенирования небольшого фрагмента гена данного белка.

Данный подход позволил осуществить клонирование всех 6000 открытых рамок считывания из *S. cerevisiae* как белка-приманки, так и белка-добычи. При скрининге 6000 клонов добычи против 6000 клонов приманки было обнаружено 691 взаимодействие, из которых лишь 88 были известны ранее. Так был получен ключ к установлению роли более 600 белков с ранее неизвестными функциями. Тот же подход, хотя и в гораздо большем масштабе, был использован для поиска взаимодействий между белками фруктовой мушки *Drosophila melanogaster*. Все 14 000 предсказанных открытых рамок считывания *D. melanogaster* были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и клонированы в векторы в двухгибридной системе. Было получено 45 417 клонов и обнаружено 10 021 белковое взаимодействие с участием 4500 белков. Более подробно дрожжевые двухгибридные системы описаны в разд. 6.8.3.

8.5.5 Белковые чипы

Новый подход к изучению белок-белковых взаимодействий основан на использовании белковых чипов. Во многом принцип данного метода совпадает с тем, что лежит в основе **ДНК-чипов** (разд. 6.8.8). Однако создание белковых чипов сопряжено с определенными трудностями, в частности, возникающими при связывании белков с поверхностью носителя, а также вызванными необходимостью контролировать отсутствие денатурации белка на каждом этапе работы.

Для создания белкового чипа белки иммобилизуют на твердом носителе (обычно на стекле или нитроцеллюлозной мембране) с помощью высокоточного контактного механизма (несколько напоминающего работу матричного принтера). В результате образуются мелкие пятнышки белка (размером 150–200 мкм) с плотностью нанесения 1500 пятен/см^2. Затем раствор неизвестного белка инкубируют на поверхности чипа в течение определенного времени, отмывают и идентифицируют участок связывания белка (см. ниже). Поскольку известно, какой белок был иммобилизован в каждой позиции чипа, можно идентифицировать каждую пару взаимодействующих белков.

Хорошим примером успешного применения данной технологии вновь служит *Saccharomyces cerevisiae*: был проведен скрининг белков из этих дрожжей с целью поиска белков, связывающихся с кальмодулином (это важный белок, участвующий в обмене кальция). В высококопийный экспрессионный вектор дрожжей было клонировано 5800 открытых рамок считывания и каждый из экспрессировавшихся белков был очищен. Затем каждый белок наносили на покрытое никелем покровное стекло микроскопа. Поскольку каждый белок содержал на С-конце последовательность из шести остатков гистидина (для связывания с никелем; см. разд. 11.8.5), все белки оказались ориентированы определенным образом: С-конец белка через последовательность $(His)_6$ был прикреплен к покрытому никелем стеклу, а остальная часть молекулы белка была свободна и доступна для взаимодействия с другим белком. Этот чип далее инкубировали с раствором кальмодулина, меченного биотином. Затем раствор кальмодулина уда-

ляли, а участки связывания идентифицировали путем инкубации чипа с раствором меченного флуоресцентной меткой авидина (белок авидин имеет высокое сродство к низкомолекулярному витамину биотину, см. разд. 7.5.5). По наличию флуоресценции в ультрафиолетовом свете удалось идентифицировать участки связывания кальмодулина. В результате было обнаружено 33 новых белка, способных связывать кальмодулин.

На рис. 8.11 (цветная вклейка) показана карта взаимодействий в протеоме дрожжей, составленная на основании опубликованных данных о белковых взаимодействиях в дрожжах. На карте представлено 1584 белка и 2358 взаимодействий. Белки окрашены в соответствии с их функцией: участвующие в слиянии мембран — в синий цвет, в метаболизме жиров — в желтый, в поддержании клеточной структуры — в зеленый и т. д. В электронной версии данной публикации этот рисунок можно увеличить и разобрать названия белков и существующие между ними взаимодействия.

Рис. 8.12 (цветная вклейка) суммирует данные, представленные на рис. 8.11, и показывает число взаимодействий между белками каждой функциональной группы с белками из своей и других групп. Под функциональной группой белков подразумеваются белки, выполняющие определенную роль в клетке. Первое число в скобках указывает на количество взаимодействий внутри группы, второе — на количество белков в группе. Числа на линиях, соединяющих группы, указывают на количество взаимодействий между белками этих двух групп. Например, в верхнем левом углу: существует 77 взаимодействий между 21 белком, участвующим в слиянии мембран, и 141 белком, вовлеченным в везикулярный транспорт. Если посмотреть в правый нижний угол диаграммы, можно увидеть, что некоторые белки, участвующие в процессинге и модификации РНК, взаимодействуют с белками, вовлеченными в оборот, спайсинг и транскрипцию РНК, а также в синтез белка (что, впрочем, кажется вполне естественным).

8.5.6 Системная биология

Из посвященного протеомике раздела нетрудно понять, что в современных условиях для изучения белков все меньше требуются методы выделения и анализа отдельных белков. Белки все чаще анализируют как окрашенные точки на двумерном геле, часто в количестве нескольких нанограммов, с помощью таких аналитических методов, как масс-спектрометрия (см. гл. 9), и в любом случае дело не обходится без анализа белковых и нуклеотидных последовательностей с помощью интернетовских программ (**биоинформатика**; разд. 5.8). После этого обязательным этапом является идентификация белка, взаимодействующего с анализируемым белком. Таким образом, протеомика уводит нас от изучения изолированных белков и предлагает рассматривать клеточные белки как часть динамической системы взаимодействий. Такой подход привел к возникновению **системной биологии**, которую можно определить как науку, изучающую живые организмы с общих позиций структурных взаимодействий, а не просто как сумму отдельных молекулярных компонентов. Таким образом, системная биология требует изучения всех взаимодействующих

компонентов клетки и мощные количественные методы протеомики играют при этом чрезвычайно важную роль. Понятно, что анализ сложных биологических систем приводит к накоплению гигантского количества информации, обработка которой возможна исключительно с помощью компьютерных методов, составляющих предмет биоинформатики (см. разд. 5.8). Сегодня уже изучение на уровне клетки не сводится исключительно к работе биолога. Системная биология использует междисциплинарные исследования, осуществляемые биологами, программистами, химиками, инженерами и математиками, способными понимать язык всех задействованных дисциплин и сопрягать свои методы работы с теми методами получения, накопления и анализа данных, которыми пользуется биоинформатика.

8.6 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

CUTLER, P. (2004) *Protein Purification Protocol*. Humana Press, Totowa, NJ. Детальное изложение теории и ряда практических методов очистки белков.

LIEBLER, D.C. (2002) *Introducton to Proteomcs*. Humana Press, Totowa, NJ. Хорошее введение в различные аспекты протеомики, в частности в анализ двумерных гелей методом масс-спектрометрии.

SCOPES, R.K. (1996) *Protein Purfcation*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin. Принципы и методы очистки белков.

WALKER, J.M. (2005) *Proteomics Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. Теория и ряд методов протеомики.

Глава 9

Методы масс-спектрометрии

9.1 ВВЕДЕНИЕ

9.1.1 Общие принципы

Масс-спектрометрия (МС) — это очень полезный метод анализа, суть которого состоит в превращении молекул анализируемого образца в газообразные ионы с последующим разделением в масс-спектрометре на основании **отношения массы к заряду** (m/z) и детекцией. **Масс-спектр** — это график, отражающий (относительное) количество ионов при каждом значении m/z. Обратите внимание, что в данном методе анализируют именно отношение массы к заряду иона, а не просто массу иона. Если какая-то молекула ионизируется путем добавления одного или нескольких протонов (H^+), прибор определяет отношение m/z после добавления 1 Да для каждого протона при определении положительно заряженных ионов или после вычета 1 Да для каждого удаленного протона при определении отрицательно заряженных ионов. Масс-спектрометрия позволяет находить точное значение относительной молекулярной массы M_r (см. разд. 1.2.2) каждой ионизованной молекулы, а также во многих случаях и детали ее структуры. Создание двух методов ионизации — **ионизации электроспреем** (electrospray ionisation, ESI) и **матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации** (matrix-assisted laser desorption/ionisation, MALDI) — позволило определять молекулярные массы как высокомолекулярных веществ, так и небольших молекул, и привело к тому, что масс-спектрометрия теперь может применяться для анализа практически любых биологических молекул. Методы масс-спектрометрии широко применяются в новой области науки — протеомике (разд. 8.5), а также при создании новых лекарственных препаратов. В последнем случае используются методы комбинаторной химии, с помощью которых из большого числа похожих молекул (комбинаторных библиотек) выбирают наиболее эффективные соединения. Данная глава посвящена общим принципам масс-спектрометрии, а среди возможных применений метода акцент сделан на роли МС в изучении структуры белка.

Основные принципы работы любого масс-спектрометра следующие:

- образование ионов в газовой фазе;
- ускорение ионов в электрическом поле до определенной скорости;
- разделение ионов в масс-анализаторе;
- детекция частиц с определенным значением отношения m/z.

Для калибровки приборов используют стандартные вещества с точно известными значениями относительной молекулярной массы. Измерения проводятся по углеродной шкале, причем масса углерода ^{12}C принимается равной 12,000000. Такой уровень точности достигается в приборах высокого разрешения с двойной фокусировкой и в масс-спектрометрах с преобразованием Фурье.

Масс-анализатор разделяет ионы с помощью либо магнитного, либо электрического поля. В еще одном варианте прибора осуществляется точное определение времени, необходимого ионам с разной массой для прохождения определенной дистанции (так называемый **времяпролетный** (TOF, time-of-flight) **масс-спектрометр**; разд. 9.3.7). Метод МС позволяет анализировать любое вещество, которое можно ионизировать и ионы которого можно перевести в газовую фазу; учтем, что в приборе создаются условия очень низкого давления (глубокого вакуума) — порядка 10^{-6} торр (1 торр или 1 мм рт. ст. соответствует 133,3 Па). Большинство анализов биологических молекул осуществляется в **квадрупольных масс-спектрометрах**, **квадрупольных ионных ловушках** и во времяпролетных МС. В органической химии и в биохимии для анализа веществ со сравнительно небольшими молекулярными массами все еще используются **масс-анализаторы с магнитным сектором**, принцип работы которых также будет изложен ниже.

Изложение теоретических основ масс-спектрометрии в данной книге освобождено от математических и технических деталей. Цель была представить читателю обзор различных типов приборов с их возможными применениями, а также достоинствами и недостатками. Кроме того, определенное внимание уделяется методам анализа результатов и подготовки образцов, что необходимо для достижения наиболее высокой чувствительности для каждого типа вещества.

9.1.2 Устройство масс-спектрометра

Все масс-спектрометры устроены по одинаковой схеме (рис. 9.1). Они состоят из следующих необходимых элементов:

- *Система создания глубокого вакуума* (10^{-6} торр, или 1 мкторр). Это может быть **турбомолекулярный насос**, **диффузионный насос** и **поворотно-лопастной насос**.
- *Система ввода образца*. Сюда относятся подложка для образца; система для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии (ГХ) или капиллярного электрофореза; система прямого

Рис. 9.1. Основные блоки масс-спектрометра

ввода образца; **камера электронного удара** или **прямой химической ионизации**.

- *Источник ионизации (для перевода молекул в газообразное состояние).* Это может быть MALDI, ESI, **бомбардировка быстрыми атомами** (FAB), электронный удар или прямая химическая ионизация.
- *Масс-фильтр/масс-анализатор*. Это может быть TOF, квадрупольная ионная ловушка, магнитный сектор или **циклотрон с преобразователем Фурье** (одновременно он же детектор).
- *Детектор*. Это может быть **конверсионный динод**, **электронный умножитель**, **детектор с микроканальной пленкой** или **матричный детектор**.

9.1.3 Система создания вакуума

Все масс-анализаторы работают в условиях вакуума, чтобы минимизировать столкновения ионов с молекулами воздуха. Если вакуум недостаточный, образующиеся ионы не будут достигать детектора. Средний путь, который проходит типичный ион, составляет при атмосферном давлении 52 нм, при давлении 1 мторр — 40 мм, а при давлении 1 мкторр — 40 м. В большинстве приборов установлено два вакуумных насоса, например поворотно-лопастной насос для начального снижения давления, за которым следует турбомолекулярный насос или диффузионный насос для создания глубокого вакуума. В качестве поворотно-лопастного насоса может использоваться масляный насос, создающий разряжение порядка 1 торр, а затем турбомолекулярный насос создает более глубокое разрежение (от 1 мторр до 1 нторр). Это устройство представляет собой высокоскоростную газовую турбину с роторами (движущиеся лопасти) и статорами (т. е. фиксированными, или стационарными, лопастями), вращение которой заставляет молекулы проходить сквозь систему лопастей.

9.2 ИОНИЗАЦИЯ

Ионы образуются из нейтральной молекулы либо путем присоединения электрона (с образованием отрицательно заряженного **аниона**), либо путем удаления электрона (с образованием положительно заряженного **ка-**

тиона). Существуют методы масс-спектрометрического анализа как положительно, так и отрицательно заряженных ионов, однако в данной книге мы остановимся подробнее на методах анализа положительных ионов, поскольку они используются чаще, а принципы разделения и детекции двух типов ионов во многом совпадают.

9.2.1 Ионизация электронным ударом

Ионизация электронным ударом (electron impact ionisation, EI) широко применяется для анализа метаболитов, загрязняющих веществ и фармацевтических препаратов, например при тестировании лекарственных средств. Система EI используется в качестве детектора в газовой хроматографии (ГХ/МС, разд. 11.9.3). Поток электронов от нагретой металлической проволоки ускоряется до потенциала 70 эВ (электрон-вольт — единица измерения энергии). Ионизация образца происходит при прохождении потока электронов сквозь вакуумную камеру, в которую поступают молекулы анализируемого вещества (рис. 9.2). Взаимодействие электронов с образцом приводит либо к потере молекулами образца электронов (к образованию катионов), либо к захвату электронов (к образованию анионов). Анализируемое вещество должно находиться в газовой фазе, поэтому максимальный размер анализируемых молекул не может превышать 400 Да. До изобретения методов ESI и MALDI данный метод иногда применяли для анализа пептидов, летучесть которых удавалось повысить, например, путем химической модификации. Для данного метода характерна фрагментация анализируемого вещества, что может быть как положительным, так и отрицательным фактором — в зависимости от типа требуемой информации.

Химические связи в органических молекулах образуются путем спаривания электронов. Образование катиона требует потери электрона в одной из связей (что с высокой эффективностью происходит при бомбардировке электронами), в результате чего вместо связи остается единственный неспаренный электрон. Образующаяся частица одновременно является и катионом, и радикалом, так что ее обозначают $M^{+\cdot}$, где знак плюса обозначает катион, а точка — радикал. Напротив, захват электрона приводит к образованию отрицательно заряженного радикала, который принято обозначать $M^{-\cdot}$. Такие ион-радикалы называют **молекулярными ионами**, **родительскими ионами** или **ионами-предшественниками**; в условиях бомбардировки электронами эти частицы крайне неустойчивы. Они обладают избыточной энергией, которая должна рассеяться. При этом родительские ионы распадаются на ряд фрагментов, которые также могут быть нестабильны и подвержены дальнейшей фрагментации. В результате образуется набор **дочерних ионов** (**ионов-продуктов**), которые и регистрируются в виде масс-спектра.

Поскольку при образовании катиона-радикала никогда не известно, находится ли на молекуле положительный заряд или неспаренный электрон, обычно за знаком закрытой скобки ставят точки. В результате фрагментации родительских ионов один из продуктов приобретает заряд, а второй — неспаренный электрон, т. е. происходит распад на ион

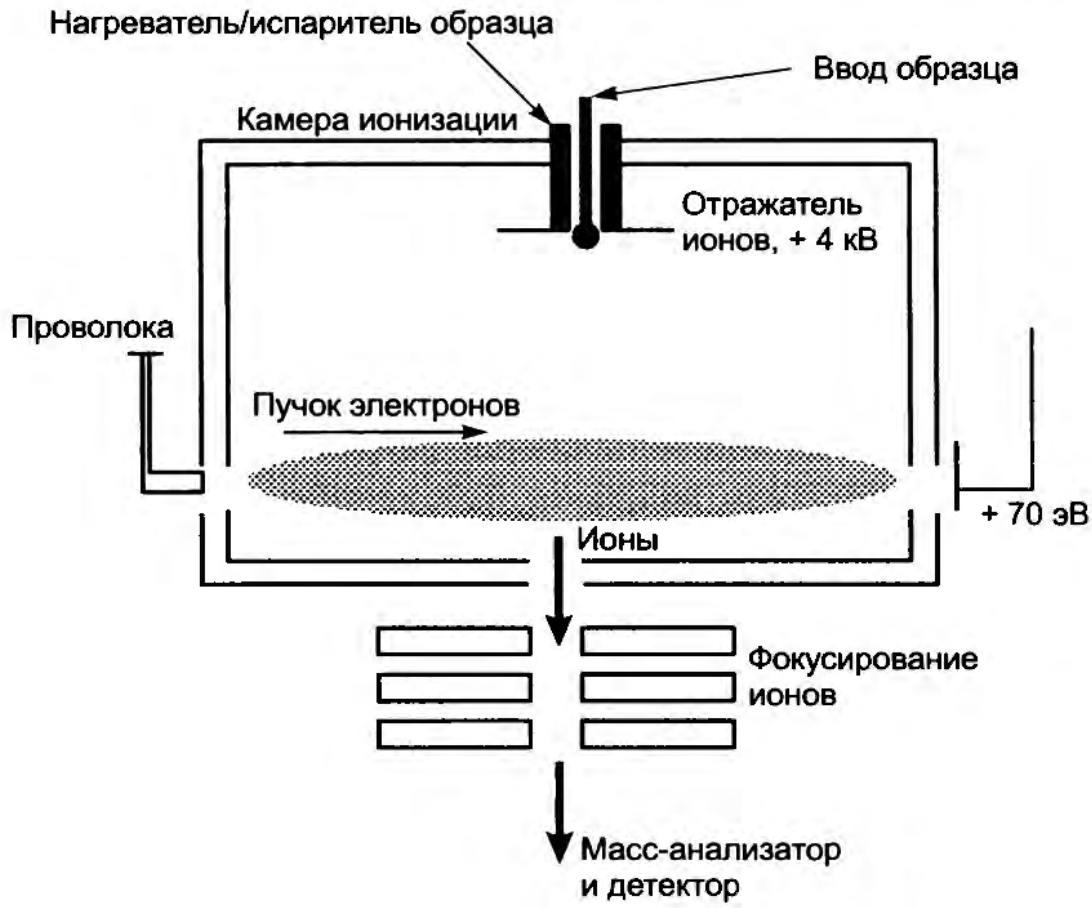
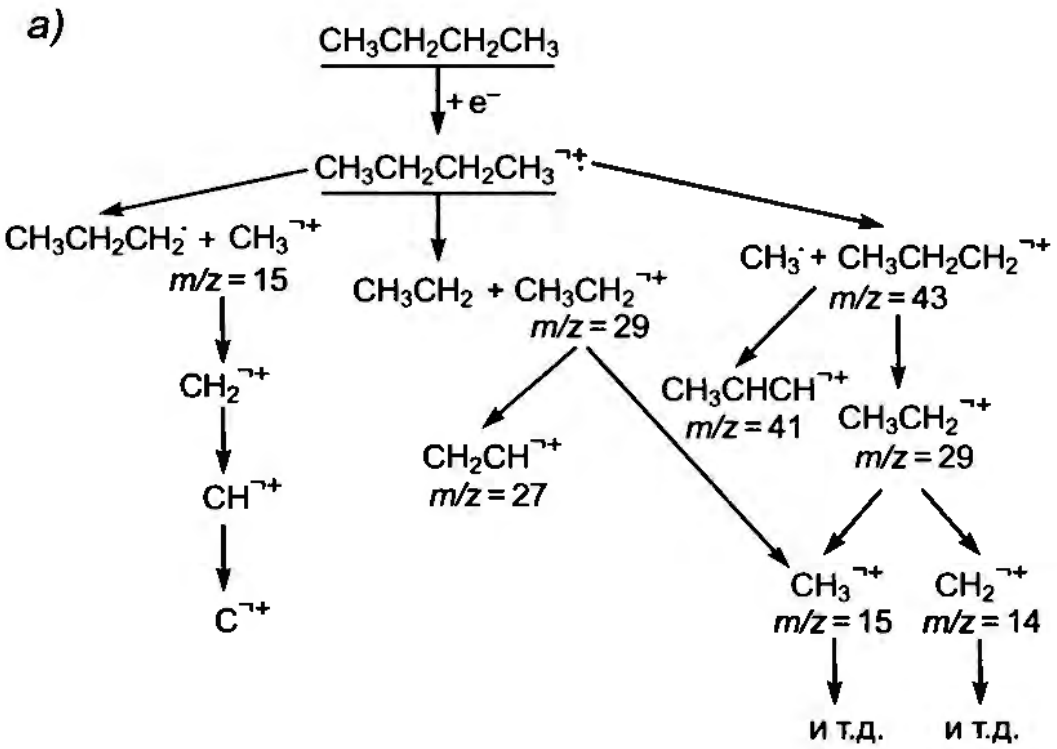


Рис. 9.2. Ионизация электронным ударом. Электроны образуются в результате термоэмиссии из вольфрамовой или рениевой проволоки. Сила тока в проволоке обычно равна 0,1 мА. Электроны ускоряются и направляются в сторону ионизационной камеры, в которой поддерживается положительный потенциал, равный напряжению ускорения; электроны приобретают энергию, обусловленную напряжением между проволокой и камерой ионизации (обычно 70 эВ). Электронная ловушка имеет фиксированный положительный потенциал по отношению к камере ионизации. Газообразные молекулы анализируемого вещества проходят сквозь пучок электронов и при этом ионизуются. Благодаря положительному напряжению отражателя и отрицательному напряжению возбуждения, создающим электрическое поле в камере ионизации, ионы покидают камеру через специальную щель и далее анализируются

и радикал. Образующиеся в результате фрагментации радикалы не несут заряда, не играют никакой роли для МС и выкачиваются под действием вакуума. Только заряженные частицы ускоряются и попадают в анализатор. Важно также отметить, что в процессе фрагментации могут разрываться практически любые химические связи в молекуле, так что любой фрагмент может возникать как в виде иона, так и в виде радикала. Однако распределение зарядов и неспаренных электронов отнюдь не равное. Оно полностью зависит от термодинамической устойчивости продуктов фрагментации. Кроме того, любой образующийся при фрагментации ион может распадаться далее (вплоть до образования отдельных атомов), следовательно, выживает не так много ионов конкретного типа, что приводит к сравнительно небольшой интенсивности сигнала. В качестве простого примера на рис. 9.3 представлена схема фрагментации *н*-бутана ($CH_3CH_2CH_2CH_3$) и соответствующий масс-спектр.



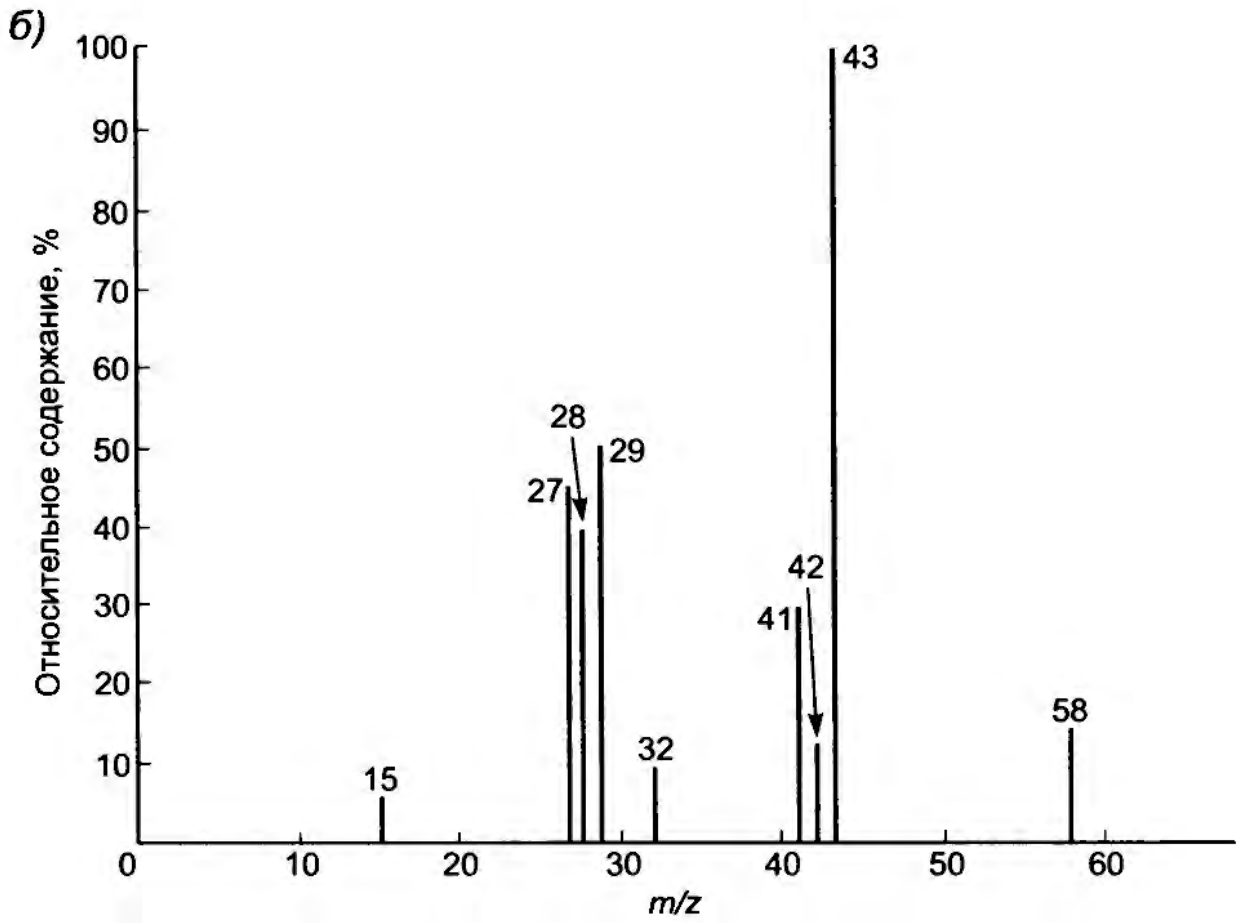


Рис. 9.3. Схема фрагментации *н*-бутана методом электронного удара (*а*) и полученный масс-спектр (*б*). На спектре относительное содержание ионов измеряется в процентах от 0 до 100, причем максимальный пик соответствует 100%. Представленные в таком виде спектры называют **нормализованными**

9.2.2 Химическая ионизация

Химическая ионизация (CT) используется для тех же самых образцов, что и ионизация электронным ударом (EI). Метод особенно удобен для определения молекулярной массы, так как из-за сравнительно невысокой степени фрагментации пики молекулярных ионов имеют довольно высокую интенсивность. Следовательно, спектр при химической ионизации довольно чистый. Источник ионизации обычно такой же, как при EI, но в системе должен присутствовать подходящий газ типа метана (CH_4) или аммиака (NH_3), предварительно ионизированный методом EI. В условиях высокого давления газа происходят взаимодействия между ионами газа (NH_3^+ или CH_4^+) и молекулами анализируемого вещества, в результате чего образуются ионы анализируемого вещества. Ионные аддукты отличаются по массе от исходных нейтральных соединений.

9.2.3 Бомбардировка быстрыми атомами

Разработка в 1980-е гг. метода бомбардировки быстрыми атомами (Fast atom bombardment, FAB) коренным образом изменила возможности применения МС в биологии. Важным достоинством FAB является то, что этот метода мягкой ионизации, приводящей к образованию ионов с небольшой внутренней энергией и незначительной последующей фрагментацией, позволяет анализировать биологические молекулы в растворе без предварительной обработки. Образец смешивают с нелетучим вязким веществом типа глицерина, тиоглицерина или *м*-нитробензилового спирта. Смесь помещают на зонд, вводят в ионизационную камеру и бомбардируют **ионизирующим пучком** нейтральных атомов (таких, как Ar, He, Xe), движущихся с высокой скоростью. Позднее с этой целью стали применять ионы цезия (Cs^+) и соответствующий метод получил название **жидкостной масс-спектрометрии вторичных ионов** (liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS), чтобы отличать его от метода FAB-МС. **Псевдомолекулярные ионы** появляются либо в протонированном $(M + H)^+$, либо в депротонированном виде $(M - H)^-$, что позволяет получать **масс-спектры положительных и отрицательных ионов**. Термин «псевдомолекулярный» подразумевает, что ион образуется из молекулы определяемого соединения путем приобретения или потери одного или нескольких протонов. Возможно также образование и других заряженных аддуктов, например $(M + Na)^+$ и $(M + K)^+$.

9.2.4 Электроспрей (ESI)

В данном методе раствор анализируемого вещества впрыскивают в электрическое поле. Этот метод ионизации в мягких условиях позволяет анализировать крупные интактные молекулы, такие как ДНК и белки. При впрыскивании создаются мельчайшие капельки анализируемого вещества в растворителе. Принцип метода заключается в том, что направленный поток заряженных капелек образуется путем **распыления**. При попадании капель в масс-спектрометр растворитель (обычно это 50%-й раствор орга-

нического растворителя в воде) удаляется. Ионизация происходит в результате действия на поверхность раствора образца сильного электрического поля (около 4кэВ на конце капилляра и 1 кэВ на противоэлектроде). После испарения растворителя под вакуумом размер капель еще уменьшается, и в результате в капле остается только заряженное анализируемое вещество. Ионизация может происходить при атмосферном давлении, поэтому данный метод иногда называют **ионизацией при атмосферном давлении** (atmospheric pressure ionisation, API). Концентрация образца обычно составляет от 1 до 10 пмоль/мм^3. В качестве растворителя используют смесь (50 : 50) ацетонитрила (или метанола) и воды с 1%-й уксусной кислотой или 0,1%-й муравьиной кислотой. Можно также использовать гидроксид аммония или трифторуксусную кислоту (ТФУ, 0,02%) в смеси (50 : 50) ацетонитрила (или метанола) и воды. Органические кислоты (или NH_4OH) способствуют ионизации анализируемого вещества. При низких значениях pH ионизируются основные группы. В пептидах это боковые группы лизина, гистидина и аргинина, а также N-концевая аминогруппа. При щелочных значениях pH ионизируются боковые цепи карбоновых кислот, а также фосфатные и сульфатные группы. Наличие растворителя способствует образованию мелких капелек и облегчает испарение. Скорость введения образца в ионизационную камеру обычно составляет несколько мм^3/мин, однако, если образцом является элюат после ВЭЖХ в режиме online, скорость подачи можно увеличить до 1 см^3/мин.

Небольшие молекулы обычно образуют однозарядные ионы, а крупные биологические молекулы часто превращаются в многозарядные ионы (в отличие от метода MALDI), так что значения m/z достаточно малы и можно использовать квадрупольный анализатор. Таким образом, метод позволяет точно определять массы больших белковых молекул, ДНК и органических полимеров, хотя предел измерений лежит в области от 2000 до 3000 Да. Например, белки обычно анализируют в виде положительно заряженных ионов (они приобретают заряд в результате присоединения протона). Максимальный заряд белковой частицы зависит от числа основных аминокислот в ее составе (главным образом, количеством остатков аргинина и лизина). Распределение основных остатков в большинстве белков таково, что множество пиков (каждый пик соответствует одному иону $(M + n\mathrm{H})^{n+}$) центрированы относительно отношения $m/z \sim 1000$. На рис. 9.6 представлен масс-спектр крупного белка с молекулярной массой >100 000 Да; белок ведет себя как набор частиц с $m/z \approx 1020$. Для молекулы со 100 протонами заряд $z = 100$, а $m/z = 1027{,}6$, следовательно, $(M + 100\mathrm{H})^{100+} = 1027{,}6$. Если компьютер обрабатывает данные для множества пиков, усреднение значений для каждого набора пиков дает значение массы с высокой точностью. Метод деконволюции позволяет представить все пики в виде одного пика, максимум которого соответствует M_r (в данном примере $M_r = 102\,658$). Схематично процесс ионизации в методе ESI представлен на рис. 9.4. Иногда для облегчения испарения растворителя при комнатной или более низкой температуре вокруг иглы распылителя со слабой скоростью пропускают газ (обычно азот). Этот прием, в частности, используют при анализе неустойчивых при нагревании веществ.

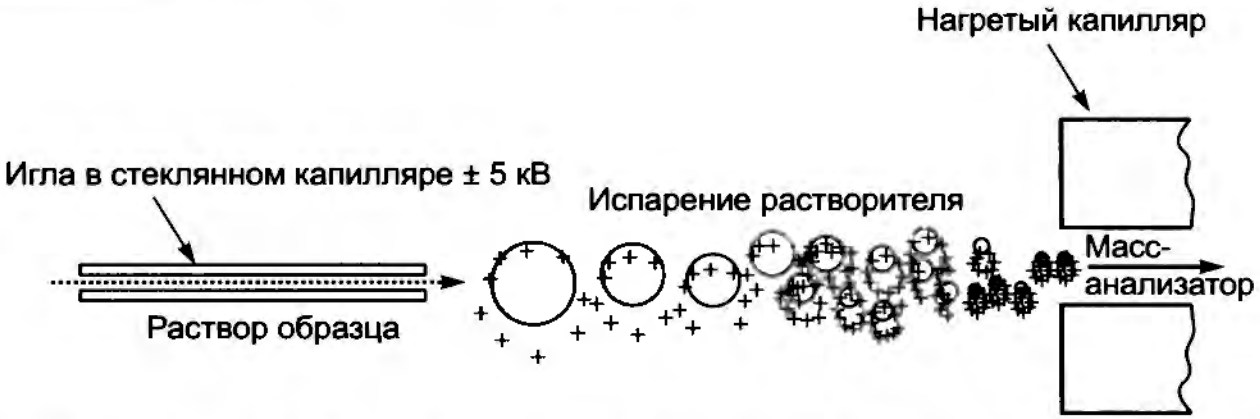


Рис. 9.4. Ионизация методом электроспрея (ESI). В методе ESI очень мелкие капельки анализируемого вещества в растворителе создаются путем атомизации или **распыления** при введении образца в камеру ионизации через тонкую иглу в стеклянном или сделанном из другого материала капилляре. При попадании образца в камеру ионизации в условиях глубокого вакуума растворитель испаряется. Под действием сильного электрического поля и в результате электростатического отталкивания капли уменьшаются в размерах и в них остается только анализируемое вещество без примеси растворителя. Молекулы анализируемого вещества могут нести на себе несколько зарядов, это зависит от наличия в них ионизируемых групп

Пример 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССЫ БЕЛКА МЕТОДОМ ESI

Вопрос Из тканей человека выделен белок. Его относительная молекулярная масса по данным гель-фильтрации составляет 12 000, а по данным электрофореза — 13 000. После очистки белка его анализировали методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Были получены следующие результаты.

m/z	773,9	825,5	884,3	952,3	1031,3
Относительное содержание, %	59	88	100	66	37

Считая, что $n_2 = (m_1 - 1)/(m_2 - m_1)$ и $M = n_2(m_2 - 1)$, а также при условии, что ионы в смеси образуются только путем протонирования, определите среднюю молекулярную массу белка.

Ответ По данным гель-фильтрации $M_r = 12\,000$,
по данным электрофореза $M_r = 13\,000$.
Рассмотрим пары пиков, образующиеся в процессе ESI:

$m_1 - 1$	$m_2 - m_1$	n_2	$m_2 - 1$	M, Да	z
951,3	79,0	12,041	1030,3	12 406,6	12
883,3	68,0	12,989	951,3	12 357,1	13
824,5	58,8	14,022	883,3	12 385,7	14
772,9	51,6	14,978	824,5	12 349,9	15

Отсюда $\Sigma M = 49\,499{,}3$ Да
Среднее значение $M = 12\,374{,}8$ Да
Замечание. Обратите внимание, что значения относительного содержания ионов для расчета молекулярной массы не нужны.

9.3 МАСС-АНАЛИЗАТОРЫ

9.3.1 Введение

Образующиеся в ионизационной камере ионы подаются в масс-анализатор, функция которого состоит в разделении ионов и определении их массы. (Вспомните, что на самом деле для каждого иона определяется не масса, а отношение массы к заряду (m/z)). В каждый конкретный момент ионы определенной массы проходят через анализатор, где учитываются детектором. Затем через анализатор проходят ионы с другими массами и вновь регистрируются детектором. Таким образом анализатор сканирует массы ионов в широком диапазоне. В большинстве приборов определенному типу ионизации соответствует определенный тип анализатора. Так, электронный удар, химическая ионизация и бомбардировка быстрыми атомами подразумевают использование магнитного сектора, электроспрей и его варианты сочетаются с квадруполем (или его вариантом — ионной ловушкой), а MALDI — с времяпролетным детектором.

9.3.2 Квадрупольный анализатор

Квадрупольный анализатор состоит из четырех параллельно расположенных цилиндрических стержней (рис. 9.5). На каждый стержень подается постоянное напряжение (ПН) и переменное радиочастотное напряжение (РН), в результате чего по всей длине анализатора создается переменное электрическое поле. Попадающие в это поле ионы ускоряются и направляются к детектору. Переменное электрическое поле четко контролируется таким образом, что на каждой стадии сканирования в анализатор поступают ионы с определенным отношением массы к заряду. Ионы с другим отношением m/z сталкиваются со стержнями и не детектируются. Путем изменения напряжения электрического поля (**сканирования**) на детектор последовательно подаются ионы с разными m/z. Квадрупольный анализатор позволяет анализировать ионы с m/z вплоть до 3000, что чрезвычайно удобно именно для биологических исследований, поскольку, как мы знаем, белки и другие биологические молекулы имеют отношение m/z ниже данной величины (рис. 9.6). Для направления пучка ионов, например, в следующий отсек **тройного квадрупольного анализатора** или в ионную ловушку используются также семи- и восьмиполюсные устройства, однако принцип их действия тот же.

9.3.3 Масс-спектрометры с ионными ловушками

В масс-спектрометрах с ионной ловушкой ионы образуются методом ESI; далее все ионы переносятся в устройство, называемое **ионной ловушкой** (рис. 9.7), и регистрируются там практически сразу (за несколько миллисекунд). Затем ловушка заполняется новыми ионами, поступающими от источника. Следовательно, хотя в данном устройстве не измеряются 100% всех образующихся ионов (количество измеряемых ионов определяется

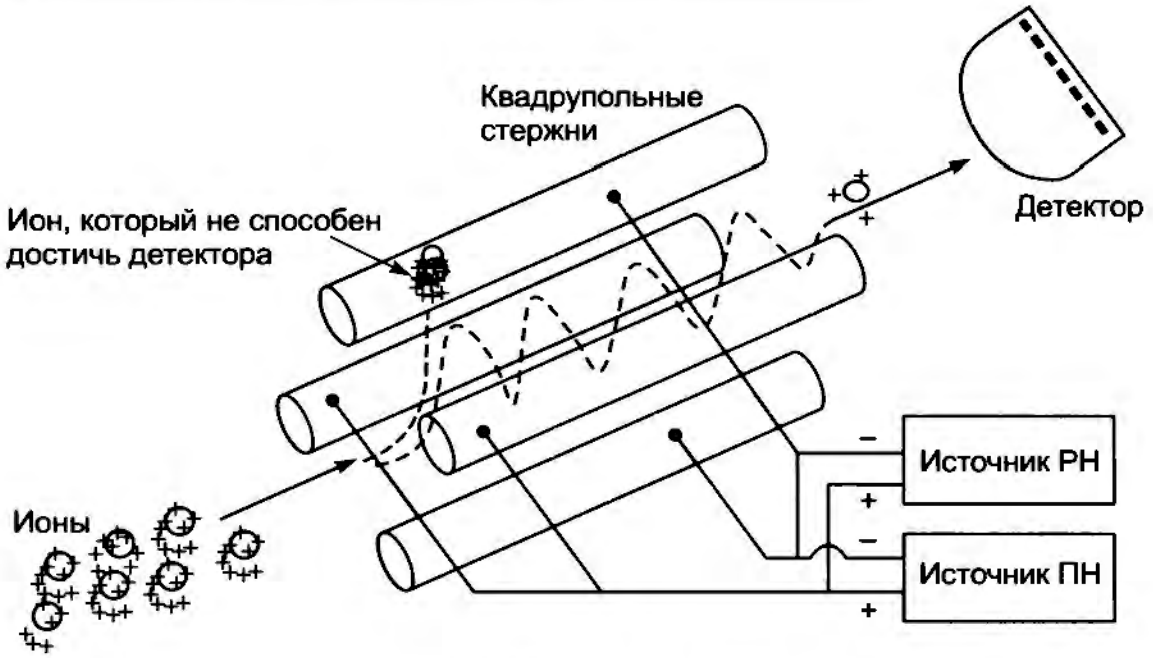


Рис. 9.5. Квадрупольный анализатор. Постоянное (ПН) и переменное радиочастотное (РН) электрическое поле заставляют ионы перемещаться по сложной траектории. Для каждого набора полей только определенные траектории являются стабильными, т. е. только ионы со специфическим отношением *m/z* способны достигать детектора. Эффективность работы квадрупольного анализатора снижается в результате появления ионов, которые не способны достигать детектора. Поэтому анализатор снабжен набором дополнительных фильтров, удаляющих такие ионы

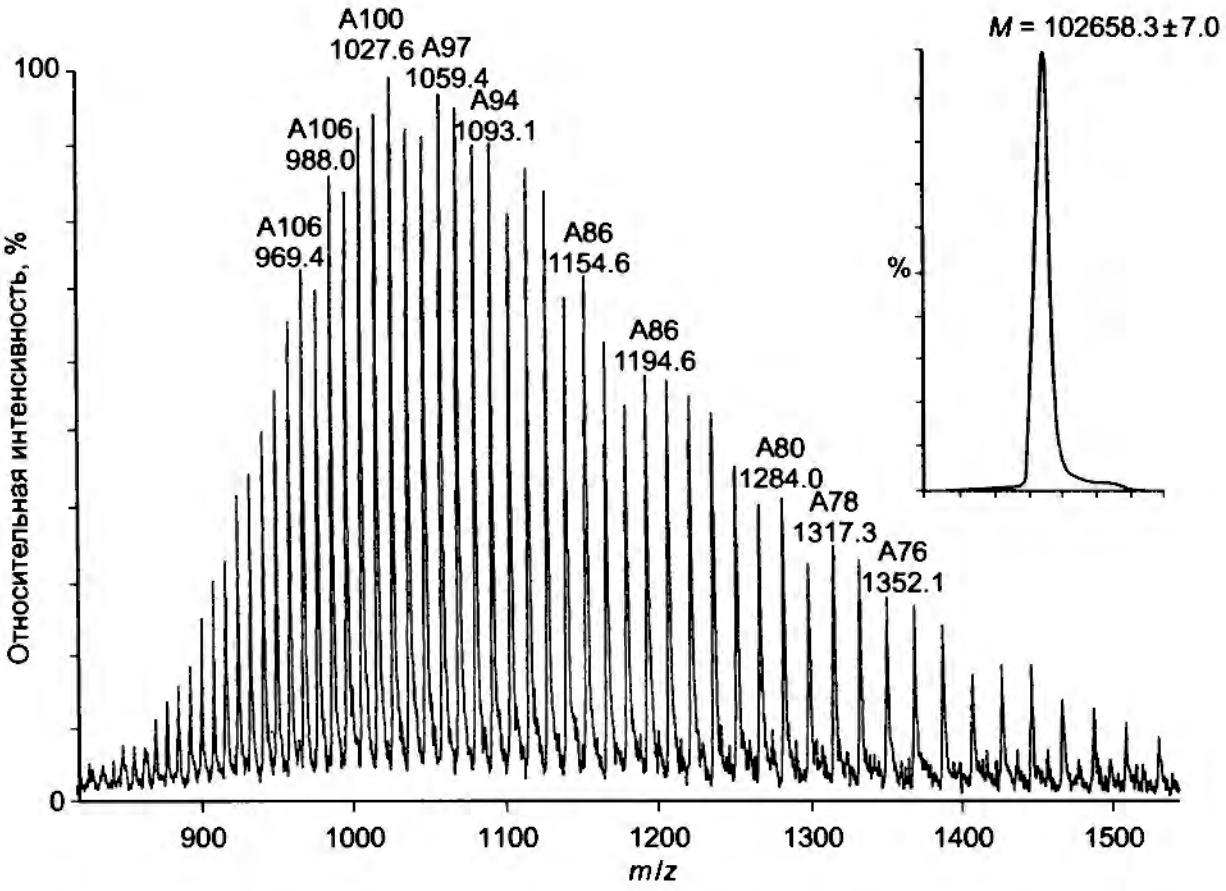


Рис. 9.6. Измерение молекулярной массы крупного белка методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем. Каждый ион обозначается в соответствии с его зарядом, например 99, 100, 101 и т. д., с указанием соответствующего значения *m/z*. Отдельно представлен пик, полученный в результате проведения деконволюции

временем цикла — временем, которое необходимо для заполнения ловушки и проведения самого измерения), тем не менее чувствительность метода значительно выше, чем в масс-спектрометре с квадрупольным анализатором, в котором в данный момент времени анализируются лишь ионы с определенным значением *m/z*. Масс-спектрометры с электроспреем и ионной ловушкой находят широкое применение для анализа пептидов и небольших биологических молекул, например, посредством тандемной масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ/МС), для анализа комбинаторных библиотек и быстрого анализа лекарств при разработке новых лекарственных препаратов. МС с ионной ловушкой позволяют получать информацию о структуре молекул, а также

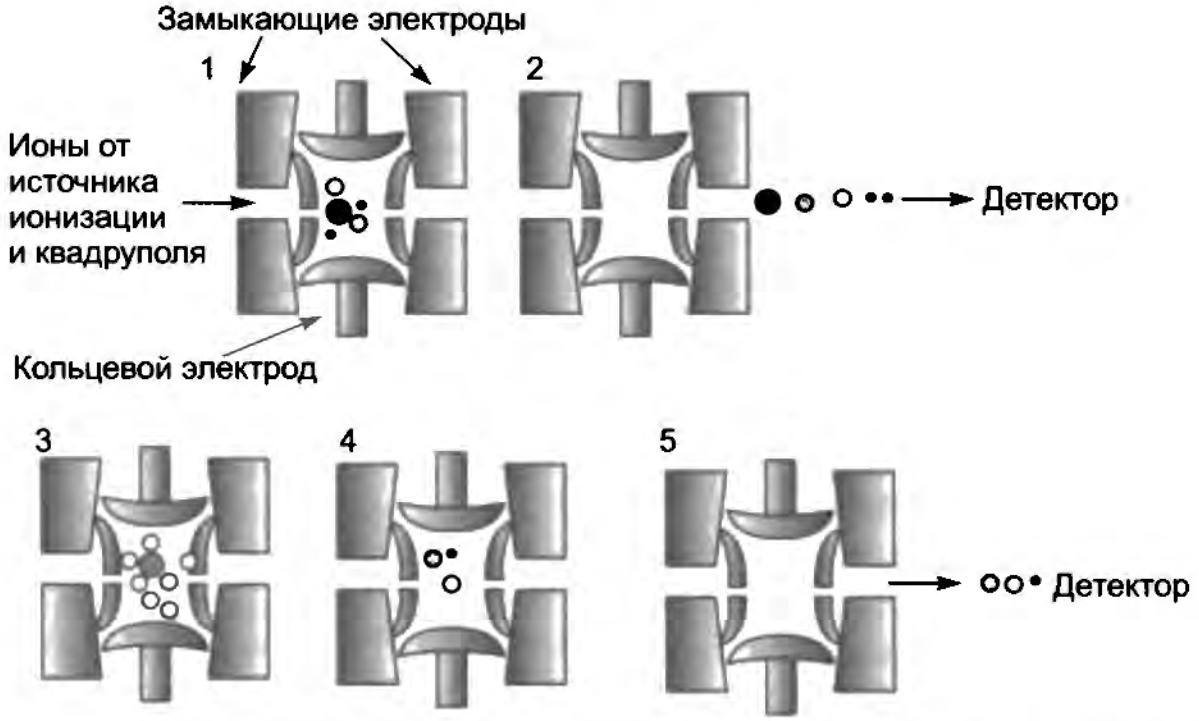


Рис. 9.7. Схема устройства ионной ловушки. Ионная ловушка состоит из трех гиперболических электродов, образующих в цилиндрической камере полость диаметром ~ 5 см; в этой полости удерживаются и анализируются ионы. Каждый замыкающий электрод имеет в центре небольшое отверстие. Ионы от источника ионизации попадают в ловушку через квадруполь и отверстие в замыкающем электроде. На электроды подается напряжение, в результате чего ионы удерживаются (схемы 1 и 2). Кольцевой электрод имеет переменный потенциал с постоянной радиочастотой, но переменной амплитудой. В результате в полости создается трехмерное электрическое поле. Происходит захват ионов, движущихся по стабильным осциллирующим траекториям, что зависит от потенциала и значения *m/z*. Для детекции ионов потенциал варьируют, так что траектории ионов становятся нестабильными и ионы отбрасываются из ловушки в аксиальном направлении в сторону детектора в порядке возрастания отношения *m/z*. В ловушке поддерживается очень низкое давление гелия; в результате соударений с молекулами гелия, не приводящих к фрагментации ионов, ионы группируются в центре ловушки. Эти соударения в значительной степени замедляют движения ионов, так что при сканировании ионы быстро покидают ловушку в виде компактной группы, что позволяет получать узкие пики с хорошим разрешением. Далее из ловушки выталкиваются все ионы, за исключением ионов с определенным значением *m/z*, которые были выбраны для дальнейшей фрагментации (схемы 3, 4 и 5). Эти стадии заключаются в выборе родительского иона (3), его диссоциации за счет соударений (4) и выталкивании фрагментов и их анализе (5)

расшифровывать последовательности полипептидов. Данное устройство позволяет не только проводить тандемную масс-спектрометрию, но также осуществлять несколько (n) этапов дальнейшей фрагментации выбранных ионов (до MC^n; рис. 9.8). На таком приборе определяют массу молекул вплоть до 100 000 Да с погрешностью не более 0,01%.

Процедура многократной фрагментации в ионной ловушке состоит в выталкивании всех ионов, за исключением ионов с выбранным значением m/z. В методе тандемной МС (MC^2) в ловушку вводят гелий под низким давлением, в результате чего происходит **диссоциация ионов в результате соударений** (collision-induced dissociation, CID; рис. 9.7). Затем образующиеся ионы фрагментов также выталкиваются и определяется **спектр фрагментов**. Процесс можно повторить заново, выталкивая ионы всех фрагментов, кроме фрагмента с новым значением m/z. Этот фрагмент можно подвергнуть дальнейшей фрагментации для получения структурной информации (рис. 9.8). Такой подход имеет большое преимущество, поскольку для его реализации не требуется дополни-

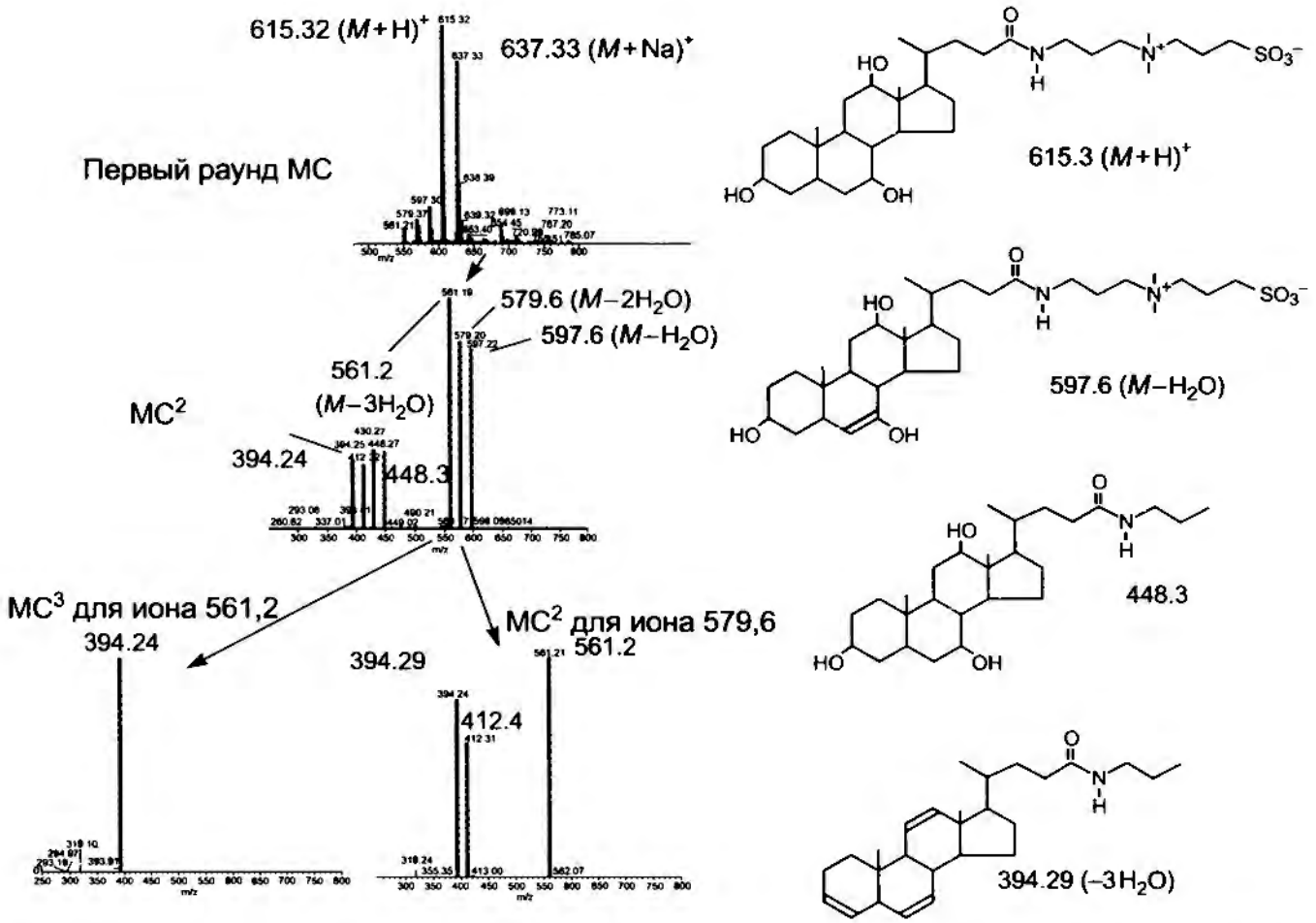


Рис. 9.8. Структурный анализ методом MC^n в ионной ловушке. В данном примере для анализа структуры стероидного производного был выбран ион $(M + H)^+$ с отношением m/z 615,3. Данный ион удерживали в ловушке и подвергали диссоциации в результате соударений (CID), что привело к потере алифатического сульфоната у четвертичного атома азота и частичному отделению некоторых гидроксильных групп. Ионы основных образовавшихся фрагментов (561,2 и 579,6) были выбраны для последующей фрагментации (MC^3), в результате которой были удалены гидроксильные группы из определенных положений в стероидном кольце

тельного масс-спектрометра или ячейки для соударений. Ограничение метода — его чувствительность, которая падает с каждым последующим этапом фрагментации; в настоящее время рекорд, поставленный с помощью ловушки ионов, — это MC[14].

9.3.4 Наноспрей и тандемная масс-спектрометрия в режиме online

Чувствительность метода ESI можно существенно повысить путем снижения скорости потока. **Наноспрей** является методом выбора для достижения максимальной чувствительности при ограниченном количестве образца. Существуют две разновидности метода — **статический** и **динамический наноспрей**. В обоих вариантах скорость потока составляет несколько десятков нм^3/мин, что приводит к небольшому расходу образца и низкому отношению сигнала к фону.

В методе статического наноспрея используют стеклянные иглы с очень тонкими остриями (их покрывают золотом, чтобы игла могла выдерживать напряжение в несколько киловольт; см. рис. 9.4). Иглы заполняют 1–2 мм^3 образца и аккуратно помещают на входе в камеру ионизации. Положение острия контролируют с помощью видеокамеры. Образец вводится в источник ионизации под действием электростатических сил, хотя, если нужно, можно оказать небольшое давление на открытый конец иглы с помощью наполненного воздухом шприца. В методе динамического наноспрея для разделения при низкой скорости потока используют микроколонки для ВЭЖХ или капиллярные колонки. Такое устройство может дополнительно комбинироваться с **делителем потока**, что дополнительно снижает скорость потока (разд. 11.3.2). Делитель потока может использоваться для отвода потока раствора, скажем 99–99,9%, от насоса в слив, так что лишь оставшаяся часть попадает на колонку. Это позволяет гораздо точнее контролировать скорость потока, поскольку чрезвычайно трудно осуществлять подачу жидкости на скорости 0,5 мм^3/мин или даже 50 нм^3/мин с помощью насоса высокого давления. Следовательно, используют насосы, которые действуют более эффективно при скоростях потока 50–500 мм^3/мин, чтобы подавать на колонку жидкость со скоростью 0,5 нм^3/мин и ниже.

Наноспрей применяется в приборах с тройным квадруполем, ионной ловушкой, а также в гибридных системах MALDI. Метод тандемной МС предусматривает возможность контролировать элюирование каждого компонента с помощью компьютера, если, конечно, сигнал этих компонентов превышает пороговое значение, установленное оператором.

9.3.5 Анализатор с магнитным сектором

Схема анализатора с магнитным сектором представлена на рис. 9.9. Ионы ускоряются под действием электрического поля. Электрический сектор выполняет функцию фильтра ионов, позволяя проходить лишь ионам с определенной кинетической энергией вне зависимости от соотношения m/z. Такой принцип значительно повышает разрешение метода, поскольку из **электро-**

статического анализатора выходят ионы в широком диапазоне масс, но все они имеют одну и ту же скорость. Далее ионы, движущиеся с определенной скоростью, попадают в магнитный сектор. Ионы движутся в магнитном поле по искривленным траекториям, радиус которых зависит от отношения *m/z* и скорости иона (последняя уже была выбрана). Таким образом, при заданной напряженности магнитного поля будут регистрироваться лишь ионы с определенным значением *m/z*. Траектория движения ионов проходит через сектор полюса магнита, отсюда и происходит термин **магнитный сектор**. На рис. 9.9 представлено несколько возможных траекторий движения конкретного иона в магнитном поле. Только определенная группа ионов будет фокусироваться на детекторе. Если поле меняется, эти ионы перестают фокусироваться, поскольку они более не отклоняются в необходимой степени. На детекторе будет фокусироваться новая группа ионов. Изменяя величину магнитного поля, ионы можно просканировать по массам от легких до тяжелых, или наоборот. Такое **магнитное сканирование** — это наиболее частый тип анализа на данном приборе. В другом варианте можно просканировать масс-спектр путем изменения напряжения при постоянной напряженности магнитного поля. Такой тип приборов называют **масс-спектрометрами с двойной фокусировкой**; на этих приборах можно достичь разрешения порядка нескольких частей на миллион.

9.3.6 Ионизация методом плазменной десорбции

Масс-спектрометрия с ионизацией методом плазменной десорбции (plasma desorption ionisation mass spectrometry, PDMS) была первым масс-спектрометрическим методом, примененным для анали-

Рис. 9.9. Масс-спектрометр с магнитным сектором с двойной фокусировкой. На схеме представлено устройство прибора с «прямой геометрией», в котором электростатический анализатор располагается перед магнитным сектором (такую схему называют схемой EB-типа: E — электрическая составляющая, B — магнитная). Аналогичные результаты можно получить в приборах с «обратной геометрией» (BE-типа). Траекторию каждого иона можно зафиксировать путем сканирования магнитного поля, и каждый ион со специфическим значением *m/z* можно направить в щель детектора

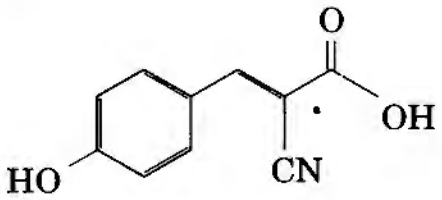
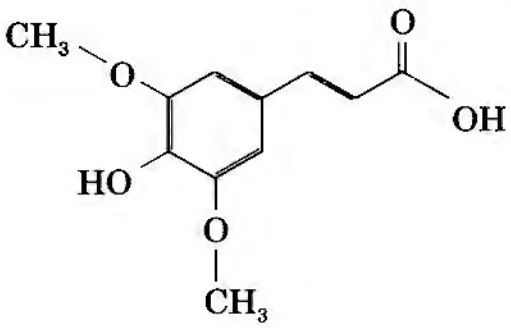
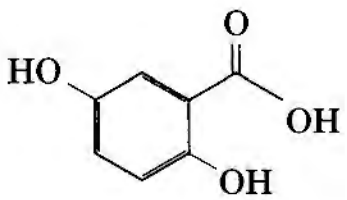
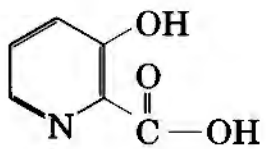
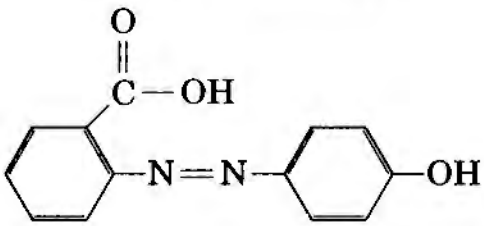
за белков и других крупных биологических молекул (с молекулярными массами, не превышавшими 35 000). Сам принцип метода и его аппаратурное оформление в значительной степени уже устарели; сегодня работают на гораздо более мощных, чувствительных и точных и приборах, которые описаны в данной главе, и другими методами. Однако PDMS до сих пор еще используется в некоторых лабораториях, и до сих пор в печати появляются результаты, полученные с помощью данного метода. Поэтому уделим здесь несколько строк его описанию. Источником плазмы (ядер атомов, лишенных электронов) является радиоактивный калифорний ^{252}Cf. При распаде ^{252}Cf образуются ядра Ba^{20+} и Tc^{18+} (100 МэВ), которые выталкиваются в противоположных направлениях практически коллинеарно и с равной скоростью. Это так называемые **импульсные методы** (частицы испускаются через дискретные интервалы времени); здесь требуется использование времяпролетного масс-анализатора (TOF). Плазменная частица, выбрасываемая в противоположную от образца сторону, запускает счетчик времени, а десорбированные ионы образца ускоряются в электрическом поле и детектируются в другом масс-анализаторе TOF (разд. 9.3.7).

9.3.7 MALDI- и TOF-масс-спектрометрия. Метод MALDI-TOF

Лазерная десорбция/ионизация, ассистируемая матрицей (matrix-assisted laser desorption ionisation, MALDI) позволяет получать протонированные ионы в газовой фазе путем возбуждения молекул образца энергией лазерного света, проходящего сквозь матрицу, поглощающую свет в УФ-диапазоне. Матрица представляет собой органическое соединение с сопряженными связями (чаще всего это слабая органическая кислота типа производных коричной и дигидроксибензойной кислот), которое образует с образцом однородную смесь. Примеры матриц для MALDI с их возможными применениями представлены в табл. 9.1. Эти вещества должны хорошо поглощать свет на длине волны лазерного источника — обычно это азотный лазер (337 нм) или неодим-иттрий-алюминий-гранатовый лазер (Nd-YAG, 355 нм).

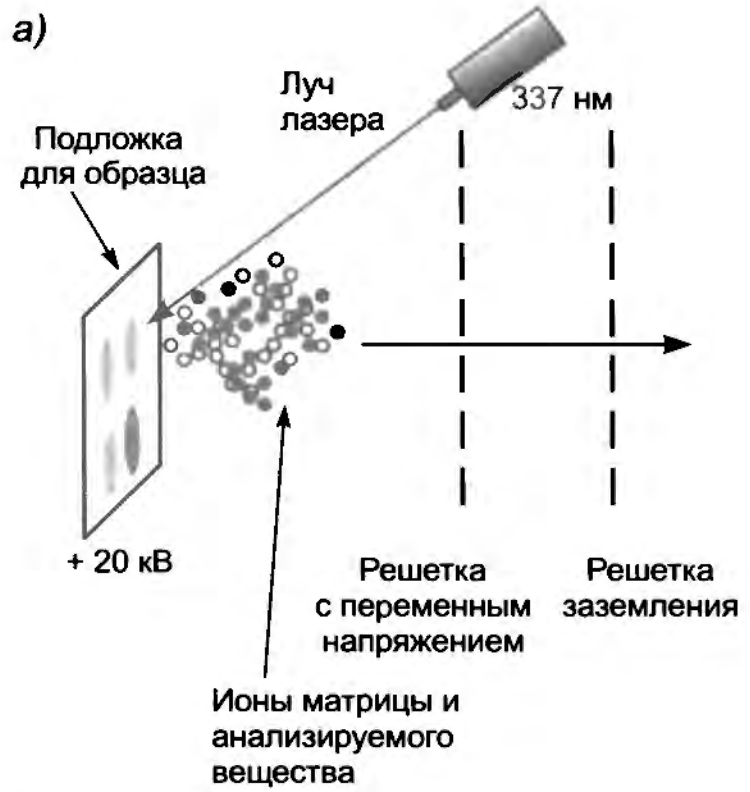
Образец (1–10 пмоль/мм^3) смешивают с избытком матрицы и высушивают на подложке; при этом происходит сокристаллизация образца и матрицы. Импульсы лазерного излучения длительностью в несколько наносекунд вызывают быстрое возбуждение и испарение кристаллической матрицы с последующим переходом ионов анализируемого вещества и матрицы в газовую фазу (рис. 9.10). В результате образуется совокупность ионов анализируемого вещества и матрицы, которую анализируют с помощью масс-анализатора TOF. Особое преимущества метода MALDI состоит в возможности производить большую массу ионов, что позволяет достигать высокого уровня чувствительности. Этот метод очень мягкой ионизации не приводит к значительной фрагментации образца, как многие другие методы. Поскольку фрагментов образуется мало, этот метод

Таблица 9.1. **Примеры материалов для изготовления матриц в методе MALDI**

Соединение	Структура	Применение
α-Циан-4-гидроксикоричная кислота (ЦГКК)		Пептиды <10 кДа (гликопептиды)
Синапиновая кислота (3,5-диметокси-4-гидроксикоричная кислота; СК)		Пептиды >10 кДа
«Супер ДГБ», смесь 10% 5-метокси-салициловой кислоты (2-гидрокси-5-метокси-бензойной кислоты) с ДГБ		Белки, гликозилированные белки
2,5-Дигидробензойная кислота (ДГБ; гентизиновая кислота)		Нейтральные углеводы, синтетические полимеры (олигосахариды)
3-Гидроксипиколиновая кислота		Олигонуклеотиды
2-(4-Гидроксифенилазо)-бензойная кислота (ГАБА)		Олигосахариды, белки

подходит для анализа смесей (см. рис. 9.14; ср. со сложным спектром на рис. 9.6).

Лучшим масс-анализатором для метода MALDI является TOF, поскольку он практически не имеет ограничений по массам анализируемых веществ. Например, с помощью данного метода удалось точно определить молекулярные массы белков и других макромолекул с $M_r > 400\,000$. Принцип TOF отражен на рис. 9.11, а основные элементы прибора — на рис. 9.12.



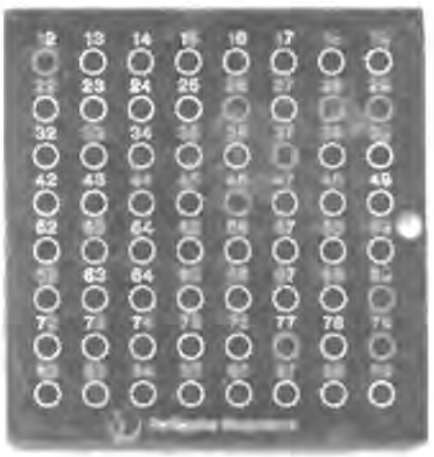


Рис. 9.10. Механизм ионизации по методу MALDI и подложка для образца для анализа по методу MALDI-TOF. *а* — раствор анализируемого вещества (А) смешивают с «матрицей» — органической кислотой — в условиях избытка анализируемого вещества (от 1000 : 1 до 10 000 : 1) и наносят на пластинку. Свет от УФ-лазера пучком диаметром в несколько микрометров направляется на образец для десорбции. Лазерное излучение, длящееся несколько наносекунд, поглощается молекулами матрицы, что приводит к быстрому нагреванию области вокруг зоны облучения и возбуждению электронов матрицы. Находящиеся поблизости молекулы образца в условиях поддерживающегося в масс-спектрометре глубокого вакуума превращаются в газообразные протонированные молекулы (то же происходит и с молекулами кислоты).

Вспышка лазера приводит к ионизации как молекул матрицы (нейтральные фрагменты (*M*) и ионы $(M\text{H})^+$ и $(M - \text{H})^-$), так и молекул анализируемого вещества (А). Молекулы образца в газовой фазе ионизируются в результате переноса протонов от матрицы:

$$M\text{H}^+ + \text{A} \rightarrow M + \text{AH}^+$$

$$(M - \text{H})^- + \text{A} \rightarrow (\text{A} - \text{H})^- + M$$

Матрица в данном случае служит в качестве поглощающей среды, которая превращает энергию падающего от лазера ультрафиолетового света в электронную энергию молекул как для десорбции, так и для ионизации, а также в качестве источника протонов для ионизации молекул анализируемого вещества.

б — подложка для образца для MALDI, позволяющая анализировать до 100 образцов

Концентрация образцов для проведения MALDI

Максимальная чувствительность метода MALDI-TOF достигается в том случае, если концентрация образцов соответствует определенному диапазону. Если концентрация образца неизвестна, готовят серию разведений для получения пятна образца и матрицы с необходимой концентрацией. Для получения спектров пептидов и белков обычно оптимальными являются концентрации от 0,1 до 10 пмоль/мм^3 (рис. 9.13 и 9.14). Некоторые белки, особенно

Рис. 9.11. Принцип работы времяпролетного масс-анализатора (TOF, time-of-flight). Ионы движутся к детектору через трубку, причем более легкие ионы движутся быстрее, более тяжелые — медленнее. Если ионы ускоряют путем наложения одного и того же потенциала в фиксированной точке и в фиксированный начальный момент времени, они разделятся в соответствии со значениями *m/z*. Время нахождения ионов в пути можно перевести в значения масс. Обычно для построения хорошего спектра требуется несколько сотен импульсов лазера; продолжительность каждой вспышки составляет несколько наносекунд. С помощью камеры, отслеживающей вспышки лазера, можно перемещать луч лазера по пластинке с образцом, чтобы найти так называемые «сладкие точки» (sweet spots), в которых состав сокристаллизовавшихся матрицы и образца оптимален для получения наибольшей чувствительности

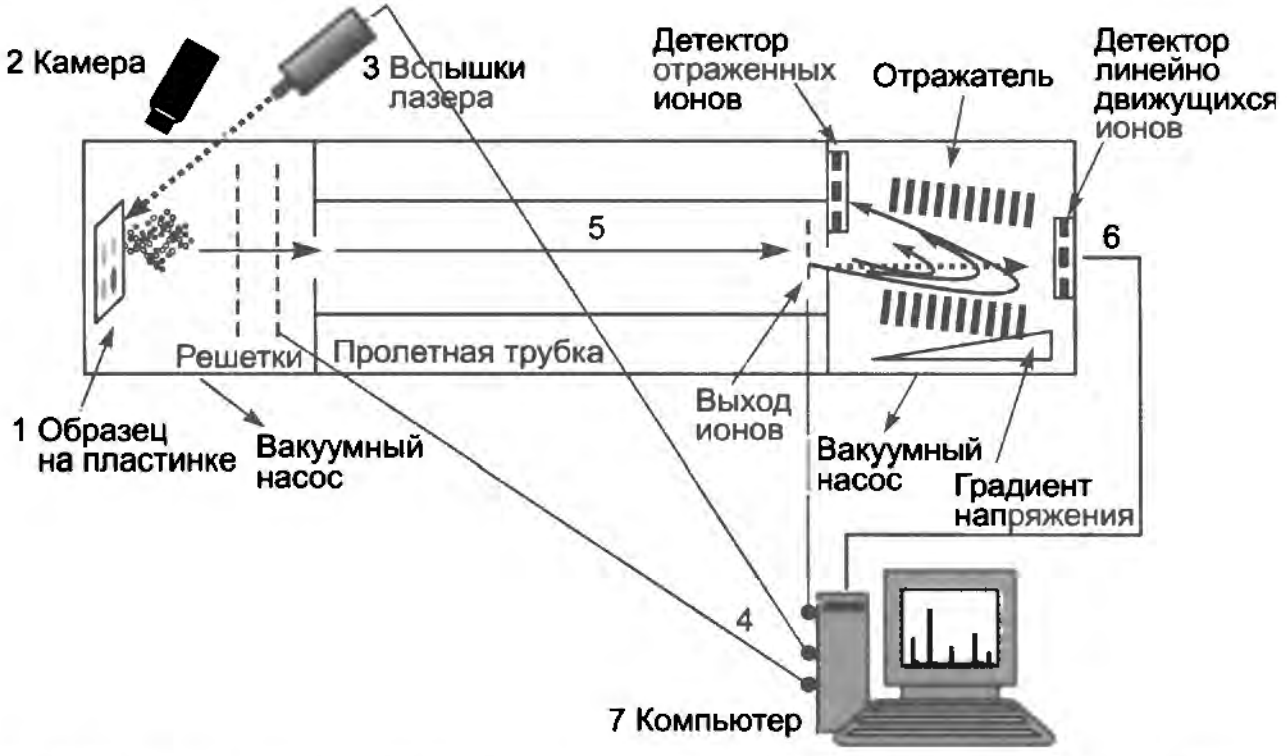


Рис. 9.12. Аппаратурное оформление метода MALDI-TOF. 1) Смешанный с матрицей образец высушивают на специальной пластинке, которую помещают в вакуумную камеру. 2) Камера позволяет следить за положением лазерного луча, чтобы оптимизировать сигнал. 3) Матрицу с образцом облучают лазерными импульсами. 4) Запускают часы для измерения времени полета ионов. 5) При перемещении ионов в трубке они ускоряются под действием электрического поля до одинаковых величин кинетической энергии и разделяются в соответствии со значениями масс. 6) Ионы ударяются о детектор, либо двигаясь линейно (пунктирная стрелка), либо после отражения (сплошные стрелки) через разные промежутки времени в зависимости от значений *m/z*. 7) Компьютерная система контролирует настройки прибора, регистрирует сигналы и обрабатывает данные

гликопротеины, лучше анализировать при концентрации 10 пмоль/мм^3. Спектры олигонуклеотидов лучше получаются при концентрации образцов от 10 до 100 пмоль/мм^3, а полимеры следует брать в концентрации около 100 пмоль/мм^3. (Напомним, что 1 пмоль/мм^3 = 10^{-6} моль/дм^3.)

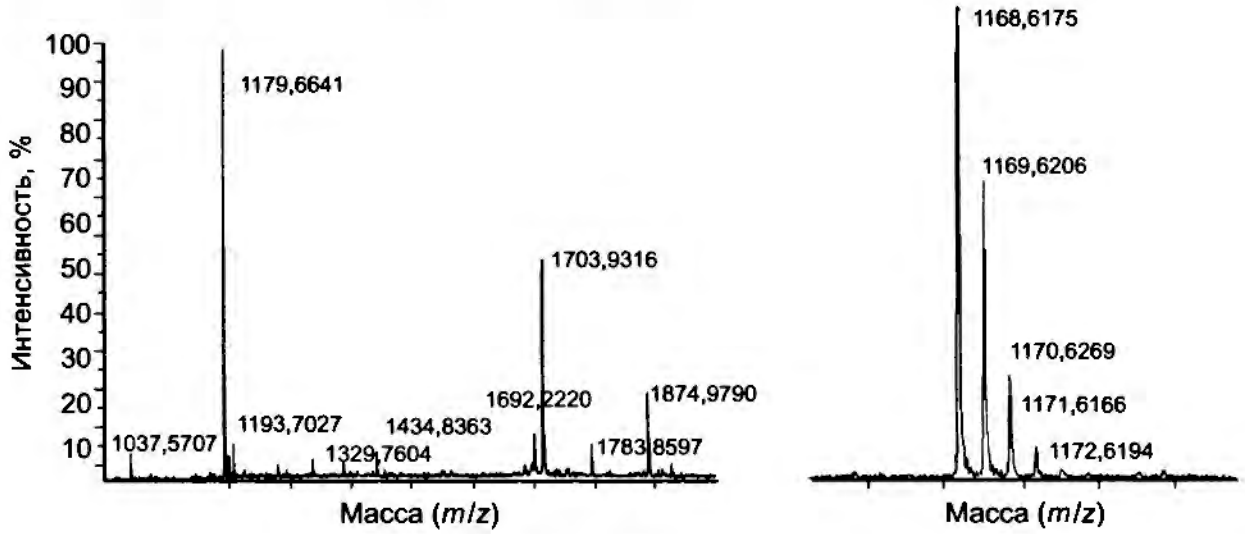


Рис. 9.13. Два примера спектров, полученных методом MALDI-TOF. *Слева* — спектр смеси, образовавшейся после расщепления белка, *справа* — небольшой фрагмент спектра, отражающий наличие ^{13}C-содержащих форм (см. разд. 9.5.4)

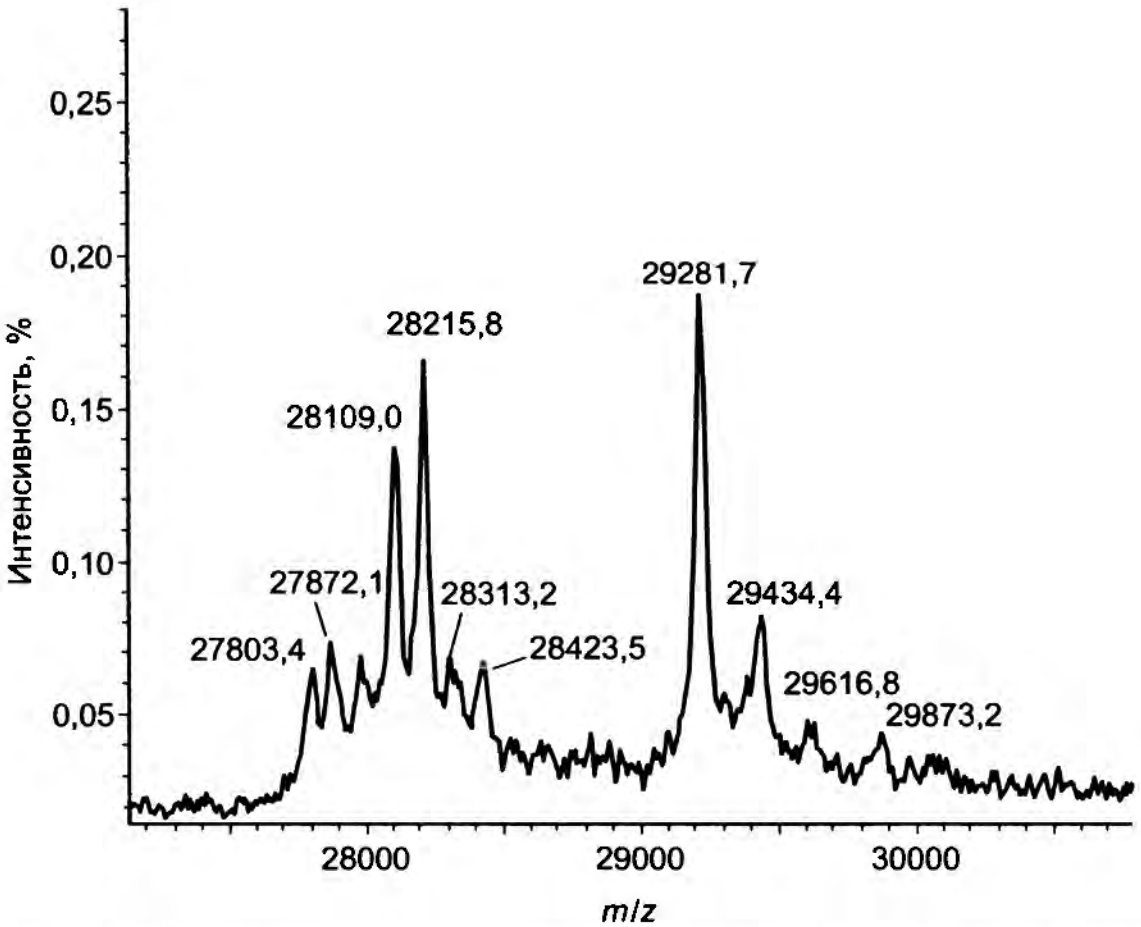


Рис. 9.14. Спектр изоформ белка, полученный методом MALDI-TOF. Спектр показывает наличие почти исключительно однозарядных ионов, соответствующих молекулярным ионам присутствующих в смеси белков. Сравните этот спектр с тем, что был получен в результате ионизации электроспреем (рис. 9.6). В случае электроспрея множественные пики соответствуют многозарядным ионам, и анализировать такой спектр гораздо сложнее. (Автор выражает благодарность лаборатории Bruker Daltonics за проведение анализа.)

Пример 2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССЫ ПЕПТИДОВ (I)

Вопрос Масс-спектрометрический анализ метаболита, представляющего собой пептид, и продуктов его ферментативного расщепления дал следующие результаты.

1) При проведении анализа пептида методом MALDI-TOF получено два сигнала: *m/z* 3841,5 и 1741.
2) При ионизации электроспреем удавалось различить пять сигналов:

m/z	498,2	581,1	697,1	871,2	1161,2

3) Анализ продуктов ферментативного расщепления методом ВЭЖХ-МС показал наличие четырех компонентов с *m/z* 176, 625, 1229 и 1508. Ионы, соответствующие компоненту с *m/z* 625, появлялись при *m/z* 521, 406, 293, 130 и 113.
4) Анализ ВЭЖХ-МС-МС иона с *m/z* 406 из компонента с *m/z* 625 выявил наличие двух ионов с *m/z* 378 и 336, а ион с *m/z* 113 образовывал продукты с *m/z* 85 и 57.

Используйте приведенные выше данные для сравнения результатов разных методов; определите молекулярную массу пептида и установите последовательность фрагмента с *m/z* 625.

Значения масс аминокислотных остатков возьмите из табл. 9.2.

Ответ На основании значений *m/z* 3481,5 и 1741 можно предложить два варианта ответа.

а) $m/z = 3481{,}5 = (M + H)^+$
если $m/z = 1741 = (M + H)^{2+}$, откуда $M = 3480{,}5$.

б) $m/z = 3481{,}5 = (2M + H)^+$
если $m/z = 1741 = (M + H)^+$, откуда $M = 1740$.

Учитывая результаты в п. 1, можно выбрать правильный ответ:

$n_2 = (m_1 - 1)/(m_2 - m_1)$ и $M = n_2(m_2 - 1)$

$m_1 - 1$	$m_2 - m_1$	n_2	$m_2 - 1$	M, Да	z
870,2	290	3,0006	1160,2	3481,2	3
696,1	174,1	3,9982	870,2	3479,3	4
580,1	116	5,0000	696,1	3481,1	5
497,2	82,9	5,9975	580,1	3479,2	6

$\Sigma M = 13920{,}8$ Да

Среднее значение $M = 3480{,}2$ Да.

Среднее значение M подтверждает вывод а), сделанный на основании данных MALDI.

Результаты в п. 3 указывают на то, что при ферментативном расщеплении исходного пептида образуется четыре фрагмента. Поскольку эти фрагменты являются результатом прямого расщепления исходного соединения, сложение масс фрагментов дает массу исходного пептида:

$176 + 625 + 1229 + 1508 = 3538$ Да.

Разность определенных значений составляет

$3538 - 3480{,}2 = 57{,}8 \approx 58$ Да.

Эту разность можно объяснить следующим образом. Каждый из продуктов расщепления пептида протонируется (иначе его нельзя «увидеть»

с помощью масс-спектрометра). Следовательно, добавляются четыре единицы массы. Еще 54 единицы возникают в результате гидролиза, причем из линейного пептида четыре фрагмента образуются при расщеплении по трем точкам, а в каждой точке присоединяется по одной молекуле воды (M_r 18): $3 \cdot 18 = 54$.

Ион с *m/z* 625, $(M + H)^+$, подвергали следующему этапу масс-спектрометрии и получали ионы фрагментов.

m/z 624	521	406	293	130	113
□	103	115	113	163	17
Амнокислота	Cys Asp	Ile/Leu	Tyr	Ile/Leu	

Потеря фрагмента с *m/z* 113 ионом с *m/z* 406 означает отщепление Ile или Leu. MC^2 демонстрирует дальнейшую потерю фрагментов с *m/z* 28 (CO) и *m/z* 42 (CH_2=CH–CH_3), что указывает на то, что эта аминокислота Leu. Потеря 17 из фрагмента с *m/z* 130 подтверждает, что это С-концевая аминокислота.

Итак, можно привести аминокислотную последовательность фрагмента, начиная с N-конца: Cys-Asp-Leu-Tyr-Ile.

Пример 3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССЫ ПЕПТИДОВ (II)

Вопрос При масс-спектрометрическом анализе метаболита, представляющего собой пептид, получены следующие результаты.

1) При проведении анализа пептида методом MALDI-TOF получено два сигнала — с *m/z* 1609 и 805.
2) При анализе положительных ионов с помощью МС с ионной ловушкой выявлено два четких сигнала с *m/z* 805 и 827, причем последний усиливался в присутствии хлорида натрия.
3) При ионизации методом электроспрея выявлено наличие четырех сигналов с *m/z* 161,8, 202,0, 269,0 и 403,0.

Используйте приведенные выше данные для сравнения использованных методов ионизации. Обсудите значимость результатов и определите молекулярную массу метаболита. Значения масс аминокислотных остатков возьмите из табл. 9.2.

Ответ

1) На основании значений *m/z* 1609 и 805 можно предложить два варианта ответа.
   а) $m/z = 1609 = (M + H)^+$
   Если $m/z = 805 = (M + 2H)^{2+}$ и $m/z = 403 = (M + 4H)^{4+}$, то
   $M = 1608$ Да.
   б) $m/z = 1609 = (2M + H)^+$
   Если $m/z = 805 = (M + H)^+$ и $m/z = 403 = (M + 2H)^{2+}$, то
   $M = 804$ Да.
2) Установить правильный ответ можно на основании результатов эксперимента с ловушкой ионов. Данный способ ионизации привел к появлению двух пиков с *m/z* 805 и 827, причем последний усиливался в присутствии хлорида натрия. Отсюда следует:
   $m/z = 805 = (M + H)^+$
   $m/z = 827 = (M + Na)^+$
   Это подтверждает правильность ответа 1б, полученного на основании данных MALDI.

3) Результаты, полученные при ионизации электроспреем, позволяют рассчитать среднее значение молекулярной массы, используя стандартную формулу.

$m_1 - 1$	$m_2 - m_1$	n_2	$m_2 - 1$	M, Да	z
268,0	134	2,0	402,0	804	2
201,0	67	3,0	268,0	804	3
160,8	40,2	4,0	201,0	804	4

Молекулярная масса пептида действительно составляет 804, что подтверждает сделанные ранее выводы.

Отсроченная экстракция

В приборах MALDI-TOF первого поколения генерированные лазером ионы постоянно экстрагировались сильным электростатическим полем. Поскольку образующийся набор ионов занимает малый, но конечный объем, возникающие в разных точках этого пространства ионы имеют разную энергию. Такое различие в энергии, а также процесс фрагментации, происходящий в этот начальный период экстракции, приводят к уширению пиков отдельных ионов и, соответственно, к большей погрешности при расчете массы. Если же экстракции не происходит до тех пор, пока все ионы не сформировались, такое уширение пиков минимизируется. Данный вариант метода носит название **отсроченной экстракции** (delayed extraction, DE). Ионы образуются либо в слабом поле, либо вообще в отсутствие электрического поля, а затем в определенный момент времени экстрагируются путем наложения высокого напряжения. Степень фрагментации ионов (разд. 9.3.8) также можно до некоторой степени контролировать, варьируя время подачи напряжения. Метод отсроченной экстракции проиллюстрирован на рис. 9.15.

9.3.8 Распад после источника ионизации

Распад после источника ионизации (post-source decay, PSD) — фрагментация происходит после того, как ион (родительский ион) был экстрагирован из источника ионизации. Многие биологические молекулы, в частности пептиды, образуют ионы, которые далее, спустя микросекунды, распадаются, а большинство родительских ионов экстрагируется из источника ионизации до завершения этой диссоциации. Образующиеся ионы фрагментов имеют ту же скорость, что и предшественники, и приводят к уширению пиков и ухудшению разрешения в линейном TOF-анализаторе (рис. 9.16). Эта проблема решается путем использования отражателя.

Отражатель

Отражатель (или **рефлектрон**) представляет собой особый тип **ионного зеркала**, обеспечивающий более высокое разрешение в методе MALDI-TOF. Отражатель увеличивает общую длину пути иона и корректирует минорные вариации энергии ионов одинаковой массы. Оба эти эффекта

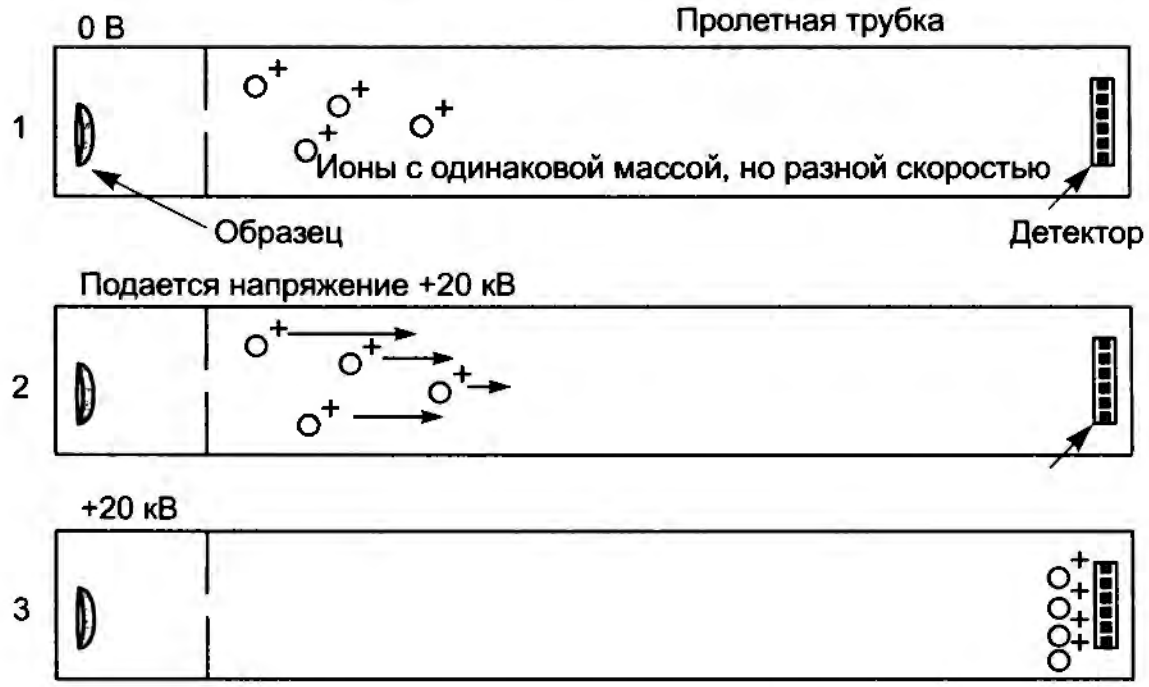


Рис. 9.15. Отсроченная экстракция. 1) В отсутствие электрического поля ионы спонтанно распределяются в объеме. 2) Подается напряжение. В градиенте напряжения медленные ионы ускоряются сильнее быстрых. 3) Медленные ионы нагоняют быстрые ионы у детектора

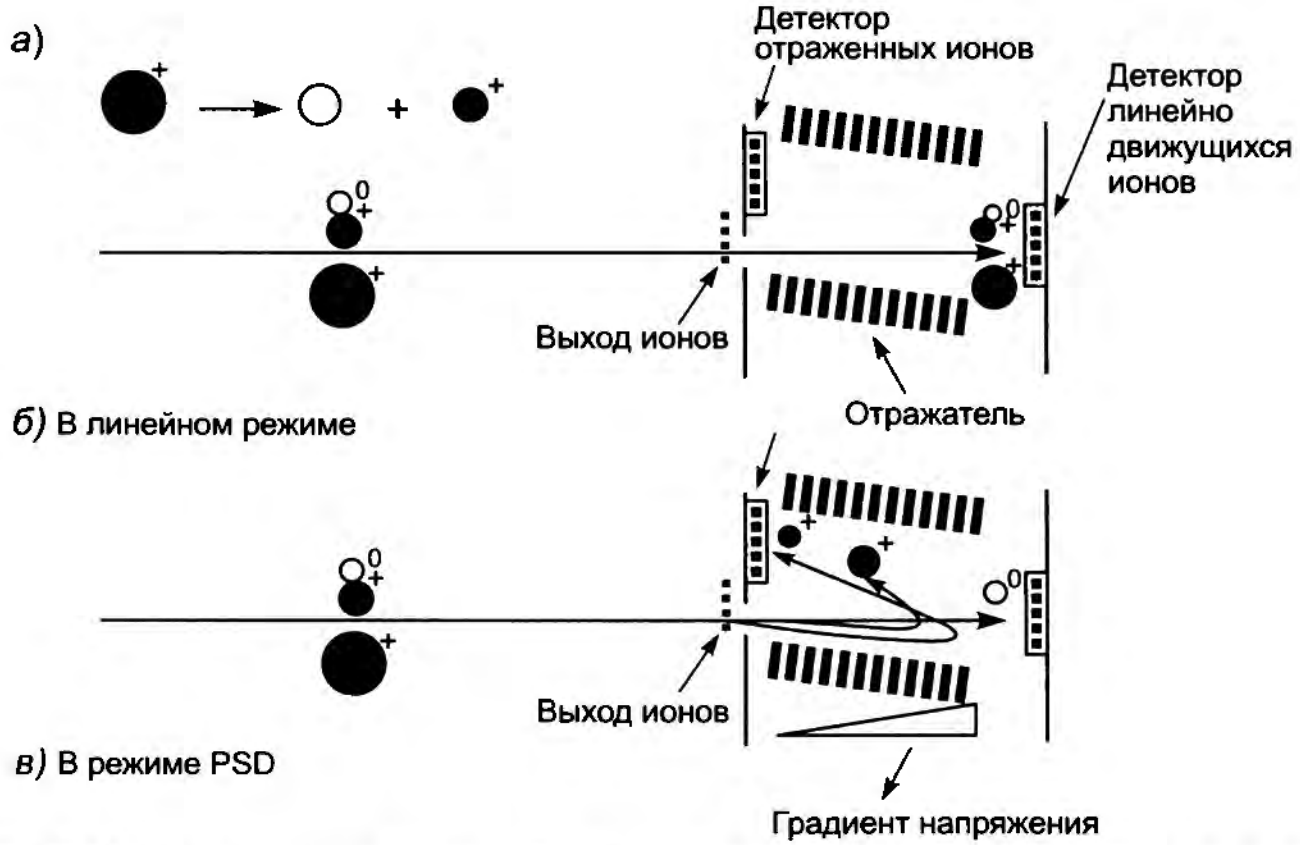


Рис. 9.16. Отражатель в установке MALDI-TOF, действующей по принципу распада после источника (PSD). *а* — фрагменты, образующиеся в результате распада после источника излучения, а также нейтральные фрагменты и родительские ионы достигают детектора одновременно. Это не позволяет различать родительские ионы и PSD-фрагменты. *б* — в линейном варианте метода заряженные фрагменты не разделяются. *в* — при использовании отражателя нейтральные фрагменты (обозначены как O^0) не отклоняются отражателем, а заряженные ($\bullet^+$) отклоняются в соответствии со значениями *m/z*. Это позволяет записывать спектр дочерних ионов, хотя и в ограниченном диапазоне *m/z* для каждого конкретного напряжения на отражателе

влияют на разрешение. Устройство использует градиентное электрическое поле, причем глубина проникновения ионов в это поле до изменения направления движения зависит от энергии ионов. Ионы с большей энергией проходят более длинную дистанцию, чем ионы с меньшей энергией. В результате времена полета ионов фокусируются, а на нейтральные фрагменты поле воздействия не оказывает. На рис. 9.16 представлена схема MALDI-TOF-анализа, предусматривающая возможность регистрации как линейно движущихся, так и отклоняющихся ионов. Отражатель улучшает разрешение и точность измерения масс, а кроме того, позволяет получать информацию о структуре и последовательности молекул (в случае пептидов) при проведении PSD-анализа.

Определение аминокислотной последовательности пептидов по принципу PSD осуществить сложнее (большое количество экспериментов оказывается неудачными), чем с помощью тандемной МС в варианте квадрупольного анализатора с электроспреем или с ионной ловушкой. При заданном положении ионного зеркала на нем фокусируются заряженные фрагменты с определенным диапазоном значений *m/z* (рис. 9.16). Ионы фрагментов со значениями *m/z* за пределами этого диапазона фокусируются плохо. Следовательно, поскольку при заданных параметрах зеркала фокусируются только фрагменты в ограниченном диапазоне масс, для получения полного спектра приходится снимать целый ряд спектров при разных установочных параметрах и накладывать их друг на друга.

Варианты подложек для нанесения образца в методе MALDI

Среди существующих подложек для образца, использующихся в анализе MALDI, стоит назвать 100-луночную стальную квадратную подложку. Она подходит для одновременного анализа многих образцов с **внешним стандартом**; для этого в соседние лунки помещают вещество (или вещества) с известной молекулярной массой для калибровки прибора. На таком типе поверхности, кроме того, легче следить за процессом кристаллизации матрицы. Четырехсотлуночные подложки с покрытием из тефлона используются для концентрирования образцов с целью увеличения чувствительности. Малый диаметр пятен не позволяет точно наносить образцы вручную, но такие подложки подходят для автоматического нанесения образцов. Поверхность подложки открыта только в центре каждого пятна, поэтому образец не растекается по всей поверхности пятна, а по мере высыхания концентрируется в центре. Покрытые золотом подложки с лунками диаметром 2 мм (см. рис. 9.10, *б*) хороши для распыления образцов и матрицы в случае использования органических растворителей типа тетрагидрофурана при анализе полимеров. В этих лунках, кроме того, можно проводить реакции с тиолсодержащими реагентами, которые связываются на поверхности золота.

9.3.9 Гибридные приборы для масс-спектрометрии

Разработан ряд устройств, совмещающих в себе такие источники ионизации как электроспрей, ионная ловушка или MALDI с гибридным ортого-

нальным квадрупольным TOF-масс-спектрометром (рис. 9.17). Это позволяет улучшить характеристики тандемной МС с вводом образцов по методу MALDI. В основе создания таких устройств лежала идея совмещения достоинств обоих типов ионизаторов с достоинствами всех типов анализаторов для расширения возможностей и увеличения чувствительности тандемной МС. Кроме того, производятся гибридные приборы с магнитным сектором, в которых первый масс-спектрометр представляет собой устройство с двойной фокусировкой, а второй масс-спектрометр — квадруполь.

9.3.10 Ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье

Новый метод масс-спектрометрии **ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье** (Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR) имеет большой потенциал для анализа широкого диапазона биологических молекул. Возможно, это наиболее чувствительный метод масс-спектрометрического анализа, который практически не имеет ограничений по массам анализируемых веществ (большинство приборов позволяют измерять массы $>10^6$). Метод также позволяет проводить тандемную МС. Ионы можно генерировать разными методами, например ESI или MALDI. Принцип FT-ICR состоит в том, что внутри ячейки вращающиеся в магнитном поле ионы возбуждаются радиочастотными сигналами. При этом на электродах возникает **изображение тока** всех ионов (наведенный ток,

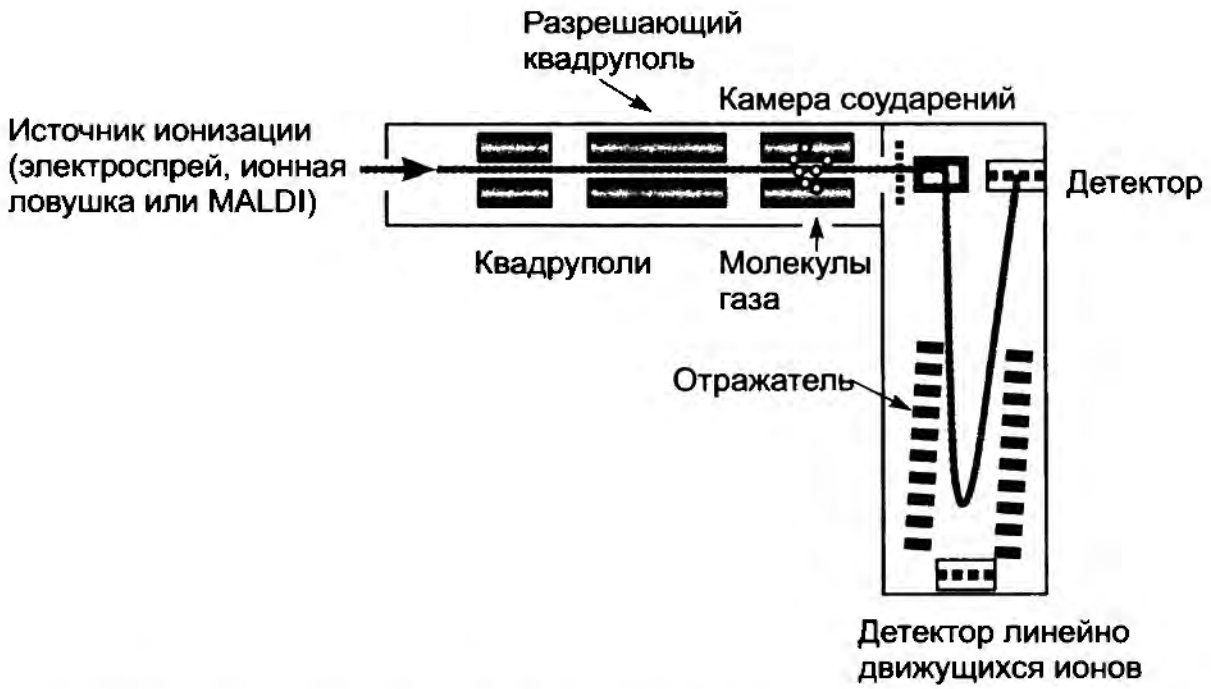


Рис. 9.17. Схема устройства гибридного квадрупольного TOF-масс-спектрометра. Представлено общее устройство прибора, а не схема прибора конкретного производителя. Источником ионов может быть ионная ловушка, электроспрей или даже источник MALDI (в анализаторе «MALDI Q-TOF» фирмы Micromass). К другим гибридным инструментам относятся «BioTOF III, ESI-Q-q-TOF System» фирмы Bruker Daltonics и гибридный ЖХ-МС/МС «QSTAR» фирмы Applied Biosystems с электроспреем, наноспреем или обычным источником MALDI. В приборе «AXIMA MALDI QIT TOF» фирмы Shimadzu Biotech совмещен источник MALDI с ионной ловушкой и анализатор TOF с отражателем

или образ тока), циркулирующих в ячейке, которое может быть записано. Каждый ион вращается в ячейке с индивидуальной частотой и различные частоты анализируются и извлекаются из общего сигнала с помощью преобразования Фурье, а результирующий частотный спектр конвертируется в масс-спектр с использованием известного отношения частоты и массы (рис. 9.18).

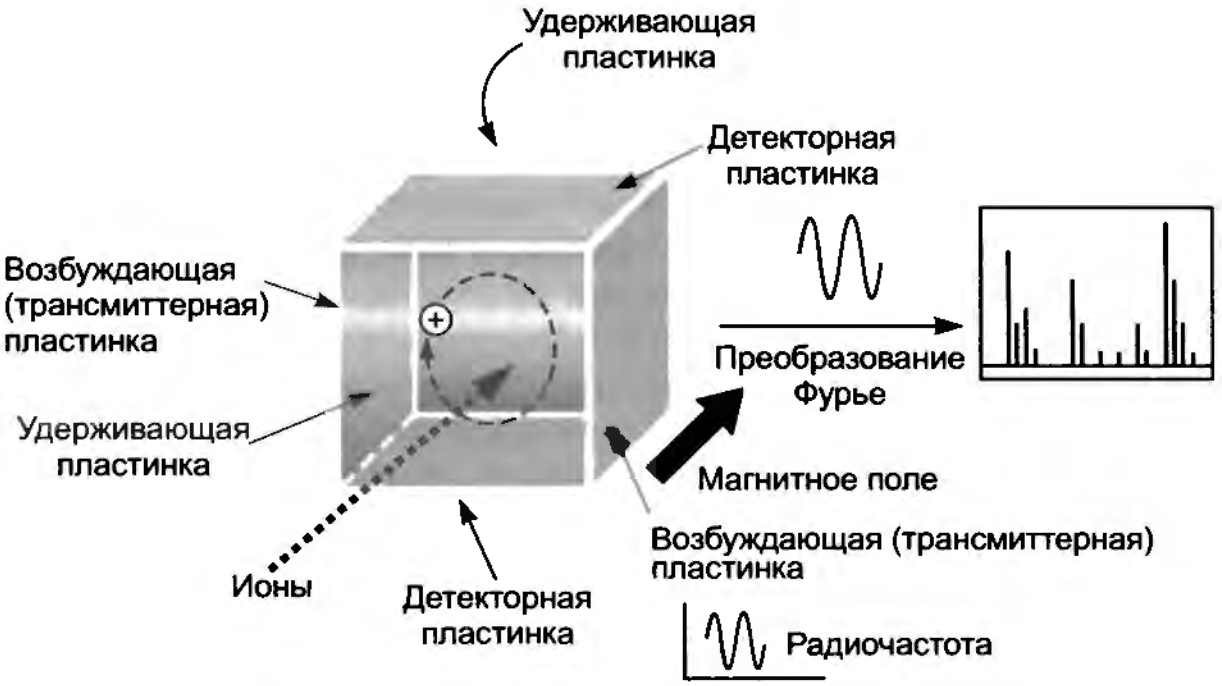


Рис. 9.18. Схема ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR). Суть метода состоит в захвате, возбуждении и детектировании ионов с записью масс-спектра. На схеме передняя и задняя стороны куба — это удерживающие пластинки, которые заставляют ионы совершать круговые движения. Боковые поверхности куба — это возбуждающие, или трансмиттерные, пластинки, на которых ионам передаются импульсы радиочастоты. Верхняя и нижняя поверхности — это детекторные пластинки, регистрирующие образ тока, подвергающийся преобразованию Фурье. Обычно источником ионизации является электроспрей или источник MALDI. Ионы фокусируются и передаются в анализирующую ячейку, в которой поддерживается глубокий вакуум. Анализирующая ячейка представляет собой вариант ионной ловушки в статическом и равномерном магнитном поле, которая заставляет ионы двигаться по круговой орбите с частотой, зависящей от массы, заряда и скорости иона. Пока ионы находятся на этих орбитах в пространстве между электродами детектора, они не дают измеряемого сигнала. Для получения сигнала ионы с заданным отношением m/z возбуждают радиочастотным сигналом длительностью несколько миллисекунд, в результате чего радиус вращения ионов увеличивается. На одной частоте возбуждаются только ионы с одним определенным значением m/z; они и дают детектируемый образ тока. Этот зависимый от времени ток подвергается преобразованию Фурье, что позволяет получить составляющие частоты, которые соответствуют значениям m/z для различных ионов. Измерение угловой частоты вращения дает значения m/z. Таким образом удается получать масс-спектры с очень высоким разрешением, поскольку частоты измеряются гораздо точнее любых других физических параметров. После возбуждения ионы возвращаются на исходные орбиты; повторяя данный процесс многократно, можно достичь высокой чувствительности анализа

9.4 ДЕТЕКТОРЫ

9.4.1 Введение

Выходящие из масс-анализатора ионы сталкиваются с поверхностью детектора; при этом их заряд нейтрализуется в результате либо приобретения, либо потери электронов. Образующийся электрический ток усиливается и в конечном итоге преобразуется в сигнал, который обрабатывается компьютером. **Полный ионный ток** (ПИТ) представляет собой суммарный ток, создаваемый всеми ионами, которые могут детектироваться в каждый конкретный момент времени; этот параметр очень удобен для контроля процесса в режиме online. Зависимость ионного тока от времени дополняет кривую поглощения в ультрафиолетовом свете, регистрируемую при проведении хроматографии. В отличие от поглощения в ультрафиолетовом свете, которое зависит от поглощения каждого компонента при конкретных значениях длин волн на детекторе, ПИТ, естественно, не зависит от светопоглощающих свойств веществ, а определяется лишь их способностью к ионизации.

9.4.2 Электронный умножитель и конверсионный динод

Электронные умножители используются в качестве детекторов для всех типов масс-спектрометров. Их часто комбинируют с **конверсионным динодом**, предназначенным для повышения чувствительности. Пучок ионов из масс-анализатора фокусируется на конверсионном диноде, который испускает электроны в прямо пропорциональной зависимости от числа падающих ионов. Положительно или отрицательно заряженные ионы попадают в конверсионный динод, вызывая испускание вторичных частиц со вторичными ионами, электронов, а также нейтральных частиц (рис. 9.19). Эти вторичные частицы ускоряются на динодах электронного умножителя. Они ударяются о диноды с достаточной энергией, чтобы выбить из них электроны, которые проникают далее в электронный умножитель, в котором образуется все больше и больше электронов.

9.5 ПОЛУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ИНФОРМАЦИИ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

9.5.1 Введение

Как упоминалось ранее, новые методы ионизации ESI и MALDI, также как и FAB и его производные, позволяют осуществлять ионизацию молекул в мягких условиях. В отличие от ионизации электронным ударом при таких способах ионизации не образуется большого количества фрагментов. Для получения информации о структуре биологических молекул, а также для определения последовательностей белков и пептидов был разработан метод тандемной масс-спектрометрии. Этот метод, кроме того, можно использовать для определения последовательностей олигосахаридов (разд. 9.5.6) и олигонуклеотидов (рис. 9.20). Маловероятно, что этот метод когда-нибудь

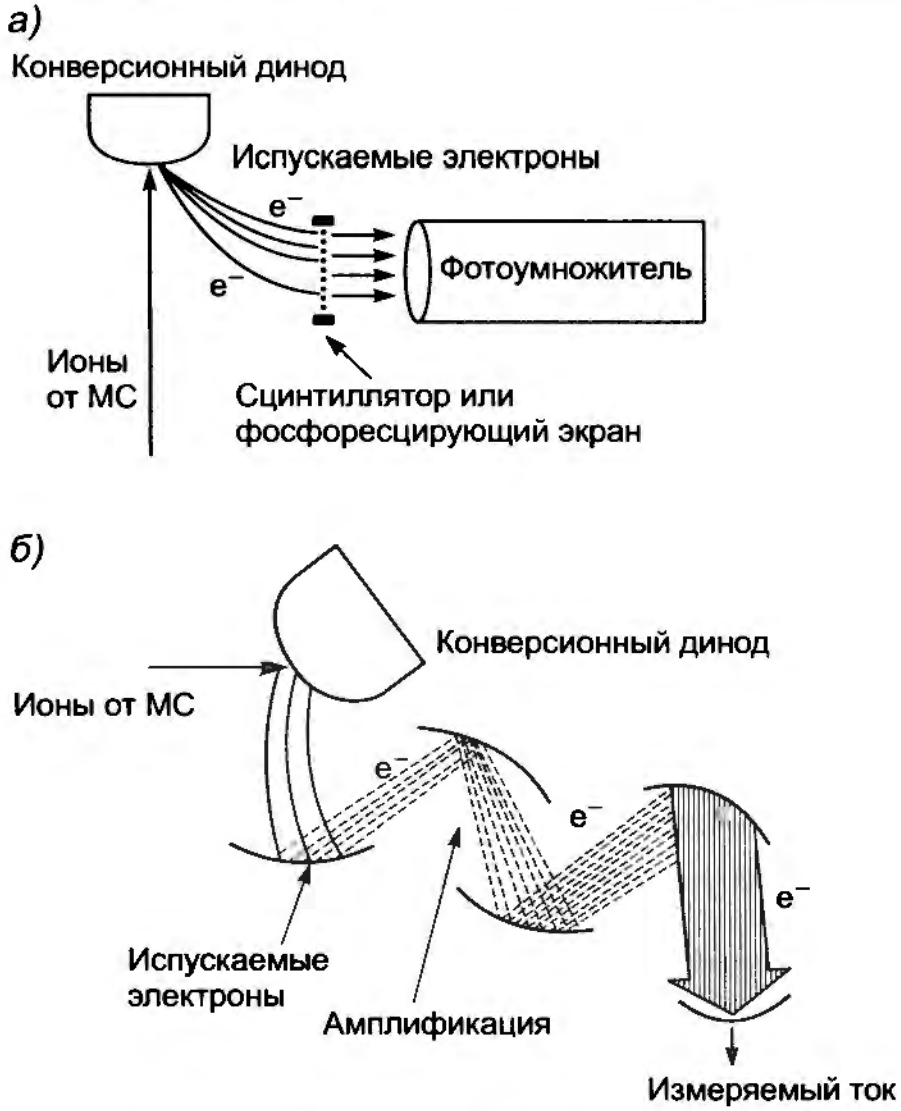


Рис. 9.19. Конверсионный динод и электронный умножитель (*а* и *б*). Каждый ион сталкивается с конверсионным динодом и вытесняет из него несколько электронов, которые движутся дальше к следующему диноду с более высоким потенциалом. Вторичные электроны из конверсионного динода ускоряются и фокусируются на втором диноде, который в свою очередь также испускает вторичные электроны. Таким образом, каждый электрон приводит к образованию еще нескольких электронов. Усиление сигнала достигается в результате «каскадного эффекта» вторичных электронов, движущихся от динода к диноду, так что на выходе электронного умножителя генерируется измеряемый электрический ток. Каскад электронов нарастает до тех пор, пока не будет получен достаточный для регистрации электрический ток. Серия из 10–20 динодов с разным напряжением обеспечивает усиление сигнала в 10^6–10^7 раз

сможет заменить секвенирование ДНК в геле, однако он может применяться для идентификации расположения модифицированных или меченых оснований, что не всегда удается осуществить при секвенировании по методу Сэнгера.

Масс-спектрометрия позволяет определить структуру практически любой органической молекулы при наличии прибора, подходящего для анализа данного типа образца. В частности, органические соединения анализируют с помощью МС с магнитным сектором, для чего два устройства с двойной фокусировкой объединяют в четырехсекторное устройство через **камеру соударений**. Общий принцип анализа такой. Как обычно,

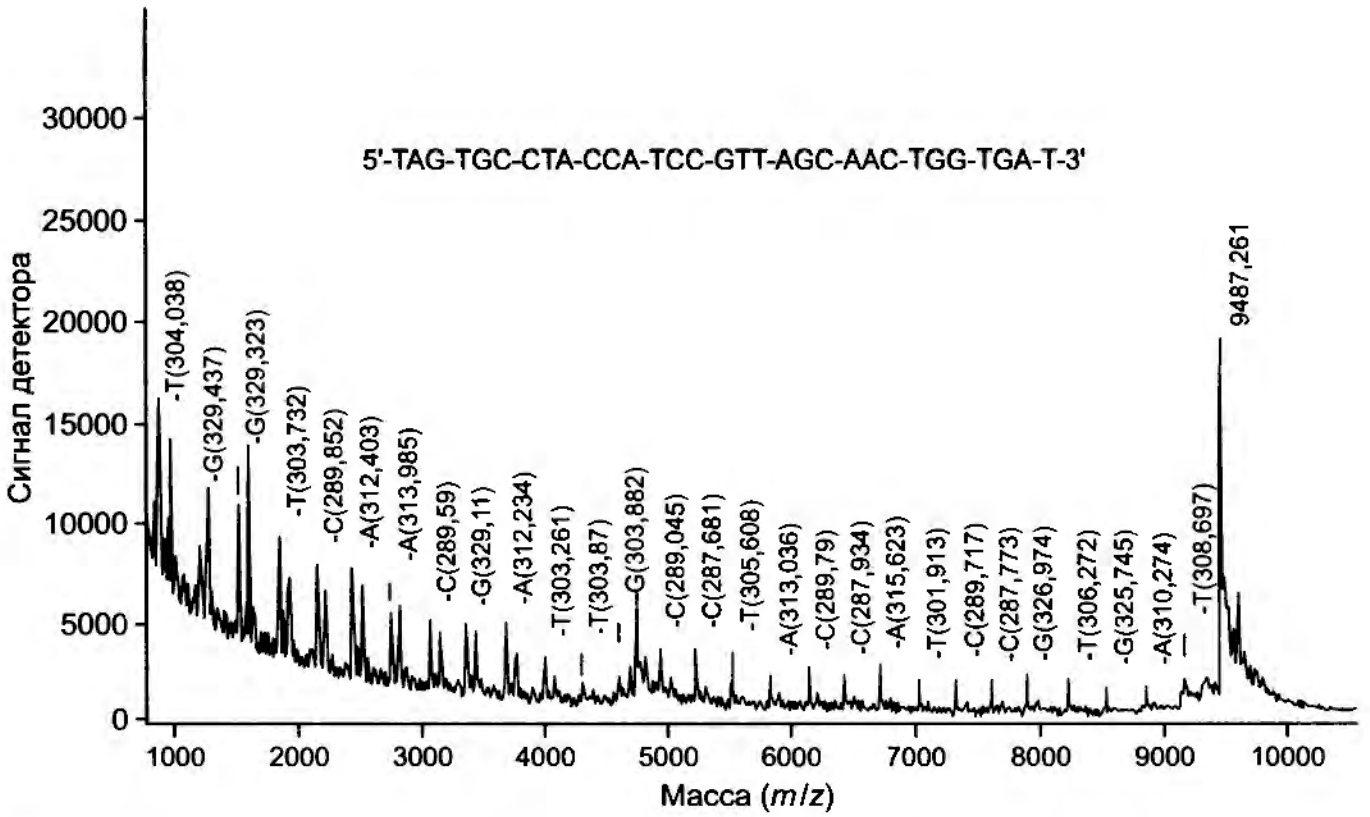


Рис. 9.20. Секвенирование ДНК методом МС. Представлен пример определения последовательности олигонуклеотида, состоящего из 36 оснований, методом MALDI-TOF с распадом в источнике ионизации. Последовательность восстановлена на основании разностей масс между пиками, соответствующих поочередному удалению оснований при каждой фрагментации. Автор благодарит Applied Biosystems за предоставленную возможность воспроизведения спектра.

смесь ионов образуется в источнике ионизации, а затем ионы пропускают сквозь первый масс-анализатор, где отбирается (но не детектируется) ион с определенным значением *m/z*. Далее этот ион попадает в камеру соударений и сталкивается с молекулами инертного газа, такого как аргон или гелий. Кинетическая энергия иона переходит в колебательную энергию и в ионы фрагментов. Этот процесс называют **диссоциацией в результате соударений** (collision-induced dissociation, CID) или **диссоциацией, активированной соударениями** (collision-activated dissociation, CAD). Затем во втором масс-спектрометре определяются значения *m/z* ионов фрагментов (см. рис. 9.21 — иллюстрация принципа на примере квадрупольного масс-спектрометра). Камера соударений может располагаться в любом месте, где нет электрических или магнитных полей, что приводит к большому разнообразию экспериментальных методологий для множества различных применений. Например, как и в тройном квадрупольном масс-спектрометре, анализ можно осуществлять с помощью гибридного прибора типа Q-TOF (разд. 9.3.9). Поскольку принципы тандемной МС в большинстве типов приборов практически одни и те же, мы остановимся на методе тандемной МС с ионизацией электроспреем. Процедура проведения структурного анализа и определение последовательностей полипептидов в масс-спектрометрах с ионной ловушкой описаны в разд. 9.3.3.

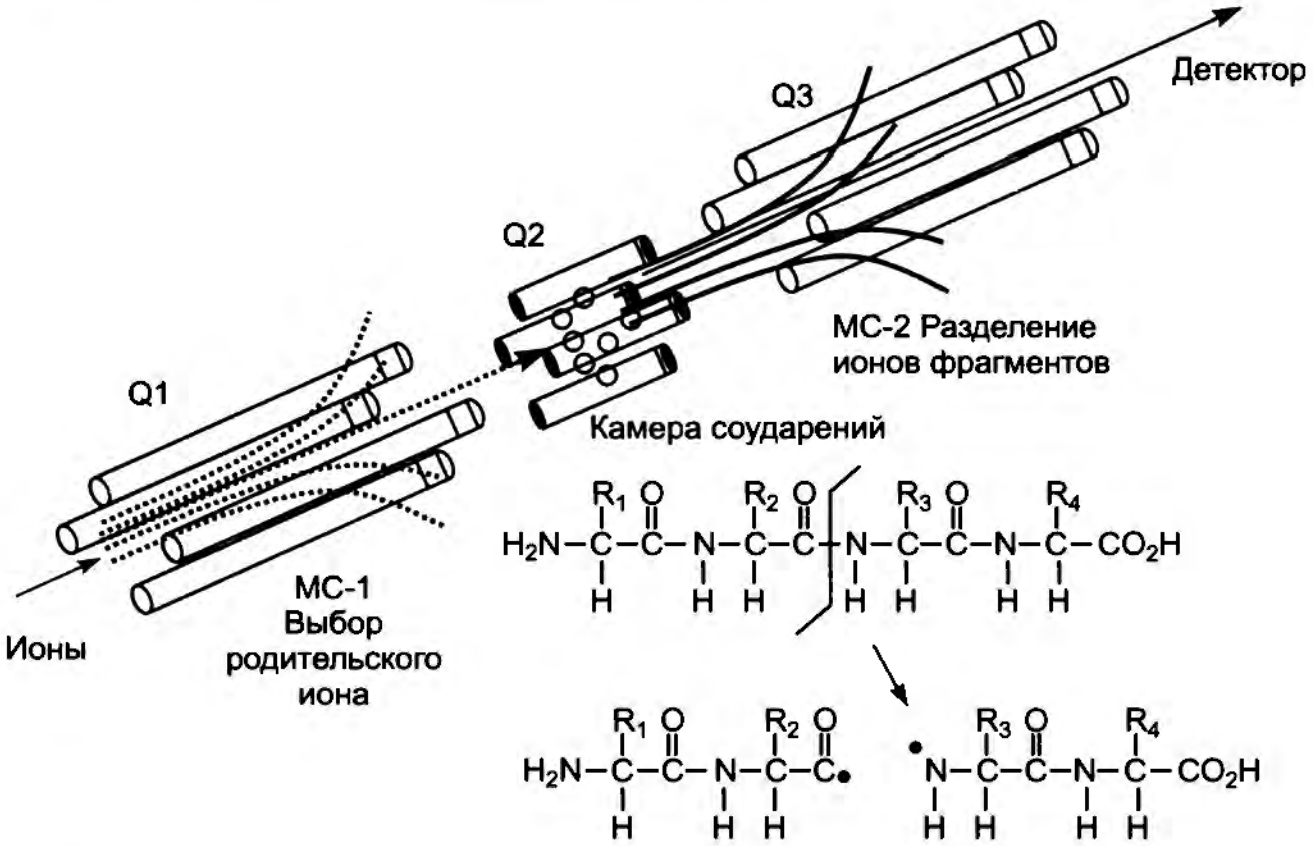


Рис. 9.21. Определение аминокислотной последовательности с помощью квадрупольного масс-спектрометра. В первом квадруполе (Q1) выбирается ион с определенным значением *m/z* (как на рис. 9.5), но не детектируется, а направляется во второй квадруполь (Q2), где подвергается соударениям с молекулами инертного газа. Квадруполь Q3 играет роль второго квадрупольного масс-спектрометра (МС-2), который сканирует величины *m/z* для построения спектра ионов фрагментов. Камера соударений Q2 — это заполненный подходящим газом квадруполь, на который часто воздействуют только радиочастотными волнами. Здесь не происходит никакого разделения по массам, а радиочастотные волны лишь заставляют ионы претерпевать дополнительное количество соударений. Происходящая здесь фрагментация является результатом расщепления по пептидным связям, причем один из образующихся фрагментов сохраняет заряд, так что образуются ионы y- или b-серий (см. рис. 9.22).

9.5.2 Определение последовательностей белков и пептидов

Анализ структуры белков начинается с их расщепления протеазами, чаще всего трипсином. Специфичность действия этого фермента приводит к тому, что на N- и C-концах образующихся фрагментов обычно находятся основные группы. Трипсин расщепляет пептидную цепь после остатков лизина и аргинина, а обе эти аминокислоты имеют основные группы в боковой цепи (соответственно аминогруппу и гуанидиновую группу). В результате расщепления образуются главным образом положительные двухзарядные ионы с высокой энергией, которые легко распадаются далее. После расщепления белка до пептидов следует этап идентификации пептидов по значениям *m/z* либо напрямую, либо после следующей фрагментации по пептидным связям. Хотя в принципе фрагменты могут образовываться в результате разрыва разных типов связей, большинство фрагментов возникает при расщеплении именно пептидных связей, что соответствует

появлению в спектре пиков, различающихся на величину массы следующего аминокислотного остатка. Следовательно, различие в массах служит основой для воссоздания аминокислотной последовательности пептида (его **первичной структуры**; см. табл. 9.2).

Различают серии ионов a–b–c и x–y–z в зависимости от того, на каком фрагменте сохраняется заряд. Ионы серий x, y и z возникают при сохранении заряда на С-концевом фрагменте пептида. Например, ион z_1 представляет собой первый С-концевой остаток, y_1 содержит также NH-группу (следовательно, имеет массу на 15 атомных единиц больше), а x_1 содержит карбонильную группу; y_2 содержит два С-концевых остатка и т.д. Серии ионов a–b–c образуются из N-концевых фрагментов пептида при сохранении на них заряда. На рис. 9.22, *а* представлена схема фрагментации идеального пептида. Часто при фрагментации преобладают ионы определенной серии, а при комплементарных данных — пептиды можно секвенировать с обеих сторон (рис. 9.22, *б*). Кроме того, ионы могут образовываться при отщеплении боковых цепей аминокислот, что позволяет различать изомеры аминокислот, такие как лейцин и изолейцин. Идентификация белков осуществляется путем сравнения баз данных, содержащих массы всех известных пептидов из всех белков (или транслированных последовательностей

Таблица 9.2. **Символы и массы аминокислотных остатков**

Аминокислота	Символ	Масса аминокислотного остатка[а]	Боковая цепь
Аланин	A, Ala	71,079	CH_3-
Аргинин	R, Arg	156,188	$HN{=}C(NH_2)–NH–(CH_2)_3$-
Аспарагин	N, Asn	114,104	$H_2N–CO–CH_2$-
Аспарагиновая кислота	D, Asp	115,089	$HOOC–CH_2$-
Валин	V, Val	99,133	$CH_3–CH(CH_2)$-
Гистидин	H, His	137,141	Имидазол-CH_2-
Глицин	G, Gly	57,052	H-
Глутамин	Q, Gln	**128,131**	$H_2N–CO–(CH_2)_2$-
Глутаминовая кислота	E, Glu	129,116	$HOOC–(CH_2)_2$-
Изолейцин	I, Ile	**113,160**	$CH_3–CH_2–CH(CH_3)$-
Лейцин	L, Leu	**113,160**	$(CH_3)_2–CH–CH_2$-
Лизин	K, Lys	**128,17**	$H_2N–(CH_2)_4$-
Метионин	M, Met	131,199	$CH_3–S–(CH_2)_2$-
Метсульфоксид	Met.SO	**147,199**	$CH_3–S(O)–(CD_2)_2$-
Пролин	P, Pro	97,117	Пирролидон-CH-
Серин	S, Ser	87,078	$HO–CH_2$-
Тирозин	Y, Tyr	163,176	4-OH-Фенил-CH_2-
Треонин	T, Thr	101,105	$CH_3–CH(OH)$-
Триптофан	W, Trp	186,213	Индол-$NH–CH{=}C–CH_2$-
Фенилаланин	F, Phe	**147,177**	Фенил-CH_2-
Цистеин	C, Cys	103,145	$HS–CH_2$-

[а] Масса остатка равна массе аминокислоты после удаления молекулы H_2O при образовании пептидной связи. Жирным шрифтом выделены те значения масс, которые сложно однозначно интерпретировать при определении аминокислотной последовательности методом тандемной МС, поскольку они близки к значениям масс других остатков.

ДНК), и теоретически рассчитанных масс фрагментированных пептидов. С помощью тандемной масс-спектрометрии можно определять всего несколько зептомолей (10^{-21} М) вещества (см. табл. 9.3).

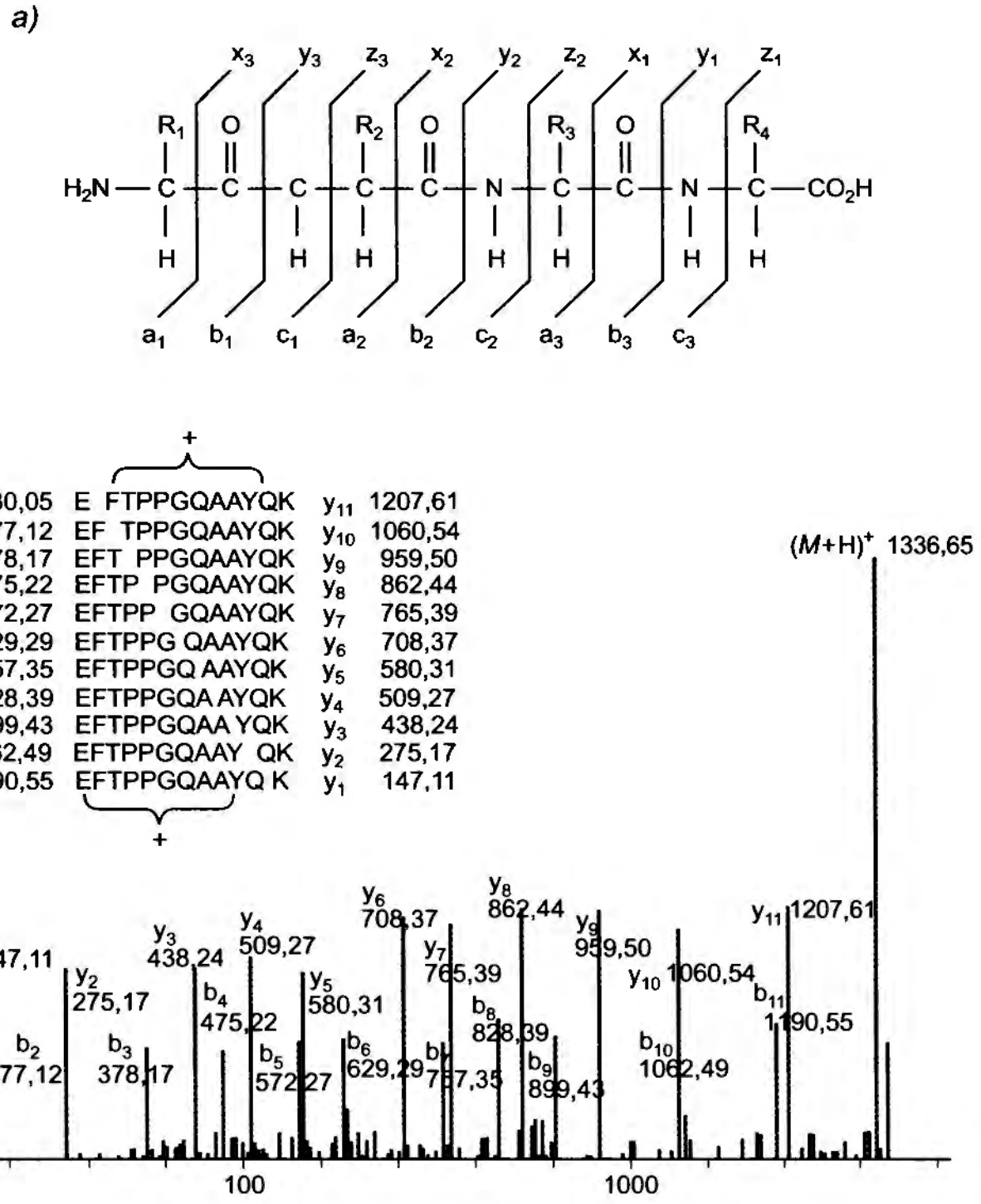


Рис. 9.22. Обозначения ионов фрагментов и спектр пептида, полученный методом тандемной МС. *а* — заряд может сохраняться на N- или С-концевом фрагменте пептида, что приводит к образованию ионов серий a–b–c или x–y–z соответственно. *б* — часто преобладают ионы серий y и b. Понятно, что нейтральные фрагменты не детектируются. Здесь представлена последовательность пептида из мутантного гемоглобина: EFTPPGQAAYQK. Масс-спектр получен путем вызванной соударениями диссоциации родительского иона $(M + H)^{2+}$ с m/z = 668,3. Расщепление по каждой пептидной связи приводит к образованию b- или y-ионов с сохранением заряда на N- или на С-конце пептида соответственно

Таблица 9.3. **Массовая разность между многозарядными ионами пептидов, обусловленная присутствием в них различных изотопов**

Заряд пептида	Кажущаяся масса	Разница между пиками изотопов
Однозарядный ион	$[(M + H)/1]$	1 Да
Двухзарядный ион	$[(M + 2H)/2]$	0,5 Да
Трехзарядный ион	$[(M + 3H)/3]$	0,33 Да
n-Зарядный ион	$[(M + nH)/n]$	$1/n$ Да

9.5.3 Сравнение определения аминокислотной последовательности масс-спектрометрическими методами и методом Эдмана

В настоящее время для определения полной аминокислотной последовательности белка редко пользуются методом Эдмана, поскольку последовательности геномов известны и для поиска конкретного белка достаточно знать последовательности небольших фрагментов генома. Большинство белков, если только они не образованы из секретированной или пропептидной формы, блокированы на N-конце, чаще всего, с помощью ацетильной группы. Другой вариант блокирования N-конца — ацилирование жирными кислотами, чаще всего миристиновой (C_{12}) кислотой, присоединенной через остаток глицина, а также другими жирными кислотами с более короткой цепочкой. Кроме того, встречаются случаи циклизации глутамина с образованием остатка пироглутамила и посттрансляционная модификация с образованием N-концевого триметилаланина или диметилпролина. В случае рекомбинантных белков с высоким уровнем экспрессии в клетках *Escherichia coli* часто не полностью удаляется первый аминокислотный остаток (N-формилметионин). Все эти модификации приводят к тому, что в N-концевом остатке азот в α-положении не несет свободного протона; это делает невозможным протекание реакции Эдмана. Для таких белков масс-спектрометрический метод определения последовательности незаменим. Приборы для секвенирования белков до сих пор используются для твердофазного секвенирования при идентификации посттрансляционных модификаций, в частности участков фосфорилирования. Сочетание микросеквенирования и МС теперь широко применяется для определения полной ковалентной структуры белка.

9.5.4 Изотопы углерода и определение заряда пептида

В масс-спектрометрии оперируют отношениями m/z, при этом обычно предполагается, что каждый ион несет один заряд (т. е. $m/z = m + 1$, если речь идет о положительных зарядах). Однако поскольку в природных ве-

ществах содержится около 1,1% изотопа углерода ^{13}C, по мере увеличения размера пептида возрастает вероятность того, что в нем содержится один, два и т. д. ^{13}C. Состоящий из 20 аминокислотных остатков пептид дает практически равные по интенсивности пики, соответствующие «полностью ^{12}C-пептиду» и пептиду с одним атомом ^{13}C. Однозарядные ионы пептидов дают на спектре парные пики, различающиеся на одну единицу массы; двухзарядные ионы пептидов дают парные пики, различающиеся на половину единицы массы и т.д. (рис. 9.23 и табл. 9.3). В примере, приведенном на рис. 9.23, относительная молекулярная масса ангиотензина, рассчитанная на основании его последовательности, составляет 1295,69. Экспериментальные значения составляют $[(M + H)/1] = 1296,65$ для однозарядного иона и $[(M + 2H)/2] = 648,82$ для двухзарядного иона. Изотопы хлора ^{35}Cl и ^{37}Cl встречаются в природе в соотношении примерно 3 : 1. Если соединение содержит один атом хлора, при ионизации образуются два типа ионов с соотношением интенсивностей пиков примерно 3 : 1. Если в соединении два атома хлора, на спектре появятся три пика. Данный метод особенно полезен для анализа высокоэнергетических двухзарядных ионов пептидов, образующихся при расщеплении белков трипсином для тандемной МС.

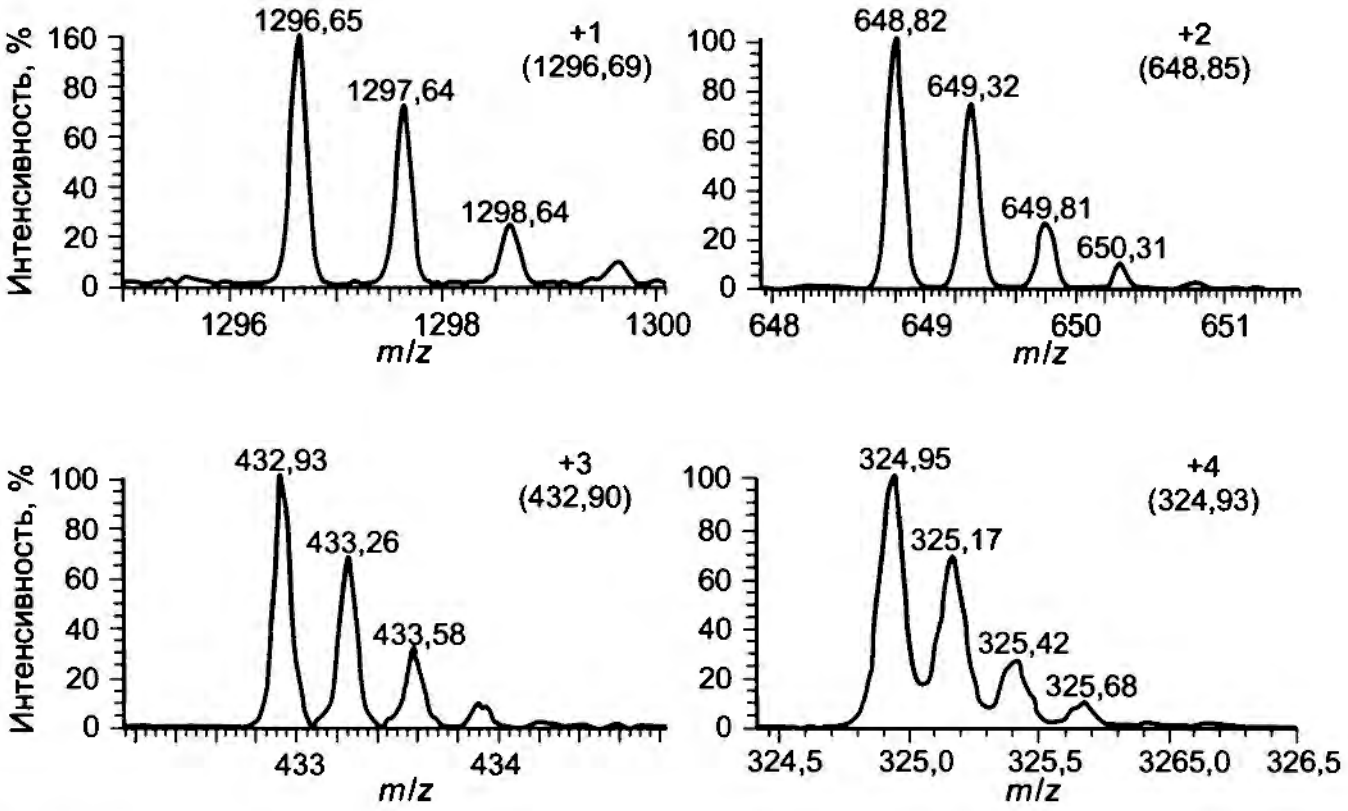


Рис. 9.23. Спектры многозарядных пептидов. Для определения заряда пептида надо увеличить часть масс-спектра для получения более четкого изображения отдельных пиков, образующихся из одной и той же биомолекулы, что обусловлено наличием у некоторых атомов нескольких изотопов. Главным образом, это связано с наличием изотопов ^{12}C и ^{13}C (см. текст)

Пример 4 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ (I)

Вопрос Олигопептид, полученный после обработки белка трипсином, анализировали методами МС с электроспреем (ESI) и МС с ионной ловушкой. Были получены следующие значения *m/z*:

Электроспрей	223,2	297,3								
Ионная ловушка	146	203	260	357	444	591	648	705	802	890

1) Определите последовательность олигопептида. Для расчетов используйте значения масс аминокислотных остатков, приведенные в табл. 9.2.
2) Определите молекулярную массу пептида.
3) Идентифицируйте пики в спектре ESI.

Замечание. Трипсин расщепляет пептиды у остатков аргинина и лизина со стороны С-конца.

Ответ 1) Наибольшая масса в спектре, полученном с помощью ионной ловушки, составляет $m/z = 890$, что соответствует $(M + H)^+$. Следовательно, $M = 889$ Да.

m/z	146	203	260	357	444	591	648	705	802	889
Δ		57	57	97	87	147	57	57	97	87
ак		Gly	Gly	Pro	Ser	Phe	Gly	Gly	Pro	Ser

Разность масс соседних ионов (Δ) соответствует массе аминокислотного остатка (ак). Наименьшее значение массы иона, $m/z = 146$, слишком мало для аргинина и, следовательно, соответствует Lys + OH. Начиная с N-конца, последовательность можно записать в виде

Ser-Pro-Gly-Gly-Phe-Ser-Pro-Gly-Gly-Lys.

2) Сложение масс остатков дает значение 889 Да, что подтверждает результат масс-спектрометрии.
3) Значения *m/z* в спектре ESI соответствуют многозарядным ионам; их можно интерпретировать следующим образом:

$m/z = 223{,}2 = (M + 4H)^{4+}$ из $889/223{,}3 = 3{,}98$
$m/z = 297{,}3 = (M + 3H)^{3+}$ из $889/297{,}3 = 2{,}99$

Запомните, что *z* должно быть целым числом, так что полученные значения следует округлять до ближайших целых чисел.

Пример 5 СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПЕПТИДОВ (II)

Вопрос Определите первичную структуру олигопептида, для которого методом МС-МС (для положительных ионов) были получены следующие данные:

m/z	149	305	442	529	617

Для расчетов используйте значения масс аминокислотных остатков, приведенные в табл. 9.2.

Ответ $m/z = 617 = (M + H)^+$.

m/z	149	305	442	529	616
Δ	156	137	87	87	
ак	Arg	His	Ser	Ser	

Последовательность можно записать в виде
Ser-Ser-His-Arg-?
Обратите внимание, что ни один аминокислотный остаток не соответствует иону с m/z 149. Для определения его природы необходимы дополнительные данные, в частности более точное определение молекулярной массы олигопептида. Можно, однако, сделать некоторые предположения. Если ион с m/z 149 представляет собой С-концевой остаток олигопептида, он должен иметь на конце ОН-группу и, следовательно, молекулярная масса соответствующего остатка на 17 единиц меньше. Разность 149 – 17 = 132, что очень близко к молекулярной массе остатка метионина, так что, возможно, именно эта аминокислота находится на С-конце данной цепи.

Пример 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССЫ ПЕПТИДОВ (III)

Вопрос Неизвестный пептид и продукты его ферментативного расщепления анализировали масс-спектрометрическими и хроматографическими методами; были получены следующие результаты:

1) При анализе пептида методом MALDI-TOF было обнаружено два сигнала с m/z 3569 и 1785.
2) При анализе гидролизата методом MALDI-TOF обнаружены сигналы с m/z 766, 891, 953 и 1016.
3) При анализе пептида комбинированным методом ВЭЖХ-МС с ионизацией электроспреем получены пики с m/z 510,7, 595,7, 714,6, 893,0 и 1190,3.
4) При анализе гидролизата методом ВЭЖХ удалось различить четыре компонента.

Какие выводы можно сделать из полученных результатов? Определите молекулярную массу пептида, используя значения масс аминокислотных остатков, приведенные в табл. 9.2.

Ответ 1) При проведении анализа методом MALDI-TOF обнаружено два сигнала с m/z = 3569 и 1785. Возможны два варианта:

а) $m/z = 3569 = (M + H)^+$
при $m/z = 1785 = (M + 2H)^{2+}$, откуда $M = 3568$

б) $m/z = 3569 = (2M + H)^+$
при $m/z = 1785 = (M + H)^+$, откуда $M = 1784$.

2) Правильный ответ можно найти, если учесть результаты MALDI-TOF-анализа продуктов гидролиза пептида. Были получены четыре пика со значениями m/z 766, 891, 953 и 1016. Каждый из этих ионов представляет собой протонированный пептид и сумма их масс (3626) близка к массе исходного пептида. Таким образом, правильный ответ в п. 1 — а.

3) При ионизации методом электроспрея получают многозарядные ионы. Используя стандартную формулу, найдем среднее значение массы.

$m_1 - 1$	$m_2 - m_1$	n_2	$m_2 - 1$	M, Да	z
892,2	297,3	3,0003	1189,3	3568,3	3
713,6	178,4	4,0000	892,0	3568,0	4
594,7	118,9	5,0016	713,6	3569,2	5
509,7	85	5,9964	594,7	3566,1	6

ΣM = 14271,6 Да

Среднее значение M = 3567,9 Да.

Точное среднее значение M подтверждает сделанный ранее вывод. Для объяснения разности между относительной молекулярной массой пептида и суммой масс продуктов его гидролиза обратитесь к ответу в примере 2.

Данные п. 4 подтверждают, что продуктов гидролиза было лишь четыре.

9.5.5 Ступенчатое секвенирование

Этот метод является альтернативой тандемной масс-спектрометрии и состоит в получении набора фрагментов полипептидной цепи с последующим анализом массы каждого компонента. Все компоненты смеси отличаются друг от друга на величину массы определенного аминокислотного остатка (в том числе и относящегося к модифицированной боковой цепи), что позволяет прочитать последовательность полипептида. Набор пептидных фрагментов может быть получен как по методу Эдмана (разд. 8.4.3), так и с помощью ферментов экзопептидаз, отщепляющих остатки от C- или N-конца пептида. В метод Эдмана вносятся некоторые изменения: стадия присоединения фенилизотиоцианата (ФИТЦ) осуществляется в присутствии небольшого количества фенилизоцианата, обрывающего полипептидную цепь. В этом проявляется некоторое сходство с секвенированием ДНК по методу Сэнгера. Это разностный метод: в нем определяют массы оставшихся фрагментов после каждого цикла. Например, если встречается остаток фосфосерина, цепь становится легче на 167,1 Да, а не на 87,1, как если бы в этом положении находился остаток серина. Такой подход позволяет обойти одну из наиболее сложных проблем, связанных с анализом посттрансляционных модификаций, поскольку большинство из таких модификаций сохраняются в цикле реакций Эдмана. Метод ступенчатого секвенирования применяется в анализе MALDI-TOF, имеющем высокий уровень чувствительности и позволяющем анализировать смеси пептидов.

9.5.6 Посттрансляционная модификация белков

Известно множество типов посттрансляционной модификации белков. К ним относятся разного рода реакции ацилирования по N-концу (уже

упоминавшиеся выше), а также ацилирование по С-концу и внутри цепи. В данном разделе приводятся примеры применения методов МС для анализа гликозилирования, фосфорилирования и образования дисульфидных мостиков. Постоянно обновляемый список известных химических модификаций, а также боковых цепей аминокислот, в которых они происходят, можно найти на сайте Delta Mass (http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home). На сайте можно найти ссылки на публикации.

Фосфорилирование белков и идентификация фосфопептидов

Обратимое ковалентное фосфорилирование белков в эукариотических клетках — это распространенный регуляторный механизм активации белков (разд. 15.5.4 и 16.5.3). Чаще всего в результате модификации образуются О-фосфосерин, О-фосфотреонин и О-фосфотирозин, но, кроме того, встречаются О-фосфо-Asp, S-фосфо-Cys, N-фосфо-Arg, N-фосфо-His и N-фосфо-Lys. Масс-спектрометрический анализ модифицированных пептидов играет важную роль в определении точной локализации и количества фосфорилированных остатков, особенно в тех случаях, когда не используется ^{32}P или другая радиоактивная метка. В зависимости от типа ионизации и фрагментации конкретного пептида больше информации можно извлечь при идентификации либо положительно, либо отрицательно заряженных ионов. В случае фосфопептидов более информативные спектры получаются при анализе отрицательно заряженных ионов, поскольку фосфатная группа несет устойчивый отрицательный заряд. Анализ фосфопептидов методом MALDI-TOF не очень информативен, поэтому для данного типа прибора были разработаны специальные методы, в которых смеси пептидов анализируют до и после их дефосфорилирования под действием фосфатаз.

Масс-спектрометрия гликозилированных пептидов и анализ структуры сахаров

Масс-спектрометрические методы позволяют идентифицировать участки N- и О-гликозилирования (через остатки аспарагина и серина соответственно), а также определить структуру сложных углеводов. Воссоздание структуры олигосахарида осуществляется посредством определения массы каждого отщепленного моносахаридного звена (рис. 9.24).

Для интерпретации спектров может оказаться полезным обратиться к сайту GlycoMod (часть сайта ExPASy). Имеющаяся на этом сайте программа предсказывает структуру олигосахаридов в белке на основе экспериментальных значений масс. Программу можно использовать для свободных олигосахаридов или их производных, а также для гликопептидов. Другая программа, GlycanMass (также часть ExPASy), может пригодиться для расчета массы олигосахарида на основе его состава. Программы GlycoMod и GlycanMass можно найти на сайтах http://us.expasy.org/tools/glycomod и http://us.expasy.org/tools/glycomod/glycanmass.html соответственно.

Идентификация расположения дисульфидных связей

Методы МС можно использовать для определения локализации дисульфидных связей в белках. Для этого белки разделяют на пептиды при низ-

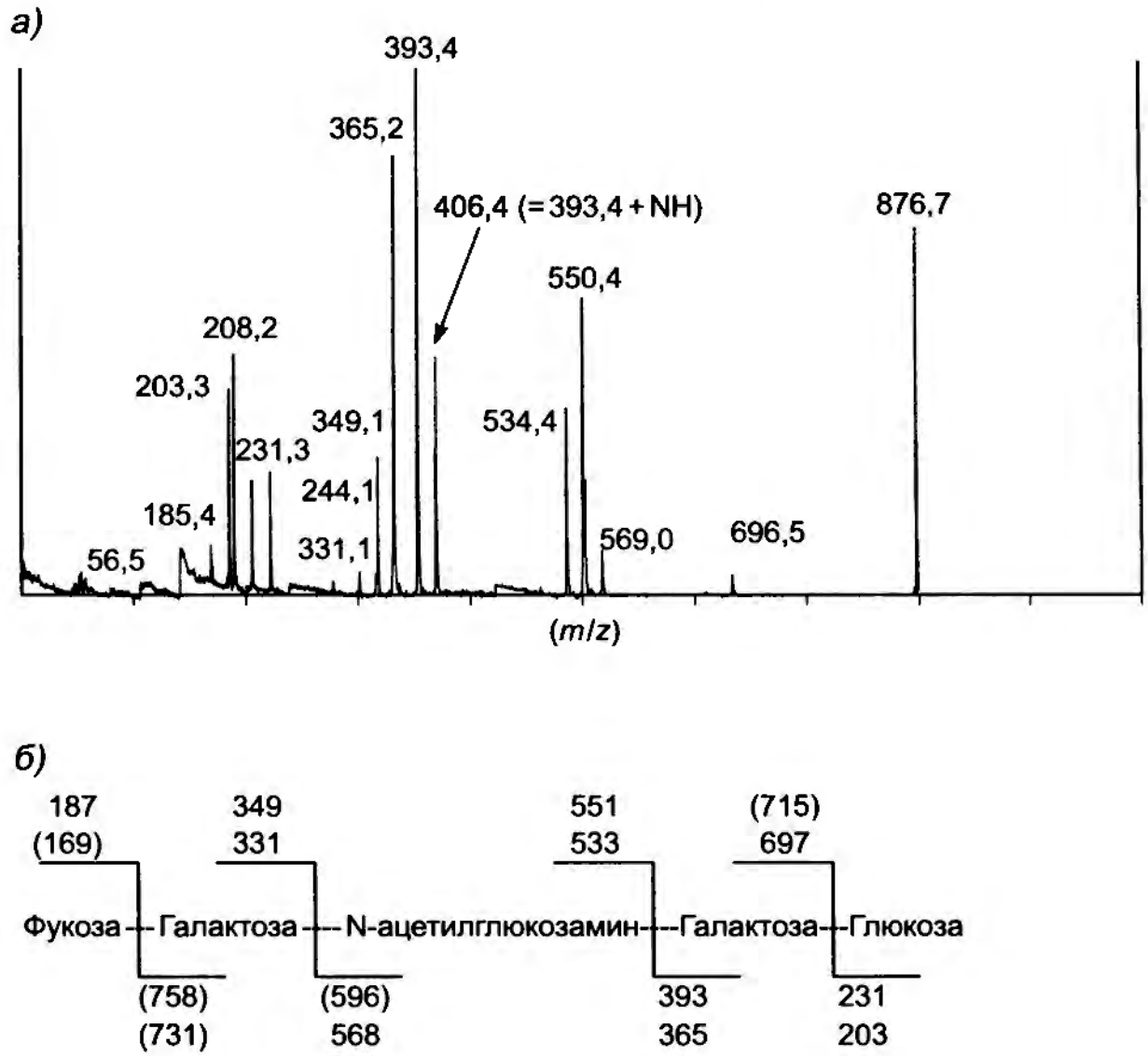


Рис. 9.24. Анализ углеводов методом MALDI-TOF-PSD. *а* — PSD-спектр углевода Fuc1-2Gal1-3GlucNAc1-3Gal-4Glc, полученный при использовании в качестве матрицы 2,5-дигидроксибензойной кислоты. При детальном анализе спектра можно обнаружить ряд резких изменений базовой линии, соответствующих стыкам отдельных PSD-спектров. Пик при значении *m/z* 876,7 соответствует интактной молекуле, присоединившей ион натрия, т. е. 876,7 = $(M + Na)^+$. *б* — интерпретация спектра. Экспериментальные массы фрагментов в пределах 1 Да совпадают с теоретическими значениями. Значения масс, приведенные в скобках, в данном эксперименте не видны

ких значениях pH, чтобы снизить вероятность дисульфидного обмена. Не следует использовать для протеолиза ферменты, имеющие в активном центре тиогруппы (например, папаин или бромелаин). Чаще всего используют пепсин и бромциан. Связанные дисульфидными связями пептидные фрагменты разделяют и анализируют методом ВЭЖХ-МС в мягких окислительных условиях. Разделение пептидов в тех же условиях повторяют после их восстановления меркаптоэтанолом или дитиотрейтолом (ДТТ), расщепляющими -S–S- связи. Пептиды с дисульфидными связями исчезают из спектра и появляются в виде своих компонентов.

9.5.7 Селективный мониторинг ионов

Селективный мониторинг ионов (selected ion monitoring, SIM) обычно применяется для отслеживания ионов, которые являются характерными для анализируемого соединения или группы соединений. Этот метод особенно полезен при проведении online-хроматографии-МС; при этом прибор настраивается таким образом, чтобы отслеживать поведение ионов определенной массы, например по мере выхода компонентов с колонки в случае капиллярной ЖХ или обращенно-фазовой ВЭЖХ (разд. 11.3.3 и 11.9.3). Программы или алгоритмы детектирования каждого компонента по мере его выхода с колонки в рамках тандемной МС могут быть адаптированы таким образом, чтобы избирательно детектировать различные типы посттрансляционных модификаций в пептидах. Такой подход позволяет селективно детектировать низкомолекулярные фрагменты — ионы-маркеры и выявлять наличие фосфорилированных, гликозилированных, сульфатированных или ацилированных остатков в любом конкретном пептиде. Например, фосфопептиды можно идентифицировать по появлению ионов фрагментов с массой 63 Да (PO_2^-) и 79 Да (PO_3^-) при диссоциации в результате соударений в рамках ВЭЖХ-ES-масс-спектрометрии с детектированием отрицательно заряженных ионов. Гликопептиды также можно идентифицировать по наличию характерных фрагментов, таких как гексоза$^+$ (163 Да) или N-ацетилгексозамин$^+$ (204 Да). Пептиды, содержащие фосфосерин и фосфотреонин, можно идентифицировать с помощью так называемого анализа **нейтральных потерь** (neutral loss scanning), при котором в результате β-элиминирования молекулы H_3PO_4 пептиды становятся легче на 98 Да (рис. 9.25).

9.6 АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Методы масс-спектрометрии часто используются для выяснения того, с какими белками взаимодействует тот или иной изучаемый белок. Взаимодействующие между собой белки можно выделить целым рядом способов, в том числе методами иммунопреципитации меченых белков после трансфекции клеток, аффинной хроматографии и поверхностного плазмонного резонанса. Поверхностный плазмонный резонанс (разд. 16.3.2) широко применяется для изучения взаимодействий биологических молекул; при изучении взаимодействий белков с лигандами и белок-белковых взаимодействий теперь возможен прямой анализ образцов, связанных с чипами Biacore, методом MALDI-TOF (этот метод также пригоден для анализа кинетики взаимодействий; разд. 16.3.2). Кроме того, возможен прямой анализ белковых комплексов методами МС. Метод ESI-TOF позволил точно определить молекулярные массы крупных биополимеров, таких как белки с массой >400 кДа, а также вирусных частиц размером $40 \cdot 10^6$ Да (40 МДа). Гибридный масс-спектрометр ESI-TOF позволил провести анализ икосаэдрического вируса с массой $6{,}5 \cdot 10^6$ Да, в котором однонитевая РНК заключена в гомогенную белковую оболочку, а также палочковидного РНК-вируса с массой $40{,}5 \cdot 10^6$ Да.

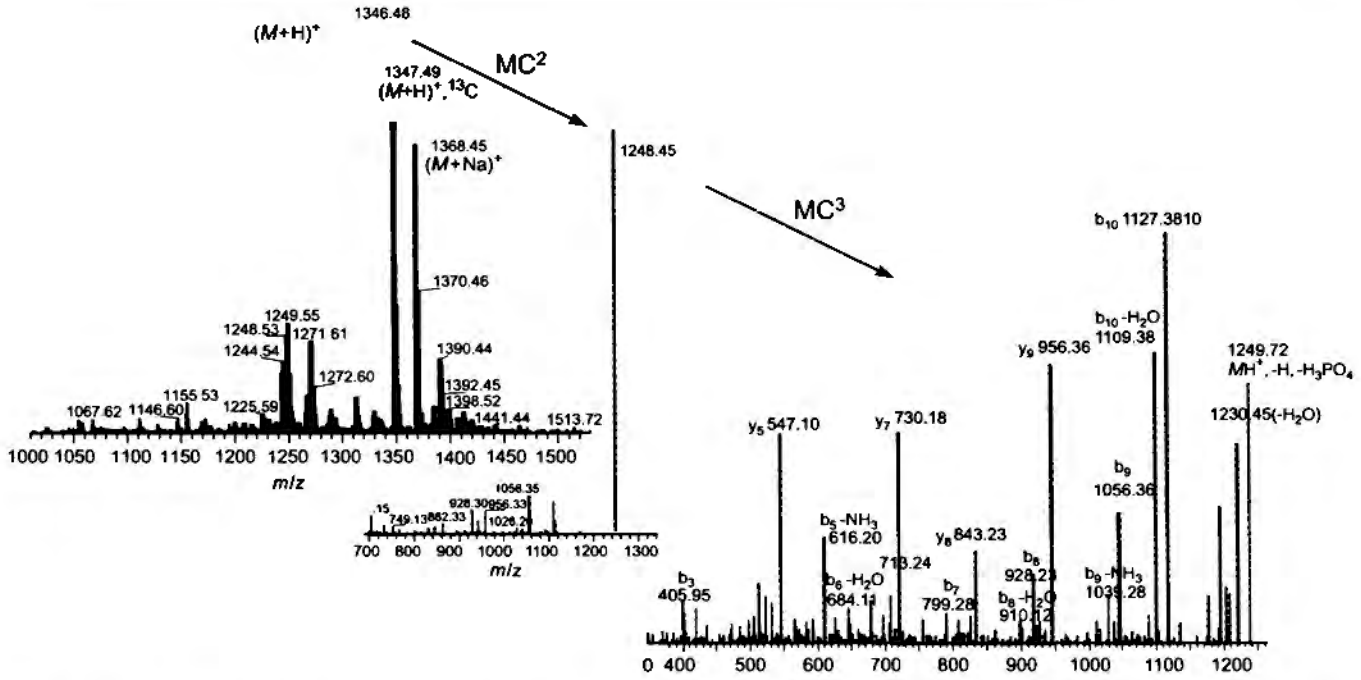


Рис. 9.25. Идентификация фосфопептидов методом масс-спектрометрии. Последовательность представляет собой YEILNS^{P}EKAC, где S^{P} — фосфосерин. Представлены спектры MC^2 и MC^3. Первый эксперимент тандемной MC приводит главным образом к потере H_3PO_4 (98 Да). Некоторые проблемы могут возникать при ионизации фосфопептидов методом электроспрея, при котором регулярно обнаруживается большое количество продуктов присоединения Na^+ и K^+

9.6.1 Подготовка образца

Определению масс методами электроспрея и MALDI-TOF мешает присутствие определенных солей, буферов и детергентов. Серьезной проблемой может стать загрязнение кератином из кожи и волос, особенно если речь идет о работе с гелями или срезами; поэтому в процессе выполнения эксперимента необходимо носить перчатки и лабораторный халат. Работать следует на чистой поверхности, если возможно, в боксе с воздушным фильтром и использовать специально предназначенные для данной работы чистые полипропиленовые центрифужные микропробирки, предварительно проверив, что они не выделяют полимеров, смазывающих веществ, пластификаторов и др. Снизить в образце содержание солей, ЭДТА, ДМСО, неионных и ионных детергентов (например, SDS) и т.д. можно путем разбавления, промывки, капельного диализа или с помощью ионообменных смол. Если анализ ведется методом MALDI-TOF, удалить буфер и соль можно путем промывки образцов прямо на подложке. Для очистки образца, кроме того, можно провести хроматографическое разделение в носике пипетки (разд. 11.2.5). Речь идет о миниатюрной колонке с фазой C18 для обращенно-фазовой хроматографии в наконечнике объемом 10 нм^3. Не содержащий органического растворителя образец помещают в наконечник, несколько раз поднимая и опуская поршень пипетки для полного связывания образца. Большинство указанных выше примесей не связывается с носителем, а связавшийся образец смывают с колонки буфером с высоким содержанием органического растворителя (чаще всего используют 50–70%-й ацетонитрил). Этот метод особенно хорош для очистки образцов

после расщепления в геле белковых полос, разделенных в SDS-ПААГ. При этой процедуре удаляется также краситель Кумасси бриллиантовый синий. Данный подход можно использовать для концентрирования образцов и фракционирования смесей. При специфическом связывании одного из компонентов смеси можно таким образом осуществить его очистку. Для обогащения образцов фосфопептидов используют аффинные колонки с иммобилизованными ионами металлов.

9.6.2 Количественный анализ сложных белковых смесей

Анализ протеома (разд. 8.5) подразумевает осуществление следующих шагов:

- проведение одномерного (1D) или двумерного (2D) электрофореза в геле;
- окрашивание геля;
- сканирование с целью выявления интересующих полос (пятен);
- вырезание полос (пятен) из геля;
- экстракция и расщепление белков;
- анализ масс образовавшихся пептидов;
- поиск по базам данных.

Для разделения белков часто используют электрофорез в геле, который имеет ряд ограничений, в том числе трудности одновременного анализа абсолютно всех белков, что связано с большой разницей в уровнях экспрессии. Тысячи белков из 1 мг ткани или биологической жидкости можно воспроизводимо разделить на одном двумерном геле, однако диапазон экспрессии белков может составлять девять порядков! До некоторой степени проблему количественной оценки экспрессии белков можно решить с помощью **кодированной изотопом аффинной метки** (ICAT). Тяжелую и легкую формы сульфгидрильных (тиол-)-специфических реагентов ICAT (см. структуру на рис. 9.26) используют для связывания с белками из клеток или тканей в различных состояниях. Два образца объединяют и подвергают протеолизу, обычно под действием трипсина. Меченые пептиды выделяют методом аффинной хроматографии, используя биотиновую группу реагента ICAT, а затем анализируют масс-спектрометрическим методом либо в варианте ЖХ-МС-МС (включая ионную ловушку), либо MALDI-TOF. Относительная интенсивность ионов из двух меченных изотопами форм каждого специфического пептида коррелирует с их относительным содержанием. Эти пары пептидов легко идентифицировать, поскольку они одновременно сходят с колонки при проведении микрокапиллярной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (RP-μLC) и различаются на восемь единиц массы (на столько различаются две формы реагента ICAT). Первичное сканирование позволяет идентифицировать пептиды из белков с различной экспрессией путем измерения относительных интенсивностей сигнала в каждой паре меченых пептидов. Затем выбирают пептиды для секвенирования методом тандемной МС, а идентификацию белка, из которого они образованы, осуществляют с помощью баз данных.

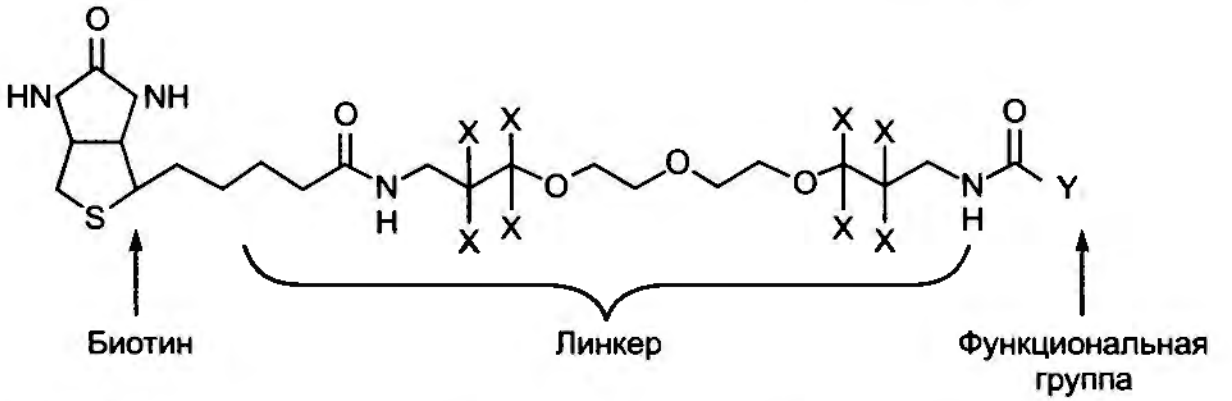


Рис. 9.26. Структура ICAT-реагента. Реагент существует в двух формах: тяжелой (8 атомов дейтерия) и легкой (без дейтерия). Он построен из трех частей — аффинной метки (биотин) для выделения пептидов, меченных ICAT, линкера в одной из двух форм, в состав которого входят стабильные изотопы, и реакционной группы (Y), специфичной по отношению к тиогруппам (или другим **функциональным группам** белков, таким как SH, NH_2, COOH) (остатки цистеина). Тяжелую форму обозначают D8-ICAT (тогда X — это дейтерий), а легкую — D0-ICAT (тогда X — водород). Две белковые смеси, соответствующие двум состояниям клеток или тканей обрабатывают тяжелой и легкой формой реагента ICAT. Реагент ковалентно связывается с каждым остатком цистеина во всех белках. Белковые смеси объединяют и подвергают протеолизу, а затем меченные ICAT пептиды выделяют на колонке с авидином. Пептиды разделяют с помощью микроколоночной ВЭЖХ. В каждой паре меченые пептиды идентичны по химическим свойствам, но их легко обнаружить, так как они сходят с колонки друг за другом с разницей по массе 8 Да. Исходное соотношение белков в двух клеточных состояниях строго сохраняется и в пептидных фрагментах. Определение содержания белков осуществляют относительно содержания пептидов в парах. Белок идентифицируют с помощью баз данных, используя аминокислотные последовательности пептидов с разным уровнем экспрессии в анализируемых образцах; аминокислотные последовательности определяют методом тандемной МС

Данная методология позволяет идентифицировать белок всего лишь по одному пептидному фрагменту. Это особенно важно для белков, находящихся в смеси с другими белками. Для идентификации необходимо знать массу (или m/z) интактного пептида и массы некоторого количества ионов фрагментов. Пример идентификации белка схематично представлен на рис. 9.27.

Рис. 9.27. Пример идентификации белка по фрагменту последовательности. В данном примере поиск основан на значении масс исходного пептида (m) и пяти фрагментов. Этих данных достаточно, чтобы расположить три аминокислотных остатка относительно N- и C-концов пептида между массами m_1 и m_3

9.7 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ. АНАЛИЗ БАЗ ДАННЫХ

9.7.1 Базы данных органических соединений

Существуют базы данных масс-спектров органических соединений, с помощью которых можно идентифицировать соединения в составе анализируемого образца. Содержащиеся в базах данных спектры получены путем ионизации электронным ударом.

Назовем две такие базы данных.

- **Integrated Spectral Data Base System for Organic Compounds** (SDBS) из NIMC — Национального института промышленных наук и технологий. Поиск данных о конкретном веществе осуществляют на основании его названия, формулы, числа атомов (CHNO) в молекуле и молекулярной массы. База данных содержит 19 000 масс-спектров, полученных путем ионизации электронным ударом, 47 000 спектров FT-IR, 11 500 ^{1}H-ЯМР спектров и 10 200 ^{13}C-ЯМР спектров. Найти эту базу данных можно на сайте http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/menu-e.html.
- **NIST Chemistry WebBook.** NIST — это Национальный институт стандартов и технологий. Данные о конкретном веществе в этой базе данных ищут на основании его названия, химической формулы, регистрационного номера в Chemical Abstracts Service, значений молекулярной массы, а также спектральных или энергетических характеристик выбранных ионов. На данном сайте содержатся масс-спектры свыше 15 000 соединений, термохимические данные для 7000 органических и небольших неорганических соединений, а также ИК-спектры более 16 000 соединений. Найти базу данных можно на сайте http:/webbook.nist.gov./chemistry/.

9.7.2 Идентификация белков

Поиск по базам данных для идентификации белка, который анализировали методами МС, это очень важный этап работы. В данном разделе представлен обзор интернет-сайтов, к которым можно обратиться для идентификации белков.

Существует множество сайтов, с помощью которых можно осуществить идентификацию белка, например «Mascot» из Matrix Science (http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html) или «Protein prospector» (http://128.40.158.151/mshome3.4.htm). Поиск можно ускорить, если ограничиться определенным видом или родом организмов, например искать только среди белков млекопитающих. Однако при поиске гомологичных последовательностей этого делать не следует. Если в белке модифицированы остатки цистеина, это следует указать, иначе сократится число пептидов, совпадающих с теоретически предсказанными пептидами, что ухудшит результаты поиска. Если модификацию остатков цистеина не производили, а белок выделен из геля, многие из этих остатков подверглись модификации акриламидом. Для несогласующихся значений масс следует провести поиск повторно, поскольку иногда два или несколько белков движутся в геле вместе. Обратите внимание на **разность p.p.m.** (разность

между теоретическим и экспериментальным значениями массы определенного белка), которая должна быть низкой и постоянной. Этот параметр говорит об истинности результатов. Если в эксперименте использовалась внутренняя калибровка, параметр точности определения массы может быть установлен на уровне 20 p.p.m. В случае внешней калибровки этот параметр должен быть на уровне 50 p.p.m. Если первичный поиск не дал результата, это значение можно увеличить.

Существуют большие базы данных (**NCBInr**) и более мелкие (**Swiss Prot**). Тем не менее база данных Swiss Prot обеспечивает больше информации. Если известно, что белок имеет молекулярную массу, скажем, не более100 кДа, следует сократить **диапазон масс** для поиска. Однако следует учесть возможность образования фрагментов или субъединиц данного белка. Для образца, который анализировали в двумерном геле, известно значение изоэлектрической точки, хотя к этим данным следует относиться с определенной долей осторожности. Если после расщепления белка наблюдается ряд пептидов более крупного размера, следует увеличить параметр **пропущенных сайтов расщепления**. Обычно он равен 1 или 2. Если ничего не известно о возможности посттрансляционной или другой модификации белка, следует выбрать три верхние опции, а именно, ацетилирование N-конца, окисление Met и превращение Glu в пиро-Glu. Если безосновательно выбрать опцию фосфорилирования S, T или Y, это может привести к неправильному результату. В данной графе обычно можно указать более одной аминокислоты (например, «STY 80» указывает на полное фосфорилирование). По возможности, массы пептидов следует указывать с точностью до четырех знаков после запятой. В начале поиска используйте массы, соответствующие сигналам с наибольшей интенсивностью, и установите низкое значение параметра **минимального числа пептидов** по сравнению с числом масс в списке пептидов. Для повышения специфичности поиска это число можно увеличить. При отрицательном результате поиска это число можно снизить. Не забудьте правильно указать, были ли значения масс родительских ионов и ионов фрагментов рассчитаны на основе моноизотопных или усредненных масс.

Существуют программы, позволяющие удалить из спектра пики, появляющиеся в результате присутствия изотопа углерода ^{13}C (так называемый deisotoping). Это облегчает расшифровку спектра, но что еще более важно, позволяет проверить правильность выбранного алгоритма поиска и найти действительно различные пептиды, отличающиеся по массе на 1 Да. Это особенно важно при анализе белковых смесей, поскольку позволяет правильно идентифицировать перекрывающиеся кластеры изотопов и выделить лишь те пики, которые соответствуют ^{12}C. Если разрешение спектра недостаточно для выделения пиков, соответствующих разным изотопам, рассчитывают среднее значение массы. Это часто происходит при анализе крупных белков и полипептидов (см. рис. 9.14), хотя современные приборы позволяют различить пептиды, содержащие только атомы ^{12}C, один атом ^{13}C, два атома ^{13}C и т.д. (см. рис. 9.13).

Существуют различные пакеты программ (в том числе такие коммерческие пакеты программ, как SEQUEST), позволяющие использовать информацию об ионах фрагментов, полученную методом тандемной МС, для

поиска в базах данных с целью идентификации последовательности и того белка, которому она принадлежит. Как только белок идентифицирован, можно прочесть всю имеющуюся о нем информацию, а также найти ссылки на базы данных о структуре белков, базу данных нуклеиновых кислот, Swiss 2D PAGE и т. д.

9.8 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

AEBERSOLD, R. and MANN, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **422**, 198–207. В этом выпуске журнала между с. 193 и 225 содержатся и другие, очень полезные обзоры по протеомике.

HERNANDEZ, H. and ROBINSON, C.V. (2001) Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 46685–46688.

LARSEN, M.R., SØRENSEN, G.L., FEY, S.J., LARSEN, P.M., and PROEPSTORFF, P. (2001) Phospho-proteomics: evaluation of the use of enzymatic dephosphorylation and differential mass spectrometric peptide mass mapping for site specific phosphorylation assignment in proteins separated by gel electrophoresis. *Proteomics*, **1**, 223–238. Обзор методов идентификации важного и часто встречающегося типа посттрансляционной модификации.

MOSELEY, M.A. (2001) Current trends in differential expression proteomics: isotopically coded tags. *Trends in Biotechnology*, 19 (suppl.) 10–16. О применении кодированной изотопом аффинной метки, позволяющей на количественном уровне анализировать различия в экспрессии белков в клетках и тканях, находящихся в различном состоянии, например в норме и при болезни.

NELSON, R.W., NEDELKOV, D., and TABBS, K.A. (2000) Biosensor chip mass spectrometry: a chip-based proteomics approach. *Electrophoresis*, **21**, 1155–1163. Обзор масс-спектрометрических методов анализа белковых взаимодействий для детальной характеристики белков и белок-белковых взаимодействий, а также обзор развития биосенсорных масс-спектрометрических методов как нового подхода в протеомике.

SIMPSON, R.J. (2003) *Proteins and Proteomics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Этот выпуск содержит множество полезной информации о масс-спектрометрическом анализе белков.

Интернет-сайты

Сервер ExPASy (Expert Protein Analysis System) Швейцарского института биоинформатики (SIB) содержит большой набор программ для анализа белковых последовательностей, структуры белка и протеомов, а также для анализа 2D-гелей (документация 2D-гелей и анализ 2D изображений). Найти программы ExPASy можно на сайтах http://www.expasy.ch и http://us.expasy.org/tools/. Программы Glycomod и GlycanMass находятся соответственно на сайтах http://us.expasy.org/tools/glycomod/ и http://us/expasy.org/tools/glycomod/glycanmass.html.

Кроме того, существует база данных посттрансляционных модификаций в белках Deltamass, найти которую можно на сайте http://www/abrf.org/index.cfm/dm.home. С помощью этой базы данных можно определить наличие посттрансляционных модификаций в анализируемом белке и найти необходимые ссылки.

Предсказательная программа «findmod» поможет обнаружить потенциально возможные посттрансляционные модификации (http://expasy.org/tools/findmod/).

Необходимую информацию о подготовке образцов и соответствующие протоколы можно найти на сайтах www.millipore.com/ziptip и http://www.nestgrp.com/protocols/protocols.shtml#massspec.

Реактивы и материалы, используемые при детектировании и обогащении фосфорилированных пептидов и белков, можно найти на сайтах http://www/piercenet.com/files/phosphor.pdf и http://www/piercenet.com/.

Глава 10
Методы электрофореза

10.1 ОСНОВЫ МЕТОДА

Метод электрофореза основан на миграции заряженной частицы под действием электрического поля. Многие важные биологические молекулы, такие как аминокислоты, пептиды, белки, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, обладают ионизируемыми группами и поэтому при любом pH существуют в растворе как электрически заряженные частицы: либо в виде катионов (+), либо в виде анионов (–). Под влиянием электрического поля эти заряженные частицы будут мигрировать либо к катоду, либо к аноду в зависимости от своего результирующего заряда.

Оборудование, необходимое для электрофореза, состоит из двух основных блоков: блока питания и электрофорезной камеры. В распоряжении имеются электрофорезные камеры для вертикального или горизонтального слоя геля. Существуют камеры для электрофореза в вертикальном слое геля, и они обычно используются для разделения белков в акриламидных гелях (разд. 10.2). Гель образуется между двумя стеклянными пластинами, зажатыми вместе, но разделенными пластиковыми прокладками. Наиболее часто используются камеры с мини-гелями (рис. 10.1). Размеры геля обычно составляют в ширину 8,5 см и в высоту 5 см, а толщина геля может составлять 0,5–1 мм. Пластиковую гребенку помещают в раствор геля и удаляют после его полимеризации, в результате образуются до 10 лунок для нанесения образцов. При сборке аппарата в буфер нижнего резервуара электрофорезной камеры погружают пластину с нанесенным гелем, где она до некоторой степени охлаждается. Типичная система с горизонтальным гелем показана на рис. 10.2. Гель заливают на стеклянную или пластиковую пластину, которая снабжена системой охлаждения (через щель внутри пластины протекает холодная вода, отводя выделяемое тепло). Соединение между гелем и электрофорезным буфером осуществляется через тонкий тампон смоченной фильтровальной бумаги (рис. 10.2); следует отметить, однако, что электрофорез ДНК происходит в агарозном геле, погруженном в буфер; (см. разд. 10.4.1). Блок питания обеспечивает постоянный ток между электродами в электрофорезной камере. Все типы электрофореза выполняются в подходящем буфере,

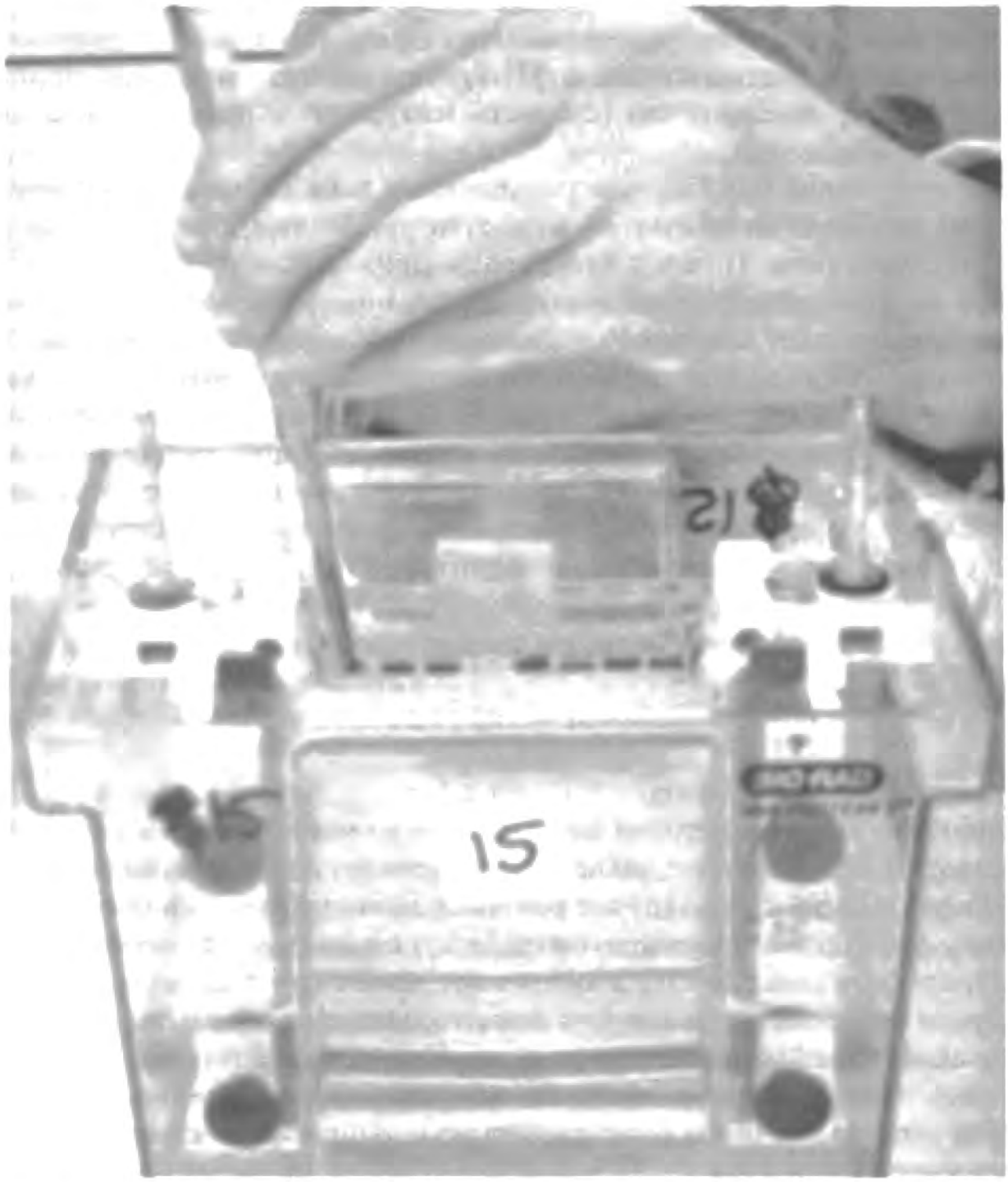


Рис. 10.1. Нанесение образцов в лунки минигеля SDS-ПААГ. Шесть лунок, в которых находятся образцы, можно увидеть благодаря синей окраске (бромфенол синий), входящей в состав буфера

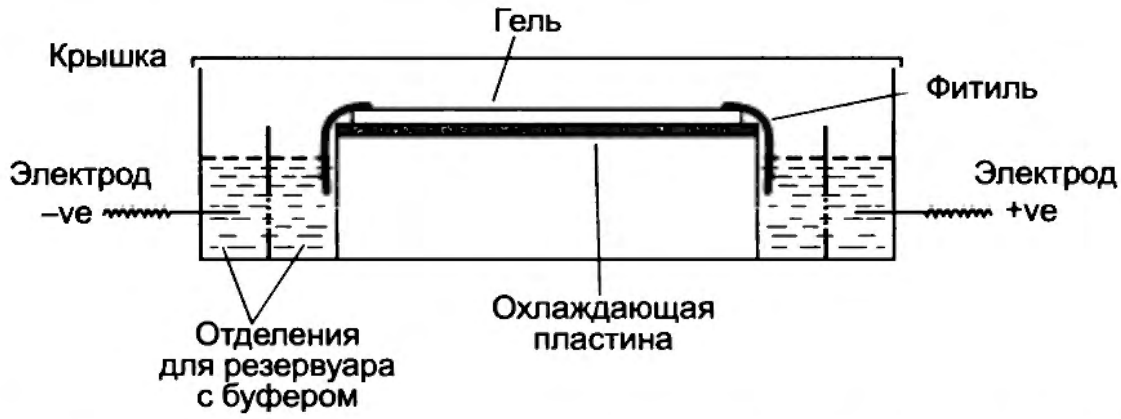


Рис. 10.2. Типичный горизонтальный аппарат для иммуноэлектрофореза, изоэлектрического фокусирования и электрофореза ДНК и РНК в агарозных гелях

который необходим для поддержания разделяемых молекул в состоянии ионизации. Любые изменения в pH будут изменять итоговый заряд и, следовательно, подвижность (скорость миграции в приложенном поле) разделяемых молекул.

Для того чтобы понять, как разделяются заряженные биологические частицы, необходимо рассмотреть простые уравнения, описывающие процесс электрофореза. Когда к электродам прикладывают разность потенциалов (напряжение), создается градиент потенциала E — отношение приложенного напряжения V и расстояния d между электродами. При действии этого градиента потенциала напряжения на молекулу, обладающую зарядом q (Кл), возникает сила Eq (Н). Эта сила направляет заряженную молекулу к электроду. Однако возникает также сопротивление — сила трения, что задерживает движение молекулы. Сила трения имеет гидродинамическую природу и зависит от размера и формы молекулы, размера пор среды, в которой происходит электрофорез, и вязкости буфера. Следовательно, скорость движения (υ) заряженной молекулы в электрическом поле определяется уравнением:

$$\upsilon = \frac{Eq}{f} \tag{10.1}$$

где f — коэффициент трения.

Чаще используется термин *электрофоретической подвижности* иона (μ), которая представляет собой отношение скорости движения иона к силе поля (υ/E). Когда подается разность потенциалов, молекулы с различным суммарным зарядом начинают разделяться в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Молекулы с одинаковым зарядом будут разделяться, если они имеют разные размеры, поскольку на них воздействует разная сила трения. Как показано ниже, некоторые варианты электрофореза основаны на различии в зарядах молекул, а другие — на различии в размере молекул — поэтому там важную роль играет трение.

Если отключить электрическое поле до того, как все молекулы достигнут электродов, компоненты образца будут разделены согласно их электрофоретической подвижности. Таким образом, электрофорез — это не до конца проведенный электролиз. Локализацию разделенных компонентов затем определяют путем окрашивания в подходящем красителе или с помощью авторадиографии (разд. 14.2.3), если образцы несут радиоактивную метку.

Ток в растворе между двумя электродами проводится в основном ионами буфера и лишь в небольшой степени — ионами образца. Закон Ома описывает связь между силой тока (I), напряжением (V) и сопротивлением (R):

$$\frac{V}{I} = R \tag{10.2}$$

Следовательно, возможно ускорить электрофоретическое разделение, увеличивая приложенное напряжение, что приводит к соответствующему усилению тока. Расстояние, проходимое ионами, пропорционально силе тока и

времени разделения. Однако при этом мы не учитываем одной из главных проблем, возникающих в большинстве вариантов электрофореза, а именно выделение тепла.

Во время электрофореза мощность (W, ватт), производимая в среде, выражается формулой:

$$W = I^2R \tag{10.3}$$

Большая часть этой генерируемой мощности рассеивается в виде тепла. Нагревание среды, в которой проводится электрофорез, имеет последствия, а именно

- повышение скорости диффузии ионов образца и буфера, приводящее к уширению зон разделяемых образцов;
- образование конвекционных токов, приводящее к перемешиванию разделенных образцов;
- термическое разрушение образцов, которые довольно часто чувствительны к нагреванию. Это может вызывать денатурацию белков (и потерю ферментативной активности);
- уменьшение вязкости буфера со снижением сопротивления среды.

При постоянном напряжении ток в процессе электрофореза растет из-за уменьшения сопротивления (см. закон Ома, уравнение 10.2), что усиливает нагревание. По этой причине часто используют стабилизированный источник питания, который обеспечивает постоянную мощность и, таким образом, препятствует дополнительному нагреванию электрофорезной камеры.

Однако постоянное выделение тепла неблагоприятно сказывается на ходе разделения. Можно предположить, что решить проблему помогло бы проведение электрофореза при очень малой мощности (слабом токе), чтобы предотвратить нагревание, однако это может привести к плохому разделению из-за усиления диффузии вследствие длительного времени разделения. Поэтому должны быть найдены компромиссные условия между допустимой мощностью и приемлимым временем разделения, а также подходящая система охлаждения для устранения высвобождаемого тепла. Несмотря на то что такие системы работают довольно хорошо, эффект нагревания не всегда полностью устраняется. Например, при электрофорезе в цилиндрических трубках или в слое геля тепло производится в среде равномерно (во всем объеме электрофоретической системы), но удаляется только на границах, приводя к температурному градиенту внутри геля, при котором температура в центре геля выше, чем на его границах. Поскольку более теплая среда в центре является менее вязкой, электрофоретическая подвижность выше в центре (она увеличивается примерно на 2% с повышением температуры на 1°C), и зоны миграции имеют искривленную форму: миграция быстрее в центре, чем на границах.

Последним фактором, который может влиять на электрофоретическое разделение, является феномен **электроэндоосмоса** (также известный как **электроосмотический поток**), который имеет место

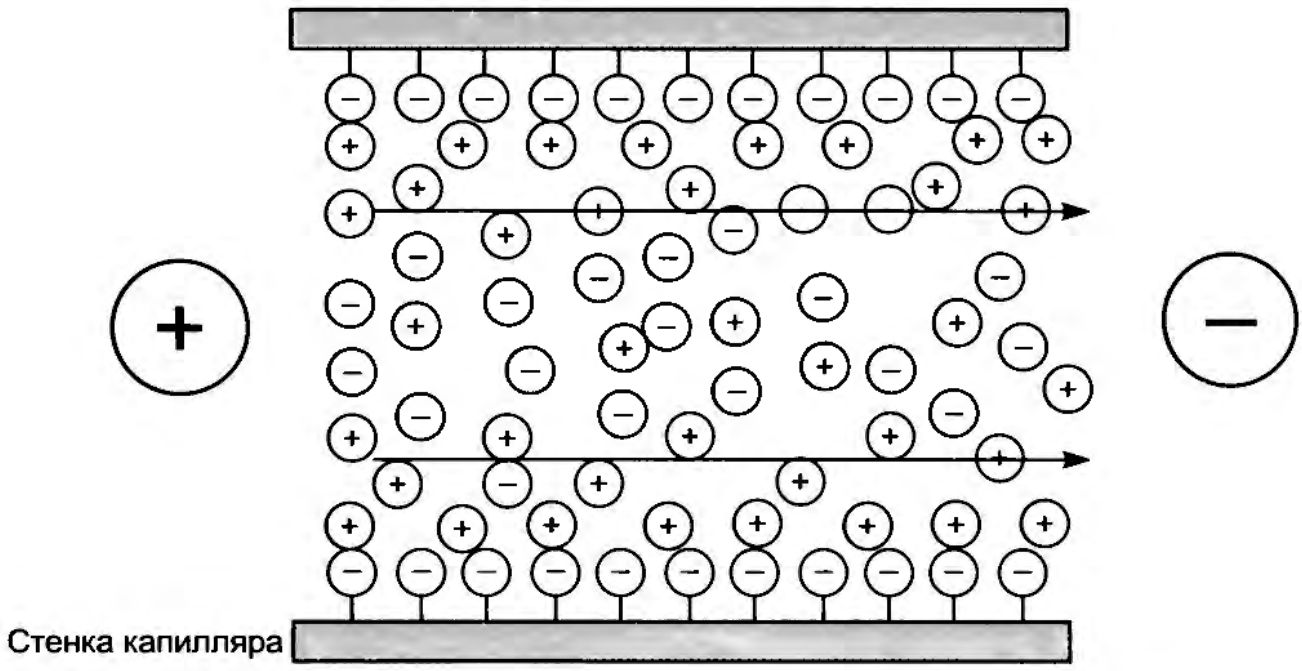


Рис. 10.3. Электроосмотический поток в стеклянном капилляре. Катионы электролита притягиваются к стенкам капилляра, образуя двойной электрический слой. При подаче напряжения возникает движение раствора электролита по направлению к катоду, называемое электроэндоосмотическим потоком

из-за присутствия заряженных групп на поверхности матрицы. Например, целлюлоза — материал бумаги — содержит несколько карбоксильных групп, агароза (в зависимости от степени чистоты) — сульфатные группы, а поверхность стеклянных стенок в капиллярном электрофорезе (разд. 10.5) — силанольные группы (Si-OH). Рисунок 10.3 демонстрирует, как происходит электроэндоосмос в капиллярной трубке — один и тот же принцип для любой матрицы, имеющей на поверхности заряженные группы. В капиллярной трубке из плавленого кварца при pH > 3 силанольные группы на стенке кварцевого капилляра ионизированы и образуют отрицательно заряженные участки. Именно эти заряды обусловливают электроэндоосмос. Ионизированные силанольные группы создают двойной электрический слой (область разделения зарядов) между стенкой капилляра и слоем электролита. Когда прилагается напряжение, катионы в электролите вблизи стенки капилляра мигрируют к катоду, захватывая раствор электролита. Это создает электроосмотический поток в направлении к катоду.

10.2 МАТРИЦА

Новаторская работа в области электрофореза, выполненная Тизелиусом с сотрудниками, проводилась в свободном растворе. Однако вскоре стало

понятно, что многие проблемы, связанные с этим подходом, в частности неблагоприятное воздействие диффузии и конвекционных потоков, могут быть сведены к минимуму при стабилизации среды. Это было достигнуто путем проведения электрофореза в пористом носителе, смоченном в электрофорезном буфере, в котором возможен электрофорез ионов буфера и образца. Твердая подложка позволяет снизить конвекционные потоки и диффузию так, что разделяемые компоненты остаются в виде четких зон. Первые носители представляли собой фильтровальную бумагу или полоски ацетата целлюлозы, смоченные в электрофорезном буфере. В настоящее время такие носители используются редко, хотя ацетат целлюлозы все еще находит применение (см. разд. 10.3.6). В частности, в течение многих лет небольшие молекулы, такие как аминокислоты, пептиды и углеводы, разделяли и анализировали с помощью электрофореза на бумаге или тонких пластинах целлюлозы, кварца или алюминия. Хотя этот метод до сих пор иногда применяется, такие молекулы теперь анализируют более современным и чувствительным методом, таким как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) (разд. 11.3.2). В то время как бумага или тонкослойные носители вполне подходят для разделения малых молекул, разделение макромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты, на этих носителях дает плохие результаты.

Использование гелей в качестве разделяющей среды привело к быстрому развитию методов анализа макромолекул. На ранних этапах развития метода использовали крахмальный гель, и, хотя он все еще находит применение, в большинстве методов электрофореза сегодня работаю либо на агарозных, либо на полиакриламидных гелях.

10.2.1 Агарозные гели

Агароза представляет собой линейный полисахарид (M_r ~ 12000), образованный из повторяющихся единиц агаробиозы, состоящей из чередующихся остатков галактозы и 3,6-ангидрогалактозы (рис. 10.4). Агароза является одним из компонентов агара — смеси полисахаридов, выделенных из морских водорослей. Агароза обычно присутствует в агаре в концентрации 1–3%. Раствор агарозы получают путем кипячения сухой агарозы в водном буфере до образования прозрачного раствора. При охлаждении до комнатной температуры образуется твердый гель. Образование геля объясняется наличием внутри- и межмолекулярных водородных связей между длинными агарозными цепями. Такая структура с поперечными связями сообщает гелю хорошие антиконвекционные свойства. Размер пор в геле зависит от исходной концентрации агарозы; большие поры образуются при низких концентрациях агарозы, а малые — при высоких концентрациях. Агароза в основном не несет зарядов, но может происходить замещение остатков сахаров на карбоксильные, метоксильные, пируватные и чаще сульфатные группы. Это замещение может приводить к электроэндоосмосу и ионным взаимодействиям между гелем и образцом, что оказывает

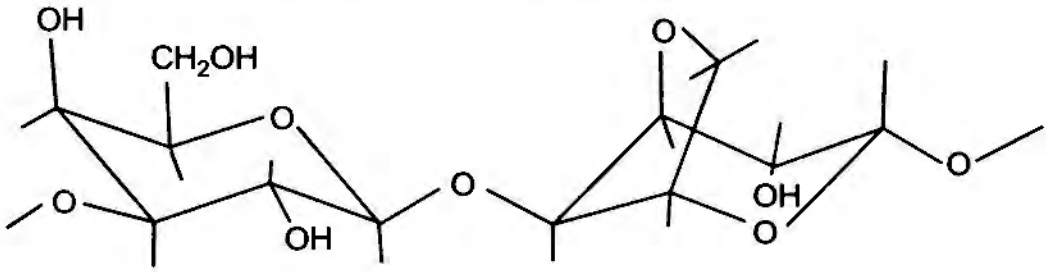


Рис. 10.4. Агаробиоза — повторяющаяся единица агарозы

нежелательный эффект. Поэтому для продажной агарозы указана степень очистки в зависимости от концентрации сульфата — чем ниже концентрация сульфата, тем выше степень чистоты.

Агарозные гели используют для электрофореза белков и нуклеиновых кислот. Размеры пор 1%-й агарозы сравнимы с размерами молекул белков. Поэтому агарозные гели применяются в таких методах, как иммуноэлектрофорез (разд. 7.4.1) или плоскостное изоэлектрическое фокусирование (разд. 10.3.4), когда движение белковых молекул в геле обусловлено их зарядом. Гели с большими порами используются для разделения совсем крупных молекул, таких как ДНК и РНК: большой размер позволяет молекулам ДНК и РНК проходить через гель. Однако, так как размеры пор и размеры молекул сопоставимы, при разделении таких молекул начинает играть роль вязкость среды (разд. 10.4). Следующим преимуществом использования агарозных гелей является возможность использовать агарозу с низкой температурой плавления (62–65 °С). Как видно из названия, такие гели можно расплавить при нагревании до 65 °С, и образцы ДНК, разделенные в таком геле, можно вырезать, перевести в раствор и выделить из него.

Из-за малой упругости агарозных гелей и связанных с этим проблем, возникающих при извлечении геля из небольших трубок, электрофорез в столбиках геля, который иногда осуществляют с полиакриламидными гелями, не проводят в агарозе. Для изоэлектрического фокусирования и иммуноэлектрофореза используют горизонтальные пластины геля. Они также обычно применяются для разделения ДНК и РНК (разд. 10.4), хотя в некоторых лабораториях пользуются вертикальными системами.

10.2.2 Полиакриламидные гели

Электрофорез в *поли*а*крил*а*мид*ном *г*еле сокращенно называют ПААГ-электрофорезом.

Полиакриламидные гели с поперечными связями образуются при полимеризации акриламида в присутствии небольшого количества N,N'-метиленбисакриламида (обычно называемого просто «бисакриламидом») (рис. 10.5). В бисакриламиде две акриламидные молекулы соединены метиленовой группой; он используется как сшивающий агент.

Мономер акриламида полимеризуется в длинные цепи по типу «голова к хвосту», и время от времени в растущую цепь встраивается молекула бисакриламида, внося второй участок для наращивания цепи. Образуется поперечная сетка (матрикс) довольно регулярной структуры (рис. 10.5). Полимеризация акриламида — пример свободно-радикального катализа и инициируется добавлением персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметилендиамина (ТЕМЕД). ТЕМЕД катализирует разложение иона персульфата, образуя свободный радикал (т. е. частицу с неспаренным электроном):

$$S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{-\bullet}$$

Если свободный радикал обозначить через $R^\bullet$
(где точка обозначает неспаренный электрон), а молекулу мономерного акриламида — через M, тогда реакцию полимеризации можно схематически представить следующим образом:

$$R^\bullet + M \rightarrow RM^\bullet$$

$$RM^\bullet + M \rightarrow RMM^\bullet$$

$$RMM^\bullet + M \rightarrow RMMM^\bullet \text{ и т. д.}$$

Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью благодаря присутствию неспаренного электрона, которому «хочется» спариться с другим электроном, чтобы стабилизировать молекулу. Поэтому

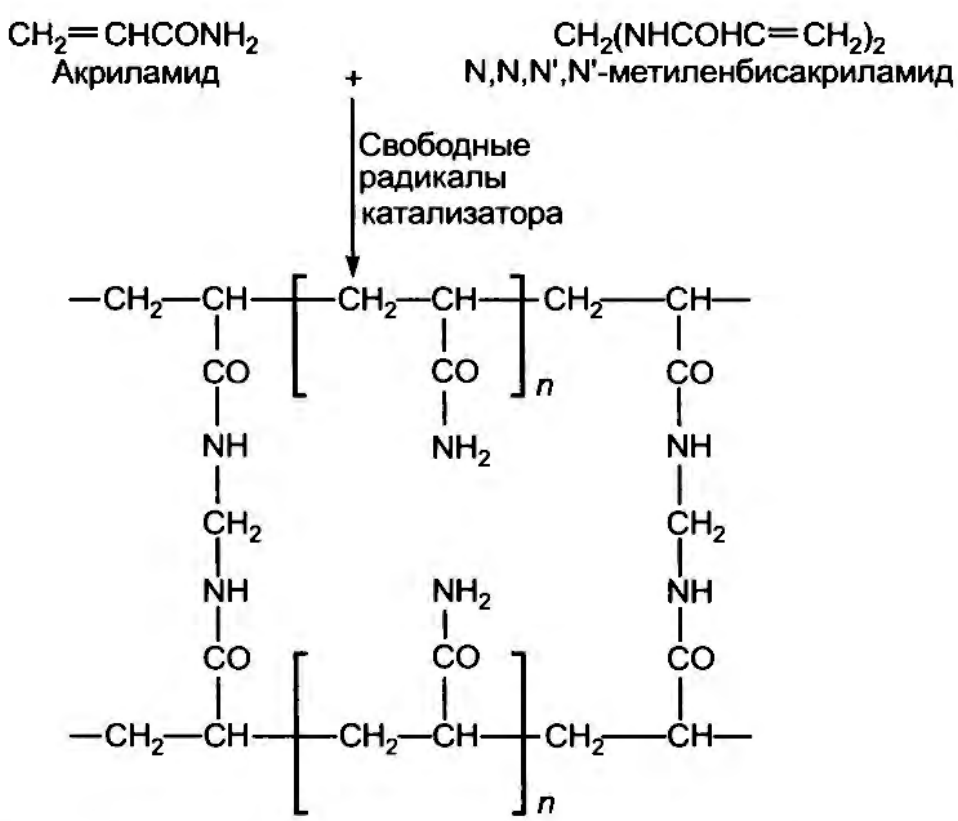


Рис. 10.5. Образование полиакриламидного геля из акриламида и бисакриламида

$R^{\bullet}$ реагирует с М, образуя одинарную связь, объединяя свой неспаренный электрон с другим электроном из внешней оболочки молекулы мономера. В результате образуется новый свободный радикал $R–M^{\bullet}$ — в такой же степени активная частица, способная атаковать следующий мономер. Так образуются длинные цепи акриламида с поперечными связями из-за случайного встраивания в растущую цепь молекул бисакриламида. Кислород уничтожает свободные радикалы, и поэтому раствор геля обычно дегазируют (еще до использования раствор геля помещают на короткое время в вакуум для удаления растворенного воздуха). Дегазирование раствора геля служит и другой цели. Полимеризация акриламида — экзотермическая реакция (т. е. протекает с выделением тепла), и нагревание геля при его отвердевании может сопровождаться высвобождением пузырьков воздуха, которые остаются включенными в полимеризующийся гель. Дегазирование предотвращает это.

Фотополимеризация представляет собой альтернативный метод полимеризации акриламидного геля. Персульфат аммония и ТЕМЕД заменяют рибофлавином, а залитый гель помещают на яркий свет на 2–3 ч. Фоторазложение рибофлавина происходит с образованием свободных радикалов, инициирующих полимеризацию.

Акриламидные гели характеризуют, указывая долю акриламида; размер пор в геле может варьировать в результате изменения концентрации как акриламида, так и бисакриламида. Акриламидный гель готовят с содержанием акриламида от 3% до 30%. Таким образом, гель с низким содержанием акриламида (4%) имеет поры большого размера и используется, например, для электрофореза белков, когда требуется свободное движение белков, например для изоэлектрофокусирования (разд. 10.3.4) или в концентрирующем полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS, *s*odium *d*odecyl *s*ulfate) (разд. 10.3.1). Низкопроцентные акриламидные гели также используются для разделения ДНК (разд. 10.4). Гели с содержанием акриламида 10–20% применяют в таких методах, как гель-элекрофорез с SDS, где поры малого размера выполняют роль сита, пропуская молекулы небольших белков (разд. 10.3.1).

Первоначально белки разделяли в полиакриламидных гелях, которые полимеризовались в стеклянных трубках диаметром ~7 мм и длиной 10 см. С такими трубками было легко работать, и для проведения электрофореза не требовалось специального оборудования. Однако на трубку можно было наносить только один образец, и, поскольку условия разделения могли варьировать от трубки к трубке, сравнивать различные образцы между собой было трудно. Вертикальные пластинки геля позволили за один эксперимент в идентичных условиях осуществлять пробег до 20 образцов. Сейчас вертикальные пластины применяются обычно для анализа белков (разд. 10.3) и для разделения фрагментов ДНК во время секвенирования (разд. 10.4). Хотя в некоторых лабораториях продолжают работать с гелями собственного приготовления, в других используют готовые к употреблению гели, подходящие для таких методов, как SDS-ПААГ-электрофорез, электрофорез в нативном геле и изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) (см. ниже).

10.3 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

10.3.1 SDS-ПААГ-электрофорез

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ-электрофорез) — наиболее широко применяемый метод для количественного анализа смеси белков. Он особенно удобен для контроля степени очистки белков, и, поскольку метод основан на разделении белков по их размерам, он может также быть использован для определения M_r белков. Додецилсульфат натрия (CH_3-$(CH_2)_{10}$-$CH_2OSO_3^-Na^+$) является анионным детергентом. Образцы, которые предстоит разделить, прежде всего кипятят в течение 5 минут в буфере, содержащем β-меркаптоэтанол и SDS. Меркаптоэтанол разрывает дисульфидные мостики, которые удерживают третичную структуру белка, а SDS прочно связывается с белками и денатурирует их. Поэтому каждый белок в смеси полностью денатурирует, распрямляет свою полипептидную цепь, вдоль которой «висят» отрицательно заряженные молекулы SDS. В среднем одна молекула SDS связывается с каждым вторым аминокислотным остатком. Поэтому исходный заряд молекулы полностью скрыт отрицательно заряженными молекулами SDS. Растянутая в длинную цепь форма молекулы сохраняется, так как любые повороты, стремящееся свернуть белковую цепь, будет приводить к отталкиванию между отрицательными зарядами в различных участках белковой цепи, возвращая молекулу обратно к вытянутой конформации. Буфер для образца также содержит ионизированный краситель, обычно бромфеноловый синий, который позволяет наблюдать за продвижением образца, и сахарозу или глицерин, которые увеличивают плотность раствора образца, таким образом заставляя образец опуститься на дно лунки при нанесении (см. рис 10.1). Как только все образцы нанесены, через гель пропускают ток. На практике разделяемые образцы не наносят прямо на основной разделяющий гель. Когда основной разделяющий гель (обычно длиной 5 см) заливают между стеклами и оставляют полимеризоваться, более короткий (~0,8 см) **концентрирующий гель** заливают сверху, и именно в нем формируются лунки для нанесения образца. Смысл этой процедуры заключается в концентрировании белкового образца с формированием четкой полосы еще до того, как он войдет в основной разделяющий гель. Это достигается за счет различий в ионной силе и pH между электрофорезным буфером и буфером концентрирующего геля и основано на явлении, известном как **изотахофорез**. Концентрирующий гель имеет очень большой размер пор (4%-й полиакриламид), что позволяет белкам свободно двигаться и концентрироваться в электрическом поле. Четкость полос улучшается благодаря тому, что отрицательно заряженные ионы глицина (в электрофорезном буфере) имеют меньшую электрофоретическую подвижность, чем комплексы белок-SDS, которые, в свою очередь, имеют меньшую подвижность, чем ионы хлора (Cl^-) в буфере для нанесения и в буфере для концентрирующего геля. Когда включают ток, все виды ионов должны

мигрировать с такой скоростью, чтобы не произошел разрыв в электрическом контуре. Ионы глицина могут двигаться с такой же скоростью, как и Cl^-, только если они находятся в области высокой напряженности поля. Напряженность поля обратно пропорциональна удельной проводимости, которая, в свою очередь, пропорциональна концентрации. В итоге три иона последовательно концентрируются друг за другом: [Cl^-] > [белок-SDS] > [глицин]. Поскольку комплексы белок-SDS содержатся в небольшом количестве, они концентрируются в очень четкие полосы между зонами ионов глицина и Cl^-. Как только глицин достигает разделяющего геля, он при более высоком pH более полно ионизируется и его подвижность увеличивается (pH разделяющего геля 8,8, а концентрирующего 6,8). Таким образом, граница раздела между глицином и Cl^- остается позади полосы комплексов белок-SDS. Отрицательно заряженные комплексы белок-SDS продолжают двигаться к аноду, и, поскольку на единицу длины белковой цепи приходится одинаковый заряд, они движутся в приложенном электрическом поле с одной и той же скоростью. Однако, как только они входят в разделяющий гель, он действует на них, как сито. Чем меньше белок, тем легче он может проходить через поры этого геля, тогда как большие белки задерживаются благодаря просеивающему эффекту геля. Молекула бромфенолового синего малого размера совсем не задерживается и поэтому движется с фронтом электрофореза. Когда краситель достигает дна геля, ток выключают, гель вынимают из стекол, прокрашивают при встряхивании в соответствующем красителе (обычно кумасси бриллиантовый синий, см. разд. 10.3.7) и отмывают от красителя. Отмывающий раствор удаляет фон несвязавшегося красителя, оставляя прокрашенные белки в виде синих полос на светлом фоне. Для типичного минигеля требуется 1 час для приготовления и полимеризации, 40 минут для пробега при 200 В и 1 час для прокрашивания с помощью кумасси. Основные белковые полосы видны уже через 10–20 мин, но, чтобы полностью удалить всю фоновую краску, требуется отмывка в течение ночи. Вертикальные гели используются очень широко, так как они позволяют наносить на один гель до 10 различных образцов. Типичный полиакриламидный гель с SDS показан на рис. 10.6.

Обычно для разделяющего геля используют 15%-й акриламид. При этом размер пор таков, что белки $M_r \sim 10\ 000$ беспрепятственно движутся в геле, тогда как белки с $M_r \sim 100\ 000$ могут только входить в поры такого геля. Поэтому 15%-й полиакриламидный гель удобен для разделения белков с M_r от 100 000 до 10 000. Однако, например, белки с M_r 150 000 неспособны входить в поры 15%-го геля. В таком случае используют гель с более крупными порами (10%- или даже 7,5%-гель), так что белки смогут входить в гель, а после разделения их можно окрасить и идентифицировать. Следовательно, выбор используемого геля зависит от размера исследуемого белка. В табл. 10.1 показаны диапазоны фракционирования гелей с различным содержанием акриламида. Видно, что белки с $M_r > 200$ кДа не могут входить в гель, тогда как белки с M_r от 200 000 до 15 000 разделяют. Белки с $M_r \leq 15\ 000$

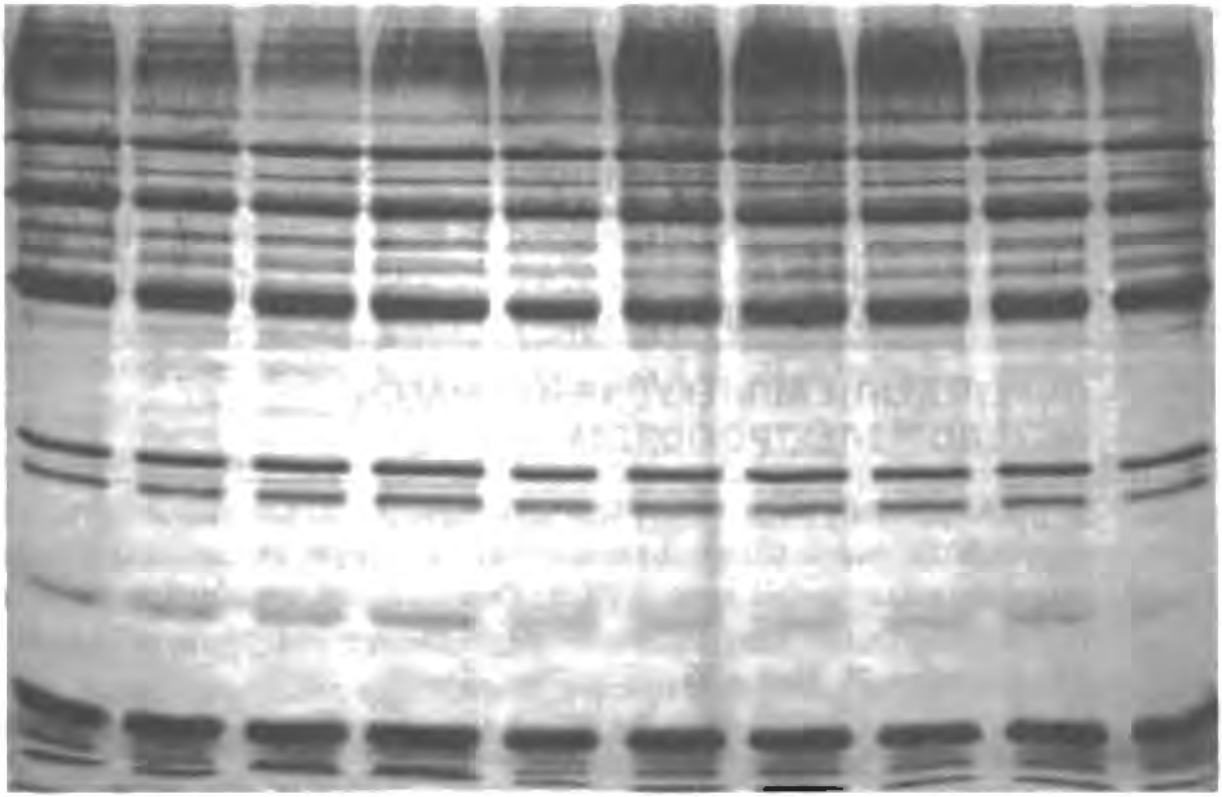


Рис. 10.6. Типичный SDS-полиакриламидный гель. Во все 10 лунок в геле была нанесена одинаковая сложная смесью белков. (Любезно предоставлено компанией Bio-Rad)

слишком малы, чтобы на них действовала вязкость гелевой матрицы, и движутся вместе в виде единой полосы с фронтом электрофореза.

Молекулярная масса белка может быть определена путем сравнения его подвижности с подвижностью стандартных белков с известной M_r, которые разделены в том же геле. Можно построить градуировочный график в координатах расстояние–lg M_r для каждого стандартного белка. Затем измеряют расстояние, пройденное белком с неизвестной M_r и по градуировочному графику определяют M_r.

Гель-электрофорез с SDS часто используют после каждого шага очистки белка, чтобы оценить наличие примеси в образце. Чистый белок должен давать единую полосу в полиакриламидном геле с SDS, за исключением

Таблица 10.1. **Взаимосвязь между концентрацией акриламидного геля и диапазоном фракционирования белка**

Концентрация акриламида, %	Диапазон фракционирования белка ($M_r \cdot 10^{-3}$)
5	60–350
10	15–200
15	10–100

тех случаев, когда белок состоит из нескольких неидентичных субъединиц. В последнем случае будут наблюдаться полосы, соответствующие отдельным субъединицам. При электрофореза требуются очень небольшие количества белка, поэтому расходуется очень мало материала, но тем не менее можно определить M_r белка.

Пример 1 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

Вопрос В приведенной ниже таблице для набора маркерных белков с известной M_r указаны расстояния, пройденные этими молекулами в полиакриламидном геле с SDS. Очищенный белок X, нанесенный на тот же гель, дает единственную полосу на расстоянии 45 мм. Определите M_r белка X.

Белок	M_r	Пройденное расстояние, мм
Трансферрин	78000	6,0
Бычий сывороточный альбумин	66000	12,5
Овальбумин (яичный альбумин)	45000	32,0
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	36000	38,0
Карбоангидраза	29000	50,0
Трипсиноген	24000	54,0
Соевый ингибитор трипсина	20100	61,0
β-лактоглобулин	18400	69,0
Миоглобин	17800	69,0
Лизоцим	14300	79,0
Цитохром *c*	12400	86,3

Отметьте, что β-лактоглобулин имеет M_r = 36800; это димер из двух идентичных субъединиц с M_r = 18400. В денатурирующих условиях дисульфидные мостики, связывающие субъединицы, разрываются, и таким образом мономерные цепи видны в геле по отдельности.

Ответ Постройте градуировочный график, нанося lg M_r против пройденного каждым маркерным белком расстояния. Из этого графика можно определить, что для белка X $M_r \sim 31000$. Отметьте, что точность этого метода ±10%, так что правильный ответ $M_r = 31000 \pm 3100$.

10.3.2 Разделение в неденатурирующих условиях

SDS-ПААГ-электрофорез наиболее часто применяется при изучении белков, однако этот метод нельзя использовать в том случае, если определение белка (чаще всего фермента) основано на его биологической активности, поскольку белок (фермент) в этих условиях денатурирует. В этом случае разделение проводят в неденатурирующих условиях:

полиакриламидный гель (обычно 7,5%-й) без добавления SDS и белки не денатурируют до нанесения на гель. Поскольку все белки, присутствующие в анализируемом образце, несут нативный заряд при данном pH геля (обычно pH 8,7), то они разделяются по своим электрофоретическим подвижностям и в зависимости от вязкости геля. Поэтому невозможно предсказать поведение данного белка в таком геле, но хорошее разрешение возможно при условии различия зарядов и размеров белков в данной смеси. Искомый фермент может быть идентифицирован путем инкубации геля в растворе соответствующего субстрата, что сопровождается появлением окрашенного продукта в том участке геля, где находится фермент. В другом методе для определения ферментов субстрат включается в состав агарозного геля, который заливается и полимеризуется поверх акриламидного геля. Диффузия и взаимодействие фермента и субстрата приводят к образованию окрашенной зоны в месте нахождения фермента. Часто на гель наносят дубликаты образцов, гель разрезают пополам, одну часть окрашивают для определения активности, а другую — для окрашивания всего белка. Таким образом можно найти суммарное содержание белка в образце и идентифицировать полосу, соответствующую ферменту по активности.

10.3.3 Градиентные гели

Такие гели готовят также на основе полиакриламида, но вместо геля с одинаковым размером пор (15%-й), формируется градиентный гель, обычно от 5%-й наверху до 25%-й в нижней части геля. Градиент создается с помощью градиентного смесителя (разд. 11.3.1), и гель заливают сверху вниз между стеклянными пластинами. Сначала между стеклами заливают раствор с высоким процентом акриламида (25%), после чего следует непрерывный градиент уменьшающейся концентрации акриламида. Поэтому наверху геля имеются поры большого размера (5%-й акриламид), но по мере того, как образец движется в геле вниз, концентрация акриламида постоянно увеличивается и соответственно уменьшается размер пор. Градиентные гели обычно готовят в виде гелей с SDS с концентрирующей областью. Они обладают следующими двумя преимуществами. Прежде всего, могут быть разделены белки при значительно большим диапазоном значений M_r, чем в геле с фиксированным содержанием акриламида. Белки с очень низкой молекулярной массой сначала свободно проходят через гель, а разделение происходит, когда они достигают пор малого размера в нижней части геля. Крупные белки медленно входят в гель и сразу же начинают разделяться. Вторым преимуществом градиентных гелей является то, что с их помощью могут быть разделены белки с очень близкими значениями M_r, чего нельзя сделать в гелях с фиксированным содержанием акриламида. По мере продвижения белков в геле размер пор геля уменьшается и белок в конце концов достигает области с предельным для него размером пор. Белок не может продвигаться дальше и локализуется здесь в виде четкой полосы. Белки чуть меньшего размера способны

мигрировать немного дальше в геле до достижения предельного для себя размера пор геля, где они будут образовывать четкие полосы. Поэтому два белка с незначительно отличающимися значениями M_r образуют две близко расположенные полосы.

10.3.4 Гели для изоэлектрического фокусирования

Этот метод идеально подходит для разделения таких амфотерных веществ, как белки, поскольку он основан на разделении молекул по их изоэлектрическим точкам (разд. 8.1). Метод имеет высокую степень разрешения, и с его помощью удается разделять белки, различающиеся по изоэлектрическим точкам всего на 0,01 pH. Наиболее широко применяемая для ИЭФ система основана на использовании горизонтальных гелей на стеклянных или пластиковых подложках. Разделение достигается при приложения разности потенциалов в геле с градиентом pH. Градиент pH в геле обусловлен особыми компонентами, называемыми амфолитами, представляющих собой смесь синтетических полимеров на основе аминокарбоновых кислот (рис. 10.7). Существуют готовые наборы амфолитов с различным диапазоном pH, как широким (pH 3–10), так и достаточно узким (pH 7–8). Диапазон pH выбирают таким образом, чтобы компоненты образца имели изоэлектрические точки pI внутри этой области. Амфолиты производятся фирмами Bio-Lyte и Pharmalyte.

Традиционно для ИЭФ использовались гели толщиной 1–2 мм, но относительно высокая стоимость амфолитов делает этот метод довольно дорогим, особенно если необходимо готовить большое количество гелей. Внедрение тонкослойных ИЭФ-гелей толщиной ~0,15 мм, приготовленных с использованием изоляционной ленты в качестве спейсера между пластинами, значительно снизило расходы на анализ. Поскольку при разделении белки дожны свободно передвигаться в соответствии со своими зарядами, ИЭФ выполняют в низкопроцентных гелях, чтобы избежать просеивающего эффекта геля. Обычно это 4%-ые полиакриламидные гели, а также агароза для разделения белков с высокой молекулярной массой M_r, для которых просеивающий эффект может сказываться даже в низкопроцентных акриламидных гелях.

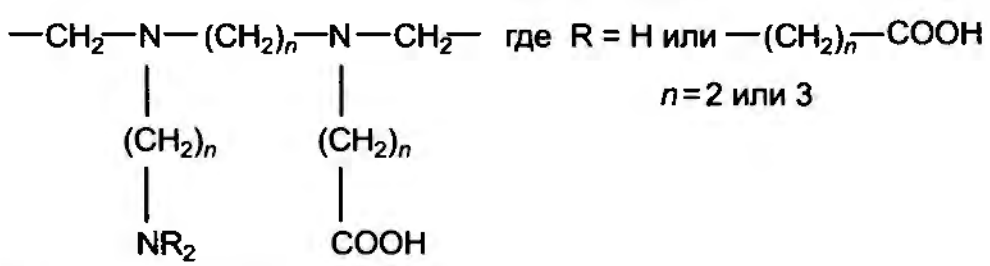


Рис. 10.7. Общая формула амфолитов

Чтобы приготовить тонкий гель для ИЭФ, находящиеся в подходящей области pH амфолиты и рибофлавин смешивают с раствором акриламида, затем смесь выливают на стеклянную пластину (обычно 25 см × 10 см) со спейсером. Вторую стеклянную пластину помещают поверх первой, этот сэндвич помещают под яркий свет — происходит фотополимеризация геля. При освещении рибофлавин разлагается с образованием свободных радикалов, которые и инициируют полимеризацию (разд. 10.2.2), которая продолжается 2–3 ч. Как только гель готов, стеклянные пластины разделяют — гель остается на одной из пластин. «Фитили» электрода, представляющие собой тонкие (3 мм) полоски смоченной фильтровальной бумаги (анод — фосфорная кислота, катод — гидроксид натрия), закладывают вдоль каждой стороны геля, а затем накладывают разность потенциалов, благодаря чему между анодом и катодом возникает градиент pH, обусловленный ионизацией амфолитов. Затем ток отключают и наносят образцы, накладывая на гель маленькие квадратики фильтровальной бумаги, смоченной в образце. Затем снова на 30 мин включают ток, позволяя образцам выйти из бумаги и войти в гель, после чего бумажные квадраты могут быть удалены с поверхности геля. Заряд на белках зависит от того, при каком значении pH был нанесен образец. Белки, находящиеся изначально при pH ниже своей изоэлектрической точки, обладают положительным зарядом и мигрируют к катоду. Однако по мере их продвижения pH геля постепенно увеличивается, а положительный заряд на белке соответственно уменьшается до тех пор, пока белок не дойдет до точки, при которой pH геля равен изоэлектрической точке этого белка. Теперь белок как амфотерная частица превращается в цвиттер-ион с нулевым суммарным зарядом, так что его движение прекращается. Аналогичным образом, вещества, находящиеся изначально в областях pH выше их изоэлектрических точек, будут нести отрицательный заряд и мигрировать к аноду до тех пор, пока не достигнут области pH, соответствующей их изоэлектрическим точкам, где и остановятся. Можно увидеть, что поскольку образцы всегда движутся к области pH, соответствующей их изоэлектрическим точкам, то не имеет значения, в каком месте геля они нанесены. Чтобы достигнуть быстрого разделения (2–3 ч), используется относительно высокое напряжение (до 2500 В). Поскольку выделяется значительное тепло, электрофорез проводят при охлаждении (10°C), а блок питания снабжен стабилизатором; таким образом, температурные колебания удается минимизировать. После электрофореза гель нужно окрасить, чтобы обнаружить белки. Однако это нельзя сделать сразу, поскольку будут краситься также и амфолиты, так что гель будет полностью синим. Поэтому гель сначала отмывают в растворе фиксатора (10%-я трихлоруксусная кислота). Это позволяет осаждать белки в геле и вымывать гораздо меньшие по размеру амфолиты. Гель затем окрашивают в растворе кумасси и отмывают (разд. 10.3.7). Типичный ИЭФ-гель показан на рис. 10.8. Метод очень напоминает метод хроматофокусирования (разд. 11.6.3).

p*I* отдельного белка можно определить без труда, если в этом же геле разделять смесь белков с известной изоэлектрической точкой. В продаже имеются смеси белков с различными значениями p*I* в области pH 3,5–10.

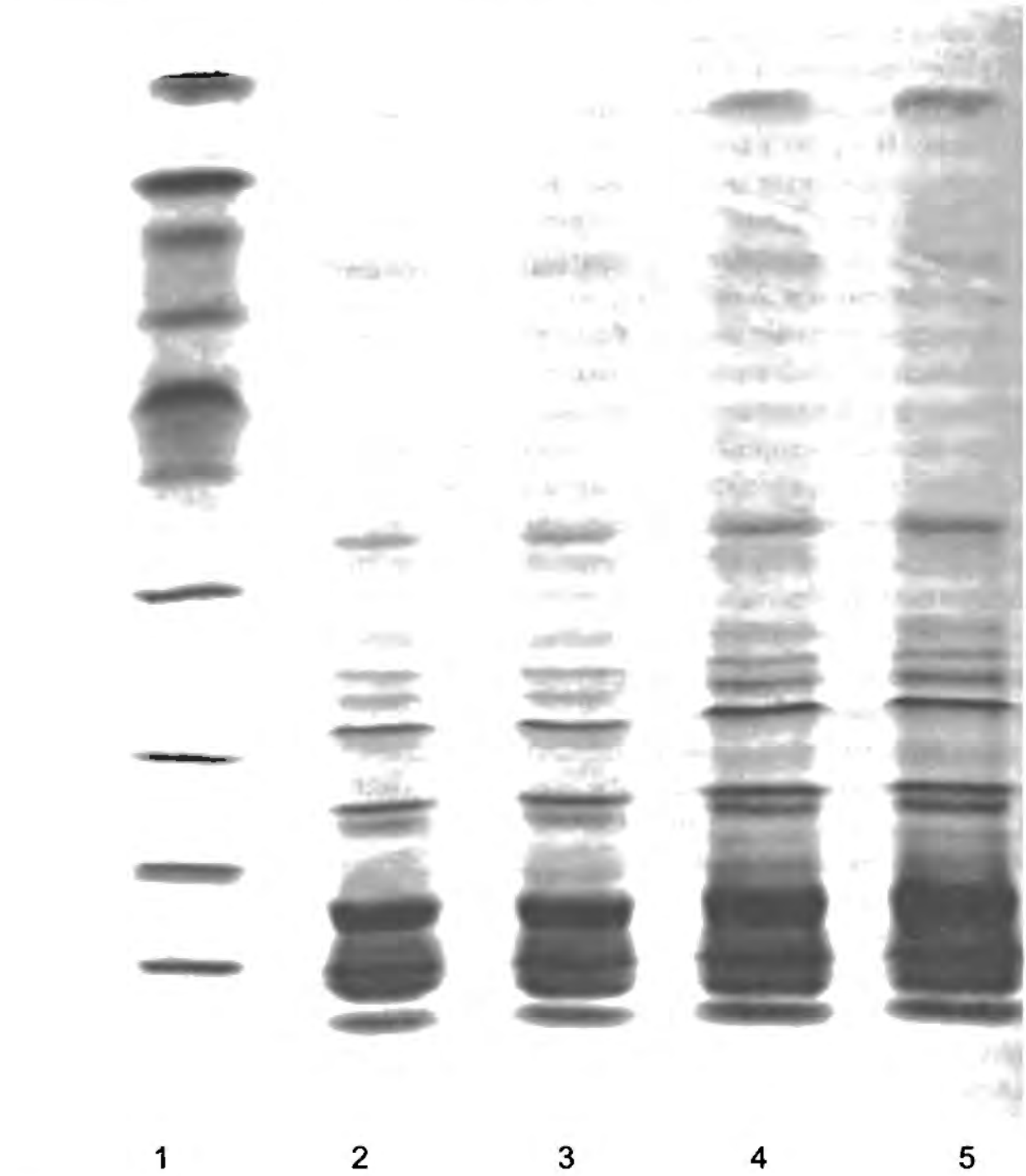


Рис. 10.8. Разделение белков методом изоэлектрического фокусирования. До содержит смесь стандартных белков с известными изоэлектрическими точками рожках 2–5 нанесены возрастающие количества яда японского водяного щитомс (С любезного разрешения Лабораторий Bio-Rad Ltd)

После окрашивания измеряют расстояние каждой полосы от эле и строят график зависимости расстояния от p*I* (т. е. pH в этой точ этой градуировочной кривой можно определить p*I* неизвестного б

ИЭФ — высокочувствительный аналитический метод, особенн ный для изучения микрогетерогенности в белках. Например, белок давать одну полосу в геле с SDS, но три полосы в геле ИЭФ. Это происходить, например, если белок существует в моно-, ди- и трифо

лированных формах. Белки, содержащие разное число фосфатных групп, имеют незначительные различия в молекулярной массе белка, поэтому наблюдается одна полоса в геле с SDS, но небольшое различие в зарядах молекул можно детектировать методом ИЭФ.

Метод с успехом применяется для разделения изоферментов (разд. 8.2), которые представляют собой различные формы одного и того же белка, отличающиеся только одним или двумя аминокислотными остатками. Поскольку белки находятся в нативной форме, наличие ферментативной активности можно определить либо путем инкубации незафиксированного и неокрашенного геля в подходящем субстрате, либо покрывая гель сверху другим агарозным гелем, содержащим субстрат. Такой подход нашел применение в судебной экспертизе: следы крови или других биологических жидкостей можно анализировать и сравнить между собой по составу определенных изоферментов.

Хотя ИЭФ используется главным образом для аналитического разделения, метод также может применяться в препаративных целях. ИЭФ в вертикальной колонке осуществляется в охлаждаемой водой стеклянной колонке, заполненной смесью амфолитов, растворенных в сахарозе с определенным градиентом плотности, чтобы предотвратить диффузию. Когда разделение завершено, ток выключают, и компоненты образца извлекают через клапан в основании колонки. Кроме того, препаративный вариант ИЭФ может выполняться в гранулах геля, такого как сефадекс G-75 (разд. 11.8.2).

10.3.5 Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле

Этот метод объединяет ИЭФ (первое измерение), при котором происходит разделение белков согласно их зарядам (p*I*), и разделение в зависимости от размера с помощью SDS-ПААГ (второе измерение). Двумерный (2D) электрофорез — довольно сложный аналитический метод, применяемый при анализе смеси белков. С целью достижения максимального разделения применяют широкий формат 2D-гелей (20 см × 20 см), хотя в некоторых случаях для успешного разделения достаточно системы минигелей. Для гелей большого формата первое измерение (изоэлектрическое фокусирование) выполняется в акриламидном геле, слой которого заливают на пластиковую полоску (18 см × 3 мм). Гель содержит амфолиты (для образования градиента pH), 8 М мочевину и неионный детергент, которые вызывают денатурацию и поддерживают растворимость анализируемых белков. Денатурированные белки разделяются в таком геле в соответствии со своими изоэлектрическими точками. Затем полосу геля инкубируют в буфере, содержащем SDS (при этом SDS связывается с денатурированными белками), и помещают между стеклянными пластинами поверх предварительно приготовленного 10%-го SDS-ПААГ. Начинается электрофорез, и связанные с SDS белки в соответствии со

своим размером разделяются в геле, как описано в разд. 10.3.1. Гель для ИЭФ выпускают в виде высушенной полосы, поэтому он нуждается в регидратации в течение ночи. Первый этап электрофореза занимает 6–8 ч, уравновешивание с буфером, содержащим SDS, занимает примерно 15 мин и затем SDS-ПААН-электрофорез занимает примерно 5 ч. Типичный 2D-гель показан на рис. 10.9. Обычно, используя этот метод, можно разделить от 1000 до 3000 белков из клеточного или тканевого экстракта, а в некоторых случаях сообщалось о разделении от 5000 до 10 000 белков. Применения 2D-ПААГ-электрофореза и важная роль этого метода в протеомике описаны в разд. 8.5.1.

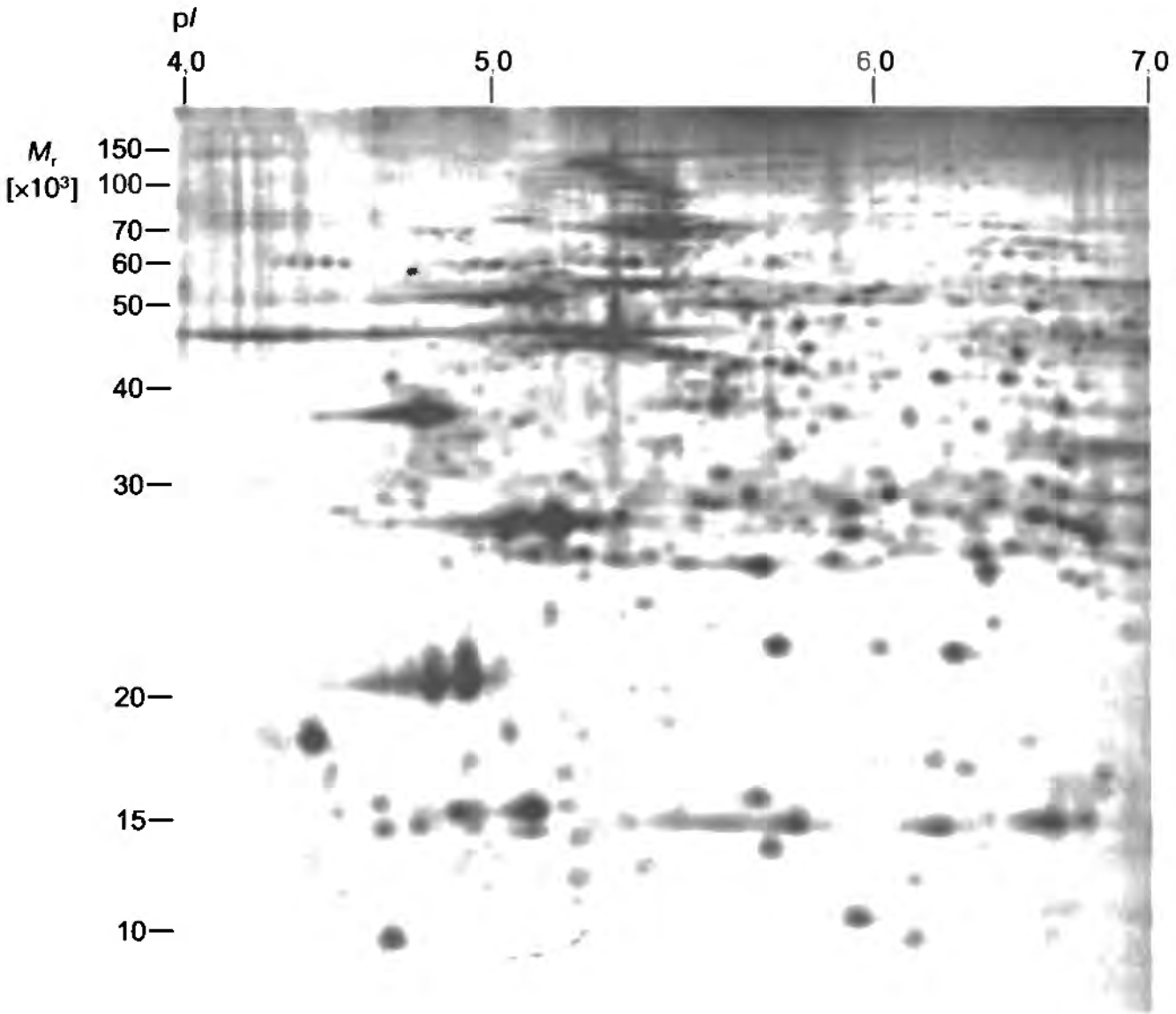


Рис. 10.9. Типичный двумерный гель. Нанесенный образец содержал суммарно 100 мкг белка, выделенного из желудочка сердца собаки. Электрофорез в первом измерении был выполнен в геле для изоэлектрофокусирования в диапазоне pH от 4 до 7. Во втором измерении белки разделяли методом SDS-ПААГ-электрофореза в вертикальном 12%-м полиакриламидном геле. Далее белки окрашивали раствором серебра. (Печатается с любезного разрешения Моник Хейнке и д-ра Майка Данна из Division of Cardiothoracic Surgery, Imperial College School of Medicine, Heart Science Centre, Harefield, UK)

10.3.6 Электрофорез на ацетате целлюлозы

Электрофорез на полосках ацетата целлюлозы — это один из старейших методов разделения, он все еще имеет множество применений. В частности, он продолжает использоваться в клиническом анализе образцов сыворотки крови. Преимущество ацетата целлюлозы по сравнению с бумагой состоит в том, что ацетат целлюлозы как носитель более гомогенный, имеет постоянный размер пор и не адсорбирует белки, как бумага. Поэтому не наблюдается размывания полос белка, а разрешение хорошее, хотя не столь хорошее, как в полиакриламидном геле. Однако этот метод гораздо проще наладить и применять. В полосе ацетата целлюлозы размером 2,5 см × 12 см обычно разделяют один образец, а на более широких листах наносят несколько образцов. Прежде всего ацетат целлюлозы замачивают в электрофорезном буфере (для образцов сыворотки крови pH 8,6), а затем наносят образец (1–2 мм^3) в виде полосы шириной 1 см примерно на 1/3 длины полосы. Концы полосы находятся в контакте с камерами электрофорезного буфера, что обеспечивается фильтровальной бумагой, которую кладут на конец полосы ацетата целлюлозы; электрофорез проводят при 6–8 В · см$^{-1}$ в течение примерно 3 ч. После электрофореза полосу окрашивают на присутствие белков (см. разд. 10.3.7), отмывают и анализируют полосы белка. При разделении белков сыворотки крови обычно получают шесть полос. Однако при многих заболеванияз этот профиль белков сыворотки изменяется, что и дает информацию о состоянии пациента. Электрофорез в ацетате целлюлозы был в значительной степени вытеснен эоектрофорезом в агарозном геле, который дает несколько лучшее разрешение.Типичный пример анализа сыворотки крови в агарозном геле приведен на рис. 10.10. Сходные картины получаются, когда используется ацетат целлюлозы.

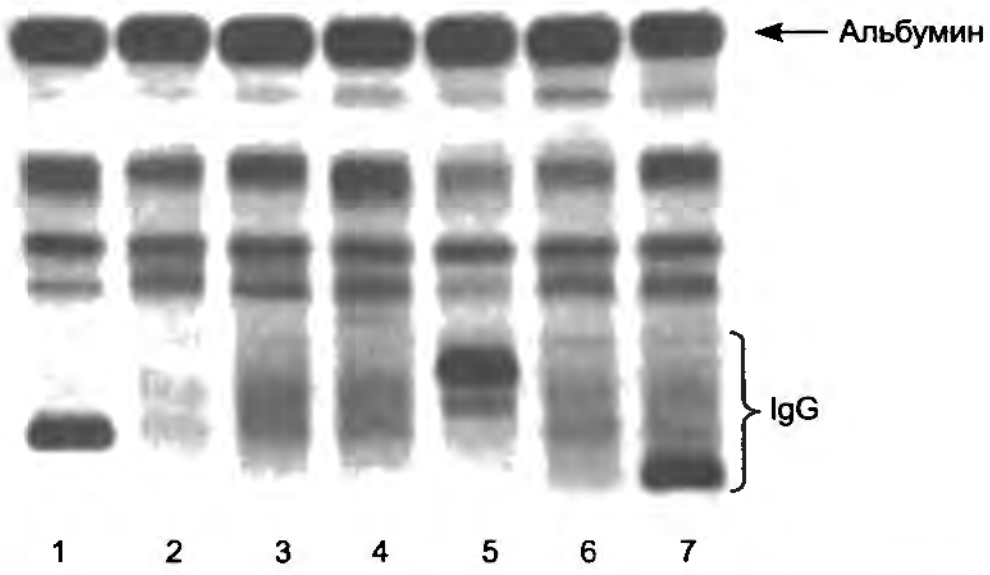


Рис. 10.10. Электрофорез в агарозном геле образцов сыворотки человека. Дорожки 2, 3, 4 и 6 демонстрируют профили белков сыворотки крови в норме. На дорожки 1, 5 и 7 нанесены образцы сыворотки крови пациентов с миеломой, которые идентифицируются по избыточной продукции определенного моноклонального антитела во фракции IgG. (Печатается с любезного разрешения Чарлза Эндрю и Николаса Канди из Edgware General Hospital, London)

Методом **зимограммы** с помощью электрофореза в ацетате целлюлозы можно легко детектировать ферменты. Полосу целлюлозы кладут на полосу фильтровальной бумаги, смоченной в буфере и субстрате. После инкубационного периода полосы разделяют, и бумага обрабатывается для определения локализации фермента; следовательно, можно идентифицировать положение ферментативной активности на исходной полосе. Другим подходом для определения и полуколичественного анализа *любого* белка на полосе является обработка этой полосы подобно белковому блоту и поиск данного белка с помощью сначала первичных антител и затем связанных с ферментом вторичных антител (разд. 10.3.8). Появление окраски субстрата указывает на присутствие определенного белка, и степень окрашивания за данный период времени дает полуколичественную оценку содержания белка. Например, на широком листе разделено много образцов сыворотки крови, затем лист обрабатывают антителами и повышенный уровень отдельного белка в некоторых образцах идентифицируют по усилению окраски.

10.3.7 Определение, оценка содержания и выделение белков из гелей

При определении белков в геле наиболее часто окрашивают гель сульфированным триметиламиновым красителем кумасси бриллиантовым синим R-250. Обычно для окрашивания используется 0,1%-й (мас./об.) кумасси в смеси метанол–вода–ледяная уксусная кислота (45 : 45 : 10 по объему). Эта кислотно-метанольная смесь действует как денатурирующее средство, которое высаждает и фиксирует белок в геле, что предотвращает вымывание белка во время окрашивания. Окрашивание большинства гелей требует примерно 2 ч, а отмывка обычно длится в течение ночи при осторожном покачивании в том же растворе кислота–метанол, но в отсутствие красителя. Кумасси — высокочувствительный краситель; очень слабо окрашенная полоса в акриламидном геле соответствует 0,1 мкг (100 нг) белка. Краситель кумасси не используется для окрашивания ацетата целлюлозы (или белковых блотов), поскольку он довольно активно связывается с бумагой. В этом случае белки прежде всего денатурируют быстрым погружением полосы в 10%-ю (об./об.) трихлоруксусную кислоту и затем в раствор красителя, например проционовый синий, амидовый черный или проционовый S, который не окрашивает материал подложки.

Окрашивание с помощью кумасси — достаточно чувствительный метод, часто нуждаются в еще более высокой чувствительности и используют, например, окрашивание серебром. Этот способ окрашивания основан на подходах, принятых в гистологии или в фотографии. В каждом случае ионы серебра (Ag^+) восстанавливаются на белке до металлического серебра и осадок серебра дает черную или коричневую полосу. Окрашивание серебром может быть использовано сразу же после электрофореза, либо после окрашивания кумасси. В последнем случае основные полосы в геле могут быть идентифицированы с помощью кумасси, а затем ми-

норные полосы, не детектируемые с помощью кумасси, обнаруживают при окрашивании серебром. Этот метод по меньшей мере в 100 раз чувствительнее окрашивания с помощью кумасси и позволяет определять белки в количестве менее 1 нг. Другие методы с подобной чувствительностью — это флуоресцентное окрашивание Sypro оранжевым (30 нг) и Sypro красным (10 нг).

Гликопротеины традиционно детектировали в белковом геле путем окрашивания в системе иодной кислоты (PAS, periodic acid-Schiff). Такой способ позволяет различать в смеси компоненты гликопротеинов. Однако краситель PAS не очень чувствителен и часто дает очень слабые розово-красные полосы, трудно различимые в геле. Гораздо более чувствительным методом, используемым в настоящее время, является перенос геля на мембрану (разд. 10.3.8) и применение лектинов для определения гликопротеинов. Лектины представляют собой белковые молекулы, которые связывают углеводы; обнаружены лектины, имеющие различную специфичность для разных типов углеводов. Например, определенные лектины узнают маннозу, фукозу или концевой глюкозамин углеводных боковых цепей гликопротеинов. Анализируемый образец разделяют в нескольких дорожках полиакриламидного геля с SDS. Окрашенные полосы появляются в точке, где связываются лектины; все дорожки инкубируют с разными лектинами, отмывают, инкубируют со связанным с пероксидазой хрена антителом к лектину, после чего добавляют субстрат пероксидазы. Таким способом, тестируя образец белка серией лектинов, возможно определить не только то, что анализируемый белок является гликопротеином, но и получить информацию о типе гликозилирования.

С помощью **сканирующей денситометрии** можно выполнить количественный анализ (т. е. измерения относительных количеств различных белков в образце). Имеется множество фирменных сканирующих денситометров, принцип работы которых состоит в пропускании окрашенной дорожки геля через луч света (лазера) и измерении пропущенного света. Строят графики зависимости пиков поглощения от расстояния белковой полосы от линии старта, а измерение площадей пиков позволяет оценить количество белка. Однако такие данные должны интерпретироваться с осторожностью, поскольку линейная зависимость между поглощением и концентрацией белка выполняется в узком диапазоне концентраций. Кроме того, равные количества различных белков не всегда окрашиваются одинаково данным красителем, поэтому любые данные об относительном содержании белков могут быть только полуколичественными. Существует также другой, более дешевый путь анализа, при котором окрашенные полосы вырезают, краситель отмывают в течение ночи в известном объеме 50%-го пиридина и затем спектрофотометрически измеряют количество высвобожденного красителя. Недавно были разработаны системы получения информации о геле, заменяющие сканирующие денситометры. Такие настольные системы состоят из видеокамеры (связанной с компьютером), присоединенной к маленькой «темной комнате», которая «заполняется» по выбору белым или ультрафиолетовым светом (трансиллюминатор). Изображения геля могут храниться в компьютере, усиливаться и печататься,

если требуется, с помощью термографического печатающего устройства, таким образом устраняя необходимость проявления фотографий в темной комнате, как в случае традиционной фотографии.

Хотя гель-электрофорез обычно используется как аналитический метод, он годится также для разделения белков в геле и выделения их оттуда. Полосы белков вырезают из мембраны, а данные о последовательности белка получают с помощью белкового секвенатора (разд. 8.4.3). Окрашенные полосы белков вырезают из белкового геля, и белок получают из кусочка геля с помощью электрофореза (**электроэлюция**). В продаже имеется множество моделей кювет для электроэлюции, но, возможно, наиболее простым способом является расплавление геля в буфере в диализном мешке и помещение этого мешка в буфер между двумя электродами. Белок будет выходить из кусочка геля в направлении соответствующего электрода, но задерживаться в диализном мешке. После электроэлюции направление тока меняют на несколько секунд, чтобы смыть белок, прилипший к стенке диализного мешка, и после этого получают раствор белка.

10.3.8 **Белковый (вестерн) блоттинг**

ПААГ-электрофорез — это главным образом аналитический метод, однако этот же метод позволяет также фракционировать смесь белков. Полученные фракции могут быть использованы для дальнейшего исследования индивидуальных белков. Первый этап — перенос разделенных белков из геля на лист из нитроцеллюлозы. Такой метод известен как белковый блоттинг по аналогии с саузерн-блоттингом (разд. 5.9.2) — методом, применяемым для получения образцов ДНК из агарозного геля. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозу достигается с помощью метода, известного как **электроблоттинг**. При этом гель накладывают на нитроцеллюлозную мембрану, зажимают вместе в кассете и погружают в буфер между двумя параллельными электродами (рис. 10.11). Ток пропускают под прямым углом к поверхности геля, что приводит к выходу разделяемых белков из геля и их закреплению на листе нитроцеллюлозы. Нитроцеллюлоза с перенесенным белком называется блотом. После переноса на нитроцеллюлозу разделенных белков они могут подвергаться дальнейшим исследованиям. Например, это может быть гибридизация блота с зондом, обычно с использованием специфических антител к искомому белку. Блот прежде всего инкубируют в растворе белка, например в 10%-м (масс./об.) растворе обезжиренного сухого молока, который блокирует все остающиеся гидрофобные участки на нитроцеллюлозе. Затем лист нитроцеллюллозы переносят в раствор разведенной антисыворотки (первичные антитела) против искомого белка. При наличии соответствующего антигена молекула иммуноглобулина (IgG) связывается с блотом, таким образом идентифицируя искомый белок. Для визуализации этого взаимодействия блот инкубируют в растворе вторичных антител против IgG того вида животного, в котором были получены первичные антитела. Напри-

мер, если первичные антитела были получены в кролике, тогда вторичными антителами должны быть антитела против IgG кролика. Эти вторичные антитела несут метку, так что взаимодействие вторичных антител с первичными может быть видно на блоте. Антивидовые молекулы IgG с различными метками выпускаются многими коммерческими фирмами. Одним из наиболее распространенных методов детектирования является использование вторичных антител, связанных с ферментом (рис. 10.12). В этом случае после обработки связанным с ферментом вторичным антителом блот инкубируют в растворе субстрата, в котором фермент превращает субстрат в нерастворимый окрашенный продукт, осаждающийся на нитроцеллюлозе. Следовательно, присутствие окрашенной полосы указывает положение искомого белка. Белок можно идентифицировать путем сравнения блота с окрашенным гелем, на котором разделен такой же образец. Ферментом, обычно используемым в связанных с ферментом антителах, является щелочная фосфатаза, которая превращает бесцветный субстрат 5-бром-4-хлориндолилфосфат в продукт синего цвета, или пероксидаза хрена, которая, используя H_2O_2 в качестве субстрата, окисляет либо 3-амино-9-этилкарбазол в нерастворимый продукт коричневого цвета или 4-хлор-1-нафтол в нерастворимый продукт синего цвета. Другим

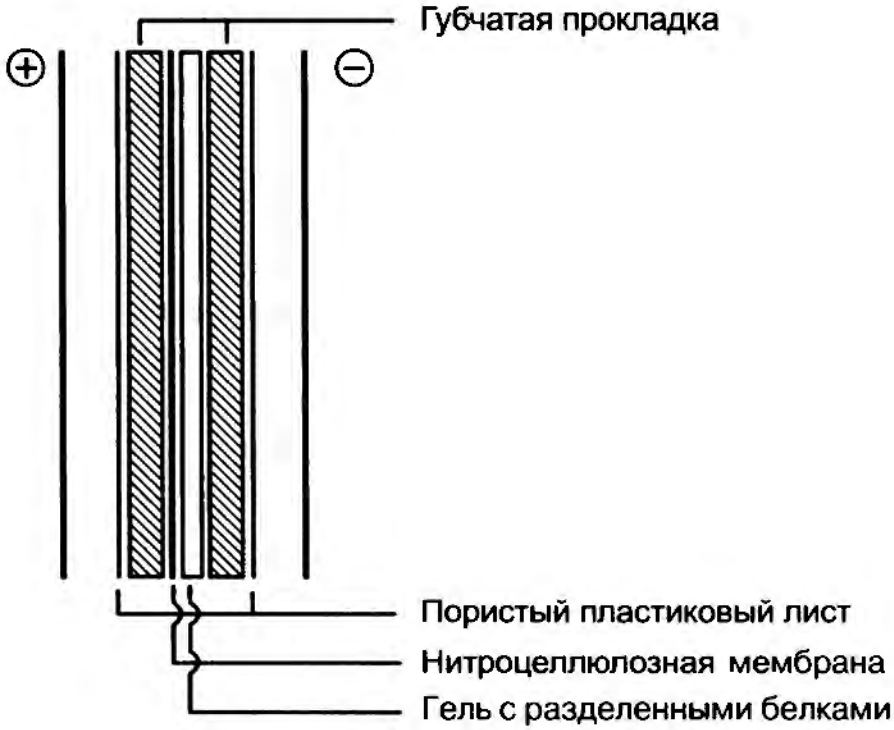


Рис. 10.11. Схема электроблоттинга. Гель помещают на губчатую прокладку, смоченную в буфере. Затем на поверхность геля помещают лист нитроцеллюлозы и сверху накладывают вторую губчатую прокладку. Этот «сэндвич» удерживается между двумя жесткими пористыми пластиковыми листами, которые скреплены двумя эластичными лентами. «Сэндвич» затем помещают между параллельными электродами в резервуар с буфером и пропускают электрический ток. «Сэндвич» должен быть помещен так, чтобы нитроцеллюлозная мембрана находилась между гелем и анодом для SDS-полиакриламидных гелей, поскольку все белки несут отрицательный заряд

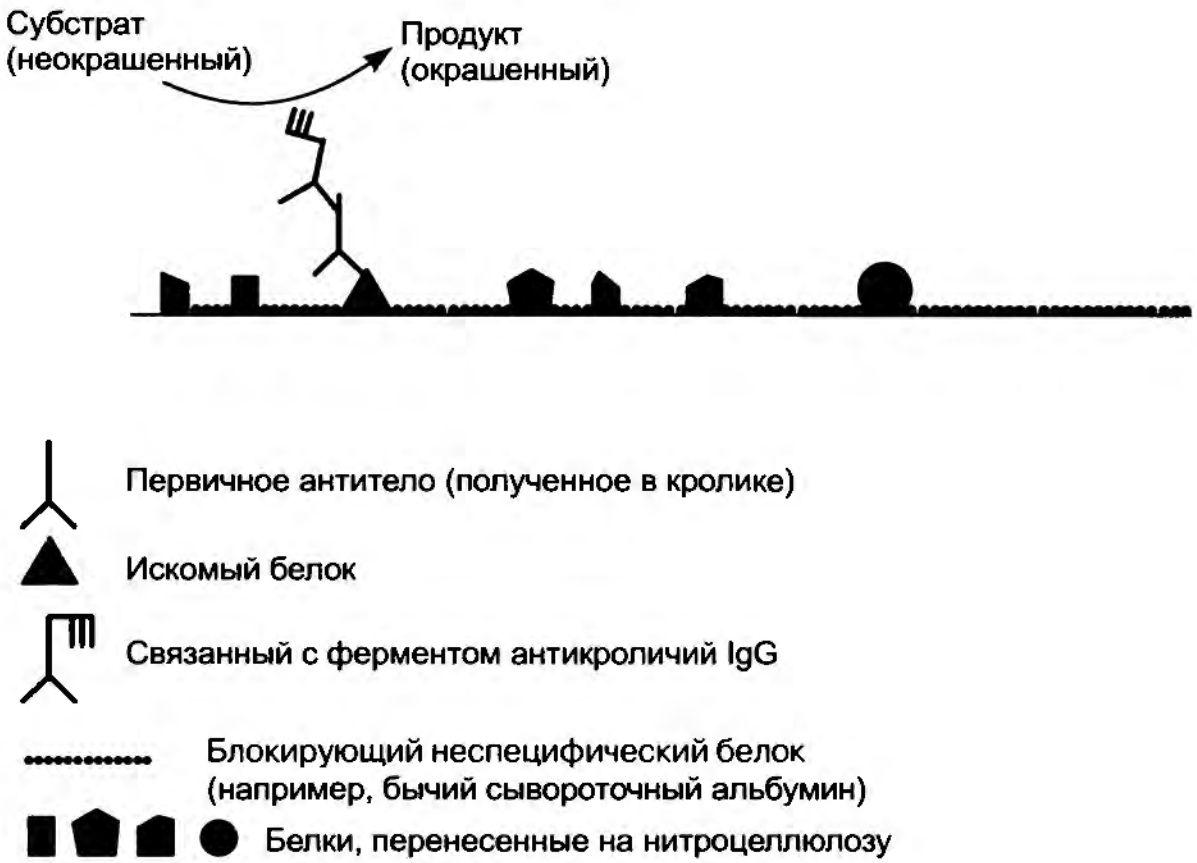


Рис. 10.12. Использование связанных с ферментом вторичных антител для иммуноанализа белков. Прежде всего, первичное антитело (полученное, например, в кролике) связывается с искомым белком на блоте. На втором этапе связанный с ферментом антикроличий IgG выявляет первичное антитело. И, наконец, добавление субстрата для фермента приводит к появлению окрашенного продукта в том участке блота, где находится искомый белок

подходом для детектирования с помощью пероксидазы хрена является использование метода усиленной хемилюминесценции (ECL, enchanced chemiluminescence). В присутствии пероксида водорода пероксидаза хрена окисляет хемилюминесцентный субстрат люминол, что сопровождается испусканием света, интенсивность которого увеличивается в 1000 раз в присутствии химического усилителя (рис. 10.13). Испускание света детектируется путем экспонирования блота на фотопленке. Аналогичная система ECL позволяет использовать антитела, меченные щелочной фосфатазой. Принцип, лежащий в основе применения связанных с ферментами антител для определения антигенов в блоте, аналогичен принципу, используемому в твердофазном иммуноферментном анализе.

Хотя обычно в качестве маркеров для вторичных антител используются ферменты, имеются и другие маркеры:

- *^{125}I-меченные вторичные антитела*; связывание с блотом определяется методом авторадиографии (разд. 14.2.3).
- *Меченные флуоресцинизотиоцианатом вторичные антитела.* Эта флуоресцентная метка детектируется экспонированием блота в ультрафиолетовом свете.

- *^{125}I-меченный белок А*; белок А выделяют из *Staphylococcus aureus*; он специфически связывается с Fc-областью молекул IgG. Поэтому белок А, меченный ^{125}I, используется вместо вторичных антител, а связывание с мембраной детектируется методом авторадиографии.
- *Вторичные антитела, меченные золотом.* Выпускаются вторичные антитела (антивидовые IgG), покрытые мелкими частицами золота. Когда они связываются с первичными антителами на блоте, их можно непосредственно наблюдать по красному окрашиванию.
- *Биотинилированные вторичные антитела.* Биотин — низкомолекулярный витамин — прочно связывается с яичным белком авидином ($K_d = 10^{-15}$ М). Блот инкубируют с биотинилированным вторичным антителом и затем с конъюгатом фермент–авидин. Многочисленные молекулы биотина могут связываться с единственной молекулой антитела, то и молекулы конъюгированного с ферментом авидина могут связаться с единственной молекулой биотинилированного антитела, таким образом обеспечивая усиление сигнала. В качестве фермента обычно используется щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена.

Кроме меченых антител или белков иногда используются другие зонды. Например, радиоактивно меченная ДНК применяется для определения на блоте ДНК-связывающих белков. Прежде всего блот инкубируют в растворе радиоактивно меченной ДНК, затем его отмывают и производит авторадиографию. Присутствие радиоактивных полос, детектируемых на блоте, указывает положение ДНК-связывающих белков.

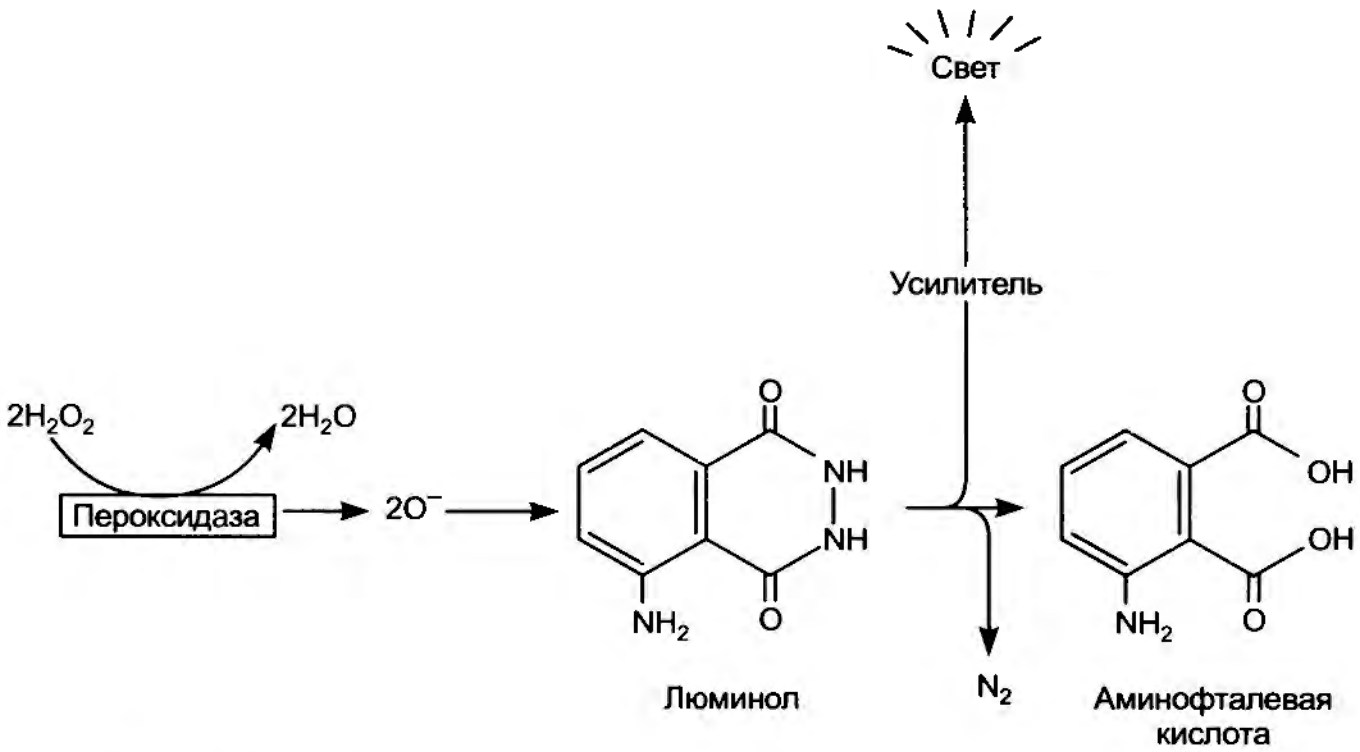


Рис. 10.13. Использование усиленной хемилюминесценции при детектировании с применением пероксидазы хрена

10.4 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

10.4.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение большинства образцов ДНК выполняется в агарозных гелях. Причиной этого является то, что анализируемые молекулы ДНК и их фрагменты чаще всего значительно крупнее белков, поэтому они неспособны входить в полиакриламидный гель — для них требуется агарозный гель, имеющий поры большого размера. Например, используемая обычно плазмида pBR322 имеет M_r $2{,}4 \cdot 10^6$. Числа такого порядка использовать неудобно, поэтому размер ДНК выражают числом пар оснований (п.о.) или тысяч пар оснований (т.п.о.), когда речь идет о двухнитевой ДНК. Размер pBR322 составляет 4,36 т.п.о. Даже маленький рестрикционный фрагмент размером 1 т.п.о. имеет M_r 620 000. Когда говорят об однонитевой ДНК, то принято выражать размер в нуклеотидах (н). Поскольку в любом фрагменте ДНК на единицу длины приходится один и тот же заряд (обсуловлен заряд присутствием фосфатных групп), все образцы ДНК в приложенном электрическом поле должны двигаться в направлении анода с одинаковой скоростью. Разделение в агарозном геле достигается благодаря тому, что матрица геля оказывает сопротивление этому движению. Большим молекулам труднее проходить через поры геля (очень большие молекулы могут вообще не войти в гель), тогда как самые маленькие молекулы движутся в геле относительно свободно. Вследствие этого подвижность молекул ДНК во время электрофореза зависит от их размера, при этом самые маленькие молекулы движутся быстрее остальных. Это аналогично разделению белков в полиакриламидном геле с SDS (разд. 10.3.1), хотя аналогия не совсем полная, так как молекулы двухнитевой ДНК образуют относительно жесткие стержни, и точно неизвестно, каким образом они проходят через гель, возможно, что длинные молекулы ДНК проходят через поры геля одним концом вперед. Во время прохождения через поры молекула ДНК испытывает сопротивление; чем длиннее молекула, тем дольше она задерживается в каждой поре. Боком движутся очень маленькие и наболее гибкие молекулы ДНК. Из выше сказанного очевидно, что концентрация геля должна соответствовать диапазону размеров разделяемых молекул. На гелях, содержащих 0,3% агарозы, разделяют двухнитевые молекулы ДНК размером от 5 до 60 т.п.о., тогда как 2%-е гели используются для образцов от 0,1 до 3 т.п.о. Многие исследователи используют 0,8%-е гели, подходящие для разделения молекул ДНК в диапазоне 0,5–10 т.п.о. Поскольку агарозные гели разделяют ДНК в соответствии с размером, M_r фрагментов ДНК можно определить из их электрофоретической подвижности, если набор стандартных маркеров ДНК с известной M_r разделяют в том же самом геле. Например, можно использовать образец ДНК бактериофага λ (49 т.п.о.), который был расщеплен рестрикционным ферментом *Eco*RI. Зная последовательность ДНК λ и участки расщепления для *Eco*RI, получают фрагменты точно известных размеров (рис. 10.14).

Для разделения ДНК всегда применяют горизонтальные, полностью погруженные в буфер гели. Агарозу, растворенную при кипячении в бу-

фере, выливают на стеклянную или пластиковую пластину с бортиками из липкой ленты или с пластиковой рамкой, чтобы получить гель глубиной ~3 мм. Лунки для нанесения образца формируют путем погружения пластикового шаблона или гребня в налитый раствор геля, который удаляют после полимеризации. Гель помещают в электрофорезную камеру,

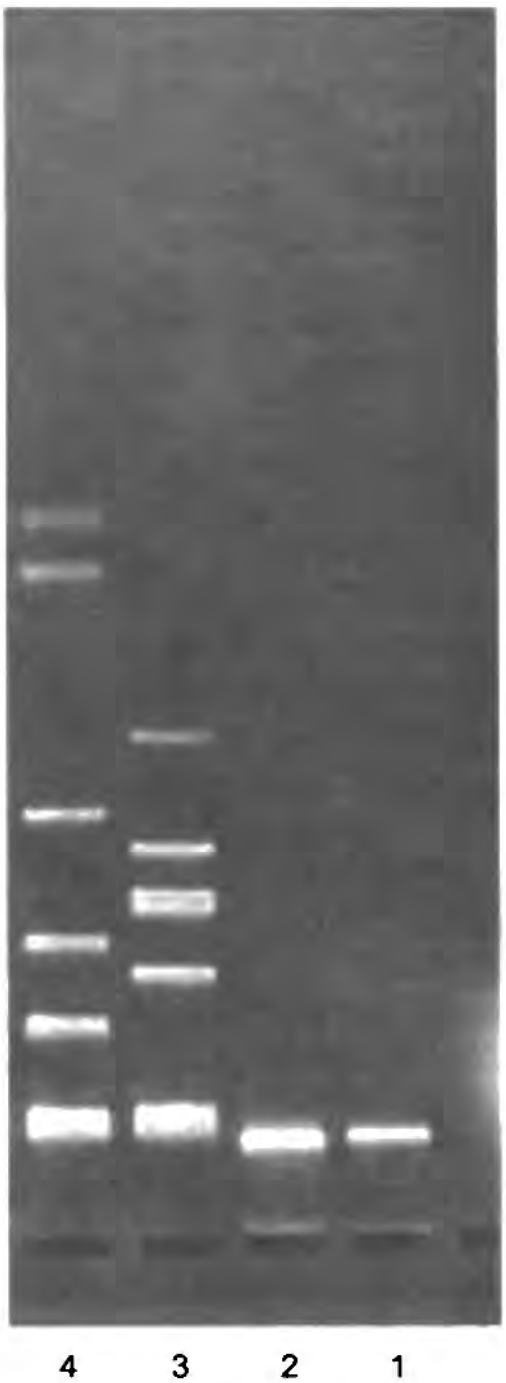


Рис. 10.14. На фотографии видны четыре дорожки погруженного в буфер 0,8%-го агарозного геля. Электрофорез проводили при 40 В в буфере трис/борат/ЭДТА в течение 16 ч, гель окрашивали в бромистом этидии и просматривали в ультрафиолетовом свете. На каждую дорожку наносили ~0,5 мкг ДНК. Дорожки 1 и 2 — ДНК λ (49 т.п.о.); дорожка 3 — ДНК λ, расщепленная ферментом *Eco*RI, дающим фрагменты следующих размеров (в порядке уменьшения): 21,80, 7,52, 5,93, 5,54, 4,80 и 3,41 т.п.о.; дорожка 4 — ДНК λ, расщепленная *Hind*III с образованием следующих фрагментов: 23,70, 9,46, 6,75, 4,26, 2,26 и 1,98 т.п.о. (Любезно предоставлено Стефеном Боффи из Университета Хертфордшира)

покрывают буфером, а затем в лунки наносят образцы. Образцы растворяют в буфере, содержащем сахарозу, глицерин или фиколл, которые повышают плотность раствора и образующиеся сгустки опускаются на дно лунки. В раствор образца также добавляют краситель бромфеноловый синий; это позволяет видеть наносимый образец, а также следить за фронтом электрофореза. Для электрофореза ДНК нет необходимости в концентрирующем геле (разд. 10.3.1), поскольку подвижность молекул ДНК гораздо выше в лунке, чем в геле, и поэтому все молекулы в течение нескольких минут после включения тока концентрируются на одной стороне лунке, образуя тонкую полосу в начале пробега. Гели общего назначения имеют размер 25 см в длину и 12 см в ширину и используются при градиенте напряжения ~1,5 В · $см^{-1}$ в течение ночи. Более высокое напряжение может вызвать слишком сильное нагревание. Для быстрого анализа, при котором нет необходимости в полном разделении молекул ДНК, применяют мини-гели — менее 10 см в длину. Таким способом можно получить информацию за 2–3 ч.

После того как пробег закончен, ДНК в геле необходимо покрасить и визуализировать. Наиболее распространенным реактивом для окрашивания является флуоресцентный краситель бромистый этидий. Гель осторожно промывают в растворе бромистого этидия (0,5 мкг·$см^{-3}$) и затем анализируют в ультрафиолетовом свете (на длине волны 300 нм). Бромистый этидий представляет собой циклическую плоскую молекулу, которая встраивается (интеркалирует) между стопками пар оснований ДНК (разд. 5.7.4). Следовательно, бромистый этидий концентрируется в полосах ДНК, и в ультрафиолетовом свете эти полосы флуоресцируют оранжево-красным цветом. Такое малое количество ДНК, как 10 нг, можно увидеть как полосу шириной 1 см. Следует отметить, что длительное наблюдение в ультрафиолетовом свете может привести к повреждению ДНК в виде надрезов (ников) или димеризации пар оснований. Таких последствий не возникает, если гель только бегло осматривают. Поэтому очевидно, что наблюдение должно сводиться к минимальному времени, если ДНК нужно извлекать из геля для дальнейшего анализа (см. ниже). Обязательно надо предохранять глаза, надевая защитные очки, когда используется ультрафиолетовый свет. Если осмотр геля занимает длительное время, надевают защитную маску, закрывающую все лицо, чтобы избежать ожога.

10.4.2 Гели для секвенирования ДНК

Электрофорез ДНК в агарозном геле чаще всего применяют в молекулярно-биологических исследованиях, а для определения первичной последовательности ДНК используют другие формы электрофореза. Какой бы ни применялся метод секвенирования ДНК (разд. 5.11), завершающий анализ обычно состоит в разделении одноцепочечных молекул ДНК размером менее тысячи нуклеотидов и различающихся в размере только на один нуклеотид. Для этого необходимо иметь гель с малыми порами,

и поэтому вместо агарозы используется акриламидный гель. Например, 3,5%-й полиакриламидный гель применяется для разделения ДНК размером 80–1000 нуклеотидов, а 12%-й гель — для разделения фрагментов ДНК размером от 20 до 100 нуклеотидов. Для больших фрагментов ДНК более подходит градиентный гель от 3,5% до 7,5%. Секвенирующие гели готовят в присутствии денатурирующих агентов, мочевины и формамида. Если разделяют молекулы ДНК очень малого размера, применяют длинные секвенирующие гели (100 см). Типичный гель для секвенирования ДНК представлен на рис. 5.38.

Как отмечено выше, электрофорез в агарозе может быть использован как препаративный метод для выделения ДНК. Интересующие полосы ДНК можно вырезать из геля и выделить ДНК: (а) электроэлюцией; (б) при размягчении кусочка геля в буфере и последующим центрифугированием; собирают супернатант; или (в) если используется легкоплавкая агароза — расплавлением кусочка геля и разведением его буфером. В каждом случае ДНК в итоге извлекают из супернатанта переосаждением из этанола.

10.4.3 Гель-электрофорез в пульсирующем поле

Описанные выше методы разделения в агарозных гелях пригодны для ДНК размером менее 60 т.п.о. После появления **гель-электрофореза в пульсирующем поле** (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis) и благодаря дальнейшим разработкам на его основе появилась возможность разделения фрагментов ДНК размером до $2 \cdot 10^3$ т.п.о. Следовательно, методом PFGE можно проводить разделение электрофорезом целой хромосомы. Метод представляет собой электрофорез в агарозе, когда на определенные периоды времени (например, 60 с) накладываются два электрических поля попеременно под различными углами. Первое электрическое поле заставляет кольцевые молекулы вытягиваться в горизонтальном направлении и начинать двигаться в геле. Остановка этого поля и приложение второго поля заставляет молекулу двигаться в новом направлении. Поскольку время релаксации молекулы зависит от ее длины (молекулы с длинной цепью испытывают конформационные изменения в электрическом поле), то чем меньше молекула, тем быстрее она выравнивается в новом поле и способна продолжать движение в геле. Большие молекулы выравниваются за более длительный период времени. Таким образом, при многократном изменении направления поля меньшие молекулы выстраиваются впереди длинных молекул и разделяются согласно размеру. Рисунок 10.15. демонстрирует разделение хромосом дрожжей размером от 260 до 850 т.п.о. Физические основы системы PFGE сложные, а появившиеся в последние годы различные разработки на той же основе привели к возникновению многих родственных методов. Детальное описание этих методов невозможно в рамках этой главы, но названия нескольких из них указывают на их основные принципы, например, **электрофорез в ортогональном переменном поле** (orthogonal field alternating gel electrophoresis, OFAGE), **электрофорез в инверсионном поле** (field inversion gel electrophoresis, FIGE),

электрофорез в поперечно-переменном поле (transverse alternating field gel electrophoresis, TAFE), **электрофорез в контролируемом гомогенном поле** (contour-clamped homogenous electric field electrophoresis, CHEF), **электрофорез во вращающемся поле** (rotating field electrophoresis, RFE).

10.4.4 Электрофорез РНК

Подобно электрофорезу ДНК, электрофорез РНК обычно проводится в агарозных гелях, и принцип разделения является таким же. Часто после

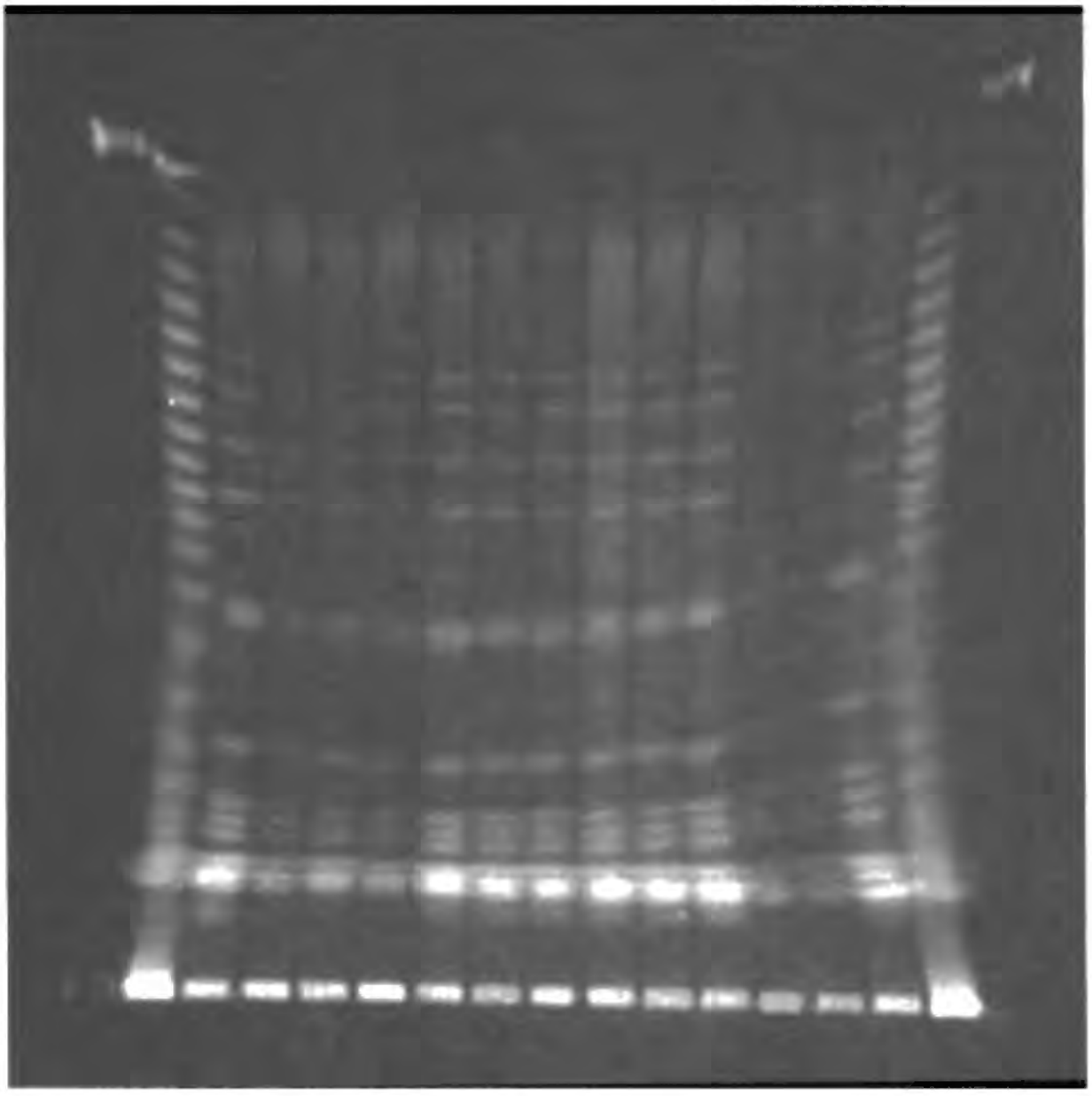


Рис. 10.15. CHEF-электрофорез ДНК дрожжей (образцы в нескольких повторах разгонялись в центральных 13 дорожках) и мультимеров бактериофага λ («лестницы» на двух внешних дорожках). Каждый шаг лестницы составляет примерно 43,5 т.п.о., и 20 шагов разделяет до 850 т.п.о. Хромосомы дрожжей имеют размеры 260, 290, 370, 460, 580/600, 700, 780, 820 и 850 т.п.о. (Любезно предоставлено Марджит Бурмейстер из Университета Мичигана)

выделения РНК немедленно требуется быстро определить ее целостность. Это может быть сделано с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле примерно в течение часа. Рибосомные РНК (18S и 28S) четко разделяются, и можно наблюдать любые признаки деградации (в виде размазанного пятна) или примесь ДНК. Однако если требуется большая разрешающая способность, используется акриламидный гель с маленькими порами, например, чтобы отделить транспортную РНК (4S) от 5S рибосомной РНК. Это может быть сделано в 2,5–5%-м акриламидном геле при пробеге в течение ночи. Оба эти метода используются для разделения нативной РНК. Почти всегда внутри молекулы РНК существуют вторичные структуры, образованные водородными связями (например, структура клеверного листа тРНК, рис. 5.6). Поэтому нативная РНК после электрофореза может быть окрашена и визуализирована в бромистом этидии. Однако, если целью исследования является определение размера РНК с помощью гель-электрофореза, необходима полная денатурация РНК, чтобы предотвратить образование водородных связей внутри или даже между полинуклеотидами, что влияет на электрофоретическую подвижность. Имеется три денатурирующих агента (формальдегид, глиоксаль и гидроксид метилртути), которые являются совместимыми как с РНК, так и с агарозой. Любое из этих веществ может быть включено в состав агарозного геля и электрофорезного буфера, а образец денатурируют нагреванием в присутствии денатурирующего агента до проведения электрофореза. После тепловой денатурации каждое из этих веществ образует продукты, соединенные с аминогруппами гуанина и урацила, таким образом предотвращается формирование водородных связей при комнатной температуре во время электрофореза. Денатурирующий гель необходимо также использовать в том случае, если планируется провести перенос и гибридизацию РНК (норзерн-блот, разд. 5.9.2), чтобы убедиться в наличии искомой последовательности нуклеотидов. Денатурированная РНК очень слабо окрашивается бромистым этидием, поэтому для визуализации РНК в денатурирующих гелях принято использовать акридиновый оранжевый. Однако следует отметить, что нередко применяют радиоактивно меченные РНК и определяют полосы авторадиографией. Пример электрофореза РНК показан на рис. 10.16.

10.5 КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Этот метод имеет разные названия: **высокоэффективный капиллярный электрофорез** (high performance gel electrophoresis, HPCE), **капиллярный зонный электрофорез** (capillary zone electrophoresis, CZE), **электрофорез в свободном растворе** (free solution capillary electrophoresis, FSCE) и **капиллярный электрофорез** (КЭ), но чаще всего говорят о капиллярном электрофорезе. Малый объем капилляра, когда для анализа расходуются только микролитры реагента и нанолитры образца, вместе с возможностью в реальном времени регистрировать менее фемтомоля (1 фмоль = 10^{-15} моль) образца, сделали капиллярный электрофорез ме-

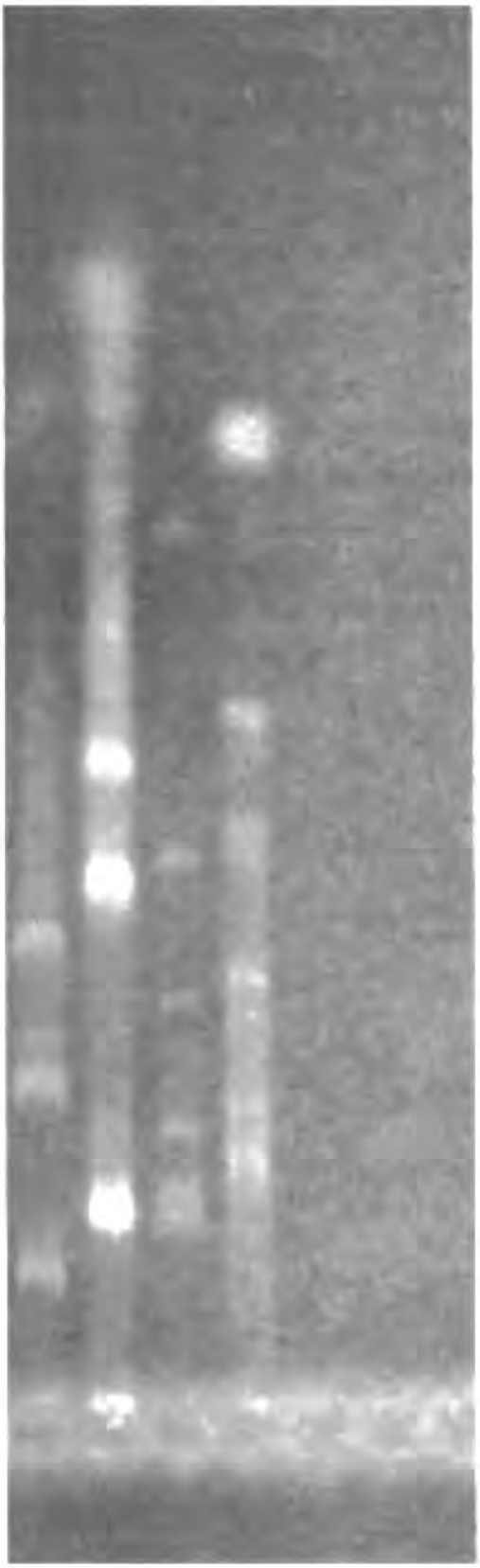


Рис. 10.16. Гель-электрофорез РНК в 1,4%-м агарозном геле. Дорожка 1 — РНК из табака до нанесения в гель, денатурированная глиоксалем. Дорожка 2 — тот же образец, но неденатурированный. Две быстро мигрирующие яркие полосы представляют собой 18S и 25S рибосомную РНК. Более медленно мигрирующая яркая полоса — ядерная ДНК. На дорожках 3 и 4 нанесена смесь фрагментов маркера РНК с (дорожка 3) или без (дорожка 4) обработки глиоксалем. Размеры фрагментов маркера РНК : 0,24, 1,4. 2,4, 4,4, 7,5 и 9,5 т.п.о. Отметьте, что денатурация приводит к снижению подвижности компонентов каждого образца. (Любезно предоставлено Дебби Куком и Робертом Слейтером из Университета Хертфордшира)

тодом выбора для множества биохимических и клинических исследований. Капиллярный электрофорез может быть использован для разделения широкого спектра биологических молекул, включая аминокислоты, пептиды, белки, фрагменты ДНК (например, синтетические олигонуклеотиды) и нуклеиновые кислоты, а также многие малые органические молекулы — лекарства или даже ионы металлов (см. ниже). Метод был успешно применен для разделения хиральных молекул (разд. 11.5.5).

Как видно из названия, капиллярный электрофорез представляет собой электрофорез образцов в трубках очень малого диаметра (обычно внутренний диаметр 50 мкм, внешний 300 мкм). Преимуществ использования капилляров является то, что устраняются проблемы, происходящие из-за нагревания. Малый диаметр трубки обеспечивает большое значение соотношения поверхности к объему, что способствует лучшему рассеиванию тепла. Это помогает устранять конвекционные потоки и препятствует уширению полос из-за усиления диффузии, вызываемой повышением температуры. Поэтому нет необходимости применения в трубке стабилизирующей среды, и можно проводить электрофорез в свободном потоке.

Принцип КЭ основан на двух важных уравнениях:

$$t = \frac{L^2}{\mu V} \tag{10.4}$$

где t — время миграции растворенного вещества, L — длина трубки, μ — электрофоретическая подвижность растворенного вещества, V — приложенное напряжение.

Эффективность разделения в терминах общего числа теоретических тарелок, N, определяется уравнением:

$$N = \frac{\mu V}{2D} \tag{10.5}$$

где D — коэффициент диффузии растворенного вещества.

Из этих уравнений можно увидеть, что, во-первых, длина колонки не влияет на эффективность разделения, но влияет на время миграции и, следовательно, на время анализа, и, во-вторых, разделения с высокой степенью эффективности можно достичь при использовании высокого напряжения (μ и D определяются природой растворенного вещества, т. е. трудноуправляемы).

Поэтому оказывается, что лучше всего к возможно меньшего размера трубке прикладывать наибольшее возможное напряжение. Однако на практике для этих условий существуют ограничения. При уменьшении длины капилляра количество тепла, которое должно быть рассеяно, увеличивается из-за уменьшения электрического сопротивления капилляра. В то же время площадь поверхности, рассеивающая тепло, уменьшается. Поэтому в очень коротких трубках происходит слишком значительное повышение температуры. Кроме того, чем выше прилагаемое напряжение, тем больше ток, и, следовательно, больше тепла производится. Таким образом, следует найти компромисс между напря-

жением и длиной капилляра. Наиболее часто применяется напряжение 10–15 кВ к трубкам длиной 50–100 см.

На рис. 10.17 представлена схема аппарата для КЭ. Небольшая порция раствора образца (обычно 5–30 мкм^3) вносится в анодный конец капиллярной трубки из плавленого кварца, содержащей соответствующий буфер. Ввод пробы осуществляется одним из двух способов: инжекцией при высоком напряжении или инжекцией под давлением.

- *Инжекция при высоком напряжении.* При выключенном напряжении резервуар буфера у положительного электрода заменяют емкостью с пробой, и вносят в капилляр порцию пробы (например, 5–30 мкм^3 раствора с концентрацией 1 мг·см$^{-3}$) при помощи краткого включения высокого напряжения. Резервуар с пробой затем удаляют, ставят на его место резервуар с буфером, снова включают высокое напряжение и начинают разделение.
- *Инжекция под давлением.* Капилляр вынимают из резервуара с анодным буфером и опускают через воздухо-непроницаемое уплотнение в раствор с пробой. Через вторую трубку в этом растворе создается давление, которое вносит пробу в капилляр. Капилляр затем извлекают, помещают в анодный буфер, включают напряжение и начинают электрофорез.

Затем на капиллярную трубку накладывают высокое напряжение (до 50 кВ), так что молекулы образца начинают двигаться с различными скоростями вдоль капиллярной трубки. Электрофоретическая миграция в рас-

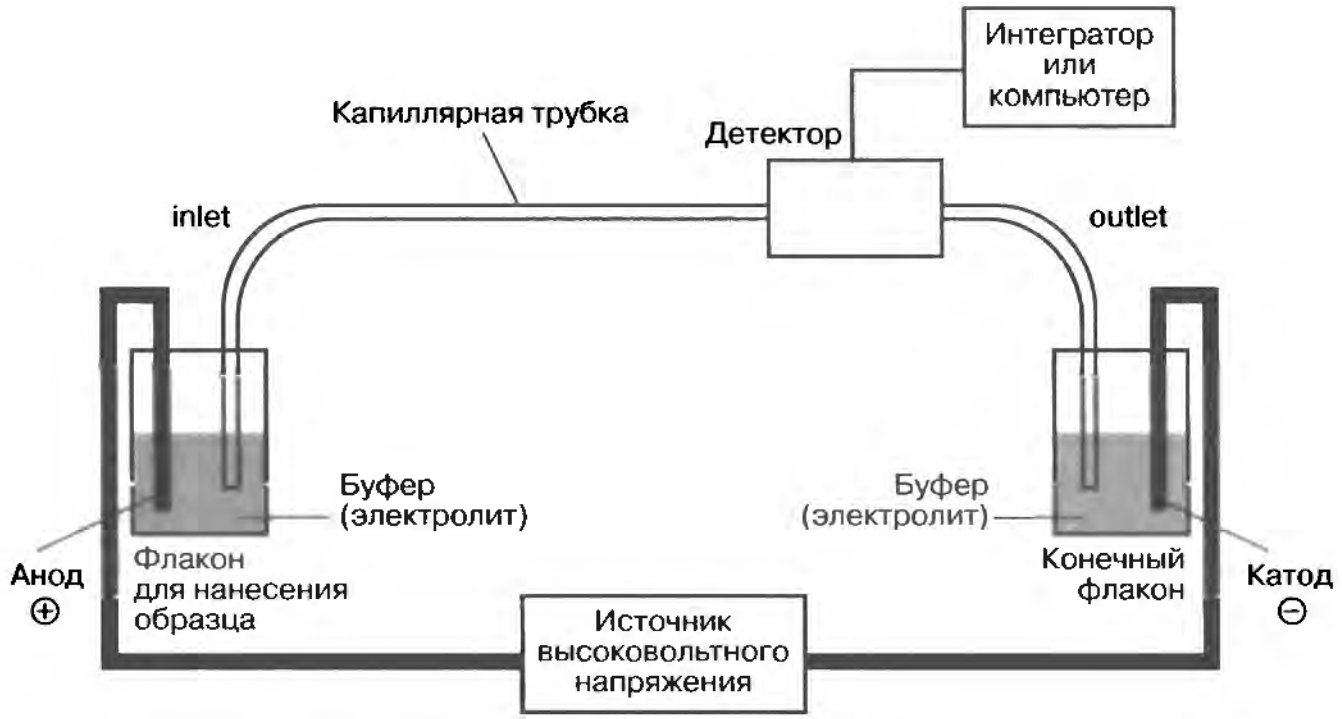


Рис. 10.17. Схема аппарата для капиллярного электрофореза

творе представляет собой движение заряженных молекул в направлении к противоположно заряженному электроду. При электрофорезе отрицательно и положительно заряженные молекулы образца движутся с различными скоростями. Однако, хотя аналиты разделяются с помощью электрофоретической миграции, все они притягиваются к катоду под действием электроэндоосмоса (разд. 10.1). Поскольку этот поток является довольно сильным и скорость электроэндоосмотического потока обычно гораздо выше, чем электрофоретическая скорость аналитов, все ионы независимо от знака заряда и нейтральные молекулы доставляются к катоду. Положительно заряженные молекулы достигают катода первыми, поскольку направление электрофоретической миграции совпадает с направлением потока электроэндоосмоса и заставляет их двигаться быстрее. Как только разделяемые молекулы приближаются к катоду, они проходят через окно наблюдения и детектируются ультрафиолетовым монитором, переносящим сигнал к записывающему устройству, интегратору или компьютеру. Обычное время пробега составляет от 10 до 30 мин. Типичные результаты капиллярного электрофореза представлены на рис. 10.18.

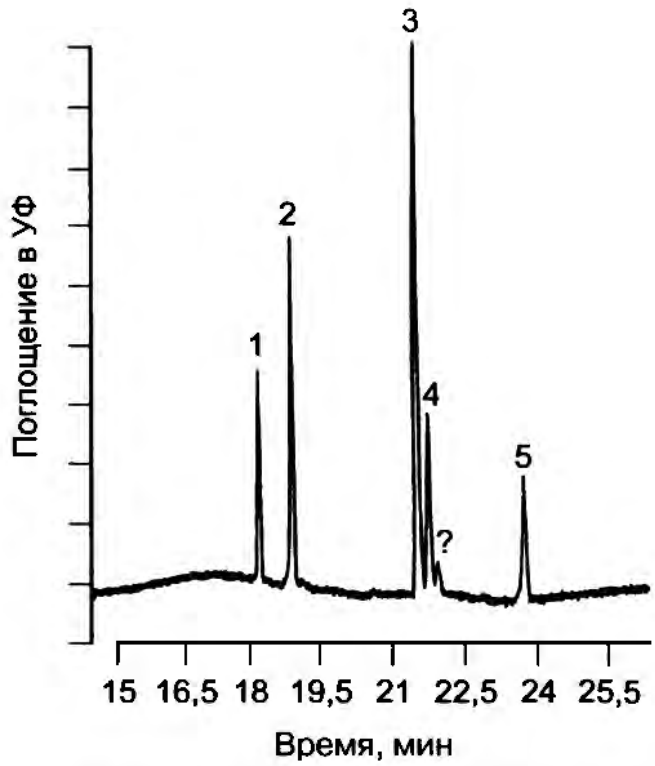


Рис. 10.18. Капиллярный электрофорез пяти родственных по структуре пептидов. Длина колонки 100 см, напряжение 50 кВ. Пептиды детектировали по поглощению в ультрафиолетовом свете при 200 нм

	Пептид
1	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
2	Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
3	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
4	Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
5	Ile-Ser-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Печатается с любезного разрешения Патрика Камиллери и Джорджа Окафо, GSK Ltd.

Метод капиллярного электрофоретического разделения в свободном потоке наиболее простой и наиболее широко применяемый на практике. Однако хотя образование ионизированных групп на стенках капилляра выгодно из-за появления электроэндоосмотического потока, в некоторых случаях это мешает. Например, может происходить адсорбция белка на стенках капилляра в результате связывания катионных групп белка с ионизированными силанольными группами. Это может привести к размазыванию белка при прохождении через капилляр (что выглядит в виде уширения пика) или даже к полной потере белка из-за его налипания на стенках. Некоторые исследователи поэтому применяют трубки с покрытием, в которых силанольные группы блокированы нейтральными группами. Таким образом, конечно, устраняется и электроэндоосмотический поток. Поэтому во время электрофореза в таких капиллярах нейтральные молекулы белка остаются неподвижными, тогда как кислые мигрируют к аноду, а основные — к катоду. Поскольку детектирование обычно происходит только на одном конце капилляра, во время анализа с использованием такого капилляра будут определяться молекулы белка только с одним типом зарядов.

Существует также ряд вариаций этой техники. Например, из вышесказанного видно, что в обычном КЭ нейтральные молекулы не разделяются, а скорее мигрируют в виде одной полосы. Однако разделение нейтральных молекул может быть достигнуто, если включить в состав буфера такое поверхностно-активное вещество, как SDS. При достижении определенной концентрации поверхностно-активного вещества его молекулы образуют мицеллы, которые под влиянием приложенного электрического поля будут мигрировать в направлении соответствующего электрода. Растворенные вещества захватываются мицеллами и двигаются вместе с ними. Если растворенное вещество активно включается в мицеллы, оно достигнет детектора позднее, чем то, которое хуже захватывается. Этот метод известен как **мицеллярный электрокинетический капиллярный электрофорез** (MECC, micellular electrokinetic capillary chromatography). Поскольку растворенные вещества ионной природы также будут мигрировать в приложенном поле, разделение с помощью MECC происходит благодаря сочетанию принципов электрофореза и хроматографии.

Ранние работы в области КЭ были сосредоточены на разделении пептидов и белков, но в последние годы КЭ успешно применялся для разделения ряда других молекул. Ниже предоставлены несколько примеров.

- Ранее анализ пептидов выполнялся с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенными фазами, при которой разделение основано на различной гидрофобности пептидов. Разделение пептидов в настоящее время также осуществляется и является особенно полезным, например, как средство контроля качества (чистоты) пептидов и белков, полученных с помощью препаративной ВЭЖХ. На рисунке 10.18 продемонстрировано разделение пептидов с очень сходными структурами.

- В некоторых случаях необходимы синтетические олигодезоксирибонуклеотиды высокой степени очистки, например, для использования в качестве зондов для гибридизации в диагностике и в экспериментах по клонированию генов, в качестве праймеров для определения первичной последовательности ДНК и в полимеразной цепной реакции (ПЦР), в направленном мутагенезе и для «антисмысловой» терапии. КЭ является быстрым методом анализа чистоты таких образцов. Например, анализ 18-членного антисмыслового олигонуклеотида, содержащего примесь фрагментов (от 8- до 17-членников), может быть выполнен всего лишь за 5 мин.
- Точечные мутации в ДНК, которые встречаются, например, при некоторых заболеваниях человека, могут быть идентифицированы методом КЭ.
- КЭ может быть использован для количественного определения ДНК. Например, анализ продуктов ПЦР из вируса HIV-I с помощью КЭ позволяет идентифицировать в сыворотке крови от 200 000 до 500 000 вирусных частиц/см^3 сыворотки.
- Используя КЭ, могут быть разделены хиральные компоненты. В основном работа выполняется в растворе с циклодекстринами в качестве хиральных селекторов.
- Ряд малых молекул, лекарств и продуктов обмена веществ могут быть определены в таких физиологических жидкостях, как моча и сыворотка крови. В них находятся аминокислоты (в моче обнаружено более 50), нуклеотиды, нуклеозиды, основания, анионы, такие как хлориды и сульфаты (в плазме крови человека можно раздельно определить NO_2^- и NO_3^-) и катионы, такие как Ca^{2+} и Fe^{3+}.

10.6 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА МИКРОЧИПАХ

Дальнейшая миниатюризация систем электрофореза привела к развитию **электрофореза на микрочипе**, который обладает многими преимуществами по сравнению с традиционными методами, позволяя осуществлять быстрый анализ очень малых количеств образцов. Например, анализ на микрочипах часто может быть завершен за десятки секунд, тогда как **капиллярный электрофорез** продолжается 20 мин, а стандартный гель-электрофорез по меньшей мере 2 ч. Используя новые системы детектирования, такие как индуцированная лазером флуоресценция, может быть достигнута чувствительность от пикомолей до аттомолей (10^{-18} молей), что по меньшей мере на два порядка величины больше, чем чувствительность стандартного электрофореза. Системы детектирования нефлуоресцирующих молекул включают электрохимические детекторы (разд. 11.3.3), **импульсную амперометрическую детекцию** (pulsed amperometric detection, PAD) и **циклическую вольтамперометрию**. Все эти методы детектирования, обладающие высокой чувствительностью, подходят для миниатюризации, очень недорого стоят и совместимы с передовыми технологиями микрообработки и микропроизводства (см. ниже). И наконец, приложенное напряжение составляет лишь несколько вольт, что устраняет необходимость в высоком напряжении, как в случае КЭ.

Производство микрочипов относится к микротехнологиям. Выполняют гравировку точных и воспроизводимых каналов, напоминающих капилляры (обычно 50 мкм шириной и 10 мкм глубиной — немного тоньше человеческого волоса), на поверхности листа кварца, стекла или пластика. Затем второй лист наплавляют поверх первого листа, в результате образуются закрытые микроскопические каналы. Конец каждого канала присоединен к резервуару, через который поступают и удаляются жидкости. Обычно размеры чипов очень малы — не более 2 $см^2$. По существу микрочип представляет собой электрофоретическую систему, подобную КЭ, но гораздо более гибкую.

Последние разработки в этой области связаны с интеграцией в микрочипе других функций, кроме функции разделения. Выделение образцов, предварительное концентрирование образцов до разделения, амплификация образцов ДНК с помощью ПЦР при использовании нагревания под действием инфракрасного света для быстрой амплификации на чипе, а также выделение разделенных молекул с использованием твердофазных носителей — все это примеры того, как в электрофоретическую систему микрочипа интегрируются дополнительные функции. Был также разработан метод, сочетающий в себе электрофорез на микрочипах с масс-спектрометрией, с помощью которого удается разделять (электрофорез на микрочипе) и анализировать (масс-спектрометрия) лекарственные вещества.

10.7 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

ALTRIA, K.D. (1996). *Capillary Electrophoresis Guide Book*. Humana Press, Totowa, NJ. Детальное описание теории и практических аспектов анализа белков, нуклеиновых кислот и метаболитов.

HAMES, B.D. and RICKWOOD, D. (2002). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3rd edn. Oxford University Press, Oxford. Детальное описание теории и практических аспектов электрофореза белков.

WALKER, J.M. (2002). *The Protein Handbook*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, NJ. Детальное описание теории и лабораторные протоколы различных электрофоретических методов.

Глава 11
Хроматографические методы

11.1 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ

11.1.1 Коэффициент распределения

Русский ботаник Михаил Цвет разработал оригинальный метод разделения веществ, который теперь известен как один из методов хроматографии. В 1903 г. он сообщил об успешном разделении смеси растительных пигментов на колонке с карбонатом кальция. Он первым показал, что хлорофилл не индивидуальное химическое соединение. Современные методы хроматографии очень разнообразны, большинство из них можно автоматизировать и адаптировать для выделения и очистки больших или очень малых количеств вещества.

В основе любого метода хроматографии — распределение анализируемого вещества между двумя несмешивающимися фазами, которое описывается **коэффициентом распределения** (K_d). Для двух фаз A и B коэффициент распределения при заданной температуре является величиной постоянной и выражается уравнением:

$$\frac{\text{концентрация в фазе A}}{\text{концентрация в фазе B}} = K_d \qquad (11.1)$$

Под **эффективным коэффициентом распределения** понимают общее количество (а не концентрацию) анализируемого вещества в одной фазе по отношению к его количеству в другой фазе. Этот параметр равен произведению коэффициента распределения на отношение объемов двух фаз. Если коэффициент распределения вещества между фазами A и B равен 1 и если это вещество распределено между 10 см^3 фазы A и 1 см^3 фазы B, его концентрация в обеих фазах одинакова, но общее содержание в фазе A в 10 раз превосходит его содержание в фазе B.

В любой хроматографической системе есть неподвижная (стационарная) фаза (это может быть твердый носитель, гель, жидкость или смесь твердого вещества и жидкости) и подвижная фаза, которая может быть жидкой или газообразной и которая проникает сквозь неподвижную фазу после нанесения на нее разделяемой смеси. В ходе хроматографии вещества кон-

тактируют с обеими фазами и различия в коэффициентах распределения веществ приводят к их разделению.

11.1.2 Колоночная и тонкослойная хроматография

Существует два варианта проведения хроматографического разделения.

- В *колоночной хроматографии* стационарная фаза находится в стеклянной или металлической колонке. Смесь анализируемых веществ наносят на колонку и начинают пропускать через колонку подвижную фазу, которую принято называть **элюентом**. Подвижная фаза движется либо самопроизвольно, либо подается с помощью насоса или приложенного давления газа. Для аналитических целей в биохимии именно такой вариант хроматографии используется наиболее часто. Стационарная фаза может быть нанесена либо на твердое достаточно дисперсное вещество в виде небольших гранул — и называется упаковкой колонки, либо в виде тонкой пленки на внутреннюю стенку колонки. По мере продвижения элюента через колонку анализируемые вещества разделяются в зависимости от их коэффициентов распределения и выходят с колонки как раствор в **элюате**.
- В *тонкослойной хроматографии* стационарная фаза на подходящей матрице покрывает тонким слоем пластинку из стекла, пластика или металлической фольги. Анализируемую смесь наносят в виде пятна или полосы на край пластинки. Затем в пластинке, находящейся в горизонтальном или вертикальном положении, начинает поступать под действием капиллярных сил подвижная жидкая фаза, заставляя вещества мигрировать к противоположному краю пластинки с характерной для каждого вещества скоростью. Преимущество такого метода перед колоночной хроматографией состоит в возможности анализировать сразу несколько образцов. Хроматография в плоскости очень простой метод в исполнении, но для многих целей ее полностью вытеснила высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ или HPLC — high performance liquid chromatography). Тем не менее данный метод продолжает широко использоваться для пептидного картирования и анализа натуральных продуктов.

Принципы колоночной хроматографии

Проиллюстрируем принцип колоночной хроматографии на примере колонки с твердой гранулированной стационарной фазой высотой 5 см и подвижной жидкой фазой, 1 см^3 которой занимает столбик колонки высотой 1 см (рис. 11.1). Допустим, что на колонку наносят 32 мкл анализируемого вещества в 1 см^3 подвижной фазы; как только этот объем подвижной фазы займет на колонке положение A, 1 см^3 жидкой фазы выйдет из нижней части колонки. Если анализируемое вещество имеет коэффициент распределения 1, оно в одинаковой концентрации распределяется между твердой и подвижной фазами (стадия 1). Когда на колонку подается еще 1 см^3 подвижной фазы, подвижная фаза из положения A сместится в положение B, продвигая

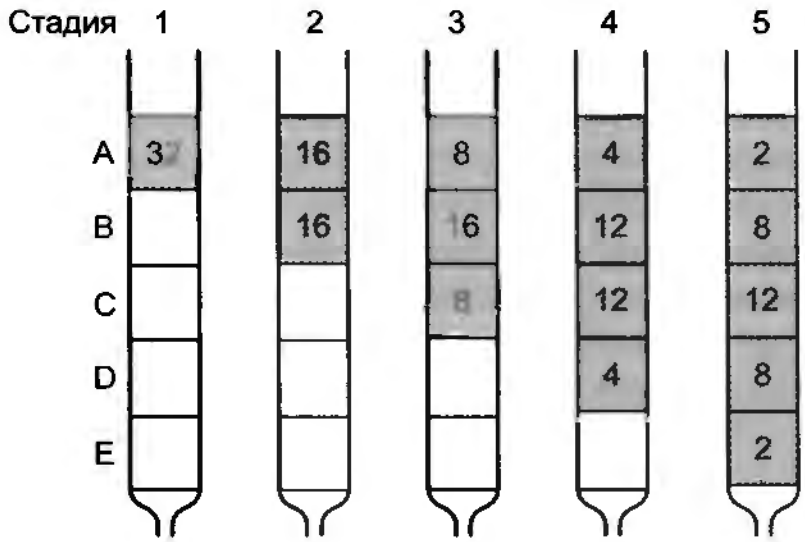


Рис. 11.1. Принцип хроматографического разделения на колонке

вместе с собой 16 мкл анализируемого вещества до положения А (стадия 2). Далее в положениях А и В происходит перераспределение анализируемого вещества, в результате 8 мкл этого вещества будет находиться в жидкой фазе и столько же в стационарной фазе. При нанесении на колонку следующего объема 1 см^3 подвижной фазы жидкость из положения А перемещается в положение В, а из В — в С с соответствующим перераспределением анализируемого вещества (стадия 3). Дальнейшее добавление подвижной фазы приведет последовательно к распределению, соответствующему стадиям 4 и 5. В подобном идеализированном варианте после нескольких перераспределений анализируемое вещество занимает симметричное положение в колонке. Очевидно, что при разделении на колонке двух веществ с коэффициентами распределения 1 и 100 они образуют две четко различимые полосы. В реальности по мере продвижения по колонке подвижной фазы происходит переход через множество равновесных состояний, поскольку подвижная фаза подается на колонку постоянно. В результате каждое вещество из разделяемой смеси выходит с колонки в виде отдельного пика.

Основные элементы колоночной хроматографии

Типичная колоночная хроматографическая система, где используется в качестве подвижной фазы газ или жидкость, состоит из следующих элементов:

- *Стационарная фаза* должна выбираться в зависимости от природы разделяемых веществ.
- *Колонки* **обычного типа** заполнены (упакованы) носителем, на который нанесена стационарная фаза; в **микроколонках** стационарная фаза наносится непосредственно на внутреннюю поверхность стенки.
- *Подвижная фаза и система ее подачи* выбираются в зависимости от природы стационарной фазы; все это служит одной цели — созданию условий для наилучшего разделения компонентов анализируемой смеси; подвижная фаза подается на колонку с постоянной скоростью.

- *Инжектор* служит для воспроизводимого введения образцов в верхнюю часть колонки.
- *Детектор и самописец* осуществляют постоянную регистрацию (детектирование) анализируемых веществ в элюате по мере их выхода с колонки. Детектирование обычно основано на измерении таких физических параметров, как поглощение света в видимой или ультрафиолетовой области или на измерении интенсивности флуоресценции.
- *Коллектор фракций* необходим для сбора отдельных фракций с целью их дальнейшего анализа.

Жидкостная колоночная хроматография подразделяется на несколько типов в зависимости от давления в колонке в процессе разделения. При **жидкостной хроматографии низкого давления** (low pressure liquid chromatography, LPLC) создается давление менее 5 бар (1 бар = 0,1 МПа), поскольку из-за физических свойств стационарной фазы создается лишь слабое сопротивление потоку элюента. В эту же категорию попадает газожидкостная хроматография. При **жидкостной хроматографии среднего давления** (medium pressure liquid chromatography, MPLC) создается давления от 6 до 50 бар, а при **жидкостной хроматографии высокого давления** (high pressure liquid chromatography, HPLC) выше 50 бар. На практике трудно провести границу между методами MPLC и HPLC, а соответствующие приборы и процедуры проведения этих анализов практически идентичны. Оба метода дают прекрасное разрешение, поэтому термин **высокоэффективная жидкостная хроматография** (ВЭЖХ, high performance liquid chromatography) является для них более предпочтительным и позволяет избежать ошибочного представления, что именно высокое давление является главной причиной высокой эффективности разделения.

11.1.3 Выбор стационарной и подвижной фаз

Успех хроматографического разделения зависит от правильного выбора стационарной и подвижной фаз, в которых компоненты образца имели бы различные коэффициенты распределения. При этом разделение может быть основано на разных типах равновесия.

- *Равновесная адсорбция* устанавливается между твердой стационарной фазой и жидкой подвижной фазой (**адсорбционная хроматография**, **гидрофобная хроматография**).
- *Равновесное распределение* возможно между жидкой стационарной фазой и жидкой или газообразной подвижной фазой (**распределительная хроматография**, **перфузионная хроматография**, **ион-парная хроматография**, **хиральная хроматография**, **газо-жидкостная хроматография**).
- *Ионообменное равновесие* устанавливается между твердой ионообменной стационарной фазой и жидким электролитом в качестве подвижной фазы (**ионообменная хроматография**, **хроматофокусирование**, **мембранная хроматография**).

- *Эксклюзионное равновесие* устанавливается между жидкой фазой, захватываемой порами стационарной пористой матрицы, и той же самой жидкой подвижной фазой (**эксклюзионная хроматография**, или гель-фильтрация).
- *Равновесное связывание* наблюдается между иммобилизованным лигандом и жидкой подвижной фазой (**аффинная хроматография**, **иммуноаффинная хроматография**, **аффинная хроматография на колонках с лектинами**, **металл-хелатная хроматография**, **хроматография с красителями в качестве лигандов**, **ковалентная хроматография**).

На практике в процессе разделения часто одновременно реализуются два или несколько из перечисленных выше равновесий.

11.1.4 Режимы хроматографических процессов

Процесс хроматографии анализируемого образца связан с разделением вещества в стационарной фазе после его нанесения на колонку вместе с подвижной фазой. Хроматографические процессы могут осуществляться в различных режимах.

- В *проявительной (элюентной) хроматографии* разделение вещества основано на различии коэффициентов распределения между стационарной и подвижной фазами. Образец растворяют в подходящем растворителе и наносят на колонку в виде узкой полосы. После этого на колонку подается подвижная фаза — смесь органических растворителей и водных буферных систем; при проходе через колонку в стационарной фазе происходит постепенное разделение веществ и их выход с колонки. Если состав подвижной фазы не меняется на протяжении хроматографического разделения, такой процесс называют **изократическим элюированием**. Однако для улучшения разделения состав подвижной фазы можно изменять, например, изменяя значение pH, концентрацию соли или полярность. Такой процесс называют **градиентным элюированием**. Состав подвижной фазы меняют постепенно или скачкообразно. Успешное проведение проявительной хроматографии приводит к выходу в чистом виде всех компонентов образца. Это наиболее распространенный вариант хроматографического разделения.
- В *вытеснительном* или *аффинном варианте* хроматографии анализируемые вещества из образца разделяются из-за различий их сродства к стационарной фазе. Образец растворяют в подходящем растворителе и наносят на колонку в виде отдельной полосы. Вещество связывается со стационарной фазой в соответствии с константой равновесия реакции между этим веществом и стационарной фазой, которая и характеризует сродство. Затем вещества последовательно смывают с колонки с помощью подвижной фазы, содержащей специфическое вещество, сродство которого к стационарной фазе выше, чем у всех веществ в составе образца. Таким образом, по мере добавления подвижной фазы это вещество

в результате конкуренции начинает вытеснять все остальные вещества из стационарной фазы, сдвигая их вниз колонки, где они вновь связываются, смываются и т. д. до тех пор, пока окончательно не будут вымыты с колонки. Первыми в таком варианте хроматографии с колонки сходят вещества с наименьшим сродством к стационарной фазе.

- При *фронтальном варианте* хроматографии образец непрерывно наносят на колонку, сдвигая тем самым компоненты образца вдоль стационарной фазы в зависимости от их сродства к ней. Вещество с наименьшим сродством накапливается на границе полосы движущегося образца и его можно выделить в чистом виде, в отличие от всех других компонентов образца. На практике такой подход используют исключительно для отделения из почти чистого образца единственной содержащейся в нем примеси.

11.2 ПАРАМЕТРЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

11.2.1 Введение

Успех хроматографического разделения смеси веществ определяется правильным выбором метода и экспериментальных условий разделения. Оптимизация экспериментальных условий требует понимания сути процессов, происходящих при проведении хроматографии, а также расчета ряда экспериментальных параметров, характеризующих поведение каждого компонента в разделяемой смеси.

В ходе любой хроматографии на поведение разделяемых веществ и, следовательно, на качество разделения влияют два типа процессов. Во-первых, это те процессы, которые лежат в основе разделения, — адсорбция, распределение, ионный обмен, образование ионных пар и вытеснение. Эти процессы зависят от кинетических и термодинамических факторов, определяющих взаимодействие компонентов смеси со стационарной фазой. Во-вторых, другие процессы, такие как **диффузия**, которые мешают разделению и приводят к неидеальному поведению разделяемых веществ, в результате чего наблюдается уширение и асимметрия хроматографических пиков (полос). Цель исследователя состоит в минимизации влияния этого второго типа процессов.

11.2.2 Время удерживания и объем элюирования

Хроматограмма представляет собой запись ответа детектора как функцию **объема элюирования** или **времени удерживания**. Она выглядит как серия пиков или полос, идеально симметричных по форме, каждый пик соответствуют элюированию отдельного компонента (рис. 11.2). Время удерживания (t_R) каждого вещества складывается из двух компонентов. Первый компонент — это время, за которое молекулы анализируемого вещества проходят свободное пространство между частицами матрицы, покрытыми стационарной фазой. Это время называют **мертвым временем** (t_M). Объем свободного пространства колонки называют **объемом пустот**

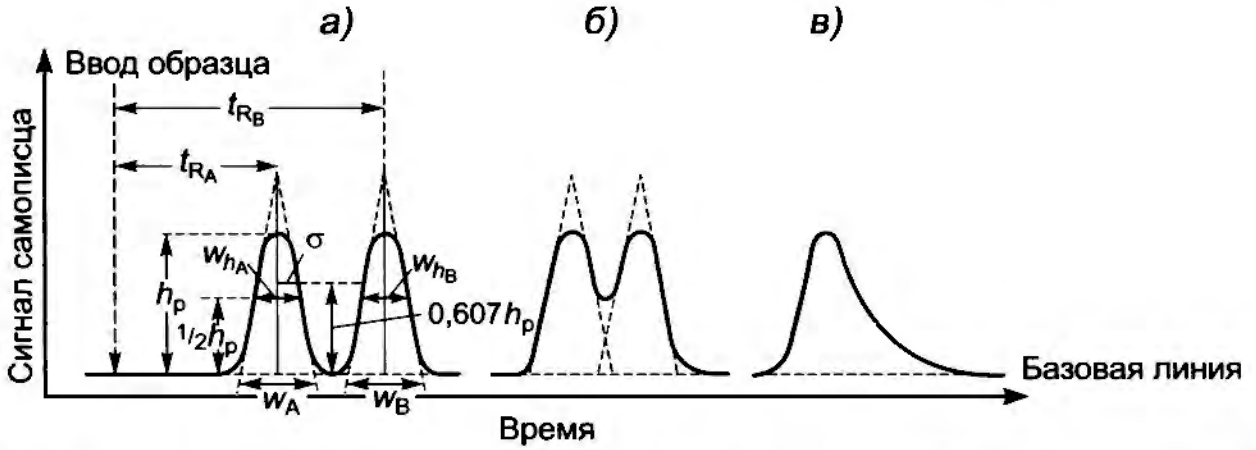


Рис. 11.2. Хроматографическое разделение двух веществ с полным разделением пиков и расчет времен удерживания (*а*); неполное разделение двух веществ (пики частично сливаются) (*б*); асимметрия хроматографического пика (*в*)

(V_o). Значение t_M одинаково для всех веществ в смеси и может быть найдено с помощью вещества, которое не взаимодействует со стационарной фазой, а во время прохождения через колонку находится в подвижной фазе. Второй компонент времени удерживания — это время, на протяжении которого анализируемое вещество удерживается стационарной фазой; его называют **приведенным временем удерживания** (t_R'). Этот характеристический параметр вещества определяется по разности наблюдаемого времени удерживания и мертвого времени:

$$t_R' = t_R - t_M \qquad (11.2)$$

На практике время удерживания анализируемого вещества t_R' или t_R часто относят к внутреннему или внешнему стандарту (разд. 11.2.5). В таких случаях рассчитывают **относительное время удерживания**. Эта величина является просто отношением времени удерживания вещества ко времени удерживания стандарта.

11.2.3 Коэффициент емкости

Одним из наиболее важных параметров в хроматографии является **коэффициент емкости** k', иначе называемый **коэффициентом удерживания**. Этот параметр представляет собой дополнительное время, которое требуется для элюирования анализируемого вещества по сравнению со временем элюирования не удерживаемого на колонке вещества (для которого, по определению, $k' = 0$):

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M} \qquad (11.3)$$

Видно, что если анализируемое вещество проводит в стационарной и подвижной фазе одинаковое время, его t_R равно $2t_M$ и $k' = 1$, а если оно проводит в стационарной фазе в четыре раза больше времени, чем в подвижной фазе, $t_R = 5t_M$ и $k' = (5t_M - t_M)/t_M = 4$. Обратите внимание, что коэффициент емкости не имеет размерности.

Если вещество имеет $k' = 4$, значит, в любой точке внутри колонки в любой момент времени его содержание в стационарной фазе в четыре раза выше, чем в подвижной фазе. Отсюда следует, что коэффициент емкости связан с коэффициентом распределения вещества (уравнение 11.1), который, по определению, представляет собой отношение концентраций вещества в двух фазах. Поскольку концентрация и количество вещества связаны между собой через объем, можно записать:

$$k' = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{M_S}{M_M} = K_d \cdot \frac{V_S}{V_M} \qquad (11.4)$$

где M_S — масса вещества в стационарной фазе, M_M — его масса в подвижной фазе, V_S — объем стационарной фазы, а V_M — объем подвижной фазы (индексы S и M обозначают стационарную и подвижную фазы; *от англ.* stationary и mobile).

Отношение V_S/V_M называют **фазовым отношением** (β). Можно записать, что

$$k' = K_d\beta \qquad (11.5)$$

Таким образом, коэффициент емкости для анализируемого вещества возрастает с увеличением как коэффициента распределения между двумя фазами, так и объема стационарной фазы. Значения коэффициентов емкости обычно лежат в диапазоне от 1 до 10. Этот параметр важен по той причине, что он не зависит от физических размеров колонки и скорости потока подвижной фазы. Следовательно, его можно использовать для сравнения поведения анализируемого вещества в различных хроматографических системах. Кроме того, он отражает селективность системы, которая в свою очередь является мерой способности дискриминировать два анализируемых вещества. Эта величина называется **фактором селективности** (или просто **селективностью**) α, который представляет собой отношение приведенных времен удерживания для двух веществ:

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{K_{dA}}{K_{dB}} = \frac{t'_{RA}}{t'_{RB}} \qquad (11.6)$$

Селективность зависит от химической природы стационарной и подвижной фаз. Некоторые хроматографические методы по своей сути являются высокоселективными; в качестве примеров можно назвать аффинную хроматографию (разд. 11.8) и хиральную хроматографию (разд. 11.5.5).

11.2.4 Высота теоретической тарелки и разрешение

Высота теоретической тарелки

Хроматографическую колонку рассматривают как набор прилежащих друг к другу зон, в каждой из них возможно (достаточно места) для установления полного равновесия анализируемого вещества между двумя фазами. Каждую такую зону называют **теоретической тарелкой**, а их общее число обозначают буквой N. Длина колонки, соответствующая одной теоретической тарелке, называется **высотой теоретической тарелки** (H); высота

тарелки измеряется в единицах длины, обычно в микрометрах. Для любой колонки следует указывать N и H каждого анализируемого вещества. Высота тарелки связана с шириной пика вещества (рис. 11.3), выраженной через стандартное отклонение σ, и расстоянием x, пройденным веществом в колонке:

$$H = \frac{\sigma^2}{x} \tag{11.7}$$

Для симметричных пиков, подчиняющихся распределению Гаусса, ширина основания пика w равна 4σ, а ширина в точке перегиба w_i — 2σ. Следовательно, значение H можно найти из хроматограммы, определив ширину пика. Число теоретических тарелок во всей колонке длиной L равно:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} \tag{11.8}$$

Если для выходящего с колонки пика $x = L$, то с учетом того, что ширина пика в основании (w), найденная путем проведения касательных к наиболее крутым участкам пика, равна 4σ (это основное свойство всех пиков, подчиняющихся распределению Гаусса), следовательно, $\sigma = w/4$ и уравнение 11.8 можно переписать в виде:

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{16L^2}{w^2} \tag{11.9}$$

Если L и w рассчитаны не в единицах длины, а в единицах времени, то уравнение 11.9 примет вид:

$$N = 16(t_R/w)^2 \tag{11.10а}$$

Параметр N можно выразить не только через ширину основания пика, но и через ширину пика на половине его высоты ($w_{1/2}$). Такой подход имеет

Рис. 11.3. Связь между числом теоретических тарелок (N) и формой пика

практическое преимущество, поскольку ширину пика на половине высоты легче измерить.

$$N = 5{,}54(t_R/w_{1/2})^2 \qquad (11.10б)$$

Уравнения 11.9 и 11.10а,б предлагают альтернативные пути для расчета **эффективности** колонки, выраженной в теоретических тарелках. Для эффективной колонки безразмерный параметр N меняется от 50 000 до 100 000, а соответствующее значение H составляет лишь несколько микрометров. Чем меньше высота тарелки (чем больше значение N), тем более узкий пик анализируемого вещества на хроматограмме (рис. 11.3).

Уширение пика

Целый ряд процессов мешают образованию узкого пика вещества, повышая тем самым высоту теоретической тарелки.

- *Нанесение образца на колонку* занимает определенное время, так что часть образца уже начинает двигаться, пока наносят оставшуюся часть. Нанесенная первой часть образца будет выходить в первой части пика.
- *Продольная диффузия*. В соответствии с законом Фика вещество диффундирует из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией со скоростью, которая определяется разностью концентраций в двух областях и коэффициентом диффузии вещества (P). В результате вещество будет стремиться диффундировать из центра пика к его краям, тем самым приводя к уширению пика.
- *Неоднородность потока подвижной фазы*. Случайная укладка заполняющих колонку частиц приводит к тому, что для подвижной фазы и содержащихся в ней анализируемых веществ возникает множество путей перемещения. Эти пути различаются по длине и, следовательно, по времени элюирования. Чем меньше размер частиц, тем менее значима данная проблема, а в полых (открытых) капиллярных колонках такое явление полностью отсутствует. Это одна из причин, почему такие колонки характеризуются меньшими временами элюирования и лучшим разрешением, чем набивные колонки.
- *Кинетика массообмена*. Каждому веществу в образце для равновесного распределения между стационарной и подвижной фазами по мере продвижения по колонке необходимо определенное время. Как следует из определения коэффициента распределения, некоторая часть каждого вещества удерживается стационарной фазой, а оставшаяся часть продолжает продвигаться по колонке. Такое разделение автоматически приводит к некоторому уширению полосы вещества. Кинетика массообмена и уширение полосы, кроме того, зависят от размера частиц стационарной фазы. Чем мельче частицы, тем меньше времени требуется для установления равновесия. Это одна из причин, по которой метод ВЭЖХ имеет более высокое разрешение, чем жидкостная хроматография низкого давления.

Два из четырех названных факторов зависят от скорости потока элюента через колонку. Продольная диффузия, определяемая по закону Фика,

обратно пропорциональна скорости потока, а время установления равновесия вещества между фазами прямо пропорционально скорости потока. Эти два фактора в сочетании с фактором неоднородности потока определяют высоту тарелки в каждой конкретной колонке, а, как говорилось выше, высота тарелки определяет ширину пика вещества. В математическом виде связь между этими тремя факторами и высотой теоретической тарелки выражается **уравнением Ван Деемтера** (уравнение 11.11), которое в графическом виде отражено на рис. 11.4.

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x \qquad (11.11)$$

где u_x — скорость потока элюента, а A, B и C — константы для конкретной колонки и конкретного типа неподвижной фазы, описывающие соответственно неоднородность потока, продольную диффузию и кинетику массообмена.

Из рис. 11.4 становится понятно, насколько важно найти оптимальную скорость потока для конкретной колонки. Продольная диффузия происходит гораздо быстрее в газе, чем в жидкости, поэтому в газовой хроматографии скорости потока всегда выше, чем в жидкостной хроматографии.

Как упоминалось выше, ширина пика вещества выражается через стандартное отклонение σ, которое соответствует половине ширины пика в точке перегиба кривой ($0{,}607h_p$, где h_p — высота пика; рис. 11.2). Можно показать, что $\sigma = \sqrt{2Pt_R}$, где P — коэффициент диффузии конкретного вещества, т. е. мера скорости, с которой оно случайным образом перемещается в подвижной фазе из области с высокой концентрацией в область с низкой концен-

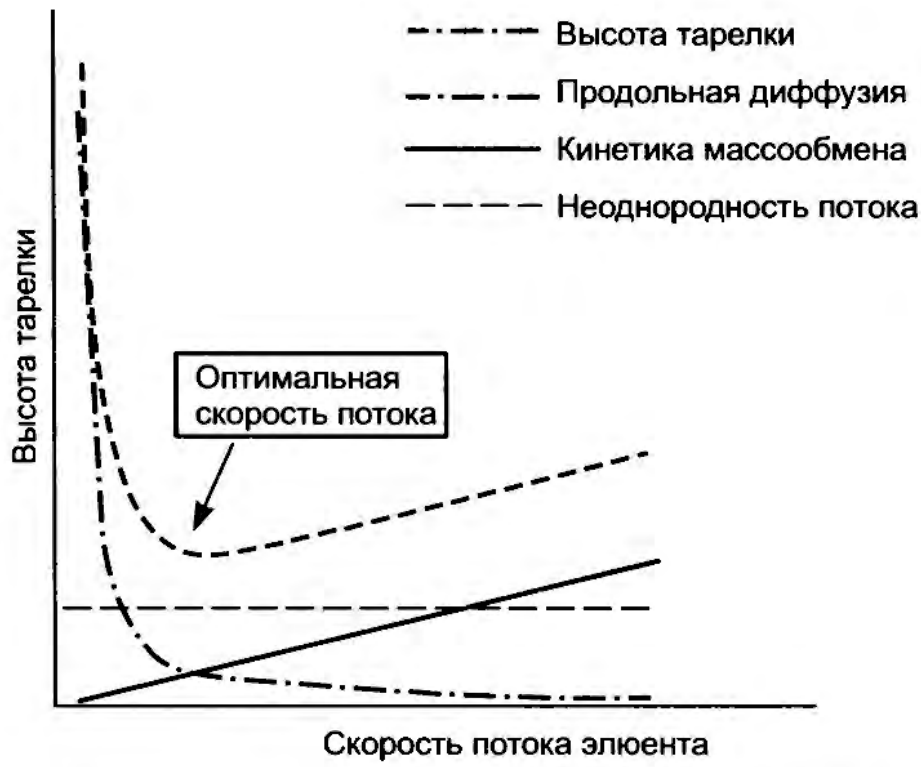


Рис. 11.4. График Ван Деемтера демонстрирует, что зависимость высоты теоретической тарелки от скорости потока объясняется результатом действия трех факторов — продольной диффузии, кинетики массообмена и неоднородности потока

трацией. Единицы измерения коэффициента диффузии — м^2/с. Поскольку значение σ пропорционально квадратному корню из t_R, следовательно, если время элюирования увеличивается в четыре раза, ширина пика удваивается. Таким образом, чем больше время элюирования вещества, тем шире его пик. По этой причине увеличение длины колонки не всегда приводит к лучшему разделению пиков.

Асимметрия пиков

На некоторых хроматограммах пики несимметричны. **Образование растянутого переднего края пика** и быстрое возвращение к нулевой линии после достижения максимума чаще всего является результатом перегрузки колонки. Часто при нанесении меньшего количества образца проблема исчезает. **Образование растянутого заднего края пика** (так называемого «хвоста») при нормальном подъеме к максимуму (рис. 11.2), возможно, объясняется удерживанием вещества несколькими участками стационарной фазы, обычно в инертной матрице. Такие участки сильно удерживают вещество и медленно его высвобождают. Данную проблему можно решить путем химического удаления таких участков (часто это гидроксильные группы), обрабатывая носитель производными силана, например гексаметилдисилазаном. Этот процесс иногда называют «кэппингом». Асимметрию пиков обычно выражают отношением ширины передней и задней части пика на высоте 0,1 h_p.

Разрешение

Качество хроматографического разделения оценивают по способности системы отделить пик одного вещества от пика другого вещества. **Разрешение** (R_S) определяется как отношение разности времен удерживания (Δt_R) двух пиков (t_{RA} и t_{RB}) к среднему значению ($w_{ср}$) ширины их оснований (w_A и w_B):

$$R_S = \frac{\Delta t_R}{w_{ср}} = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{(w_A + w_B)} \qquad (11.12)$$

При R_S = 1,0 разделение двух пиков происходит на 97,7% (т. е. они перекрываются на 2,3%). При R_S = 1,5 область перекрывания снижается до 0,2%. Неразделенные пики называют **слившимися пиками** (рис. 11.2). При достаточно малой области перекрывания анализ отдельных пиков можно проводить на основании предположения, что неполное разрешение не повлияло на их характеристики.

На разрешение оказывают влияние эффективность колонки, селективность и коэффициент емкости:

$$R_S = \left[\frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\right]\left[\frac{k'_2}{1 + k'_{ср}}\right] \qquad (11.13)$$

где k'_2 — коэффициент емкости для более длительно удерживаемого вещества, а $k'_{ср}$ — среднее коэффициентов емкости двух веществ.

Выражение 11.13 — одно из наиболее важных уравнений в хроматографии, поскольку оно предлагает рациональный подход к улучшению разделе-

ния анализируемых веществ. Например, видно, что разрешение увеличивается с ростом $\sqrt{N}$. Поскольку величина N связана с длиной колонки, удвоение длины колонки приведет к улучшению разрешения в $\sqrt{2}$ раз, т. е. в 1,4 раза. Поскольку коэффициент емкости и селективность связаны с временем и объемом удерживания, меняя природу двух фаз или отношение их объемов, можно повлиять на разрешение. Коэффициент емкости, кроме того, зависит от коэффициента распределения, который в свою очередь зависит от температуры. Следовательно, меняя температуру, можно улучшить разрешение.

Емкость хроматографической системы показывает, какое количество вещества можно разделить на компоненты без перекрывания или смыкания пиков. Высокой емкостью обладают ионообменная хроматография (разд. 11.6) и хроматофокусирование (разд. 11.6.3), вот почему их часто используют на начальных стадиях очистки.

11.2.5 Качественный и количественный анализ

Хроматографическое разделение образцов проводят на качественном или на количественном уровне.

Качественный анализ выполняется с целью подтверждения наличия в образце определенного компонента. Основанием для интерпретации результатов в данном случае является:

- Сравнение времени удерживания (в тонкослойном варианте хроматографии R_f) анализируемого вещества со временем удерживания пика стандартного образца, полученного в идентичных условиях. Проверить наличие вещества в образце можно путем одновременного нанесения на колонку второй порции анализируемого образца и известного количества аутентичного вещества. В таком случае на хроматограмме должен появиться один пик с предсказанным увеличением площади.
- При использовании в качестве детектора масс-спектрометра или ЯМР-спектрометра можно удостовериться в структурной идентичности анализируемого вещества.

Количественный анализ выполняется с целью подтверждения наличия в образце определенного вещества и измерения его количества. Количественный анализ основан на измерении площади пика и определении количества вещества с помощью соответствующей градуировочной кривой. Можно показать, что площадь каждого пика на хроматограмме пропорциональна количеству вещества в данном пике. Площадь пика находят путем измерения высоты пика (h_p) и его ширины на половине высоты (w_h) (рис. 11.2). Если требуется проанализировать сложную систему или большое количество веществ, процедура измерений отнимает довольно много времени, так что ее лучше осуществлять с помощью интегратора или компьютера. Их можно запрограммировать для расчета времен удерживания и площадей пиков и связать их с имеющимся стандартом, что позволит определить относительные времена удерживания и относительные площади пиков. Эти

данные используют для идентификации определенного вещества и нахождения его количества с помощью градуировочного графика. Кроме того, такие данные используют для корректировки работы хроматографической системы, поскольку могут возникать определенные проблемы, связанные с характеристиками детектора или с эффективностью процесса разделения. С работой детектора может быть связан дрейф базовой линии, при котором сигнал детектора постепенно меняется со временем, а также флуктуации базовой линии, выражающиеся в серии быстрых и незначительных отклонений базовой линии, которые обычно являются результатом слишком высокого диапазона чувствительности детектора или же сбоями в электронной системе.

Пример 1 РАСЧЕТ РАЗРЕШЕНИЯ ПРИ РАЗДЕЛЕНИИ ДВУХ ВЕЩЕСТВ

Вопрос Два вещества А и В разделяли на колонке длиной 25 см. Наблюдаемые времена удерживания составили 7 мин 20 с и 8 мин 20 с соответственно. Ширина основания пика В равна 10 с. Время удерживания стандартного вещества, которое не связывалось со стационарной фазой, составило 1 мин 20 с в тех же экспериментальных условиях. Каково разрешение при разделении двух веществ?

Ответ Для расчета разрешения сначала следует найти хроматографические параметры.

1) Приведенные времена удерживания для А и В на основании уравнения 11.2: $t'_R = t_R - t_M$

Для вещества А: t'_R 440 — 80 = 360 с.

Для вещества В: t'_R = 500 — 80 = 420 с.

2) Коэффициент емкости для А и В рассчитаем по уравнению 11.3: $k' = t'_R/t_M$

Для вещества А: $k'_А = 360/80 = 4{,}5$.

Для вещества В: $k'_Б = 420/80 = 5{,}25$.

3) Селективность найдем по уравнению 11.6: $\alpha = k'_Б/k'_А$

$\alpha = 5{,}25/4{,}5 = 1{,}167$

4) Число теоретических тарелок в колонке (уравнение 11.10: $N = (t_R/w)^2$).

Для вещества В: $N = (420/10)^2 = 1764$.

5) По уравнению 11.13 найдем разрешение:
$R_S = [\sqrt{N}/4((\alpha - 1)/\alpha)][k'_2/(1 + k'_{ср})]$.

Отсюда $R_S = (\sqrt{1764}/4)(0{,}167/1{,}167)(5{,}25/1 + 4{,}875) = 1{,}34$.

Обсуждение

Из сказанного ранее по поводу разрешения хроматографических пиков следует, что при разрешении 1,34 пики разделяются на 99%. Если возникает необходимость еще улучшить разделение, можно рассчитать длину колонки, необходимую для удвоения разрешения. Поскольку разрешение пропорционально $\sqrt{N}$, для удвоения разрешения число тарелок нужно увеличить в четыре раза, т. е. довести до $1764 \cdot 4 = 7065$. Высота тарелки в такой колонке равна $H = L/N = 250/1764 = 0{,}14$ мм. Чтобы получить в колонке 7056 тарелок, ее длина должна быть увеличена до $0{,}14 \cdot 7056 = 987{,}84$ мм или 98,78 см.

Внутренний стандарт

Количественное определение любого вещества основано на построении градуировочного графика с помощью чистого аутентичного образца этого вещества. При этом используют те же принципы, что изложены в разд. 1.6.6. Чаще всего используют величину относительной площади пика, полученной с помощью внутреннего стандарта, который был выделен тем же способом, что и анализируемый образец. Стандарт должен иметь физические и химические характеристики, близкие к характеристикам анализируемого вещества; на практике в качестве стандартов часто используют изомеры или структурные аналоги анализируемых веществ. В идеале стандарт и анализируемое вещество должны иметь близкие значения времен удерживания, но с тем условием, что разрешение было бы не ниже 99,5%.

Внешний стандарт

Альтернативный подход состоит в использовании внешнего стандарта. В этом случае стандарт добавляется к тестируемому образцу непосредственно перед нанесением на колонку. Таким образом, такой стандарт не смывают с колонки одновременно с образцом и, следовательно, он не позволяет оценить эффективность процесса колонки. Внешний стандарт применяют только в тех случаях, когда выход анализируемого вещества с колонки практически количественный, а также при отсутствии краткосрочных флуктуаций сигнала детектора.

11.2.6 Подготовка образца

Экстракция растворителем

Хотя хроматографические методы разработаны для разделения смесей различных веществ, это не означает, что не нужно уделять никакого внимания предварительной очистке образцов перед их нанесением на колонку. Напротив, для количественного хроматографического анализа, особенно в случае методом ВЭЖХ, подобная предварительная подготовка играет весьма важную роль, в частности, в случае анализа таких сложных смесей как плазма крови, моча, гомогенат клеток или микробная культура. Выделение и очистка отдельных компонентов из гомогената клеток часто представляет собой сложный многостадийный процесс (основные принципы очистки белков обсуждались в разд. 8.3). В других случаях, например, когда речь идет об анализе лекарственных препаратов или биологических жидкостей, подготовка образца сравнительно проста. Наиболее распространенный способ очистки образца — **экстракция растворителем**. Метод основан на экстракции веществ из водных растворов с помощью низкокипящих не смешивающихся с водой растворителей, таких как диэтиловый эфир или дихлорметан. Это еще один пример, иллюстрирующий, где вещество распределяется между двумя фазами; этот процесс также характеризуется коэффициентом распределения. Поскольку органические соединения по своей природе слабые электролиты, они в зависимости от pK_a и pH могут находиться в ионизованной или неионизованной форме; поэтому следует

привести pH анализируемого образца к такому значению, которое позволило бы экстрагировать вещества в ионизованном виде. Диэтиловый эфир и дихлорметан экстрагируют довольно значительное количество воды, от которой следует избавиться, например, добавлением безводных солей, таких как сульфат натрия или магния. Далее экстракты полностью выпаривают (часто в атмосфере азота или под вакуумом), растворяют в минимальном объеме подходящего растворителя, такого как метанол или ацетонитрил, и наносят на колонку. Такая процедура экстракции не является селективной и в большинстве случаев не годится для проведения ВЭЖХ, особенно для образцов с концентрацией в диапазоне нг/см^3 и ниже. Иногда проблему можно решить путем **образования ионных пар** (разд. 11.3.2).

Твердофазная экстракция

Альтернативой экстракции растворителем является метод твердофазной экстракции. Его преимущество состоит в более высокой селективности. Анализируемый раствор пропускают через маленькую (длиной несколько миллиметров) колонку (картридж), набитую сравнительно крупными частицами оксида кремния, несколько напоминающими те, что используются при проведении ВЭЖХ (разд. 11.3.2). Эти частицы селективно связывают анализируемые вещества и (в идеале) пропускают примеси. Предварительно следует выбрать подходящий носитель на основе оксида кремния, а анализируемый образец депротонировать путем обработки трихлоруксусной кислотой, хлорной кислотой или органическим растворителем типа ацетонитрила, чтобы минимизировать вероятность связывания анализируемых веществ с белками. Кроме того, следует установить такое значение pH раствора образца, чтобы максимально усилить связывание анализируемых веществ на колонке. Затем образец пропускают через колонку либо самотеком, либо путем создания слабого вакуума. Колонку промывают водой для удаления следов примесей, а связавшиеся на колонке вещества смывают небольшим объемом органического растворителя типа метанола или ацетонитрила. Экстракт полностью выпаривают (в атмосфере азота или под вакуумом), образовавшееся сухое вещество растворяют в минимальном объеме подходящего растворителя и подвергают хроматографическому анализу. В продаже имеется несколько типов таких твердофазных систем для экстракции, с помощью которых можно одновременно обрабатывать большое количество образцов (так называемая **хроматография в носике пипетки**, pipette tip chromatography).

Переключение колонок

Это более сложная процедура подготовки образца, наиболее часто применяемая для сложных смесей с низкой концентрацией веществ, которые предполагается далее разделять методом ВЭЖХ. Образец сначала наносят на первую короткую колонку, которая напоминает колонки для твердофазной экстракции. После связывания образца и отмывки примесей анализируемые вещества смывают с колонки подходящим органическим растворителем, направляя элюат непосредственно на аналитическую колонку для ВЭЖХ. Технически осуществить подобную процедуру довольно

сложно, для этого необходимо несколько насосов и переключающих кранов, что делает метод достаточно дорогостоящим. Один из недостатков данного метода состоит в том, что хотя все примеси смываются с первой колонки до того, как элюат с анализируемыми веществами начинает подаваться на аналитическую колонку, эти примеси в конечном итоге все же накапливаются на аналитической колонке и снижают разрешение. Тем не менее таким способом удается осуществить разделение многих сложных смесей.

Сверхкритическая экстракция (СК-экстракция)

Метод основан на том, что при значениях температуры и давления выше так называемой критической точки некоторые газы, например диоксид углерода, существуют в жидком состоянии. Критическими условиями для диоксида углерода являются температура 31,1 °С и давление 7,38 МПа. Жидкий диоксид углерода может быть использован в качестве растворителя для экстракции; он ведет себя подобно слабополярному растворителю типа гексана. Меняя физическое состояние экстракта, диоксид углерода возвращают в газообразное состояние, что упрощает выделение экстрагированных веществ.

Образование производных (дериватизация)

Некоторые функциональные группы в молекулах анализируемых веществ (особенно гидроксильная группа) часто затрудняют разделение веществ в хроматографических системах. Методы **предколоночной** или **постколоночной дериватизации** облегчают разделение и детектирование веществ путем маскирования подобных групп. Наиболее часто используемые для дериватизации реагенты перечислены в табл. 11.1.

11.3 ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (LPLC И ВЭЖХ)

1.3.1 Жидкостная хроматография низкого давления (LPLC)

Колонки

Колонки для этого метода хроматографии всегда изготавливаются из стекла, а их длина и диаметр выбираются в соответствии с количеством разделяемого материала. Стационарная фаза должна максимально близко подходить ко дну колонки, чтобы минимизировать мертвый объем ниже уровня носителя, в котором может происходить смешение уже разделенных на колонке веществ. Фирменные колонки имеют в основании пористую стеклянную прокладку или снабжены специальным устройством, поддерживающим сменную нейлоновую сетку, которая в свою очередь удерживает матрицу. Обычно элюат из колонки через капиллярные трубки поступает к детектору и коллектору фракций. В некоторых случаях хроматографию проводят при повышенной или пониженной температуре. Это проще всего осуществить с помощью рубашки, через которую циркулирует вода из термостата с необходимой температурой. Более сложным вариантом является размещение колонки в термостате с контролируемой температурой.

Таблица 11.1. **Примеры реагентов для дериватизации**

Анализируемое вещество	Реагент
А. Предколоночная дериватизация	
Детектирование в УФ-области	
Спирты, амины, фенолы	3,5-Динитробензоилхлорид
Аминокислоты, пептиды	Фенилизотиоцианат, дансилхлорид
Углеводы	Бензоилхлорид
Карбоновые кислоты	1-*п*-Нитробензил-N, N'-диизопропилмочевина
Жирные кислоты, фосфолипиды	Фенацилбромид, нафтацилбромид
Электрохимическое детектирование	
Альдегиды, кетоны	2,4-Динитрофенилгидразин
Амины, аминокислоты	*о*-Фталевый альдегид, фтординитробензол
Карбоновые кислоты	*п*-Аминофенол
Флуоресцентное детектирование	
Аминокислоты, амины, пептиды	Дансилхлорид, дабсилхлорид, флуорескамин, *о*-фталевый альдегид
Б. Постколоночная дериватизация	
Детектирование в УФ-области	
Аминокислоты	Фенилизотиоцианат
Углеводы	Орсинол и серная кислота
Пенициллины	Имидазол и хлорид ртути
Флуоресцентное детектирование	
Аминокислоты	*о*-Фталевый альдегид, флуорескамин, 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимида карбамат

Материалы для изготовления матрицы

Для каждого типа стационарной фазы необходимо правильно подобрать матрицу. Матрица должна обладать следующими свойствами:

- механическая прочность, позволяющая использовать высокую скорость потока и минимизировать перепад давления на колонке;
- химическая стабильность;
- наличие функциональных групп, способствующих закреплению стационарной фазы;
- высокая емкость (т. е. плотность функциональных групп) для снижения объема слоя;
- возможность использования частиц разного размера; кроме того, в некоторых вариантах хроматографии требуется пористая матрица с порами определенного диаметра и формы;
- инертная поверхность для снижения неселективного связывания веществ и, следовательно, уменьшения образования «хвостов» пиков.

На практике применяются шесть матриц.

- *Агароза* — полисахарид, состоящий из звеньев D-галактозы и 3,6-ангидрогалактозы. Для образования перекрестных сшивок между неразветвленными полисахаридными цепями используют такие агенты, как 2,3-дибромпропанол, что приводит к формированию геля, устойчивого в диапазоне pH от 3 до 14. Такая матрица гидрофобна и имеет хорошие реологические свойства, однако ее нельзя высушивать, поскольку при этом она подвергается необратимым изменениям. На основе агарозы созданы такие матрицы, как сефароза и биогель А.
- *Декстран* состоит из звеньев D-глюкозы, соединенных β-1-6-связями. Перекрестные сшивки образуются под действием эпихлоргидрина, однако декстрановые матрицы менее устойчивы к кислотному гидролизу, чем матрицы из целлюлозы. Декстран устойчив до pH 12 и обладает гидрофильными свойствами. Примером может служить сефадекс.
- *Оксид кремния* — полимерный материал, получаемый из ортокремниевой кислоты. Многочисленные силанольные группы (Si-OH) делают это вещество гидрофильным. Путем дериватизации с помощью трихлорметилсилана избыточные силанольные группы могут быть маскированы. Устойчивость матриц ограничена диапазоном pH 3–8. Обычно используется для перфузионной хроматографии. Родственным типом матриц являются матрицы из **стекла с регулируемым размером пор**. Эти матрицы химически инертны, но, как и матрицы из оксида кремния, растворяются при pH выше 8.
- *Полиакриламид* — полимер акриламида с перекрестными сшивками из N,N'-метилен-бис-акриламида. Устойчив в диапазоне pH от 2 до 11. Примером может служить биогель Р.
- *Полистирол* — полимер стирола с перекрестными сшивками из дивинилбензола. Полистрирольные матрицы устойчивы во всем диапазоне pH и чаще всего применяются для проведения гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Обладают довольно слабыми гидрофильными свойствами.
- *Целлюлоза* построена из звеньев D-глюкозы, связанных между собой β-1-4-связями. Для образования перекрестных сшивок между цепями целлюлозы используют эпихлоргидрин, причем количество перекрестных сшивок определяет размер пор матрицы. Целлюлоза для матриц существует в виде шариков, микрогранул и волокон; она устойчива в широком диапазоне pH, имеет хорошие реологические свойства и обладает выраженными гидрофильными свойствами. Обычно используется для ионообменной хроматографии.

Стационарная фаза

Химическая природа стационарной фазы определяется конкретным хроматографическим методом. Более детально этот вопрос рассматривается в последующих разделах данной главы. В большинстве случаев стационарные фазы уже связаны с матрицей с определенной формой и размером частиц. Оба параметра важны, поскольку они определяют скорость

потока и разрешение. Чем крупнее частицы, тем большей скорости потока можно достичь, а преимуществом более мелких частиц является более высокое отношение площади поверхности к объему и потенциально более высокое разрешение. На практике всегда следует искать определенного компромисса. Для набивки колонки лучше всего подходят сферические частицы, так что большинство фирменных матриц имеют сферическую или близкую к ней форму. Размер частиц обычно выражается как размер сетки сита (число отверстий на линейный дюйм); следовательно, чем больше размер сита, тем мельче частицы. В рутинных анализах чаще всего используют частицы размером 80–100 меш* (0,18–0,15 мм) или 100–120 меш (0,15–0,13 мм), а для более высокого разрешения — 200–400 меш (0,075–0,038 мм).

Набивка колонок

Обычно колонки набивают путем вливания суспензии стационарной фазы на матрице в подвижной фазе внутрь колонки с закрытым выходным отверстием, осторожно постукивая при этом по верхней части суспензии, чтобы избежать попадания пузырьков воздуха и обеспечить равномерное оседание стационарной фазы. Неравномерное заполнение колонки приведет к неравномерности потока (туннелированию) и ухудшению разрешения. Суспензию добавляют до тех пор, пока колонка не будет заполнена на необходимую высоту. После этого, открыв выходное отверстие колонки, начинают пропускать подвижную фазу и продолжают это делать до окончательного уплотнения стационарной фазы. Для выполнения подобной процедуры требуется определенный опыт. Чтобы не повреждать верхнего слоя упакованного материала под действием потока подвижной фазы при нанесении образца, обычно на верхнюю поверхность колонки помещают защитное приспособление в виде прокладки из нейлоновой или вискозной марли. Некоторые фирменные колонки снабжены адапторами и плунжерами, одновременно защищающими верхний слой колонки и обеспечивающими вход для подачи подвижной фазы (часто через капиллярную трубку). Готовая колонка ни в коем случае не должна высыхать, поэтому над верхней поверхностью стационарной фазы всегда оставляют слой подвижной фазы.

Нанесение образца

Существует несколько возможностей для нанесения образца на верхнюю часть подготовленной колонки.

- *Прямое нанесение в верхний слой колонки.* Простой способ нанесения образца состоит в удалении подвижной фазы, находящейся над поверхностью колонки, путем открытия выходного отверстия. С помощью пипетки на колонку осторожно наносят образец и ожидают его проникновения

---

* Меш (*от англ.* mesh — петля, ячейка сети, отверстие сита) — единица измерения; число отверстий, приходящихся на один линейный дюйм (25,4 мм). — *Прим. перев.*

в верхний слой колонки. После этого таким же путем на колонку наносят небольшой объем подвижной фазы, чтобы ввести в колонку остатки образца. Далее на колонку помещают подвижную фазу на высоту 2–5 см и начинают ее непрерывную подачу, постоянно поддерживая ее запас на таком же уровне.

- *Добавление сахарозы*. Альтернативный метод, который позволяет не «оголять» поверхности колонки, состоит в увеличении плотности образца путем добавления сахарозы в концентрации около 1%. Если такой раствор нанести на жидкость над верхним слоем колонки, он автоматически опустится на поверхность колонки и быстро в нее проникнет. Этот метод нанесения образца вполне приемлем, если только сахароза не мешает процессу разделения и последующему анализу образцов.
- *Использование перистальтического насоса*. Третий метод состоит в использовании капиллярной трубки и шприца или перистальтического насоса, с помощью которых образец непосредственно подается на колонку. Из трех предложенных методов этот, пожалуй, самый эффективный.

В любом случае не следует допускать перегрузки колонки образцом, поскольку это приводит к снижению качества разделения. Кроме того, предпочтительно наносить образец в минимальном объеме растворителя, при этом получается наиболее узкая полоса образца на колонке.

Разделение и элюирование анализируемых веществ

Компоненты нанесенного образца **разделяются** на колонке при непрерывном пропускании подвижной фазы. Далее разделившиеся вещества смывают с колонки в процессе **элюирования**. Важно, чтобы при разделении и элюирования скорость потока подвижной фазы сохранялась постоянной. Для этой цели используют либо сосуд Мариотта (рис. 11.5), либо перистальтический насос (чаще всего роликового типа, рис. 11.6). Элюнирование может быть изократическим, когда в качестве подвижной фазы используется один раствор, или градиентным. Для создания стабильного градиента два или несколько элюентов смешивают в необходимых пропорциях до входа в колонку. Это достигается с помощью градиентного смесителя (рис. 11.7) или двух или нескольких перистальтических насосов, запрограммированных на подачу разных элюентов с определенными скоростями в специальную емкость перед их поступлением в колонку. «Выпуклый» градиент обеспечивает лучшее разрешение в начале процесса, а «вогнутый» — в конце (рис. 11.7, *б*).

Методы детектирования и сбора индивидуальных веществ после их выхода с колонки с элюатом такие же, как те, что используются при проведении хроматографии высокого давления (разд. 11.3.2).

11.3.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Из уравнений 11.1–11.12 следует, что разрешающая способность хроматографической колонки растет с увеличением длины колонки и числа теоретических тарелок на единицу длины. Однако на практике оказывается,

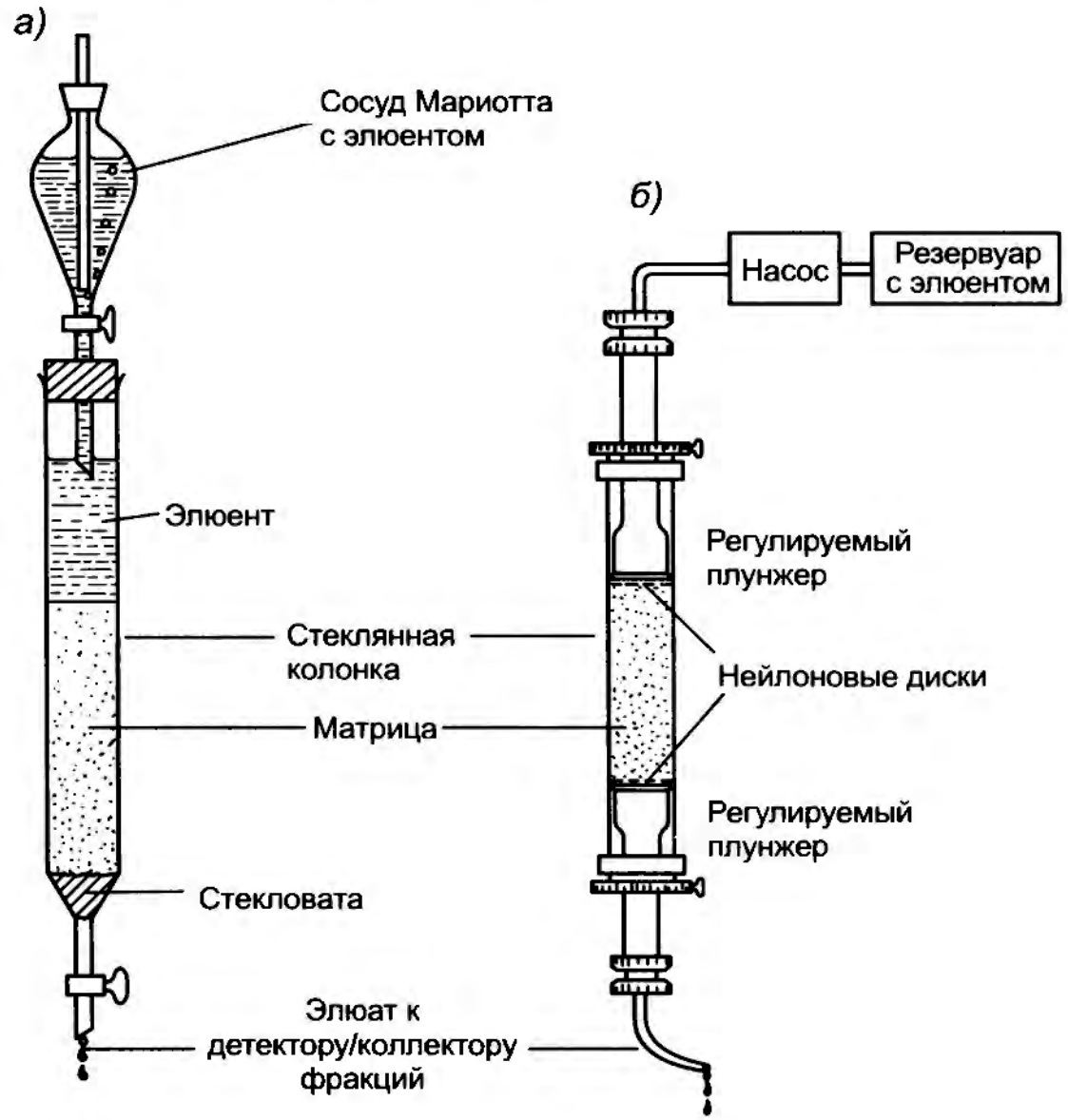


Рис. 11.5. Типы колонок для хроматографии низкого давления

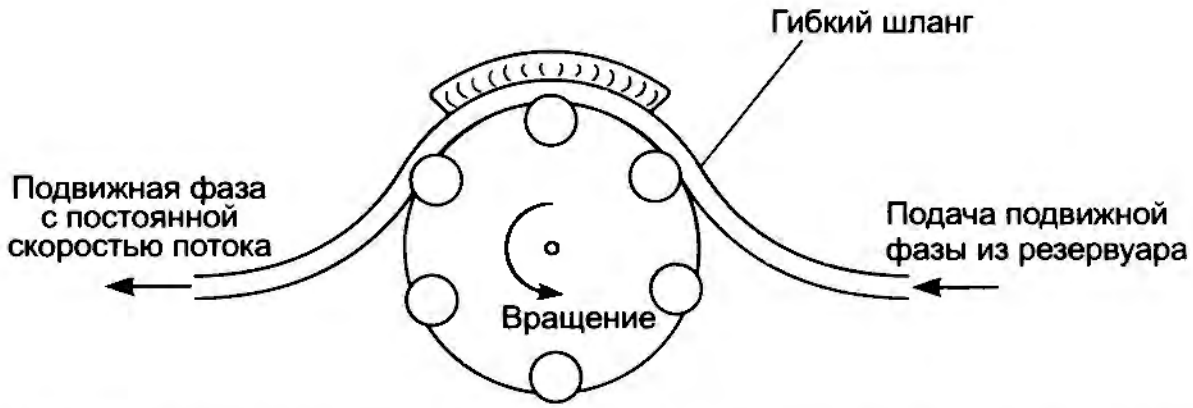


Рис. 11.6. Простой перистальтический насос, обычно используемый в хроматографии низкого давления

что чрезмерное увеличение длины колонки приводит уширению пиков (разд. 11.2.4). Поскольку число теоретических тарелок в колонке связано с площадью поверхности стационарной фазы, то чем меньше размер частиц стационарной фазы, тем лучше разрешение, в частности, потому что при этом снижается время установления равновесия анализируемого вещества

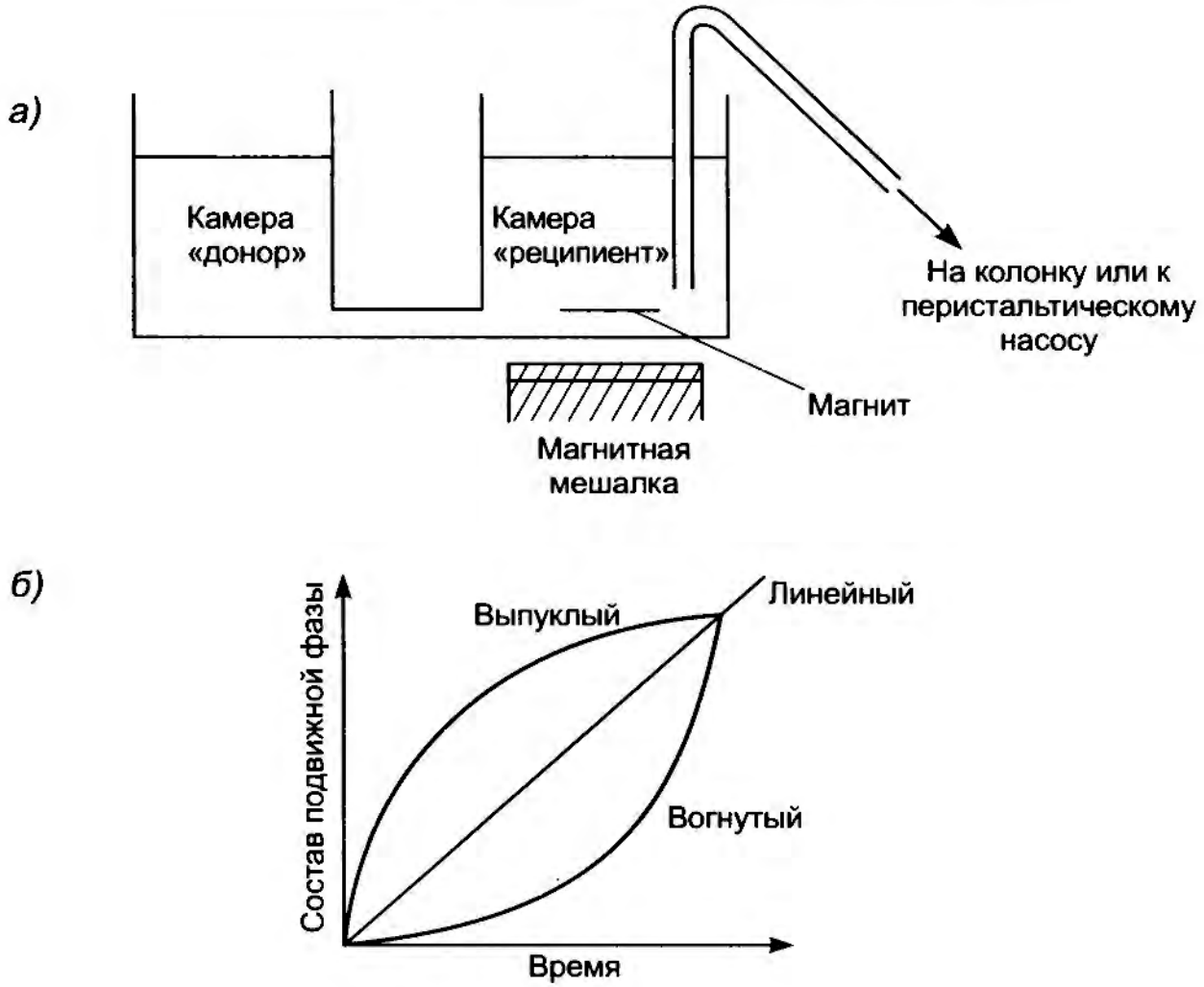


Рис. 11.7. Простое устройство для создания градиента (*а*); формы градиента (*б*)

между стационарной и подвижной фазами (разд. 11.2.4). К сожалению, с уменьшением размера частиц растет сопротивление потоку подвижной фазы. Это сопротивление создает противодавление в колонке, которое может быть настолько значительным, что способно привести к разрушению структуры матрицы и, следовательно, снижению скорости потока и ухудшению разделения. Данную проблему удалось решить путем создания стационарной фазы с малым размером частиц, способных выдерживать высокое давление. Это усовершенствование, которое затронуло адсорбционную, ионообменную, распределительную, эксклюзионную и аффинную хроматографию, привело к значительно более быстрому разделению с более высоким разрешением и сделало метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) самым распространенным, мощным и гибким методом хроматографии. Многие фирменные системы для ВЭЖХ совмещены с компьютерами и позволяют осуществлять хроматографическое разделение самого разного рода.

Колонка

Обычно колонки для ВЭЖХ (рис. 11.8) изготавливаются из нержавеющей стали и выдерживают давление до $5{,}5 \cdot 10^7$ Па. Колонки имеют длину от 3 до 50 см и внутренний диаметр около 4 мм; возможная скорость пото-

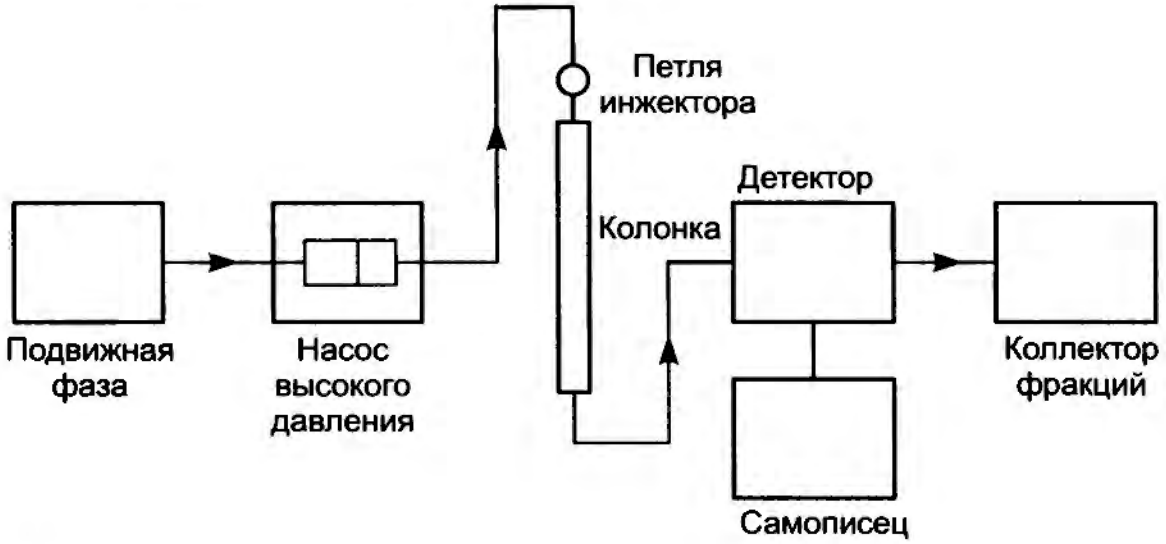


Рис. 11.8. Схема изократического элюирования в системе ВЭЖХ. Для градиентного элюирования нужны два насоса и два резервуара, в которых смешиваются компоненты подвижной фазы перед введением в петлю инжектора

ка составляет 1–3 $см^3$/мин. **Открытые (полые) капиллярные колонки** имеют внутренний диаметр 1–2 мм и длину 25–50 см. Они выдерживают скорости потока 5–20 $мм^3$/мин. Капиллярные колонки имеют три важных преимущества перед обычными колонками:

- сниженный расход элюента, связанный с низкими скоростями потока;
- совместимость с масс-спектрометром (также из-за низкой скорости потока);
- повышенная чувствительность, что связано с возможностью использования более высоких концентраций образцов.

Матрица и стационарная фаза

Существует три вида матриц/стационарных фаз, основанных на твердых, а не гелеобразных материалах, что связано с необходимостью выдерживать высокие давления в колонке. Во всех матрциах частицы обязательно имеют одинаковый размер и почти сферическую форму, что снижает скорость диффузии и, следовательно, препятствует уширению полос.

- Из *микропористых материалов* изготавливают частицы диаметром 5–10 мм и разветвленной структурой пор.
- *Пелликулярные (поверхностно-пористые) сорбенты* представляют собой инертные твердые шарики диаметром около 40 мм, например, из стекла, покрытые слоем пористого материала.
- *Сорбенты с химически связанной (привитой) стационарной фазой* состоят из инертного вещества типа оксида кремния, с которым стационарная фаза связана химической связью.

Для адсорбционной хроматографии созданы микропористые или поверхностно-пористые формы сорбентов типа оксида кремния или оксида алюминия с разным размером частиц. Поверхностно-пористые сорбенты

характеризуются высокой эффективностью, но малой емкостью, так что предпочтение обычно отдается микропористым системам.

В распределительной хроматографии стационарная фаза может покрывать инертный микропористый или поверхностно-пористый сорбент. Недостатком сорбентов, покрытых жидкой стационарной фазой, является то, что подвижная фаза постепенно смывает стационарную фазу. Эту проблему удалось решить в результате создания матриц с привитой стационарной фазой; сорбентом в таких системах является оксид кремния.

Существует множество сорбентов для проведения ионообменной хроматографии высокого давления. Широкое применение нашли микропористые полистирольные смолы. Существуют также поверхностно-пористые смолы, в которых ионообменная фаза связана ковалентной связью с силиконовой матрицей. Такие смолы классифицируются как твердые гели; они легко выдерживают давление, возникающее в условиях анализа.

Стационарные фазы для гель-фильтрации обычно состоят из оксида кремния, полиметакрилата, поливинилацетата, поливинилхлорида или перекрестно-сшитых агарозы или декстрана. Эти сорбенты могут иметь разный размер пор. Обычно такие системы используются с органическими элюентами. Для аффинной хроматографии применяются такие же типы сорбентов, как и для гель-фильтрации.

Нанесение образца

Для хорошего разделения правильное нанесение образца на ВЭЖХ-колонку играет чрезвычайно важную роль. Чаще всего с этой целью используют **петлю инжектора** (рис. 11.9). Это металлическая петля небольшого фиксированного объема, которую можно заполнить образцом. После введения в петлю образца через нее направляют элюент от насоса (это делается с помощью специальной системы переключения), так что

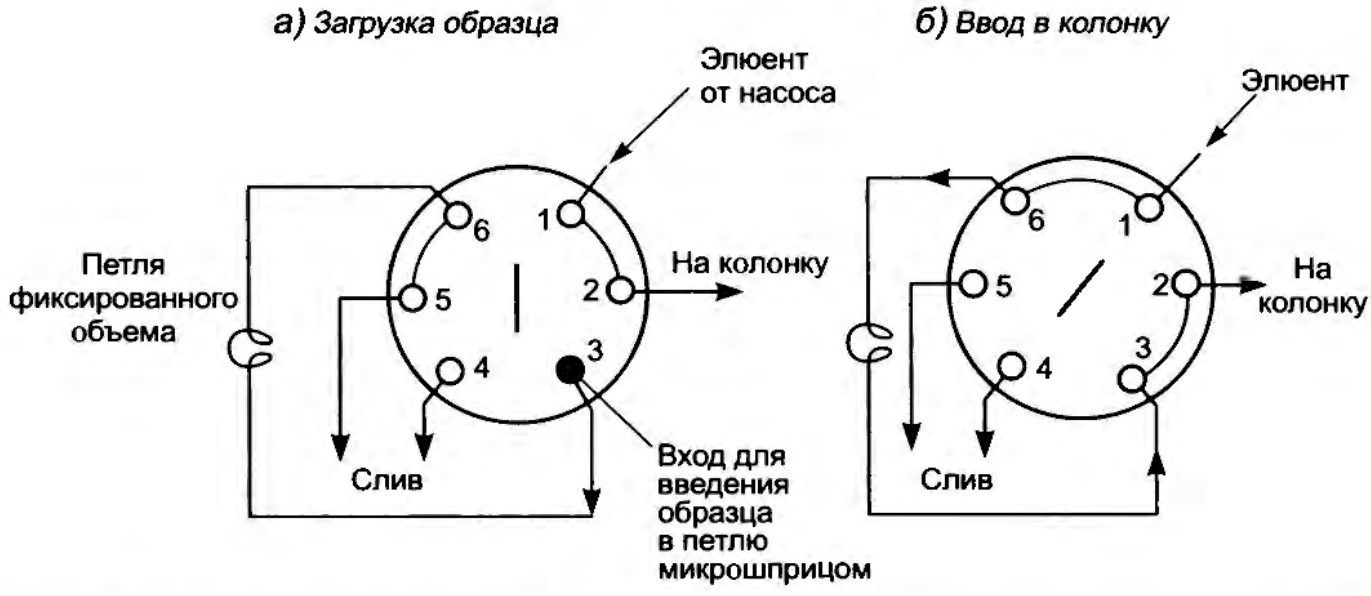


Рис. 11.9. Петля инжектора для ВЭЖХ. Петля заполняется (*а*) через вход 3, причем избыток образца сливается через вход 5. В таком положении переключателя элюент от насоса подается на колонку через входы 1 и 2. В положении для введения образца (*б*) поток элюента направляется в петлю через входы 1 и 6, а затем попадает на колонку

образец попадает на колонку через выход из петли без прерывания подачи элюента.

Многократное нанесение сильно загрязненных образцов типа сыворотки крови, мочи, плазмы или цельной крови (предварительно очищенные от белка) может в конечном итоге привести к снижению эффективности разделения на данной колонке. Чтобы этого избежать, между инжектором и колонкой ставят дополнительную короткую колонку (1–2 см длиной) такого же внутреннего диаметра и с примерно таким же сорбентом, что и в аналитической колонке. Сорбент дополнительной колонки удерживает основные примеси и может регулярно заменяться на новый.

Подвижная фаза

Выбор подвижной фазы определяется типом разделения. Для изократической элюции нужен всего один насос и один тип элюента, либо несколько элюентов, смешиваемых в постоянных пропорциях. Для градиентной элюции обычно требуется по одному насосу для подачи каждого элюента, соотношение которых задается **программатором градиента**. Все растворы для ВЭЖХ подвергают очистке, поскольку следы примесей могут повредить колонку и мешают детекции, особенно в тех случаях, когда детекция основана на измерении поглощения ниже 200 нм. Продаются чистые растворы специально для ВЭЖХ, однако даже при работе с этими растворами перед насосом рекомендуется разместить микрофильтр. Кроме того, важно дегазировать все растворы перед проведением разделения, поскольку пузырьки воздуха часто накапливаются в насосах. Наличие пузырьков воздуха (которое особенно существенно для водных растворов, содержащих метанол или этанол) снижает разрешение колонки и мешает непрерывному мониторингу процесса элюирования. Дегазировать элюент можно несколькими способами — путем нагревания, интенсивного перемешивания на магнитной мешалке, под вакуумом, с помощью ультразвука, а также путем пропускания через резервуар с элюентом газообразного гелия.

Насос

Система насосов для подачи элюента — эта одна из отличительных особенностей ВЭЖХ. Основным качеством хорошей системы насосов является ее способность создавать давление не менее $5 \cdot 10^7$ Па и (в идеале) поддерживать его на постоянном уровне (без циклических изменений), поскольку такие изменения могут повлиять на работу детектора. Для аналитических целей требуется скорость потока не менее 10 см^3/мин, а для препаративного разделения — до 100 см^3/мин.

Насосы постоянной производительности поддерживают постоянную скорость потока через колонку вне зависимости от изменения условий в колонке. Один из вариантов насоса такого типа — насос шприцевого типа, который подает на колонку фиксированный объем элюента с помощью поршня, движимого мотором. Такой насос снабжен винтовым домкратом, управляемым шаговым двигателем. При подаче элюента поршень движется с постоянной скоростью. Два клапана контролируют однонаправленное перемещение потока в камере (рис. 11.10, *а*). **Возвратно-**

поступательные насосы — это наиболее часто используемый вариант насосов постоянной производительности. Приводимый в движение мотором рычаг перемещает поршень, а контрольные клапаны регулируют вход элюента в колонку. При сжатии элюент выдавливается из рабочей камеры насоса в колонку. При возвратном движении выпускной клапан закрывается, а элюент направляется через входной клапан в рабочую камеру насоса для подачи на колонку при следующем сжатии (рис. 11.10, *б*). При работе таких насосов имеет место пульсация потока, так что для сглаживания этого эффекта в системе обычно предусмотрены демпферы пульсаций. Все насосы постоянной производительности снабжены встроенным механизмом аварийной остановки, так что если давление в колонке превышает установленные заранее пределы, насос останавливается автоматически.

11.3.3 Детектор

Поскольку на колонки для хроматографии низкого давления и ВЭЖХ обычно наносят небольшое количество материала, чувствительность детектора должна быть достаточно высокой и стабильной, чтобы зарегистрировать даже низкую концентрацию вещества в элюенте. Чаще всего применяются следующие типы детекторов.

- *Детекторы с переменной длиной волны* представляют собой спектрофотометры, работающие в ультрафиолетовом и видимом диапазоне длин волн. Такие детекторы способны измерять поглощение вплоть до длины волны 190 нм с диапазоном показаний шкалы вплоть до 0,001 единицы поглощения. Детекторы имеют чувствительность порядка $5 \cdot 10^{-10}$ г/см^3 и линейный диапазон 10^5. Все спектрофотометрические детекторы имеют проточные ячейки с малым внутренним объемом (обычно 8 мм^3) и длиной оптического пути 10 мм, что позволяет осуществлять непрерывный мониторинг на выходе из колонки.
- *Сканирующие детекторы* позволяют записывать полный спектр поглощения каждого вещества, что помогает проводить их идентификацию. Запись спектра осуществляется либо при временной остановке потока элюента, либо с помощью **чип-диодов**, которые позволяют сканировать полный спектр элюата за 0,01 с и представлять его в реальном времени в виде трехмерного изображения на экране компьютера (рис. 11.11).
- *Флуоресцентный детектор* чрезвычайно удобно использовать в ВЭЖХ, поскольку он гораздо более чувствителен (10^{-12} г/см^3), чем детектор, работающий в УФ-диапазоне, однако его линейный диапазон чуть уже (10^4). К сожалению, область применения таких детекторов ограничена сравнительно небольшим числом флуоресцирующих веществ. Проведение предварительной дериватизации образцов может расширить границы применимости метода.
- *Электрохимические детекторы* используются при анализе электроактивных веществ и являются довольно чувствительными. Существует два типа таких детекторов со сходными принципами действия — **амперометрические** и **кулонометрические**. В проточной ячейке

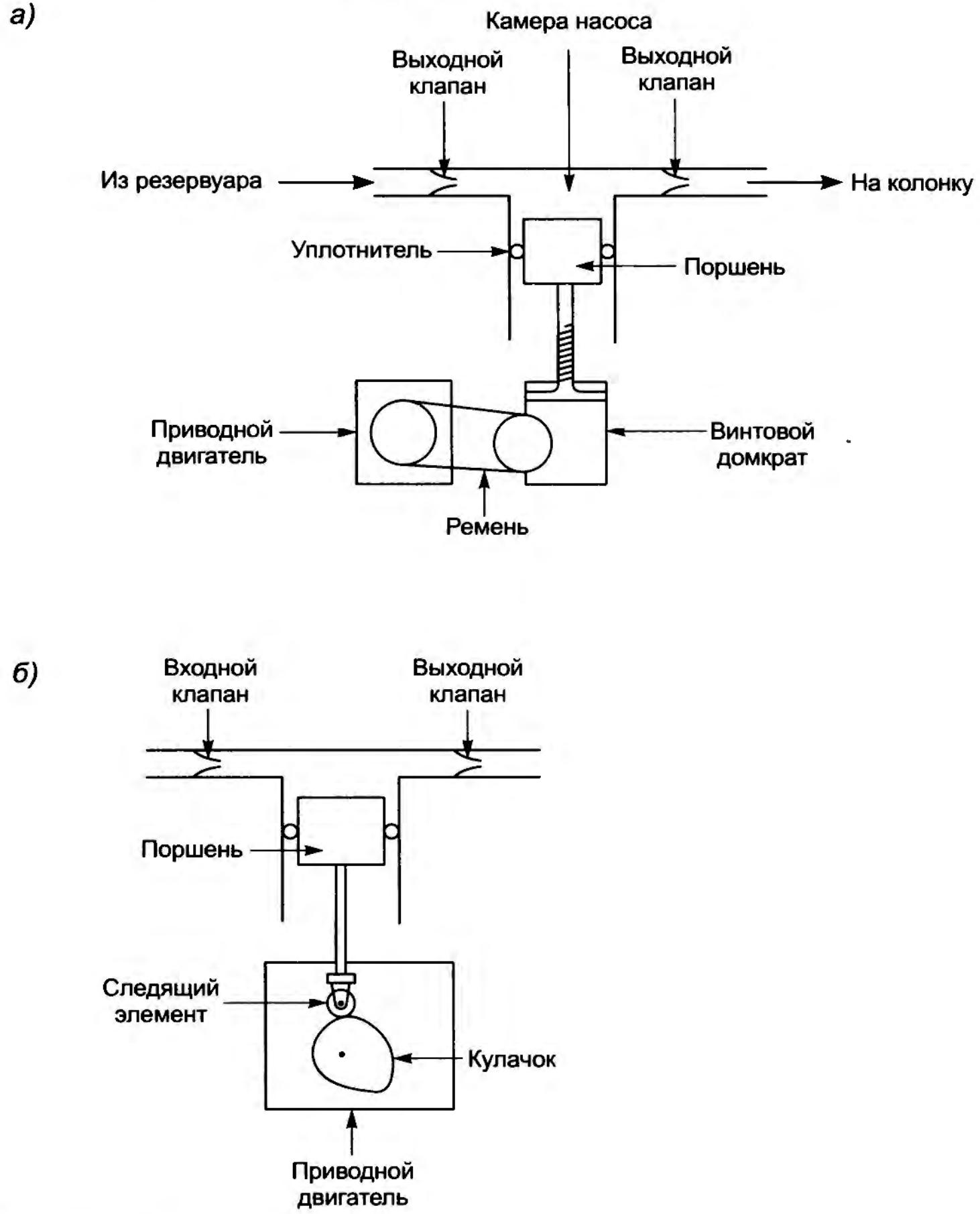


Рис. 11.10. Насосы постоянной производительности: насос шприцевого типа (*а*) и возвратно-поступательный насос (*б*). В обоих вариантах перемещение поршня вниз закрывает выходной клапан и открывает входной клапан, позволяя элюенту войти в рабочую камеру насоса. При перемещении поршня вверх закрывается входной клапан и открывается выходной, так что элюент попадает на колонку. Воспроизводится в соответствии с: R. Newton (1982), Instrumentation for HPLC, in *HPLC in Food Analysis*, R. Macrae (ed.), Academic Press, London

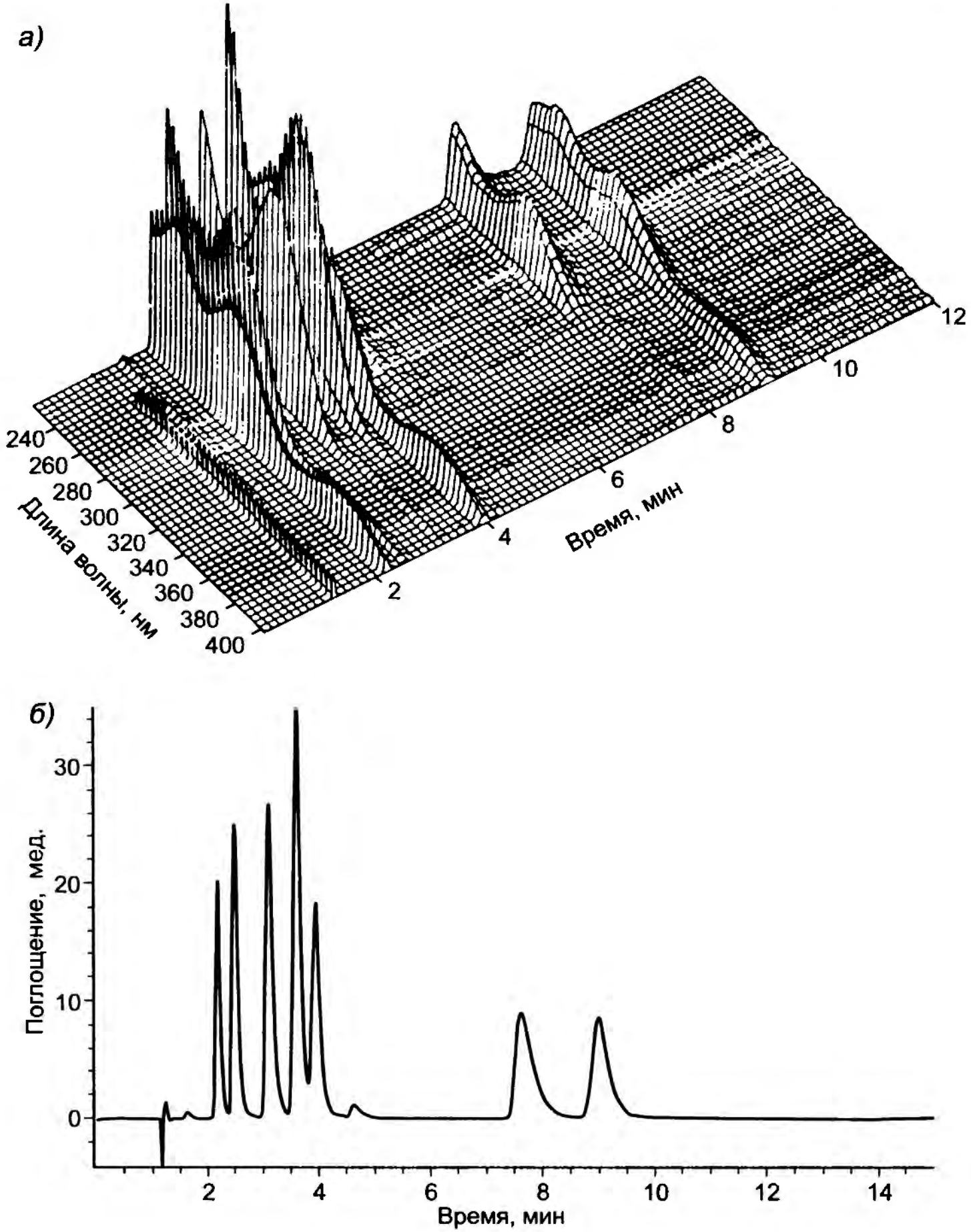


Рис. 11.11. Разделение дигидропиридинового блокатора кальциевого канала лацидипина и его метаболитов методом ВЭЖХ. Колонка ODS Hypercil; элюент — метанол:ацетонитрил : вода (66:5:29, об%), подкисленный до pH 3,5 1%-й муравьиной кислотой; скорость потока 1 $см^3$/мин; температура колонки 40 °C. Детектирование с помощью чип-диода (*а*) и ультрафиолетового детектора (*б*). Воспроизводится с разрешения GlaxoSmith-Kline, Stevenage

расположены два электрода: противоэлектрод (Ag/AgCl или каломельный, см. разд. 1.5.1) и рабочий электрод. На противоэлектрод подается постоянный потенциал такой величины, что при прохождении веществ через ячейку они окисляются или восстанавливаются на его поверхности, в результате чего между двумя электродами возникает электрический ток (разд. 1.5.1). Величина этого тока регистрируется и записывается в виде хроматограммы. Приложенный на противоэлектрод потенциал достаточен для того, чтобы в рамках анализируемого набора веществ детектируемый ток давал сигнал на полную шкалу самописца. Два типа детекторов отличаются степенью превращения веществ на поверхности электрода; большее предпочтение отдается амперометрическим детекторам, поскольку они обладают большей чувствительностью (10^{-12} г/см^3 против 10^{-8} г/см^3) и более протяженным линейным диапазоном (10^5 против 10^4). Для восстановительных реакций в качестве рабочего электрода обычно используется ртутный электрод, а для окислительных реакций — электрод из углерода или углеродных композитов. К способным окисляться веществам относятся углеводороды, амины, амиды, фенолы, ди- и триазины, фенотиазины, катехоламины и хинолины. Восстанавливаться могут алкены, простые и сложные эфиры, кетоны, альдегиды, азо- и нитросоединения. Понятно, что элюент не должен содержать следов веществ, способных изменять сигнал детектора.

- *Масс-спектрометр* позволяет одновременно детектировать сходящие с колонки вещества и определять их структуру. Техническая проблема, связанная с удалением основной массы подвижной фазы перед введением образца в масс-спектрометр, решается несколькими способами (см. гл. 9). Вещества можно детектировать по полному ионному току (ПИТ) (разд. 9.4.1) или с помощью селективного мониторинга ионов (SIM) (разд. 9.5.7). Преимущество масс-спектрометрического детектирования состоит в том, что этот метод предоставляет возможность идентификации перекрывающихся пиков. Если есть подозрение, что большой пик закрывает собой маленький пик, то присутствие минорного компонента можно подтвердить с помощью SIM, при условии, что как доминирующий, так и минорный компоненты образуют единственный молекулярный ион или ион фрагмента.
- *ЯМР-спектрометр* позволяет получать дополнительную информацию о структуре вещества, кроме той, что может быть получена методом ВЭЖХ–МС.
- *Дифференциальный рефрактометрический детектор* измеряет показатели преломления веществ по мере их выхода с колонки. Метод имеет то преимущество, что изменение показателя преломления (положительное или отрицательное) происходит при появлении любого вещества в элюенте любого типа. Ограничение метода — сравнительно низкая чувствительность (10^{-7} г/см^3); однако метод широко используется при анализе углеводов.
- *Испарительный детектор светорассеяния* (*ELSD*) измеряет рассеяние света микрочастицами анализируемого компонента, образовавшимися в результате превращения элюата в мелкий аэрозоль и его последующего

испарения. Выходящий из колонки элюат соединяется с потоком воздуха или азота, образуя аэрозоль. Затем элюент выпаривают из аэрозоля в испарителе, а образующиеся сухие частицы анализируемых веществ облучают светом от источника с последующим детектированием рассеянного света с помощью фотодиода. Интенсивность рассеянного света определяется количеством вещества и размером его частиц. Она не зависит от спектральных свойств вещества и, следовательно, данный метод не требует присутствия в анализируемых веществах хромофорных групп или проведения дериватизации. Метод позволяет осуществлять количественный анализ разделяемых веществ при скорости потока до 5 $см^3$/мин. При наличии хорошей градуировочной кривой можно получать надежные результаты и не бояться дрейфа базовой линии. Это хороший метод для анализа жирных кислот, липидов и углеводов.

Чувствительность детекторов ультрафиолетового света, флуоресцентных и электромеханических детекторов можно значительно повысить в результате проведения предколоночной или постколоночной дериватизации, переводя анализируемое вещество в его производное. Примеры дериватизации представлены в табл. 11.1.

Коллектор фракций

Если вещества в элюате предстоит анализировать дальше, то элюат необходимо разделить на фракции. Для этого существуют два приема: либо путем постоянного мониторинга отслеживают и отбирают определенное вещество, либо весь элюат разделяют на небольшие фракции (от 1 до 10 $см^3$), которые анализируют и отбирают из них те, что содержат искомое вещество. Автоматические коллекторы фракций собирают либо фракции равного объема, либо отбирают фракции на протяжении заданного промежутка времени, а затем переключаются на сбор следующей фракции. Объем фракции задают несколькими способами. В каждую пробирку может помещаться определенный объем элюата или определенное количество капель элюата. Второй вариант имеет небольшой недостаток: если состав элюента меняется (например, при градиентной элюции), может изменяться и его поверхностное натяжение и, следовательно, размер капли, так что реальный объем фракций также изменяется. Еще одна возможность состоит в том, чтобы смена пробирок происходила через равные промежутки времени. В таком случае при изменении скорости потока изменяется объем фракций, но такой способ элюирования применяют довольно редко, так что сбор фракций на протяжении фиксированного времени как раз и является наиболее распространенным вариантом.

11.3.4 Быстрая жидкостная хроматография белков (FPLC)

Широкий спектр возможностей, высокая скорость и высокая чувствительность метода ВЭЖХ сделали этот метод наиболее популярным хроматографическим методом; практически все виды биологических молекул можно анализировать или очищать с его помощью. В частности, ВЭЖХ особенно

полезна для разделения аминокислот, белков и пептидов. В результате развития инструментальной базы для разделения белков появился так называемый метод **быстрой жидкостной хроматографии белков** (fast protein liquid chromatorgaphy, **FPLC**). Этот метод предназначен для обращенно-фазовой, аффинной, гидрофобной, ионообменной хроматографии, гель-фильтрации и хроматофокусирования. При этом используются главным образом водные среды для элюирования, а также специальные стационарные фазы высокой емкости и с таким же диаметром частиц, который обычно применяют для ВЭЖХ. Однако рабочее давление (1–2 МПа) ниже, чем при проведении ВЭЖХ. Микроколонки из нержавеющей стали со стеклянным покрытием позволяют анализировать очень малые количества образцов, а время разделения составляет всего лишь несколько минут. Метод позволяет непосредственно анализировать такие сложные смеси, как гидролизаты белков после расщепления трипсином или культуральные жидкости микроорганизмов. Однако смеси белков из клеточных экстрактов все же требуют некоторого предварительного разделения (см. разд. 8.3.3).

11.3.5 Капиллярная электрохроматография

Капиллярная электрохроматография (КЭХ) — гибридный метод анализа, сочетающий ВЭЖХ и капиллярный электрофорез. Как следует из названия, капиллярная электрохроматография осуществляется на капиллярных колонках, в которых стационарная фаза либо связана с инертным сорбентом и помещена в колонку, либо нанесена непосредственно на стенки колонки. Как и в капиллярном электрофорезе, на стенки колонки подается электрический потенциал, который заставляет раствор двигаться в результате электроосмоса (разд. 10.1). Этот *электроосмотический поток* (ЭОП) перемещает раствор с содержащимися в нем анализируемыми веществами через колонку. По мере продвижения веществ через колонку они, с одной стороны, подвергаются воздействию сил электроосмоса, а с другой стороны, распределяются между подвижной и стационарной фазами. В результате вещества разделяются не только в соответствии с различием в коэффициентах распределения K_d, как в других видах хроматографии, но и в соответствии с различиями в электрофоретической подвижности, как при электрофорезе. Поэтому такой хроматографический параметр, как коэффициент емкости k', не применим в методе капиллярной электрохроматографии.

Стационарные фазы на основе матриц из оксида кремния, используемые в данном методе, примерно такие же, как для ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы обычно служат водно-органические смеси, содержащие электролит. ЭОП возникает на границе раздела фаз твердое вещество/жидкость. Поверхность оксида кремния заряжена отрицательно из-за диссоциации силанольных групп, в результате чего подвижная фаза имеет суммарный положительный заряд, что создает двойной электрический слой. Положительно заряженные молекулы, находящиеся вблизи поверхности оксида кремния, индуцируют аналогичные изменения в соседних молекулах. Эти молекулы мигрируют к отрицательно заряженному электроду, унося с собой основную массу подвижной фазы. Скорость ЭОП определяется целым

рядом факторов, в том числе силой приложенного напряжения, а также вязкостью и диэлектрической проницаемостью подвижной фазы. ЭОП в набивных капиллярных колонках значительно слабее, чем в открытых (полых) колонках.

Инструментальный аппарат КЭХ примерно такой же, как для капиллярного электрофореза, с тем только исключением, что оба конца колонки герметично закрыты, чтобы избежать перепада давления в колонке. Обычно используют колонки 50 см x 100 мкм; поскольку поток жидкости возникает главным образом в результате электроосмоса, а не приложенного давления, можно использовать более мелкие частицы (1,5–5 мкм), чем те, что обычно используются для ВЭЖХ. В результате эффективность таких колонок гораздо выше, а время разделения меньше, чем в ВЭЖХ.

11.3.6 Перфузионная хроматография

Высокое разрешение метода ВЭЖХ основано на использовании для стационарной фазы частиц малого диаметра. Однако ценой такому высокому разрешению является создаваемое высокое давление, сравнительно низкая скорость потока и те требования, которые высокое давление накладывает на инструментальный аппарат метода. **Перфузионная хроматография** преодолевает некоторые из этих ограничений, используя частицы малого размера (10–50 мкм в диаметре), имеющие каналы (поры) диаметром около 1 мкм. Прохождение жидкости через эти каналы позволяет использовать высокие скорости потока без нагнетания высокого давления. Высокие скорости потока приводят к снижению высоты теоретической тарелки (разд. 11.2.4) и, следовательно, к высокому разрешению за очень короткое время. Частицы сорбента из полистирола–дивинилбензола продаются под торговой маркой POROS. Существуют два варианта пор: более длинные **сквозные поры** (до 800 нм) и более короткие **диффузионные поры** (до 100 нм). Стационарная фаза покрывает поверхность частиц, в том числе и поверхность пор. Элюент просачивается сквозь поры, что позволяет веществам быстро уравновешиваться между подвижной и стационарной фазами. Для сравнения, микропористые частицы, используемые для ВЭЖХ, имеют гораздо меньший диаметр пор и, следовательно, создают гораздо более высокое противодавление. Все типы стационарных фаз, применяемые для различных вариантов хроматографии, можно использовать и для перфузионной хроматографии. Приборы используются те же, что и для ВЭЖХ или FPLC. Время разделения может составлять одну или несколько минут.

11.3.7 Мембранная хроматография

Альтернативой перфузионной хроматографии в контексте преодоления ограничений ВЭЖХ является **мембранная хроматография**. В данном случае вместо мелких пористых частиц применяются уложенные стопкой пористые мембраны, на которые нанесена стационарная фаза. Поры в мембранах крупные, что способствует свободному прохождению элюента с анализируемыми веществами. Равновесие устанавливается быстро, поскольку

поверхность каждой мембраны велика; это позволяет осуществлять разделение при высокой скорости потока (до 10 $см^3$/мин). Мембраны упакованы в специальные картриджи, которые заменяют колонку.

11.4 АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

11.4.1 Основы метода

Это классический вариант хроматографии, основанный на том, что некоторые твердые вещества, называемые **адсорбентами**, способны удерживать на своей поверхности молекулы других веществ. Процессы адсорбции, в основе которых лежат слабые неионные взаимодействия типа вандерваальсовых взаимодействий или образования водородных связей, происходят на специфических участках поверхности. Эти участки способны различать отдельные типы молекул и бывают заняты либо молекулами элюента, либо молекулами содержащихся в нем веществ в соотношении, которое определяется относительной силой их взаимодействия. Поскольку элюент постоянно проходит сквозь колонку, различия в силе связывания в конечном итоге приводят к разделению веществ. Сила взаимодействия конкретного вещества с поверхностью адсорбента зависит от имеющихся в молекуле вещества функциональных групп. Например, гидроксильная группа и ароматические структуры способствуют усилению связывания. В общем, сила адсорбции больше зависит от наличия в молекуле вещества специфических функциональных групп, чем от размера молекул вещества, поскольку с участками поверхности адсорбента взаимодействуют не целые молекулы, а именно их функциональные группы.

Типичным адсорбентом является оксид кремния. На его поверхности имеются силанольные группы (Si–OH), которые обладают свойствами слабой кислоты и могут взаимодействовать с полярными функциональными группами элюента или растворенного в нем вещества. **Топология** (расположение) силанольных групп в различных фирменных препаратах оксида кремния объясняет различия в их свойствах. Другие часто применяемые адсорбенты — оксид алюминия и углерод. Адсорбенты на основе углерода и оксидов алюминия и кремния применяются как для хроматографии низкого давления, так и для ВЭЖХ. Слабокислые оксиды кремния пригодны для разделения основных веществ, тогда как оксиды алюминия обладают более основными свойствами и лучше подходят для разделения кислых веществ.

В общем, для разделения обычно выбирают элюент, полярность которого сравнима с полярностью наиболее полярного вещества в разделяемой смеси. Так, для разделения веществ с гидроксильными группами подходят спирты, для веществ с карбонильной группой — ацетон или сложные эфиры, для преимущественно неполярных веществ — углеводороды типа гексана, гептана или толуола. Для градиентного элюирования обычно применяют смеси растворителей. Если в качестве стационарной фазы служит оксид кремния, то присутствие в подвижной фазе небольшого количества воды обычно улучшает разделение, поскольку молекулы воды избиратель-

но блокируют самые активные силанольные группы, оставляя свободной более селективную «популяцию» слабых участков связывания.

Адсорбционная хроматография чаще всего применяется для разделения неионных и не растворимых в воде соединений типа триглицеридов, витаминов и многих лекарственных препаратов.

11.4.2 Хроматография на гидроксиапатите

Кристаллический гидроксиапатит ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) используется в качестве адсорбента для разделения смесей белков или нуклеиновых кислот. Механизм адсорбции не до конца ясен, по-видимому, как ионы кальция, так и фосфат-ионы на поверхности адсорбента участвуют в диполь-дипольных и, возможно, электростатических взаимодействиях. Одно из наиболее важных применений гидроксиапатита состоит в отделении однонитевой ДНК от двунитевой ДНК. Обе формы ДНК связываются с адсорбентом в буфере с низким содержанием фосфата, но по мере повышения концентрации фосфата происходит селективная десорбция однонитевой ДНК. При более высокой концентрации буфера высвобождается и двунитевая форма. Это явление используется при проведении Cot-анализа (разд. 5.3.4). Сродство двунитевой ДНК к гидроксиапатиту настолько велико, что с помощью этого адсорбента ее можно отделить от РНК и белков, присутствующих в клеточном экстракте.

В продаже существует несколько вариантов гидроксиапатита, подходящих для хроматографии низкого и высокого давления. Можно назвать кристаллическую или сферическую форму, а также гидрокисапатит, связанный с агарозной матрицей. Адсорбционная способность всех этих материалов максимальна в нейтральном диапазоне pH; для адсорбции обычно применяют 20 мМ фосфатный буфер, а для элюирования концентрацию буфера увеличивают до 500 мМ.

11.4.3 Гидрофобная хроматография

Этот хроматографический метод был разработан для очистки белков и основан на гидрофобных свойствах поверхности белковых молекул, связанной с наличием в них остатков неполярных аминокислот. Гидрофобные остатки распределены на поверхности белков специфическим для каждого белка образом. В водных средах эти гидрофобные области покрыты оболочкой из упорядоченных молекул воды, которые эффективно маскируют гидрофобные группы. Однако при добавлении солей гидрофобные группы теряют свою водную оболочку, поскольку соли оттягивают ее на себя. В результате оголившиеся гидрофобные области белков могут взаимодействовать друг с другом. В **гидрофобной хроматографии** наличие гидрофобных групп, связанных с подходящей матрицей, способствует взаимодействию белков с матрицей и, тем самым, ослабляет белок-белковые взаимодействия. В качестве стационарной фазы чаще всего используют алкильные (от этильной до октильной) или фенильные группы, связанные либо с покрытым полиамидом оксидом кремния, либо с агарозой.

Среди фирменных адсорбентов можно назвать Phenyl Sepharose и Phenyl SPW для гидрофобной хроматографии низкого давления, Poly PROPYL Aspartamide, Bio-Gel TSK Phenyl и Spherogel TSK Phenyl для гидрофобной хроматографии высокого давления.

Поскольку для проведения гидрофобной хроматографии раствор образца должен содержать определенную концентрацию соли (например, сульфата аммония), чтобы способствовать открытию гидрофобных областей, этот метод применяют непосредственно после фракционирования с сульфатом аммония, поскольку в таком случае ионы аммония и сульфата уже присутствуют в образце. Для достижения максимального эффекта pH раствора белка доводят до значения его изоэлектрической точки. После адсорбции белков на стационарной фазе можно проводить

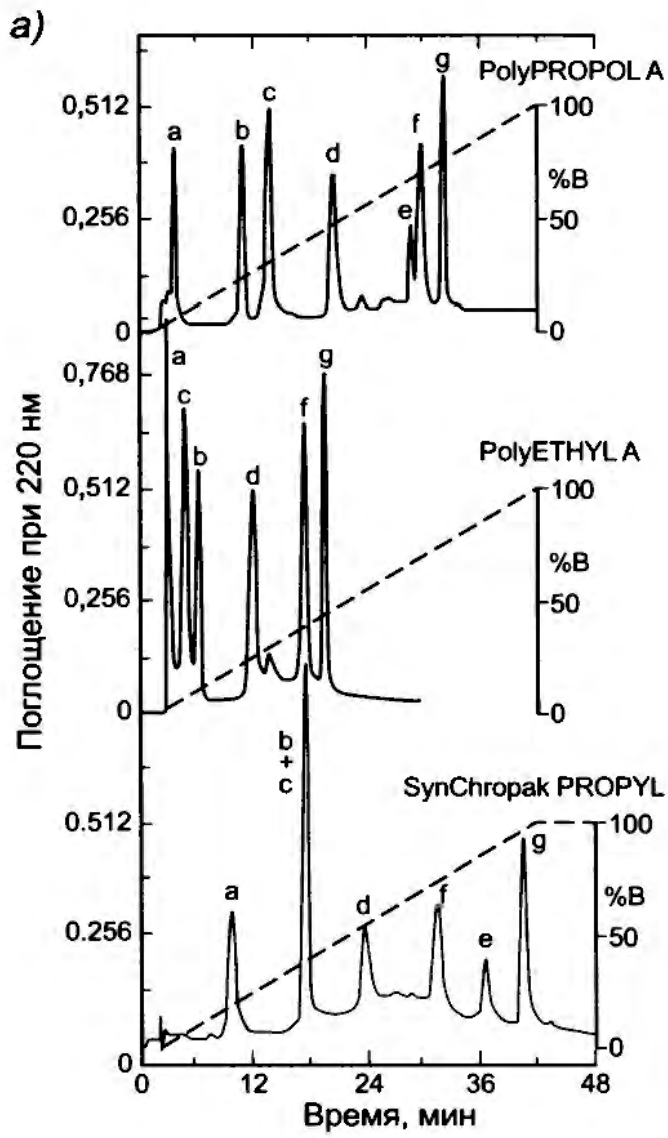


Рис. 11.12*а*. Разделение смеси белков методом гидрофобной хроматографии с применением разных стационарных фаз. Элюирование проводили линейным градиентом подвижной фазы B (от 0 до 100%; 40 мин). Состав фазы A: 1,8 M сульфат аммония + 0,1 M фосфат калия, pH 7,0. Подвижная фаза B: 0,1 M фосфат калия, pH 7,0. Детектирование осуществляли при длине волны 220 нм. Воспроизводится в соответствии с: K. Benedek (2003), High-Performance Interaction Chromatography, из книги *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology, **251**), M.-I. Aguilar (ed.), Humana Press, Totowa, NJ

селективное элюирование. Для этого существует несколько возможностей, включая постепенное снижение концентрации соли или повышение pH (что увеличивает гидрофильность белков) (рис. 11.12), а также использование заместителя, имеющего более высокое сродство к стационарной фазе. В качестве примеров можно назвать неионные детергенты (Triton X-100 или Tween 20), алифатические спирты (бутанол-1 или этиленгликоль), а также алифатические амины (1-аминобутан). Гидрофобная хроматография имеет два преимущества перед обращенофазовой хроматографией: во-первых, в водных растворах белки не так сильно денатурируют, во-вторых, высокая емкость колонок. Недостаток метода — сравнительно невысокое разрешение.

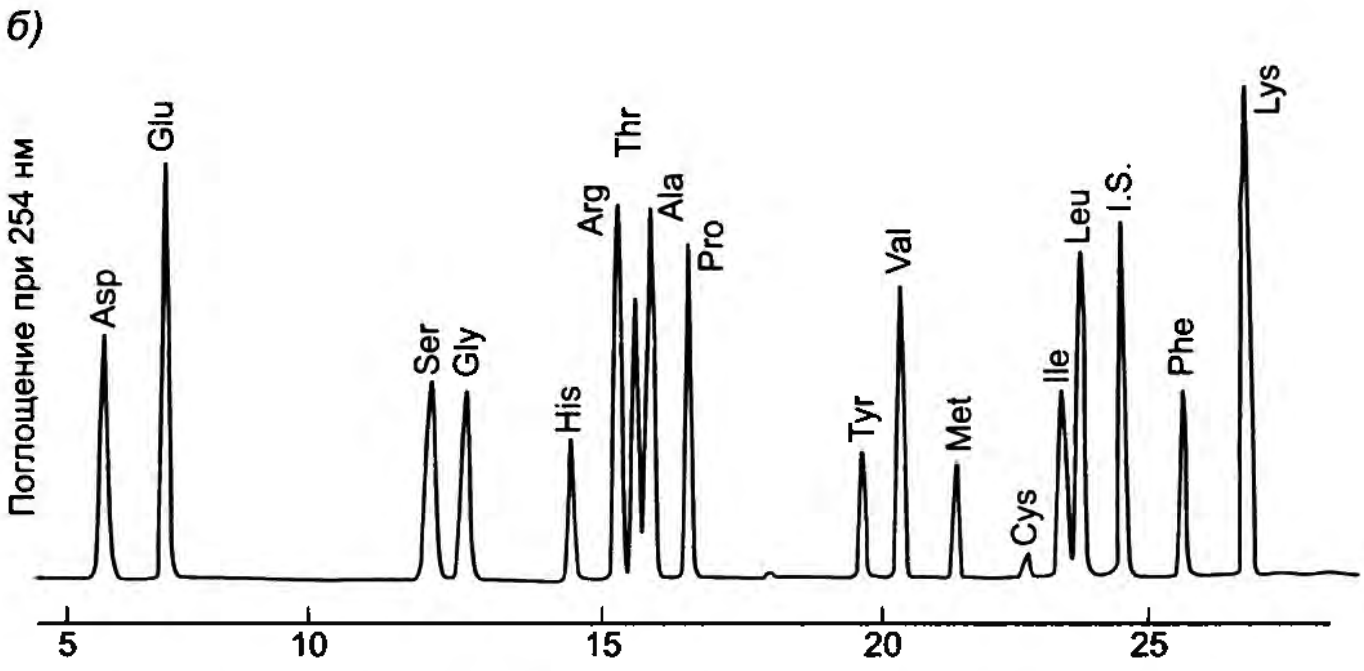


Рис. 11.12б. Разделение смеси аминокислот, образовавшихся в результате гидролиза белка куриного яйца, методом обращенно-фазовой хроматографии. Яичные белки гидролизовали в 6 М HCl при 145°C на протяжении 4 ч, а затем обрабатывали фенилизотиоцианатом до образования фенилтиокарбамильных производных. Эти производные разделяли на колонке Nova-pak C18 (длина 300 мм, внутренний диаметр 3,9 мм, слой диметилоктадецилсилил-связанного аморфного оксида кремния 4 мкм; Waters) при температуре 40°C. Осуществляли градиентное элюирование по следующей программе: 0–15 мин — раствор A (0,02 М фосфатный буфер, содержащий 5% метанол, 1,5% тетрагидрофуран, pH 6,8); 15–20 мин — 76% раствора A, 20% раствора B (элюент A:ацетонитрил, 50:50, об/об), 4% раствора C (ацетонитрил : вода, 70:30, об/об); 20–30 мин — 70% раствора A, 20% раствора B, 10% раствора C со скоростью потока 1,2 $см^3$/мин; детекцию осуществляли при 254 нм. I.S. — внутренний стандарт (норлейцин). Воспроизводится в соответствии с: H.-L. Woo (2001), Determination of aminoacids in foods be reversed-phase high-performance liquid chromatography with new precolumn derivatives, butylthiocarbamyl, and benzylthiocarbamyl derivatives compared to the phenylthiocarbamyl derivative and ion-exchange chromatography, в книге *Amino Acid Analysis Protocols* (Methods in Molecular Biology, **159**), C. Cooper, N. Packer and K. Williams (eds.), Humana Press, Totowa, NJ

11.5 РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

11.5.1 Основы метода

Подобно другим хроматографическим методам, распределительная хроматография основана на различии коэффициентов емкости k' и коэффициентов распределения K_d анализируемых веществ при использовании жидкой стационарной и жидкой подвижной фазы. Метод можно подразделить на **жидко-жидкостную хроматографию**, при которой жидкая стационарная фаза удерживается на сорбенте исключительно физически, и **жидкостную хроматографию с привитой стационарной фазой**, при которой стационарная фаза связана с сорбентом ковалентной связью. Примером жидко-жидкостной хроматографии служит система, в которой водная стационарная фаза удерживается на целлюлозе, крахмале или оксиде кремния, каждый из которых обладает способностью физически связывать до 50% воды и оставаться при этом сыпучим порошком. Преимущество такого метода хроматографии состоит в его низкой стоимости, высокой емкости и селективности к широкому кругу веществ. Недостаток заключается в постепенном вымывании стационарной фазы и, следовательно, в изменении условий процесса разделения. Эта проблема преодолевается путем связывания стационарной фазы. В большинстве случаев матрицей для связывания стационарной фазы служит оксид кремния, который модифицируют в реакции с органическим хлорсиланом:

$$\underset{\text{оксид кремния}}{\text{-S–OH}} + \underset{\substack{\text{органический}\\ \text{хлорсилан}}}{\text{Cl–Si–(CH}_3\text{)}_2\text{R}} \rightarrow \underset{\substack{\text{модифицированная}\\ \text{силанольная группа}}}{\text{Si–O–Si–(CH}_3\text{)}_2\text{R}} + \text{HCl}$$

Лишние силанольные группы удаляют путем реакции с хлортриметилсиланом, что снижает вероятность образования «хвостов» пиков, улучшая качество разделения. Существует два основных варианта проведения распределительной хроматографии, отличающихся относительной полярностью стационарной и подвижной фаз.

11.5.2 Нормально-фазовая жидкостная хроматография

В данном варианте распределительной хроматографии стационарная фаза полярная, а подвижная фаза сравнительно неполярная. Чаще всего в качестве стационарной фазы используют связанный с оксидом кремния алкиламин. Для подвижной фазы обычно выбирают органический растворитель типа гексана, гептана, дихлорметана или этилацетата. Эти растворители по их полярности можно расположить в **элютропный ряд**. Например, в порядке увеличения полярности:

н-гексан < циклогексан < трихлорметан < дихлорметан < тетрагидрофуран < < ацетонитрил < этанол < метанол < уксусная кислота < вода

Механизм разделения основан на способности анализируемых веществ замещать молекулы подвижной фазы, которые в виде монослоя адсорбированы на поверхности стационарной фазы, а также на способности

веществ конкурировать с молекулами подвижной фазы за образование двойного слоя на поверхности стационарной фазы. Элюирование происходит таким образом, что наименее полярные вещества сходят с колонки первыми, а наиболее полярные — последними. Для снятия с колонки полярных веществ обычно требуется градиентное элюирование с мобильной фазой увеличивающейся полярности, что обычно достигается с помощью метанола или диоксана. Основное применение нормально-фазовой жидкостной хроматографии — разделение малорастворимых в воде веществ, а также тех, которые не поддаются разделению путем обращенно-фазовой хроматографии.

11.5.3 Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

В данном варианте хроматографии используется неполярная стационарная фаза и сравнительно более полярная подвижная фаза, откуда и название метода — «обращение фаз». Чаще всего в данном варианте применяется привитая стационарная фаза, алкилсилановые группы которой связаны химической связью с оксидом кремния. Обычно используются бутилсилановые (C4), октилсилановые (C8) и октадецилсилановые (C18) группы (табл. 11.2). В качестве подвижной фазы обычно берут воду или водные буферы, метанол, ацетонитрил, тетрагидрофуран или их смеси. Органический растворитель в данной терминологии называют **органическим модификатором**. Обращенно-фазовая жидкостная хроматография отличается от большинства других вариантов хроматографии тем, что стационарная фаза является практически инертной и участвует лишь во взаимодействиях неполярного (гидрофобного) характера.

Разделение веществ методом обращенно-фазовой хроматографии определяется в первую очередь характеристиками подвижной фазы и, по всей видимости, основано на сочетании механизмов адсорбции и рас-

Таблица 11.2. **Примеры привитой стационарной фазы для обращенно-фазовой ВЭЖХ**

Продукт	Размер частиц, мкм	Размер пор, Å
μBondapak octadecyl	10	70
μBondapak phenyl	10	125
μBondapak CN	10	125
μBondapak NH_2	10	80
Zorbax octadecyl	6	70
Zorbax octyl	6	70
Zorbax NH_2	6	70
Discovery octyl	5	180
Supelcosil LC-octadecyl	5	120
Supelcosil LC-301 methyl	5	300
Supelcosil LC-308 octyl	5	300

1 Å = 0,1 нм.

пределения. Метод имеет много общего с гидрофобной хроматографией. Простой модели для описания процессов, происходящих при обращенно-фазовой хроматографии, не существует; наиболее часто обращаются к **сольвофобной теории**. Теория основана на рассмотрении баланса свободной энергии и изменений энтропии, происходящих при связывании веществ со стационарной и подвижной фазами. Притягательность обращенно-фазовой хроматографии состоит в том, что такие простые изменения подвижной фазы, как добавление соли, изменение pH или концентрации органического растворителя принципиальным образом влияют на параметры разделения. Кроме того, метод чувствителен к изменению температуры: увеличение температуры на 10 °C примерно вдвое увеличивает коэффициент емкости. При элюировании первыми с колонки сходят полярные вещества, а последними — неполярные. Для элюции неполярных веществ может понадобиться возрастающий градиент слабо полярного растворителя типа гексана.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ, возможно, является наиболее часто используемым методом хроматографии, главным образом, из-за гибкости метода и его высокого разрешения. Метод широко используется для анализа лекарственных препаратов и их метаболитов, инсектицидов и пестицидов, а также аминокислот и пептидов. Кроме того, его часто применяют для анализа белков в системе FPLC (рис. 11.12б). Октадецилсилан (C18) связывает белки прочнее, чем октил- или метилсилан, и поэтому с большей вероятностью вызывает денатурацию белков (в результате более жестких условий элюирования). Обращенно-фазовая хроматография в неводных средах применяется для разделения липофильных соединений, например жиров.

11.5.4 Ион-парная обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Поскольку обращенно-фазовая хроматография часто применяется для разделения некоторых очень полярных соединений, таких как аминокислоты, пептиды, органические кислоты и катехоламины, иногда возможно усовершенствовать процесс одним из двух указанных ниже способов.

- *Подавление ионизации* соединений путем использования подвижной фазы с достаточно высоким или низким значением pH. Например, при анализе слабых кислот следует использовать подкисленную подвижную фазу.
- *Образование ионных пар*. В подвижную фазу добавляют **противоион**, заряд которого противоположен заряду анализируемого вещества; образующиеся ионные пары достаточно липофильны для того, чтобы удерживаться неполярной стационарной фазой в обращенно-фазовой системе. Таким образом, для облегчения выделения кислого органического соединения (RCOOH), которое присутствует в растворе в виде аниона, в качестве противоиона используют четвертичные алкиламины типа тетрабутиламмония. Для выделения основания (RNH_2), которое присут-

ствует в растворе в виде катиона, используют алкилсульфонаты типа гептансульфоната натрия.

$$\underset{\text{карбоксильный анион}}{RCOO^-} + \underset{\text{противоион}}{R'_4N^+} \rightleftarrows \underset{\text{ионная пара}}{[RCOO^-N^+R'_4]}$$

$$\underset{\text{сопряженная кислота для слабого основания}}{RN^+H_3} + \underset{\text{противоион}}{R'SO_3^-} \rightleftarrows \underset{\text{ионная пара}}{[RH_3N^+\ ^-O_3SR']}$$

где R' — подходящая алифатическая группа. Пока не совсем ясно, почему образование ионных пар способствует лучшему разрешению; для объяснения этого явления предложено две теории. В соответствии с первой теорией пара ионов ведет себя как единая нейтральная частица, а вторая теория предполагает, что образуется некая активная поверхность для обмена ионов, на которой противоион, имеющий выраженные липофильные свойства, и разделяемые ионы адсорбируются гидрофобной и неполярной стационарной фазой. При практическом применение этого хроматографического метода условия подбираются эмпирически. На разделение могут весьма сильно влиять такие факторы, как размер противоиона, его концентрация и pH раствора.

Чаще всего используются октил- и октадецилсилан-связанные фазы в сочетании с подвижной фазой вода/метанол или вода/ацетонитрил. Одним из преимуществ ион-парной обращенно-фазовой хроматографии является то, что, если разделяемый образец представляет собой смесь неионных и ионных соединений, две эти группы веществ можно разделять одновременно, поскольку условия образования ионных пар не оказывают влияния на разделение неионных веществ. К примеру, в ионообменной хроматографии это не так.

11.5.5 Хиральная (энантиоселективная) хроматография

Хиральные вещества либо содержат в молекуле по крайней мере один асимметрический атом углерода (**хиральный центр**), либо их молекулы асимметричны. Они существуют в виде двух **энантиомерных форм**, которые соотносятся между собой как объект и его зеркальное отражение. Такие вещества имеют одинаковые физические и химические свойства и различаются только по воздействию на плоскополяризованный свет: одни являются правовращающими (+), а другие левовращающими (–). Для обозначения структуры таких веществ существует ряд договоренностей. Классическая D/L-номенклатура, применяемая для аминокислот и моносахаридов, не может быть прямо перенесена на другие вещества; более общее употребление находит система Кана–Ингольда–Прелога, в которой конфигурация энантиомеров описывается буквами R (*от лат.* rectus — правый) и S (*от лат.* sinister — левый). До недавних пор разделение энантиомеров пред-

ставляло собой неразрешимую задачу и создавало множество проблем для фармацевтической промышленности и для клинического использования лекарств, многие из которых представляют собой хиральные соединения, поскольку лишь одна из форм потенциального фармпрепарата оказывает желаемое биологическое действие. Например, такие формы различаются по своей способности взаимодействовать с рецепторами, ответственными за многие физиологические процессы; кроме того, они часто метаболизируются и выводятся из организма с разными скоростями.

На сегодняшний день существует несколько хроматографических методов, позволяющих разделять смеси энантиомеров. Один из методов основан на том факте, что диастереомеры (стереоизомеры, молекулы которых не являются зеркальными отражениями друг друга) обладают разными физическими свойствами, хотя и содержат одинаковые функциональные группы. Следовательно, такие вещества можно разделить обычными хроматографическими методами, чаще всего для этого используют обращенно-фазовую хроматографию. Для разделения других типов энантиомеров требуется, чтобы они имели функциональные группы, способные реагировать с химически и оптически чистым **хиральным дериватизирующим агентом** (ХДА), превращающим их в смесь диастереомеров:

$$\underset{\text{смесь энантиомеров}}{(R + S)} + \underset{\text{ХДА}}{R'} \rightleftarrows \underset{\text{смесь диастереомеров}}{RR' + SR'}$$

Ниже приведены примеры ХДА, которые существуют в виде R- или S-энантомеров:

Для аминов	N-Трифторацетил-1-пролилхлорид, α-фенилбутиловый ангидрид
Для спиртов	2-Фенилпропионилхлорид, 1-фенилэтилизотиоцианат
Для кетонов	2,2,2-Трифтор-1-пентилэтилгидразин
Для алифатических и алициклических кислот	1-Ментол, дезоксиэфедрин

Хотя такой подход к разделению хиральных соединений сравнительно прост, важно, чтобы процесс дериватизации проходил быстро и количественно. Очень часто, однако, это далеко не так, что и ограничивает применимость метода.

Альтернативным способом решения проблемы является использование подвижной фазы, обладающей хиральными свойствами. При этом между разделяемыми энантиомерами и хиральными молекулами в подвижной фазе образуются временные диастереоизомерные комплексы. Примерами хиральных агентов для подвижной фазы могут служить альбумин, α1-кислый гликопротеин, α-, β- и γ-циклодекстрины, камфоро-10-сульфоновая кислота и N-бензоксикарбонилглицин-L-пролин; все они используются в системе обращенно-фазовой хроматографии.

Однако наиболее успешно разделение энантиомеров достигается с помощью хиральной стационарной фазы. Такой подход основан на принципе, что благодаря трехцентровому взаимодействию между стационарной фазой (выступающей в роли дискриминатора) и энантиомером удается разделить рацемическую смесь на основе различной пространственной организации функциональных групп в молекулах энантиомеров. В одном из вариантов метода используются **фазы Пиркла** на основе динитробензольных производных аминокислот, таких как фенилглицин, связанных с оксидом кремния. По-видимому, эти фазы способствуют временному образованию комплексов между энантиомерами и стационарной фазой за счет водородных связей и вандерваальсовых взаимодействий. Элюирование обычно осуществляется по методу обращенно-фазовой хроматографии.

Другие хиральные стационарные фазы представлены триацетилцеллюлозой и различными циклодекстринами, связанные с оксидом кремния. Циклодекстрины представляют собой циклические олигосахариды с открытой усеченной конической структурой (ширина в основании 6–8 Å = 0,6–0,8 нм). Их внутренняя поверхность преимущественно гидрофобная, но вокруг широкого края конуса локализованы вторичные гидроксильные группы. β-Циклодекстрин содержит семь глюкопиранозных звеньев и 35 хиральных центров, а α-циклодекстрин — шесть глюкопиранозных звеньев, 30 хиральных центров и имеет меньший размер, чем β-циклодекстрин. Такие фазы называют **полыми хиральными фазами**, поскольку их действие основано на способности энантиомеров проникать в трехмерную структуру циклодекстрина и предоставлять при этом функциональные группы (и хиральный центр) для взаимодействия с гидроксильными группами на краю конуса. Таким методом в сочетании с элюированием в обращенно-фазовой системе удалось разделять смеси энантиомеров, имеющих в своей структуре пяти-, шести- или семичленное ароматическое кольцо. Еще один подход состоит в применении в качестве стационарной фазы макроциклических антибиотиков ванкомицина и тейкопланина. Ванкомицин имеет 18 хиральных центров, тейкопланин — 23. Оба показали хорошие результаты в разделении смесей энантиомеров как в нормальной, так в обращенно-фазовой системе.

Поскольку белки обладают оптической активностью, их в принципе можно использовать в качестве хиральной стационарной фазы. Были предприняты попытки использовать с этой целью бычий сывороточный альбумин и α1-кислый гликопротеин; оба белка показали хорошие результаты в ряде разделений, но механизм их действия пока неясен. Оба белка содержатся в плазме крови и, как уже давно известно, могут связывать лекарственные препараты. Альбумин имеет не менее двух различных участков связывания лекарств с кислыми и основными свойствами. α1-Кислый гликопротеин имеет лишь один участок для связывания основных лекарств, например пропранолола. Такие стационарные фазы на основе белков применяются в сочетании с водными буферными системами и не должны подвергаться воздействию крайних значений pH или органических растворителей.

11.6 ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

11.6.1 Основы метода

Этот хроматографический метод основан на притяжении противоположно заряженных частиц. Многие биологические молекулы, например аминокислоты и белки, имеют ионизируемые группы, которые могут нести положительный или отрицательный заряд. Суммарный заряд таких молекул определяется значением их pK_a и pH среды в соответствии с уравнением Хендерсона–Хассельбаха (разд. 1.4.2, уравнения 1.8а,б и 1.9а,б). Ионообменную хроматографию часто выбирают для разделения и очистки белков, пептидов, нуклеиновых кислот, полинуклеотидов и других заряженных молекул, главным образом, из-за ее высокого разрешения и большой емкости.

Существует два типа ионообменников — **катионообменники** и **анионообменники**. Катионообменники содержат отрицательно заряженные группы и притягивают положительно заряженные частицы — катионы. Такие ионообменники называют также **кислотными ионообменниками**, поскольку их отрицательный заряд возникает в результате ионизации групп с кислотными свойствами. Анионообменники содержат положительно заряженные группы, которые притягивают отрицательно заряженные частицы — анионы. По аналогии, для них применяется термин **основные ионообменники**, поскольку их положительный заряд обычно является результатом присоединения протонов к основным группам.

Механизм ионного обмена принято рассматривать состоящим из пяти основных этапов.

- *Диффузия иона к поверхности ионообменника* в гомогенных растворах происходит быстро.
- *Диффузия иона сквозь матрицу ионообменника к участку обмена* зависит от количества перекрестных сшивок в матрице и концентрации раствора. Считается, что данная стадия определяет скорость ионного обмена в целом.
- *Обмен ионов* происходит мгновенно и представляет собой равновесный процесс.

Катионообменник

$$\underset{\text{обменник}}{RSO_3^-\ldots}\ \underset{\text{противоион}}{Na^+} + \underset{\text{заряженный ион}}{N^+H_3R'} \rightleftarrows \underset{\text{связанный ион}}{RSO_3^-\ldots N^+H_3R'} + \underset{\text{обмененный ион}}{Na^+}$$

Анионообменник

$$(R)_4N^+\ldots Cl^- + {}^-OOCR' \rightleftarrows (R)_4N^+\ldots {}^-OOCR' + Cl^-$$

Чем больше заряд на обмениваемой молекуле, тем прочнее она связывается с ионообменником и тем труднее ее вытеснить другими ионами.

- *Диффузия обмененного иона через матрицу ионообменника к поверхности.*
- *Селективная десорбция элюентом и диффузия в толщу элюента.* Се-

лективная десорбция связанного иона осуществляется путем изменения pH и/или концентрации ионов или путем аффинного элюирования. В последнем случае в систему вводят ион, сродство которого к ионообменнику выше, чем сродство связанного иона.

11.6.2 Необходимые материалы. Применение метода

В ионообменной хроматографии низкого давления могут быть использованы ряд матриц и ионизируемых групп. Среди матриц можно назвать полистирол, целлюлозу и агарозу. Функциональные ионизируемые группы сульфонатная ($-SO_3^-$) и четвертичная аммонийная ($-N^+R_3$) — **сильные ионообменники**, поскольку они полностью ионизованы при стандартных рабочих значениях pH; карбоксильная ($-COO^-$) группа и диэтиламмоний ($-HN^+(CH_2CH_3)_2$) — **слабые ионообменники**, поскольку они ионизованы лишь в узком диапазоне pH. Примеры наиболее часто используемых ионообменников представлены в табл. 11.3. Ионообменники для ВЭЖХ с привитой фазой, содержащие широкий диапазон ионизируемых групп, существуют в пористой и поверхностно-пористой форме. Пористые сорбенты изготавливают из полистирола, пористого оксида кремния или гидрофильных полиэфиров; они особенно хороши для разделения белков. Диаметр частиц таких сорбентов составляет от 5 до 25 мкм. Большинство ионообменников для ВЭЖХ стабильны до 60 °C, так что разделение можно осуществлять при этой температуре: с ростом температуры падает вязкость подвижной фазы и, следовательно, увеличивается эффективность разделения.

Обменная емкость

Все ионообменники характеризуются **полной обменной емкостью**, которая определяется как число миллиэквивалентов обмениваемых ионов на грамм сухого ионообменника либо на единицу объема водной смолы. Иногда, например для гемоглобина, пользуются параметром **доступной емкости**. Обменная емкость отражает степень замещения ионообменника и, следовательно, помогает выбрать подходящий носитель.

Выбор ионообменника

Выбор сорбента для ионообменной хроматографии зависит от стабильности анализируемых веществ, их относительных молекулярных масс и особых требований к результатам разделения. Многие биологические молекулы, особенно белки, стабильны только в узком диапазоне pH, так что для хроматографии выбирают ионообменник, способный работать в данных условиях. Обычно, если вещество более устойчиво при pH ниже его изоионной точки (когда оно имеет суммарный положительный заряд), для разделения используют катионообменник, а если оно более устойчиво при pH выше изоионной точки (когда оно имеет суммарный отрицательный заряд), используют анионообменник. Для веществ, стабильных в широком диапазоне pH, можно использовать оба типа ионообменников. Выбор между слабым и

Таблица 11.3. **Примеры наиболее широко используемых ионообменников**

Тип ионообменника	Функциональные группы	Название функциональной группы	Матрица
Слабокислотный катионообменник	$-COO^-$ $-CH_2COO^-$	Карбоксильная Карбоксиметильная	Агароза Целлюлоза Декстран Полиакрилат
Сильнокислотный катионообменник	$-SO_3^-$ $-CH_2SO_3^-$ $-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	Сульфогруппа Сульфометильная Сульфопропильная	Целлюлоза Декстран Полистирол Полиакрилат
Слабоосновный анионообменник	$-CH_2CH_2N^+H_3$ $-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$	Аминоэтильная Диэтиламиноэтильная	Агароза Целлюлоза Декстран Полистирол Полиакрилат
Сильноосновный анионообменник	$-CH_2N^+(CH_3)_3$ $-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_3$ $-CH_2N^+(CH_2CH_2OH)(CH_3)_2$ $-CH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2(CH_2CH(OH)CH_3)$	Триметиламинометильная Триэтиламиноэтильная Диметил-2-гидроксиэтиламинометильная Диэтил-2-гидроксипропиламиноэтильная	Целлюлоза Декстран Полистирол

сильным ионообменником также зависит от стабильности вещества и от влияния pH на его заряд. Слабые электролиты, требующие для ионизации крайних значений pH, можно разделять только с помощью сильных ионообменников, поскольку они работают в широком диапазоне pH. Напротив, для сильных электролитов преимущество имеют слабые ионообменники по целому ряду причин, в частности из-за меньшей вероятности денатурации образцов, неспособности связывать слабо заряженные примеси и лучших условий для элюирования. Хотя количество перекрестных сшивок в ионообменнике не влияет на механизм ионного обмена, оно влияет на емкость ионообменника. Следовательно, выбор конкретного ионообменника определяется относительными молекулярными массами (и размерами) компонентов образца.

pH элюента

pH буфера, используемого в качестве элюента, должно быть по крайней мере на одну единицу pH выше или ниже изоионной точки выделяемого вещества. Обычно с анионообменниками используют катионные буферы, такие как Tris, пиридиновый или алкиламиновый буфер, а с анионообменниками — анионные буферы типа ацетатного, барбитуратного или фосфатного. Исходные значения pH и ионной силы буфера должны выбираться

таким образом, чтобы компоненты образца могли связаться с ионообменником. А для последующего элюирования сначала следует выбрать буфер с наименьшей ионной силой, достаточной для смывания анализируемых веществ с колонки. При таком подходе на колонке связывается минимальное количество примесей, а при элюировании их максимальное количество останется связанными на колонке. Количество наносимого на колонку вещества зависит от размера колонки и емкости ионообменника. Обычно при проведении изократического элюирования объем образца составляет 1–5% объема слоя колонки. При проведении градиентного элюирвоания исходные условия подбирают таким образом, чтобы все анализируемые вещества связывались в верхней части колонки. В таком случае объем не играет важной роли, так что можно наносить на колонку большие объемы разбавленных образцов, используя тем самым данную стадию хроматографии для концентрирования веществ.

Элюирование

Градиентное элюирование проводят гораздо чаще, чем изократическое. Можно использовать как непрерывный, так и ступенчатый градиент pH или ионной силы, однако непрерывный градиент обычно приводит к лучшему разрешению и менее вероятному образованию «хвостов» пиков. Обычно с анионообменниками используют понижающийся градиент pH и повышающийся градиент ионной силы, а с катионообменниками используют повышающиеся градиенты pH и ионной силы.

11.6.3 Хроматофокусирование

Принцип **хроматофокусирования** аналогичен принципу изоэлектрического фокусирования (разд. 10.3.4). Для создания в колонке линейного градиента pH сначала анионообменник уравновешивают при определенном значении pH, а затем наносят на него полибуфер, имеющий равную буферную емкость во всем рабочем диапазоне pH, а начальное значение pH ниже того, при котором уравновешивали колонку. В результате на колонке устанавливается градиент pH: значение pH в верхней части на 3–4 единицы ниже, чем в нижней части. Если на колонку нанести белок в стартовом буфере с таким же значением pH, как в верхней части колонки, белок будет мигрировать вниз по колонке в виде катиона до тех пор, пока не достигнет зоны pH, соответствующей его изоэлектрической точке. Сразу за этой зоной он превратится в анион и сможет связывать положительно заряженные группы ионообменника. Если продолжать элюирование стартовым буфером, значение pH вдоль колонки будет постепенно понижаться, приводя к тому, что связанный белок перейдет в катионную форму и больше не будет удерживаться. Белок будет продолжать свое перемещение вниз по колонке, пока вновь не достигнет зоны чуть выше своей изоэлектрической точки, где опять свяжется с ионообменником. Этот процесс продолжается непрерывно до тех пор, пока белок не сойдет с колонки при pH чуть выше изоэлектрической точки (рис. 11.13).

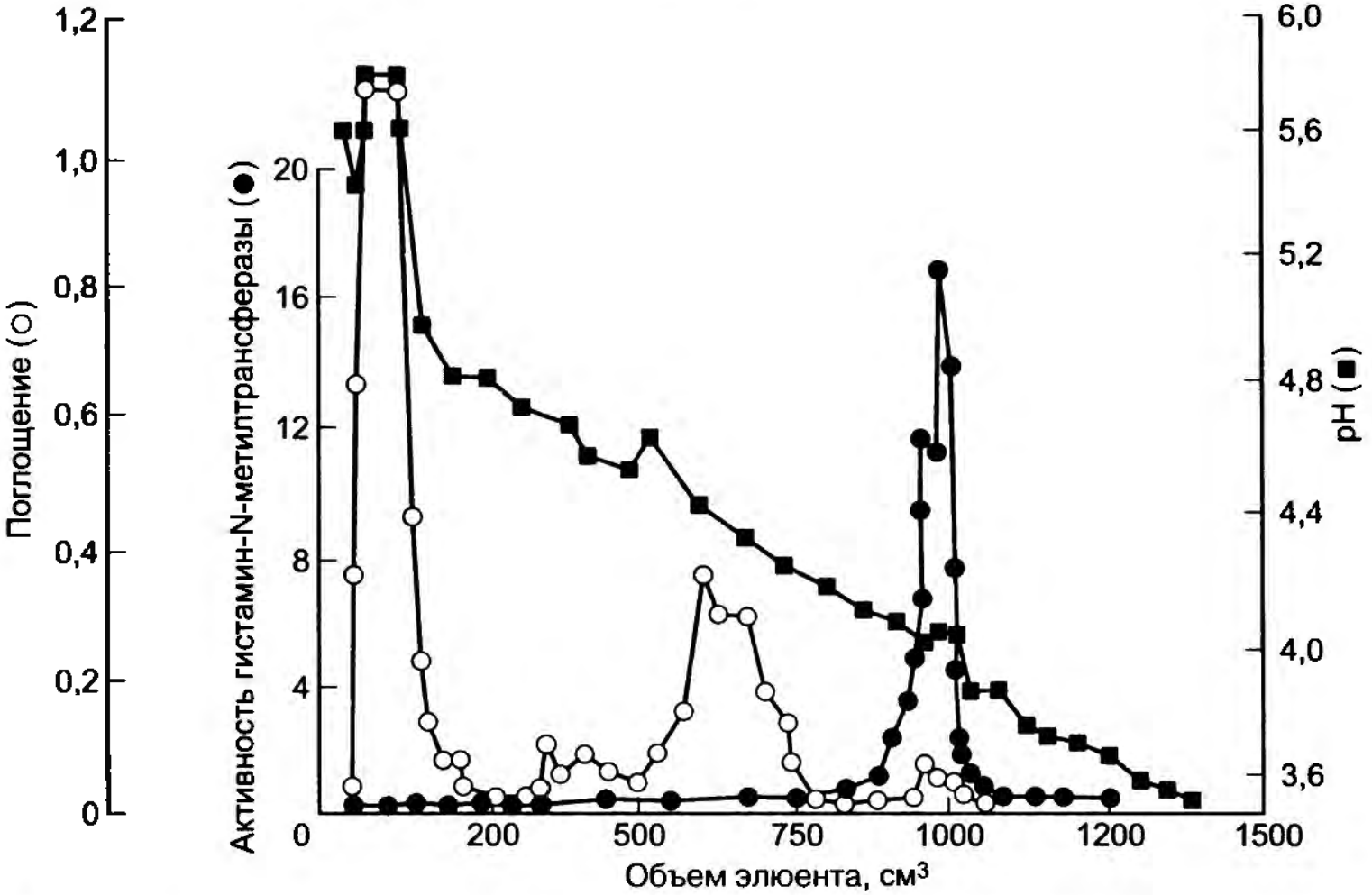


Рис. 11.13. Хроматофокусирование препарата гистамин-N-метилтрансферазы крысы. Частично очищенный образец (около 130 мг белка) в полибуфере наносили на ионообменную колонку (62 × 1,6 см), предварительно уравновешенную с 25 мМ буфером пиперазин-HCl, pH 5,5. Перед нанесением образца на колонку нанесли 5 см³ полибуфера-74, pH 3,5. Элюирование осуществляли при скорости потока 20 см³/ч. Собирали фракции объемом 5 см³, в которых измеряли pH (■), активность гистамин-N-метилтрансферазы (●) и поглощение при 600 нм после проведения реакции с Кумасси бриллиантовым синим (○). Активность белка выражали в расп./мин · 10^{-4} на 2,5 см³ хлороформа. Воспроизводится в соответствии с: M. J. York (1982), The purification and kinetic properties of histamine-*N*-methyltransferase, M. Phil. thesis, University of Hertfordshire

При элюировании нанесенные на колонку белки сходят в порядке увеличения их изоэлектрических точек. Если в процессе элюирования на колонку дополнительно нанести смесь белков, каждый из них автоматически соединится с первой фракцией идентичного белка, что приводит к **эффекту фокусирования** и позволяет наносить на колонку большие объемы образцов без вреда для разрешения. Данный метод характеризуется высокой емкостью. Хроматофокусирование приводит к достаточно хорошему разделению сложных белковых смесей при условии различия их изоэлектрических точек. Белки с близкими изоэлектрическими точками разделяются плохо.

11.7 ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ)

11.7.1 Основы метода

Хроматографический метод разделения на основании размеров молекул и их формы связан со способностью различных пористых материалов выступать в роли **молекулярного сита**. Возможно, наиболее часто для этой цели используется группа полимерных органических соединений с трехмерной структурой пор, которая придает этим веществам свойства гелей. Термин **гель-фильтрация** используется для описания разделения молекул разного размера с помощью подобных гелеобразных материалов. Метод разделения с помощью пористых стеклянных гранул называют хроматографией на стеклянных гранулах **с контролируемым размером пор**. Термин **эксклюзионная**, или **гель-проникающая**, **хроматография** описывает все процессы разделения молекул с помощью молекулярных сит*. Данный раздел посвящен главным образом рассмотрению особенностей и возможных приложений гель-фильтрации.

Общий принцип эксклюзионной хроматографии довольно прост. Заполненную частицами геля или пористыми стеклянными гранулами колонку уравновешивают подвижной фазой, подходящей для разделения образца. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в поры сорбента, проходят между частицами и быстро сходят с колонки. Более мелкие молекулы распределяются между подвижной фазой, находящейся вне и внутри пор, и, следовательно, продвигаются через колонку медленнее и сходят с нее позднее. На рис. 11.14 схематично представлены три стадии такого процесса.

Степень доступности захваченной гелем подвижной фазы для растворенных веществ определяется пористостью частиц геля и размером молекул этих веществ. Таким образом, распределение веществ на колонке с гелем зависит только от доступного для них общего объема подвижной фазы (как внутри частиц, так и вне их). Для определенного типа геля коэффициент распределения конкретного вещества между внутренней и внешней подвижной фазой является функцией размера его молекул. Если молекулы вещества крупные и полностью исключаются из подвижной фазы, находящейся внутри геля, $K_d = 0$, но если молекулы вещества достаточно малы, чтобы полностью проходить в поры, $K_d = 1$. Благодаря различию размеров пор в отдельных частицах геля, для молекул промежуточного размера какая-то доля подвижной фазы доступна, а какая-то нет; следовательно, значение K_d колеблется в пределах от 0 до 1. Именно эти вариации K_d позволяют разделить в геле вещества с близкими размерами молекул.

---

* Обычно принято подразделять эксклюзионную хроматографию на гель-проникающую хроматографию, в которой элюент — неводный растворитель, и гель-фильтрацию, в которой элюент — вода. — *Прим. перев.*

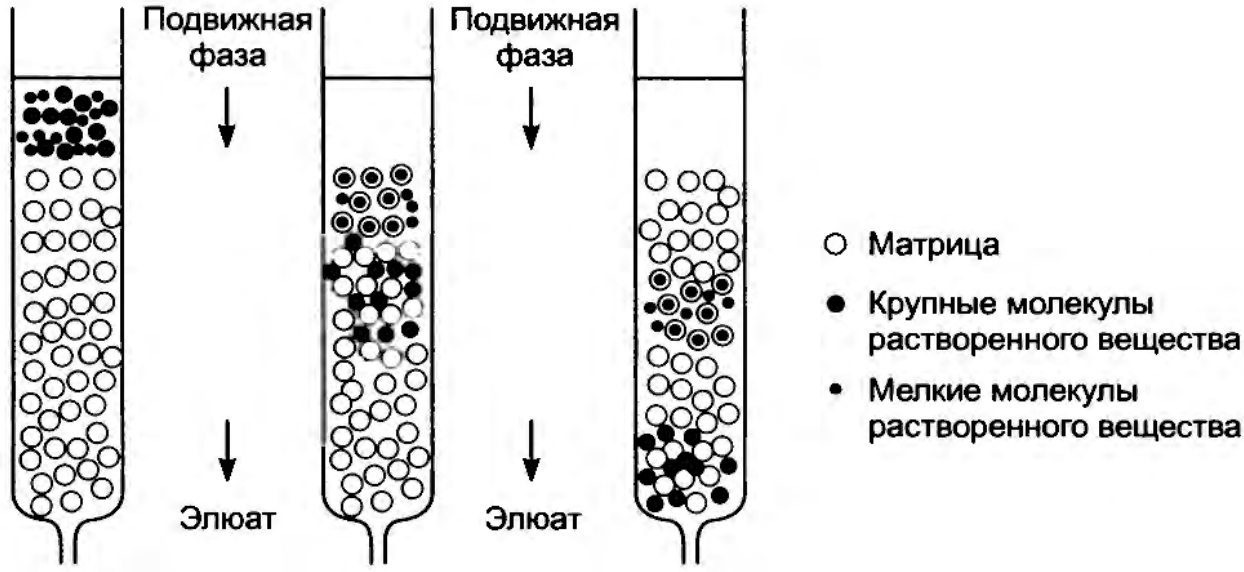


Рис. 11.14. Разделение молекул разного размера методом эксклюзионной хроматографии. Крупные молекулы элюируются первыми в мертвом объеме колонки

Для двух веществ с разной молекулярной массой и коэффициентами распределения K'_d и K''_d разница в объемах элюента V_S определяется по формуле:

$$V_S = (K'_d - K''_d)V_i \qquad (11.14)$$

где V_i — внутренний объем геля, доступный для вещества с $K_d = 1$.

На практике отклонения от идеального поведения веществ, например, в результате недостаточно равномерной набивки колонки, требуют снижения объема наносимого образца ниже величины V_S, поскольку соотношение объема образца и внутреннего объема геля влияет как на качество разделения, так и на степень разведения образца.

11.7.2 Необходимые материалы. Применение

Для жидкостной хроматографии низкого давления обычно используют гели на основе декстрана, агарозы, полиакриламида, полиакрилоилморфина и полистирола. Сорбенты для ВЭЖХ и FPLC должны быть более прочными, чтобы выдерживать высокое рабочее давление; они обычно состоят из перекрестно-сшитых молекул декстрана, агарозы, полистирола, поливинилхлорида, поливинилового спирта, полиметакрилата или выполнены из твердого стекла с контролируемым размером пор или оксида кремния (табл. 11.4). Некоторые из этих материалов, например те, что состоят из полистирола, могут использоваться только в безводных системах.

Эксклюзионная хроматография требует использования единственной подвижной фазы и изократического элюирования. Чаще всего методом детектирования является определение поглощения в УФ-диапазоне. Колонки для эксклюзионной хроматографии длиннее остальных; это позволяет увеличить количество стационарной фазы и, следовательно, объем пор.

Таблица 11.4. **Стационарные фазы для эксклюзионной хроматографии**

Полимер	Фирменное название	Диапазон фракционирования[a], $M_r \cdot 10^{-3}$
Жидкостная хроматография низкого давления		
Декстран	Сефадекс	
	G-10	< 0,7
	G-25	1–5
	G-50	1,5–30
	G-100	4–150
	G-200	5–600
Перекрестно-сшитый декстран	Сефакрил	
	S-100	1–100
	S-200	5–250
	S-300	10–1500
	S-400	20–8000
Агароза	Сефароза	
	6B	10–4000
	4B	60–20 000
	2B	70–40 000
Полиакриламид	Биогель	
	P-2	0,1–1,8
	P-6	1–6
	P-30	2,5–40
	P-100	5–100
	P-300	60–400
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ и FPLC)		
Поливинилхлорид	Фрактогель	
	TSK HW-40	0,1–10
	TSK HW-55	1–700
	TSK HW-65	50–5000
	TSK HW-75	500–50 000
Декстран, связанный с перекрестно-сшитой агарозой	Супердекс	
	75	3–70
	200	10–600

[a]Для глобулярных белков. Этот диапазон примерно такой же для однонитевых нуклеиновых кислот и несколько уже для фибриллярных белков и двунитевых нуклеиновых кислот.

Применение

Очистка биологических макромолекул путем их отделения от более мелких и более крупных молекул — это основное применение метода эксклюзионной хроматографии. Применение различных гелей или стеклянных гранул позволяет разделять и очищать вирусы, ферменты, гормоны, антитела, нуклеиновые кислоты и полисахариды.

Определение относительной молекулярной массы. Объем элюирования глобулярных белков в значительной степени определяется их относитель-

ной молекулярной массой (M_r). Для значительного диапазона значений M_r объем элюирования или K_d представляют собой практически линейную функцию от логарифма M_r. Следовательно, используя градуировочную кривую для белков с аналогичной формой и известными значениями M_r, можно оценить значения M_r других белков, причем даже в грубом экстракте.

Концентрирование препаратов с высокими значениями M_r может быть достигнуто в результате добавления сухого порошка Sephadex-25. При набухании гель поглощает воду и низкомолекулярные вещества, в то время как высокомолекулярные вещества остаются в растворе. Через 10 мин гель удаляют центрифугированием; высокомолекулярные вещества остаются в более концентрированном растворе, причем pH и ионная сила раствора не изменяются.

Обессоливание. Растворы веществ с высоким значением M_r можно обессолить на колонке с Sephadex G-25. Высокомолекулярные вещества выходят в мертвом объеме колонки, в то время как низкомолекулярные вещества распределяются между стационарной и подвижной фазами и поэтому движутся медленнее. Данный метод обессоливания быстрее и эффективнее диализа. Среди его применений — удаление фенола из образцов нуклеиновых кислот, сульфата аммония из препаратов белков и солей из элюента после ионообменной хроматографии.

ПРИМЕР 2 ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Вопрос Относительную молекулярную массу белка, M_r, определяли методом эксклюзионной хроматографии на колонке с Sephacryl S300, используя в качестве стандартов альдолазу, каталазу, ферритин, тироглобулин и голубой декстран. Были получены следующие результаты.

	Удерживаемый объем	
	M_r	V_r, см^3
Альдолаза	158 000	22,5
Каталаза	210 000	21,4
Ферритин	444 000	18,2
Тироглобулин	669 000	16,4
Голубой декстран	2 000 000	13,6
Неизвестный белок		19,5

Какова молекулярная масса M_r неизвестного белка?

Ответ График зависимости логарифма относительных молекулярных масс отдельных белков от их объемов удерживания имеет линейный вид. Из этого графика можно найти, что неизвестный белок с объемом удерживания 19,5 см^3 имеет молекулярную массу около 330 000.

11.7.3 Молекулярный импринтинг

Этот новый метод хроматографии имеет нечто общее с эксклюзионной хроматографией. Стационарную фазу для **молекулярного импринтинга** готовят путем полимеризации подходящего мономера в присутствии сшивающего агента и специфического вещества (или родственного ему вещества), которое предстоит анализировать и которое в данном случае называют **шаблоном**. Образующийся сополимер размалывают на мелкие частицы, просеивают и отмывают с помощью органического растворителя, чтобы отмыть шаблон. Дальнейшее использование полимера в качестве стационарной фазы основано на том, что образовавшиеся в нем полости имеют форму, близкую в форме молекул анализируемого вещества, и, следовательно, полимер будет селективно удерживать это вещество из смеси веществ. Данный метод успешно применяется для разделения широкого круга природных продуктов.

11.8 АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

11.8.1 Основы метода

Принцип разделения и очистки, лежащий в основе аффинной хроматографии, отличается от принципа других хроматографических методов, а также электрофореза и центрифугирования, где используются различия в физических свойствах разделяемых молекул. Аффинная хроматография основана на уникальном свойстве — специфичном биологическом взаимодействии молекул. Поэтому теоретически этим методом можно очищать вещества полностью, даже из очень сложных смесей, всего в одну стадию. Метод первоначально предназначался для выделения ферментов, но теперь он также применяется для нуклеотидов, нуклеиновых кислот, иммуноглобулинов, мембранных рецепторов и даже целых клеток и клеточных фрагментов.

Для реализации данного метода необходимо, чтобы выделяемое вещество способно было обратимым образом связываться со специфическим лигандом, иммобилизованным на нерастворимой матрице:

$$\underset{\text{макромолекула}}{\text{M}} + \underset{\substack{\text{лиганд}\\(\text{на матрице})}}{\text{L}} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} \underset{\text{комплекс}}{\text{ML}}$$

В правильно выбранных экспериментальных условиях при добавлении сложной смеси, содержащей выделяемое вещество, к иммобилизованному лиганду (который обычно находится в стандартной хроматографической колонке) только это конкретное вещество должно связываться с лигандом. Все остальные вещества смываются с колонки, а выделяемое вещество затем снимают с колонки путем его вытеснения из комплекса с лигандом (рис. 11.15). Для реализации метода необходимо предварительно определить структуру и биологические свойства выделяемого вещества, что по-

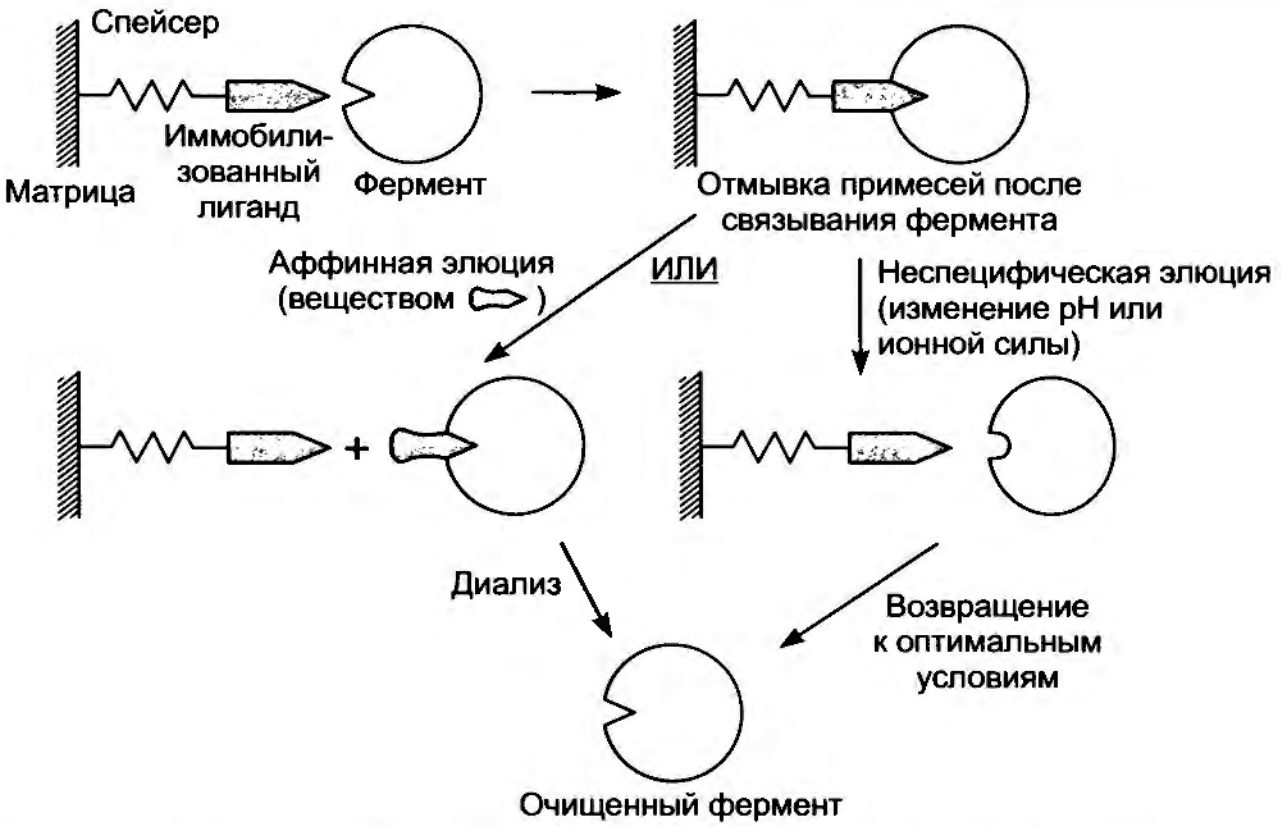


Рис. 11.15. Принцип очистки фермента методом аффинной хроматографии

зволит правильно планировать эксперимент. Если речь идет о выделении фермента, лигандом может служить субстрат, конкурентный обратимый ингибитор или аллостерический активатор. Условия выделения обычно соответствуют оптимальным условиям для взаимодействия фермента с лигандом. Поскольку в основе метода лежит обратимое образование комплекса, характеризующееся константами первого порядка k_{+1} и k_{-1}, по мере добавления фермента к иммобилизованному лиганду развивается динамический процесс, в котором возрастают концентрация комплекса и сила связывания. Именно благодаря этой увеличивающейся эффективности связывания при добавлении образца аффинная хроматография на колонке всегда приводит к лучшему результату, чем все другие варианты. Тем не менее существуют и другие способы разделения, которые удобны, в частности, в крупномасштабном эксперименте. Назовем следующие варианты метода:

- *Аффинное осаждение*: лиганд присоединяют к растворимому носителю, который затем осаждают из раствора, например, путем изменения pH.
- *Аффинное распределение*: лиганд связывается с растворимым в воде полимером типа полиэтиленгликоля, который затем переходит преимущественно в водную фазу полимера, находящуюся в равновесии с чистой водной фазой.

В любом случае для эффективного разделения необходимо, чтобы константа ассоциации комплекса K_a имела значение в диапазоне от 10^4 до 10^8 М.

11.8.2 Необходимые материалы. Применение

Матрица

Идеальная матрица для аффинной хроматографии должна удовлетворять следующим требованиям:

- обладать достаточным количеством доступных химических групп, с которыми лиганд может образовать ковалентную связь и которые должны быть устойчивы в условиях связывания;
- быть стабильной в условиях связывания макромолекул и их последующего элюирования;
- слабо взаимодействовать с другими макромолекулами, чтобы не приводить к неспецифическому связыванию;
- обладать хорошими реологическими свойствами.

На практике для изготовления матриц используют твердые частицы сферической формы одинакового размера. Чаще всего они созданы на основе перекрестно-сшитых полимеров типа агарозы или декстранов, а также полиакриламида, полиметакрилата, полистирола, целлюлозы, пористого стекла или оксида кремния.

Лиганды

Химическая природа лиганда диктуется биологическими свойствами выделяемого соединения. На практике иногда возможно выбрать лиганд, обладающий **абсолютной специфичностью**, т. е. связывающийся с одним-единственным веществом. Однако чаще выбирают лиганд с **групповой специфичностью**, связывающийся с группой близкородственных соединений, обладающих сходными химическими свойствами. Примером лиганда второго типа может служить 5'-АМФ, который обратимо связывается со многими NAD^+-зависимыми дегидрогеназами, поскольку обладает структурным сходством с частью молекулы NAD^+. Важно, чтобы лиганд обладал подходящими химическими группами, которые не требуются для обратимого связывания с макромолекулами, но могли бы использоваться для прикрепления к матрице. Наиболее часто в качестве таких групп выступают $-NH_2$, –COOH, –SH и –OH (в фенолах или спиртах).

Чтобы прикрепление лиганда к матрице не мешало его способности связывать макромолекулы, обычно между лигандом и матрицей встраивают **спейсерную группу**. Оптимальная длина такой группы составляет 8–10 атомов углерода или их эквивалентов. В некоторых случаях химическая природа спейсерной группы играет важнейшую роль на этапе разделения. Некоторые спейсерные группы сильно гидрофобны, поскольку состоят исключительно из метильных групп, другие гидрофильны, поскольку содержат карбонильные или имидные группы. Наиболее важную роль спейсеры играют при иммобилизации небольших лигандов, а для иммобилизации макромолекул (например, для иммуноаффинной хроматографии, разд. 11.8.4) они обычно вовсе не требуются, поскольку центр связывания находящихся в растворе макромолекул и так достаточно удален от матрицы.

Чаще всего перед присоединением лиганда к матрице ее обрабатывают бромцианом (CNBr) (рис. 11.16). Условия реакции и соотношение реагентов определяют число молекул лиганда, которое сможет связаться с каждой частицей матрицы. В альтернативных вариантах используют диэпоксиды, N,N'-дизамещенные карбодиимиды, сульфонилхлорид, периодат натрия, эфиры N-гидроксисукцинимида и дихлортриазины. Существует множество фирменных активированных матриц, изготовленных путем обработки этими реагентами.

В качестве спейсерных групп могут выступать 1,6-диаминогексан, 6-аминогексановая кислота и 1,4-бис(2,3-эпоксипропокси)бутан. Некоторые фирменные матрицы на основе агарозы, декстрана или полиакриламида уже имеют спейсерные группы с присоединенными к ним лигандами и готовы для непосредственного использования. Примеры лигандов представлены в табл. 11.5.

Ход анализа

Процедура разделения в аффинной хроматографии такая же, как и в других вариантах жидкостной хроматографии. Колонку набивают матрицей с закрепленным на ней лигандом, как это делается обычно. Используемый буфер должен содержать все кофакторы, например ионы металлов, необходимые для взаимодействия лиганда с макромолекулами. После нанесения и связывания образца осуществляют элюирование буфером для удаления неспецифически связавшихся веществ.

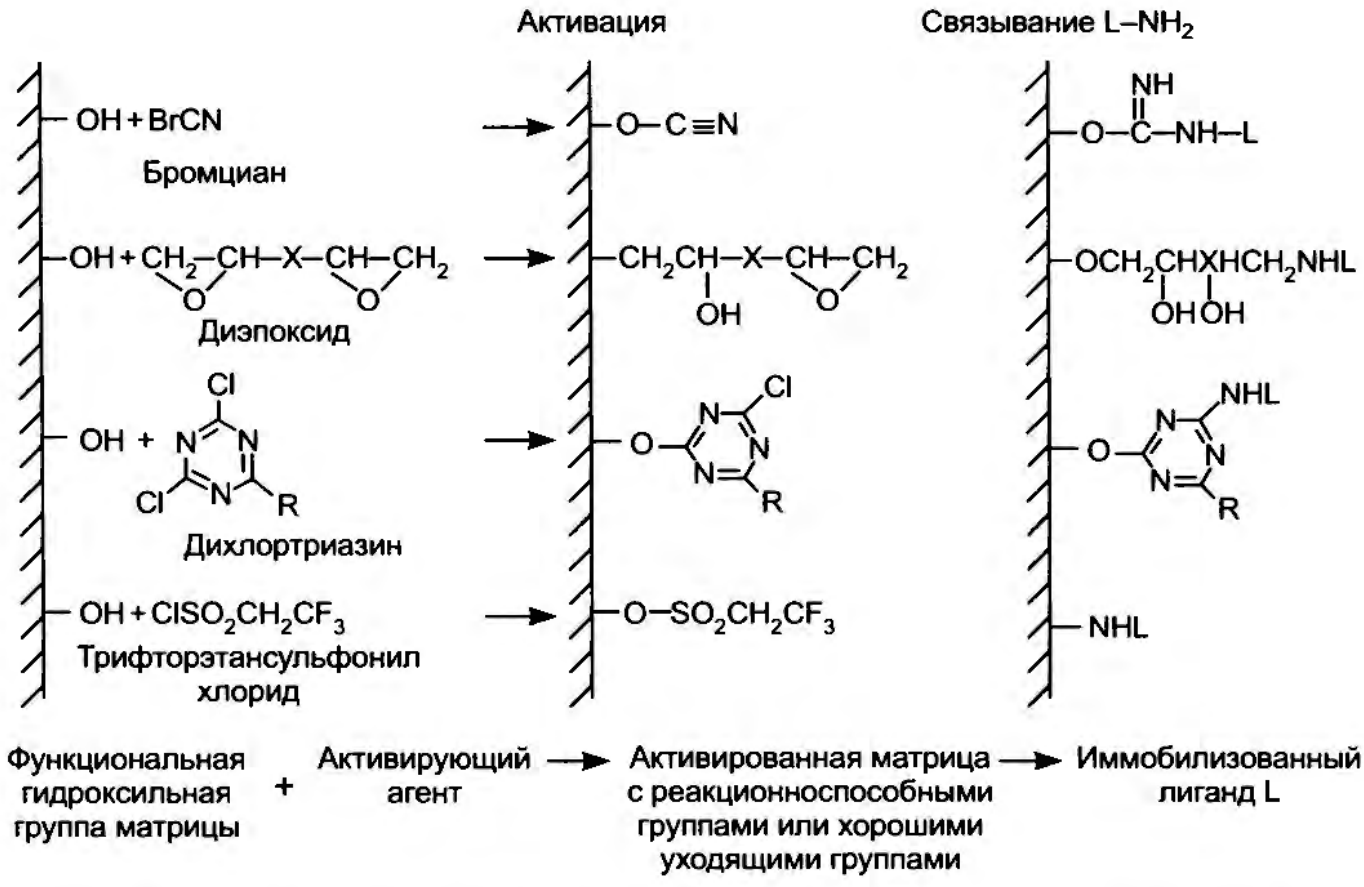


Рис. 11.16. Примеры реакций иммобилизации лигандов (L) для аффинной хроматографии. При наличии спейсерной группы между матрицей и лигандом используются те же реакции иммобилизации

Таблица 11.5. **Примеры лигандов с групповой специфичностью для аффинной хроматографии**

Лиганд	Вещества, к которым лиганд проявляет сродство
Нуклеотиды	
5'-АМФ	NAD^+-зависимые дегидрогеназы, некоторые киназы
2',5'-АДФ	$NADP^+$-зависимые дегидрогеназы
Кальмодулин	Кальмодулин-связывающие ферменты
Авидин	Биотин-содержащие ферменты
Жирные кислоты	Ферменты, связывающие жирные кислоты
Гепарин	Липопротеины, липазы, факторы свертывания крови, ДНК-полимеразы, стероидные рецепторы, факторы роста, ингибиторы сериновых протеаз
Белки A и G	Иммуноглобулины
Конканавалин A	Гликопротеины с остатками α-D-маннопиранозы и α-D-глюкопиранозы
Соевые лектины	Гликопротеины с остатками N-ацетил-α-(или β)-D-галактопиранозы
Фенилборонаты	Гликопротеины
Поли(A)	РНК, содержащие последовательности поли(U), некоторые РНК-зависимые белки
Лизин	рРНК
Сибакрон синий F3G-A	Нуклеотид-зависимые ферменты, факторы свертывания крови

Связавшееся на колонке вещество можно выделить путем **специфического** или **неспецифического элюирования**. Неспецифическое элюирование выполняется путем изменения pH или ионной силы. Элюирование веществ под действием разбавленной уксусной кислоты или гидроксида аммония происходит в результате изменения состояния ионизации функциональных групп в молекулах лиганда и/или макромолекулы, которые ответственны за взаимодействие. Изменение ионной силы, вовсе не обязательно сопровождающееся изменением pH, также приводит к элюированию связавшихся на колонке веществ в результате нарушения взаимодействий лиганда с макромолекулами; для этой цели часто применяют 1 M NaCl. Если элюирование осуществляют путем изменения pH, в собранных фракциях значение pH следует довести до оптимального, чтобы уменьшить возможность денатурации белка. Специфическое элюирование проводится путем добавления высокой концентрации субстрата или обратимого ингибитора, если речь идет о выделении фермента, или другого лиганда, сродство к которому у выделяемой макромолекулы выше, чем к иммобилизованному лиганду. В конечном итоге выделенное вещество оказывается в буферном растворе, который может содержать компоненты элюента или высокую концентрацию соли, от которых можно избавиться, например, методом гель-фильтрации.

Применение метода

Метод аффинной хроматографии позволяет выделять многие ферменты и другие белки, в том числе рецепторы и иммуноглобулины. Возможности

метода ограничены только доступностью иммобилизованного лиганда. По аналогичному принципу удается выделять нуклеиновые кислоты, что играет немаловажную роль в развитии молекулярно-биологических методов. Например, мРНК в рутинном варианте выделяют путем селективной гибридизации на поли(U)-Sepharose 4B, используя ее концевую поли(A)-последовательность. Иммобилизованную однонитевую ДНК можно использовать для выделения комплементарных молекул РНК и ДНК. Такое разделение может быть проведено на колонке, но чаще его осуществляют с помощью однонитевой ДНК, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре. Иммобилизованные нуклеотиды применяются для выделения белков, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот.

Важным приложением аффинной хроматографии является разделение смесей клеток до гомогенных популяций. Метод основан на антигенных свойствах клеточной поверхности, химической природе поверхностных углеводных остатков или на специфических взаимодействиях лигандов с рецепторами. Среди иммобилизованных лигандов можно назвать белок A, который связывается с Fc-фрагментом IgG (разд. 7.1), лектины или специфические лиганды для мембранных рецепторов.

11.8.3 Аффинная хроматография на колонках с лектинами

Лектины — это группа белков, образуемых животными, растениями и миксомицетами, которые способны связывать углеводы (и, следовательно, гликопротеины). Лектины имеют полимерную структуру, чаще всего являются тетрамерами. Субъединицы могут быть идентичными, в таком случае они узнают один специфический сахарид, или двух видов, и тогда они узнают два типа сахаридов. Молекулярная масса лектинов лежит в диапазоне от 40 до 400 кДа. Способность лектинов узнавать и связывать специфические сахара сделала их удобным орудием для очистки гликопротеинов, особенно мембранных рецепторов.

Для хроматографии с лектинами чаще всего используют лектины из бобовых (гороха, клещевины, сои) из-за их высокого содержания. Лектины иммобилизуют на агарозной матрице одним из обычных способов; существует множество готовых фирменных сорбентов с лектинами. Если природа остатков сахаров в выделяемом гликопротеине неизвестна, лектин для хроматографии выбирают экспериментальным путем. После связывания гликопротеина на колонке с иммобилизованным лектином элюирование осуществляют одним из приведенных ниже способов:

- в присутствии простого моносахарида, к которому лектин имеет сродство;
- с помощью боратного буфера, образующего комплексы с гликопротеинами;
- путем изменения pH (не ниже pH 3 и не выше pH 10);
- путем добавления реагента типа этиленгликоля, который уменьшает гидрофобность.

Одним из достоинств хроматографии с лектинами является то, что ее можно осуществлять при довольно высокой концентрации солей, поскольку разделение в данном случае не зависит от ионных взаимодействий. Следовательно, в принципе этот метод можно применять сразу после фракционирования солями. Кроме того, метод используют для разделения смесей клеток, используя наличие гликопротеинов на клеточной поверхности. Чаще всего хроматография на колонках с лектинами осуществляется в режиме низкого давления.

11.8.4 Иммуноаффинная хроматография

Использование антител в качестве иммобилизованных лигандов позволяет выделять многие белки, в том числе белки мембраны вирусов. Моноклональные антитела можно связать с агарозной матрицей с помощью бромциана. Связывание белка с иммобилизованными антителами проводят в нейтральном буферном растворе с невысокой концентрацией соли. Для элюирования связавшегося белка часто требуются довольно жесткие условия (что объясняется очень прочным связыванием: K_d от 10^{-8} до 10^{-12} М), в результате чего может произойти денатурация белка. Для элюирования повышают концентрацию соли или добавляют детергент, а также вводят в буфер мочевину или гуанидингидрохлорид (оба вещества вызывают денатурацию белка). Добавление других хаотропных агентов (ионов или небольших молекул, повышающих растворимость неполярных соединений в воде) типа тиоцианата, перхлората или трифторацетата, а также подкисление раствора до pH 3 помогает избежать денатурации.

11.8.5 Металл-хелатная хроматография (аффинная хроматография с иммобилизованными ионами металлов)

В этом варианте аффинной хроматографии иммобилизованные ионы металлов типа Cu^{2+}, Zn^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+} или переходных металлов типа Co^{2+}, Ni^{2+} и Mn^{2+} селективно связывают белки путем реакции с имидазольной группой остатка гистидина, тиогруппой остатка цистеина или индольной группой остатка триптофана. Белок образует с ионами металла координационные связи, которые должны быть настолько прочными, чтобы удерживать его в процессе элюирования несвязавшихся примесей. Для элюирования самого белка можно снизить pH буфера, что дестабилизирует комплекс белка с металлом, или добавить комплексообразователь типа ЭДТА. Чаще всего ионы металлов иммобилизуют на агарозе, на которой привит иминодиацетат или трис(карбоксиметил)этилендиамин.

11.8.6 Хроматография с красителями в качестве лигандов

Ряд триазиновых красителей, содержащих как сопряженные кольца, так и ионизируемые группы, обладают способностью связывать некоторые белки. Такие красители иногда называют **псевдолигандами**. Невоз-

можно предсказать заранее, будет ли конкретный белок связываться с тем или иным красителем, поскольку данное взаимодействие не является специфическим, а, по всей видимости, представляет собой взаимодействие с лигандсвязывающими доменами за счет ионных и гидрофобных сил. Связывание красителей с белками способствует их закреплению на таких материалах, как Sepharose 4B, на чем и основан метод разделения. Притягательность метода заключается в низкой стоимости красителей, легкости связывания с матрицей и высокой стабильности. Чаще всего применяют краситель Сибакрон синий F3G-A. Выбор красителя для выделения конкретного белка осуществляется экспериментальным путем. Обычно связывание белка с иммобилизованным красителем происходит при pH 7–8,5. Для элюирования чаще всего используют градиент концентрации соли или аффинные методы.

11.8.7 Ковалентная хроматография

Этот хроматографический метод был разработан специально для разделения тиолсодержащих белков на основании их способности взаимодействовать с иммобилизованными лигандами, содержащими дисульфидные группы. Принцип метода проиллюстрирован на рис. 11.17. Чаще всего в качестве лигандов используют дисульфид 2'-пиридильной группы, прикрепленной к агарозной матрице типа Sepharose 4B. В результате реакции с SH-содержащими белками выделяется пиридин-2-тион. За ходом реакции можно следить спектрофотометрически на длине волны 343 нм, регистрируя связывание белка. После ковалентного связывания белка с матрицей не содержащие тиоловых групп примеси смывают, а непрореагировавшие тиопиридильные группы удаляют с помощью 4 мМ дитиотрейтола или меркаптоэтанола. Связавшийся на колонке белок высвобождают путем добавления тиолсодержащих соединений типа 20–50 мМ дитиотрейтола, восстановленного глутатиона или цистеина. Матрицу регенерируют путем обработки 2,2'-дипиридилдисульфидом. Метод успешно используется для выделения многих белков, но его применение ограничено высокой стоимостью и довольно сложной стадией регенерации. Тем не менее метод может использоваться для выделения белков из сильно загрязненных образцов.

11.9 ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

11.9.1 Принцип метода

Принцип **газожидкостной хроматографии** (ГЖХ или ГХ) аналогичен принципам жидкостной хроматографии высокого и низкого давления, но устройство приборов в значительной степени отличается. Метод основан на различии коэффициентов распределения летучих веществ между жидкой стационарной фазой и газообразной подвижной фазой при их перемещении с потоком газа через колонку. Таким образом, применение метода ограничено анализом летучих веществ, которые при этом обладают

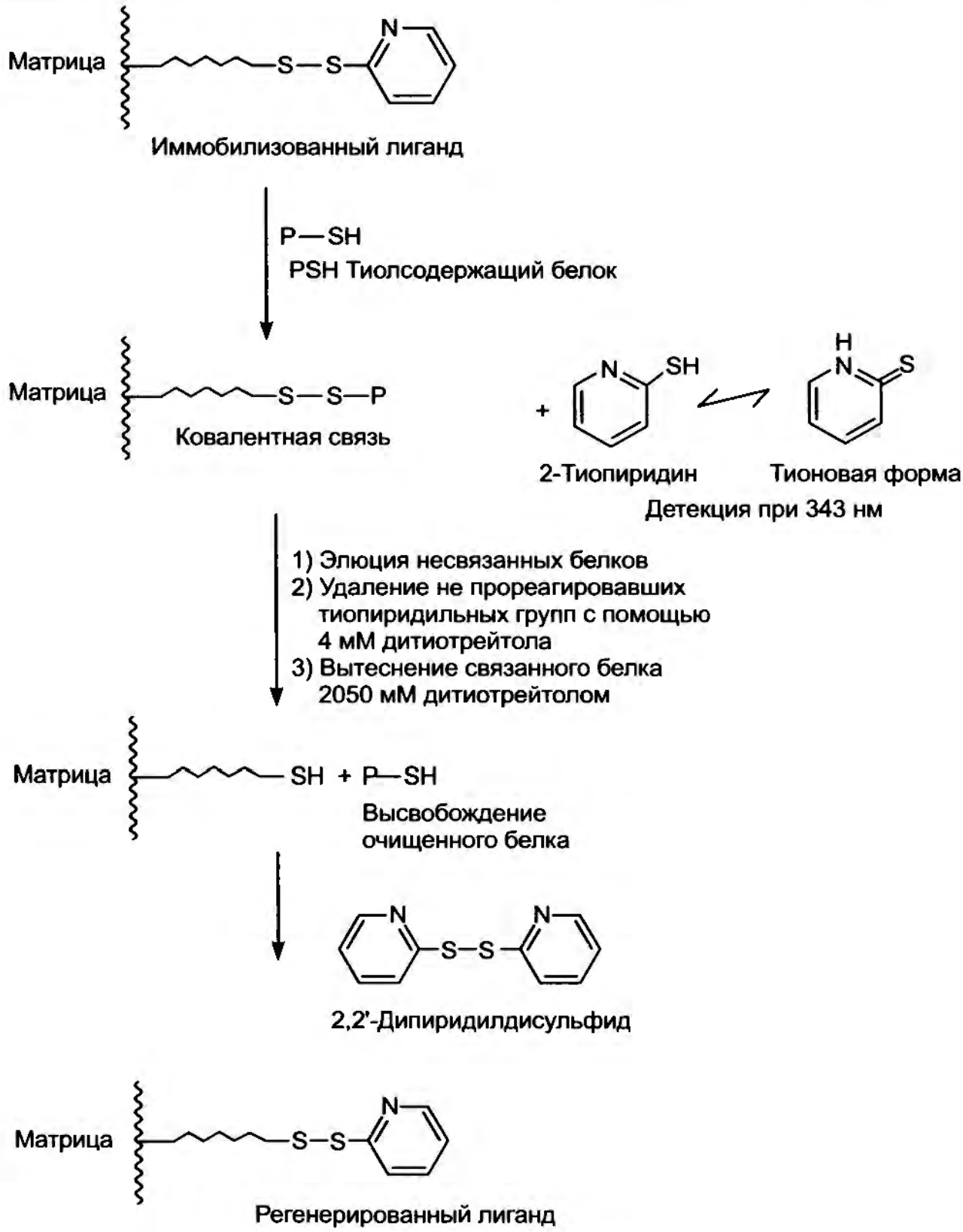


Рис. 11.17. Принцип очистки белка (P–SH) методом ковалентной хроматографии

термостабильностью. Коэффициенты распределения находятся в обратно пропорциональной зависимости от летучести веществ, так что наиболее летучие вещества сходят с колонки первыми. Для перевода веществ в газообразное состояние температуру колонки повышают до 50–300 °C. Стационарная фаза представляет собой жидкость с высокой температурой кипения (типа силиконового вазелина или смолы), которую наносят либо прямо на внутреннюю поверхность колонки, либо на инертную гранулированную матрицу, заполняющую колонку. Для достижения максимальной

эффективности разделения (минимальной высоты теоретической тарелки, H) необходимо выбрать оптимальную скорость потока подвижной фазы. Данный метод позволяет получать очень высокое разрешение (уравнения 11.8 и 11.12), так что он пригоден для разделения сложных смесей. ГЖХ используется для качественного и количественного анализа широкого круга слабополярных веществ, поскольку метод обладает высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и скоростью разделения. В сочетании с масс-спектрометрией это очень мощный аналитический метод.

11.9.2 Устройство прибора и ход анализа

Основными элементами системы ГЖХ являются:

- колонка, помещенная в термостат с программируемой температурой;
- устройство для ввода образца;
- источник и регулятор потока газа;
- детектор, усилитель сигнала и записывающее устройство (рис. 11.18).

Колонка

Существует два типа колонок для ГЖХ.

- *Обычная набивная колонка* представляет собой спиралевидную стеклянную или стальную колонку длиной 1–3 м с внутренним диаметром 2–4 мм. Такие колонки набивают инертным носителем из оксида кремния, покрытым жидкой стационарной фазой. В качестве стационарной фазы часто применяют полиэтиленгликоль (Carbowax 20M высокой полярности), метилфениловые и метилвинилсиликоновые полимеры

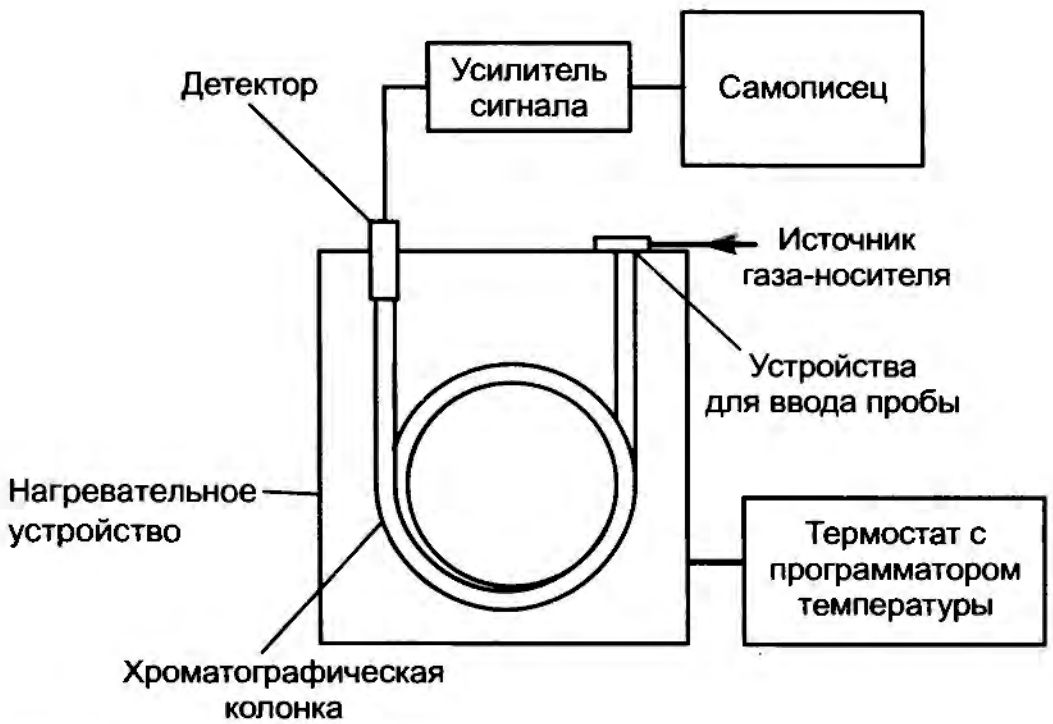


Рис. 11.18. Элементы системы ГЖХ

(OV17 и OV101, соответственно средней и слабой полярности), Apiezon L (неполярный) и эфиры адипиновой, янтарной и фталиевой кислот. Фазы на основе β-циклодекстринов пригодны для разделения энантиомеров (разд. 11.5.5). Чаще всего в качестве матрицы используют целит (диатомитовая земля), гидроксильные группы которого часто модифицируют, чтобы избежать взаимодействия анализируемого образца с матрицей. Для этого целит обычно обрабатывают силанизирующими агентами типа гексаметилдисилазана. Частицы матрицы имеют одинаковый размер, обычно от 60 до 80, от 80 до 100 или от 100 до 120 меш (разд. 11.3.1). Колонки набивают сухим сорбентом под слабым давлением газа, а затем кондиционируют 24–48 ч при температуре около верхней границы рабочего диапазона, пропуская газ с нормальной рабочей скоростью потока. В процессе кондиционирования колонку следует отсоединить от детектора, чтобы не допустить его засорения. При высоком качестве жидкой фазы кондиционирование колонки можно упростить, пропуская через нее газ-носитель при температуре 100 °С.

- *Капиллярная (открытая) колонка* изготавливается из качественного плавленого кварца; длина колонки обычно от 10 до 100 м, внутренний диаметр 0,1–1,0 мм. Известны два вида таких колонок — **открытая колонка с покрытием на стенках** (wall-coated open tubular, WCOT) и **открытая колонка с пористым слоем** (support-coated open tubular, SCOT, другое название porous layer open tubular, PLOT). В колонках WCOT стационарная фаза тонким слоем (0,1–5 мкм) покрывает непосредственно стенки капилляра, а в колонках PLOT стационарная фаза нанесена на матрицу, связанную со стенками капилляра. В качестве стационарной фазы часто используют полиэтиленгликоль (очень полярные смолы марки CP и DB), а также метил- и фенилполисилоксаны (неполярный марки BP1 и умеренно полярный марки BP10). Эти вещества покрывают от 1 до 25% матрицы в зависимости от целей анализа. Емкость колонок PLOT намного выше, чем колонок WCOT.

Рабочие температуры для колонки каждого типа должны выбираться в зависимости от стационарной фазы. Слишком высокая температура приводит к **выносу неподвижной фазы из колонки**, что загрязняет детектор и приводит к неустойчивости базовой линии самописца. Выбор рабочей температуры основан на «компромиссе» между временем удерживания веществ и разрешением. Температура колонки должна контролироваться с точностью до ±0,1 °С. Коэффициенты распределения веществ очень чувствительны к температуре, поэтому время анализа можно регулировать путем изменения температуры термостата, для чего существуют две возможности:

- *Изотермический анализ* осуществляется при постоянной температуре.
- *Программирование температуры* позволяет постепенно повышать температуру, чтобы облегчить разделение веществ с сильно различающейся полярностью и молекулярной массой. Однако это иногда приводит к усилению выноса стационарной фазы и дрейфу базовой линии. Для преодо-

ления этой проблемы в некоторых приборах установлены две идентичные колонки с детекторами: одна из колонок служит в качестве колонки сравнения. Детекторы установлены таким образом, что ток второго детектора вычитается из тока первого детектора, поэтому при условии одинакового выноса фазы из обеих колонок повышение температуры не приводит к дрейфу базовой линии. Выбор фазы для анализа зависит от конкретного образца и основывается обычно на ранее опубликованных данных.

Нанесение образца

Большинство неполярных и слабополярных веществ можно непосредственно вводить в колонку для ГЖХ, однако вещества, имеющие в своем составе такие полярные группы, как -OH, $-NH_2$ и -COOH обычно удерживаются на колонке слишком долгое время. При этом наблюдается плохое разрешение и образование «хвостов» пиков (разд. 11.2.4). Проблему можно решить путем дериватизации полярных групп. Это повышает летучесть веществ и их эффективные коэффициенты распределения. Для дериватизации жирных кислот, углеводов и аминокислот чаще всего применяют метилирование, силилирование и перфторацилирование.

Анализируемый образец растворяют в подходящем растворителе типа ацетона, гептана или метанола. Хлорсодержащих органических растворителей, как правило, следует избегать, поскольку они загрязняют детектор. На набивные колонки и колонки PLOT образец наносят микрошприцом через инжектор, соединенный с верхней частью колонки. Обычно объем образца составляет 0,1–10 $мм^3$. Часто температура инжектора на 20–50 °C выше температуры колонки, что обеспечивает быстрый и полный переход образца в газовую фазу. Во многих фирменных приборах ввод образца автоматизирован, так как это способствует повышению точности анализа. Поскольку на колонках WCOT нанесено лишь небольшое количество стационарной фазы, на такие колонки можно наносить очень маленький объем образца. В этой связи в инжекторе установлен **сплиттер** (делитель потока), так что лишь небольшая часть вводимого образца попадает на колонку. Оставшаяся часть образца отправляется в слив. Устройство сплиттера играет важнейшую роль при количественном анализе, поскольку необходимо быть уверенным в том, что соотношение вводимого на колонку и отбрасываемого образца всегда остается постоянным.

Подвижная фаза

В случае набивных колонок подвижная фаза представляет собой инертный газ типа азота, а в случае капиллярных колонок — типа гелия или аргона. Газ-носитель предварительно подвергается очистке путем прохождения через серию молекулярных сит, что позволяет удалить кислород, углеводороды и пары воды. Далее газ подается на хроматографическую колонку со скоростью 40–80 $см^3$/мин. Для обеспечения постоянства потока вне зависимости от изменения противодавления или температуры колонки используется **регулятор потока газа**.

11.9.3 **Детекторы**

В ГЖХ используется несколько типов детекторов.

- *Пламенно-ионизационный детектор* (ПИД) подходит для анализа практически всех органических веществ. Минимальное детектируемое количество вещества составляет $5 \cdot 10^{-12}$ г/с, линейный диапазон измерений около 10^7, верхний предел температуры 400 °С. Пламя в детекторе образуется в результате возгорания смеси водорода и воздуха; это пламя выступает в роли одного электрода, а другим электродом служит латунная или платиновая проволока, располагающаяся вблизи верхних языков пламени (рис. 11.19). При выходе веществ с колонки они ионизируются в пламени, в результате чего усиливается ток, который регистрирует самописец. Сам газ-носитель, проходящий через колонку и детектор, дает небольшой фоновый сигнал, который необходимо вычесть автоматическим путем, чтобы получить стабильную базовую линию.

$$\text{Анализируемое вещество} + H_2 + O_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{продукты горения} + H_2O + \text{ионы} + \text{радикалы} + \text{электроны}$$

$$\Sigma\,(\text{ионов})^- + \Sigma\,(\text{электронов})^- \rightarrow \text{электрический ток}$$

- *Азотно-фосфорный детектор* (АФД) (другое название — *термоионный детектор*, ТИД) по устройству напоминает ПИД, но здесь в систему электродов впаяны кристаллы соли натрия, либо горелка имеет наконечник из солей натрия или рубидия. ТИД обладает высокой селективностью по отношению к азот- и фосфорсодержащим веществам и практически не реагирует на вещества, не содержащие этих двух элементов. Линейный диапазон измерений (10^5) и верхний предел температуры (300 °С) не так хороши, как у ПИД, однако пределы обнаружения выше (10^{-14} г/с). Детектор широко используется для анализа фосфорорганических пестицидов.
- *Электронно-захватный детектор* (ЭЗД) реагирует исключительно на вещества, способные захватывать электроны, в частности галоген-

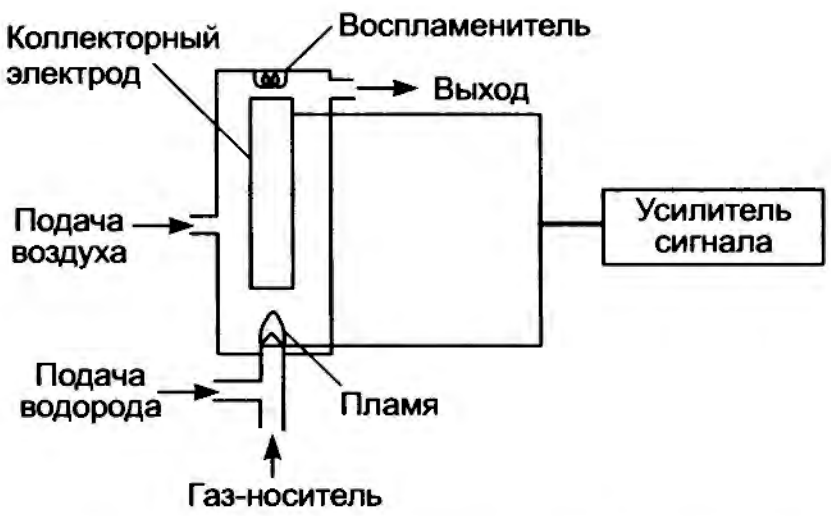


Рис. 11.19. Пламенно-ионизационный детектор для ГЖХ. Пламя горелки служит анодом, а коллекторный электрод — катодом

содержащие соединения. Данный тип детектора широко применяется для анализа полихлорированных веществ, таких как пестициды ДДТ, диэлдрин и алдрин. Детектор характеризуется очень высокой чувствительностью (10^{-13} г/с), верхним пределом температуры 300 °С, но сравнительно узким диапазоном линейного отклика (10^2–10^4). Радиоактивный источник (^{63}Ni) ионизирует газ-носитель, в результате чего высвобождаются электроны, которые создают электрический ток между находящимися под напряжением электродами. При выходе с колонки вещества, способного захватывать электроны (обычно это галогенсодержащие вещества), электроны поглощаются и электрический ток уменьшается. Падение тока регистрируется самописцем. Чаще всего в такой системе в качестве газа-носителя используются азот или аргон, содержащие 5% метана.

- *Пламенно-фотометрический детектор* (ПФД) использует свойство фосфор- и серосодержащих веществ испускать свет при сгорании в детекторе типа ПИД. Этот свет регистрируется и обсчитывается количественно. Предел обнаружения детектора для Р-содержащих веществ составляет порядка 1,0 пг, для S-содержащих веществ — порядка 20 пг.
- *Быстрый сканирующий ИК-фурье спектрометр* записывает ИК-спектры выходящих с колонки веществ и позволяет получить информацию о структуре и количестве анализируемого вещества. Детектор позволяет обнаруживать любые вещества, имеющие спектр в ИК-области; предел обнаружения 1 нг.
- *Масс-спектрометр* представляет собой универсальный детектор, с помощью которого получают масс-спектры веществ и, следовательно, информацию об структуре и количестве веществ. Предел обнаружения составляет менее 1 нг за одно сканирование. Детектирование может осуществляться неселективно по **полному ионному току** (разд. 9.4.1), либо путем **селективного мониторинга ионов** (разд. 9.5.7) избирательно для данного вещества. Если для калибровки нельзя подобрать образцов, идентичных анализируемому образцу, а также для анализа неизвестного образца лучшим способом детектирования и идентификации является именно масс-спектрометрия. Существуют специальные сепараторы, позволяющие отделить основной поток газа-носителя от выходящего с колонки образца перед его введением в масс-спектрометр (разд. 9.3).

В начале каждой хроматограммы возникает пик, соответствующий летучему растворителю, используемому для введения анализируемого вещества в колонку. Разные типы детекторов реагируют на этот растворитель по-разному, что может повлиять на детектирование и разрешение пиков быстро элюирующихся веществ.

В современных системах ГЖХ с компрьютерным управлением, процесс анализа автоматизирован, оптимизированы условия эксперимента, проводится статистическая обработка результатов при построении градуировочной зависимости и целевом анализе, результаты выводятся на дисплей в режиме реального времени.

11.9.4 Применение метода

До появления ВЭЖХ методы ГЖХ, возможно, были наиболее широко используемыми методами хроматографического анализа. Теперь применение ГЖХ ограничивается анализом летучих и неполярных соединений, не требующих дериватизации. Анализируемые вещества характеризуются абсолютными временами удерживания или временами удерживания по отношению к стандарту. В сериях гомологичных веществ, например метиловых эфиров насыщенных жирных кислот, наблюдается линейная зависимость между логарифмом времени удерживания и числом атомов углерода. Для моно- и диненасыщенных жирных кислот градуировочные графики похожи. Это свойство используют, например, для идентификации неизвестных эфиров жирных кислот в гидролизатах жиров.

11.10 ТОНКОСЛОЙНАЯ (ПЛАНАРНАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ

11.10.1 Принцип метода

Тонкослойная хроматография (ТСХ) в теории имеет много общего с колоночной хроматографией, но ее практическое воплощение выглядит иначе. Стационарную фазу наносят тонким слоем (0,25–2,0 мм) на стеклянную или металлическую пластинку прямоугольной или квадратной формы, обычно со стороной от 5 до 20 см. Анализируемый образец в виде капли или тонкой полосы помещают на одном из краев пластинки (на **линии старта**), который затем опускают в резервуар с подвижной фазой. Подвижная фаза начинает продвигаться вдоль пластинки, обычно просто под действием капиллярных сил. Поскольку перемещению жидкости почти не оказывается сопротивления, **фронт** подвижной фазы быстро продвигается вдоль пластинки. Подвижная фаза переносит с собой вещества из нанесенного образца, причем скорость их продвижения определяется коэффициентом распределения между подвижной и стационарной фазами. Стационарная фаза может иметь самую разную природу, так что процесс разделения может быть основан на принципах адсорбции, распределения, а также хиральной, ионообменной или эксклюзионной хроматографии. Перемещение веществ заканчивается, когда фронт подвижной фазы достигает противоположного конца пластинки, или когда пластинку вынимают из резервуара с подвижной фазой. Перемещение конкретного вещества характеризуется не временем или объемом удерживания, а **подвижностью** (R_f):

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом от старта}}{\text{расстояние, пройденное фронтом мобильной фазы от старта}} \qquad (11.15)$$

Тонкослойная хроматография может быть охарактеризована такими параметрами, как число теоретических тарелок (N), высота тарелки (H) и

коэффициент емкости (k'), которые можно рассчитать по следующим уравнениям:

$$N = 16(d_A/w)^2 \quad (11.16)$$

$$H = d_A/N \quad (11.17)$$

$$k' = (1 - R_f)/R_f = (d_f/d_A) - 1 \quad (11.18)$$

где d_A — расстояние, пройденное от старта анализируемым веществом, d_f — расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы от линии старта, а w — ширина пятна анализируемого образца.

11.10.2 Аппаратурное оформление и ход анализа

Подготовка пластинки

Стационарную фазу наносят на пластинку обычно в виде водной суспензии с помощью плоского шпателя, создавая равномерное покрытие необходимой толщины. Кроме того, существуют готовые фирменные пластинки. Для аналитических целей толщина пластинки должна составлять порядка 0,25 мм, а для препаративных разделений — около 2 мм. Во всех случаях, за исключением эксклюзионной хроматографии, покрытые стационарной фазой пластинки перед использованием оставляют высыхать при комнатной температуре. В случае адсорбционной хроматографии высушивание пластинки осуществляют нагреванием до 100–120 °C, поскольку при этой температуре происходит также активация адсорбента.

Нанесение образца

Растворенный в органическом растворителе образец наносят микропипеткой, отступив приблизительно 2 см от края пластинки. Растворитель затем можно удалить при слабом нагревании с помощью фена и, если необходимо, нанести на то же место дополнительное количество образца. На одну пластинку в виде отдельных пятен можно нанести от 12 до 15 образцов. Для препаративных целей образец наносят единой полосой параллельно краю пластинки.

Ход разделения

Процесс разделения осуществляют в стеклянных емкостях, заполненных подвижной фазой на высоту около 1,5 см. Подвижную фазу в закрытой стеклянной крышкой емкости оставляют уравновешиваться приблизительно на 1 ч. Затем в емкость вертикально помещают пластинку с нанесенными образцами, так что ближайший к линии старта край пластины погружается в раствор. Крышку снимают и оставляют пластинку в растворе: 20–30 мин для аналитического разделения, 75–90 мин — для препаративного разделения. Когда фронт подвижной фазы приближается к противоположному краю пластинки, пластинку вынимают и детектируют разделившиеся вещества. Качество разделения можно улучшить в **двумерном варианте** метода. В таком случае единственное пятно образца размещают в углу пластинки и осуществляют разделение, как описано выше. Затем пластинку высушивают, поворачивают на 90° и вновь осуществляют разделение в

другом измерении с другой подвижной фазой (в которой анализируемые вещества имеют другие значения K_d).

Детектирование

Существует несколько способов детектирования разделенных веществ:

- обработка пластинки **специфическим реагентом**, превращающим вещества в окрашенные продукты;
- анализ пластинки **в ультрафиолетовом свете** (при условии поглощения веществ в этом диапазоне длин волн);
- включение в стационарную фазу **флуоресцентного красителя**, в результате чего при исследовании пластинки в ультрафиолетовом свете вещества выглядели бы как красные, синие или зеленые пятна;
- использование **радиоактивных меток** и детектирования методом авторадиографии с помощью рентгеновской пленки или сканнера (радиохроматография).

Количество вещества в каждом пятне лучше всего определять с помощью прецизионного денситометра. Это устройство измеряет оптическую плотность пятна в видимом и ультрафиолетовом диапазоне длин волн и может воспроизвести полный спектр поглощения вещества для его идентификации. Идентификация неизвестного вещества основывается на данных денситометрии и на сравнении измеренного значения R_f для анализируемого вещества и стандартных веществ, нанесенных на ту же пластинку (рис. 11.20).

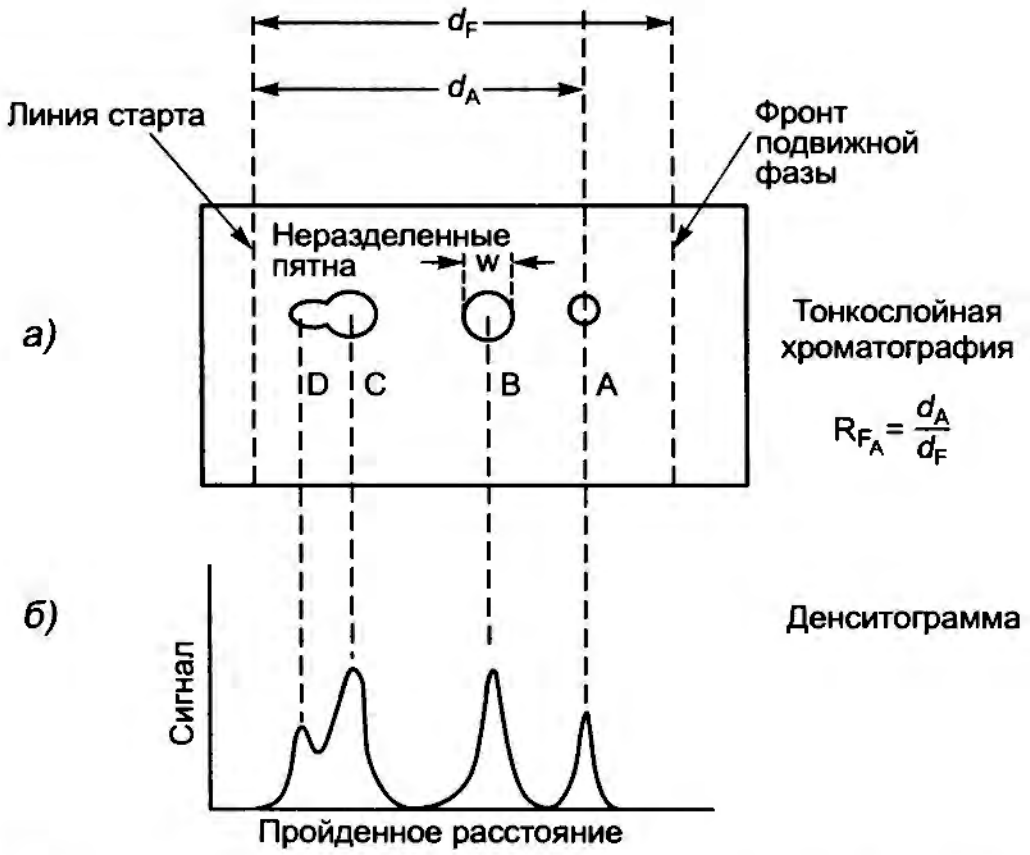


Рис. 11.20. Разделение смеси веществ A–D методом тонкослойной хроматографии (*а*); денситограмма, на основании которой можно получить количественные данные (*б*)

11.10.3 Применение метода

Преимущества тонкослойной хроматографии заключаются в ее простоте, низкой стоимости и возможности одновременно разделять несколько образцов. Основные недостатки — легкость повреждения покрытия пластинки и невысокая воспроизводимость. Результатом такого сочетания характеристик является то, что метод в настоящее время используется только для качественного анализа, например для проверки наличия того или иного вещества. В качестве примеров областей применения метода можно назвать анализ природных продуктов и пептидное картирование. Более подробно с методом можно ознакомиться в изданиях, процитированных в разд. 11.12.

11.11 ВЫБОР ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Для разделения веществ с известными физическими характеристиками можно предсказать наиболее эффективный метод хроматографии (рис. 11.21). Большая часть хроматографических методов основана на различии физических свойств веществ, исключение составляет лишь аффинная хроматография, основанная на специфической способности биологических макромолекул связываться с определенными лигандами. Если можно использовать метод аффинной хроматографии, то с большой вероятностью он окажется весьма эффективным. Для разделения летучих веществ лучше всего применить ГЖХ, а для нелетучих веществ, растворимых в органических растворителях, обычно подходит адсорбционная или нормально-фазовая жидкостная хроматография. Для веществ с несколькими типами функциональных групп, возможно, наилучшим методом разделения является адсорбционная хроматография на оксиде кремния с неполярным рас-

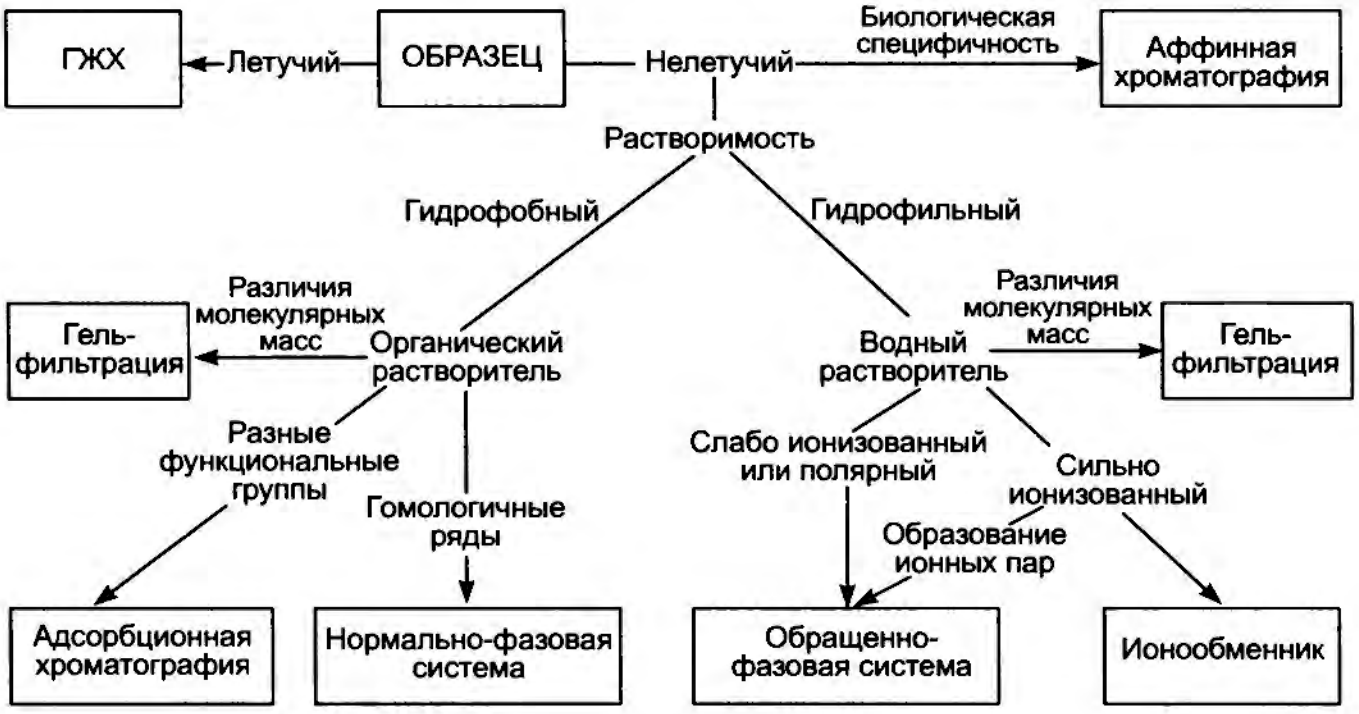


Рис. 11.21. Выбор хроматографической системы

творителем. Для разделения гомологичных рядов слабополярных веществ предпочтение отдается нормально-фазовой жидкостной хроматографии. Для растворимых в воде слабо ионизируемых веществ подходит обращенно-фазовая хроматография с неполярной стационарной фазой (например, углеводородной), используемой в сочетании с полярной подвижной фазой типа смеси воды с ацетонитрилом или с метанолом. Легко ионизируемые растворимые в воде вещества лучше всего разделяются методом ионообменной хроматографии на катионообменных или анионообменных смолах с подходящим элюирующим буфером. Ионизируемые вещества, кроме того, можно разделять в обращенно-фазовых системах методом образования ионных пар. Различающиеся по молекулярной массе вещества лучше всего выделять методом гель-фильтрации.

Выбор между жидкостной хроматографией высокого и низкого давления для конкретного биохимического анализа зависит от целого ряда факторов, в том числе от наличия прибора, стоимости, масштаба эксперимента и необходимости провести разделение на качественном или количественном уровне. В настоящее время во многих случаях предпочтение отдается системе ВЭЖХ из-за возможности быстро получить надежные и точные данные. В частности, обращенно-фазовая ВЭЖХ представляет собой чрезвычайно гибкий метод. Для разделения белков, кроме того, часто обращаются к системе FPLC, особенно в тех случаях, когда не следует опасаться денатурации белка. Простота ТСХ и предоставляемая ею возможность одновременно анализировать несколько образцов делает этот метод привлекательным для рутинного, главным образом качественного, анализа.

11.12 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

MONDELLO, L., LEWIS, A.C., and BARTLE, K.D. (2002) *Multidimensional Chromatography*. Wiley, Chichester. Обсуждение возможностей сопряжения методов ВЭЖХ и ГЖХ, метода двумерной ГЖХ и т. д.

SHERMA, J. and FRIED, B. (2003) *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd edn. Marcel Dekker, New York. Детальное обсуждение принципов, методологии и применимости ТСХ к широкому кругу биологических объектов.

SIMPSON, N.J.K. (ed.) (2000) *Solid Phase Extraction — Principles, Techniques and Applications*. Marcel Dekker, New York. Понятное изложение принципов этого важного метода анализа.

Trends in Analytical Chemistry (2002), **21**. Весь выпуск журнала посвящен обзору развития новых направлений и применению ГЖХ.

Глава 12

Спектральные методы. I. Атомная и молекулярная спектроскопия

12.1 ВВЕДЕНИЕ

12.1.1 Свойства электромагнитного излучения

Взаимодействие электромагнитного излучения с веществом имеет **квантовую** природу и зависит как от свойств излучения, так и от материала. В этом нет ничего удивительного, поскольку электромагнитное излучение обусловлено изменениями в самой материи. Понимание свойств электромагнитного излучения и его взаимодействия с веществом позволяет объяснить многообразие типов спектров и спектральных методов, применяемых при решении биологических задач. Происходящие при этом изменения с веществом (см. разд. 12.1.2) имеют квантовую природу, так что вид спектра теоретически предсказуем. В табл. 12.1 перечислены возможные взаимодействия электромагнитного излучения с отдельными «элементами» структуры вещества с указанием соответствующих длин волн. Различные структурные «элементы» вещества излучают и поглощают излучение в разных областях спектра.

Электромагнитное излучение (рис. 12.1), как следует из названия, имеет как электрическую, так и магнитную составляющие, колебания (волновой природы) происходят в плоскостях, расположенных под прямым углом друг к другу и к направлению распространения излучения.

12.1.2 Взаимодействие электромагнитного излучения с материей

Электромагнитное излучение характеризуется **энергией**, **частотой**, **длиной волны** и **интенсивностью**. Все эти параметры связаны между собой. Энергия излучения квантована (выделяется порциями, называемыми квантами). **Квант** электромагнитного излучения называется **фотоном**. Обратимся к электронным спектрам. Электроны в атомах или молекулах

Таблица 12.1. **Взаимодействие электромагнитного излучения с разными структурными «элементами» вещества**

Явление или «элемент»	Область спектра	Длина волны
Ядро	Гамма-излучение	0,1 нм
Внутренние электроны	Рентгеновское излучение	0,1–1,0 нм
Ионизация	Ультрафиолетовое излучение	0–200 нм
Валентные электроны	Ближняя УФ и видимая область	200–800 нм
Колебания молекул	Ближняя ИК и ИК область	0,8–25 мкм
Вращение и ориентация спина электрона в магнитном поле	Микроволновая область	400 мкм — 30 см
Ориентация спина ядра в магнитном поле	Радиоволны	100 см и выше

могут находиться на разных энергетических уровнях, но в принципе стремятся занять уровень с наименьшей энергией — **основной уровень**. Для перехода электрона на более высокий энергетический уровень (в **возбужденное состояние**) система должна получить определенное количество энергии, и, если источником этой энергии является электромагнитное излучение, возникает **спектр поглощения**. Согласно законам квантовой механики, вещество поглощает строго определенное количество энергии, соответствующее разнице энергетических уровней, занимаемых электроном. При переходе одного электрона поглощается один квант энергии, а абсолютная величина кванта зависит от разности энергий соответствующих уровней. При переходе электрона с более высокого на более низкий энергетический уровень система излучает один квант энергии, что сопровождается появлением **спектра излучения**. Система может поглощать энергию

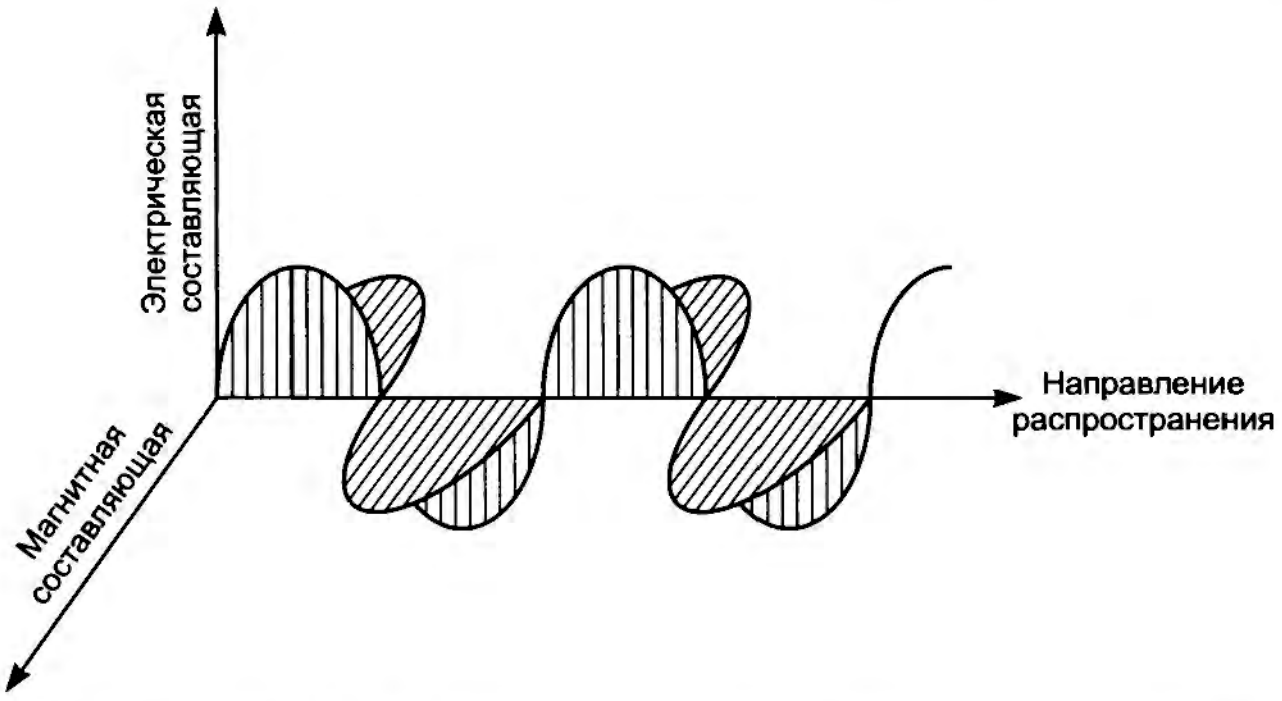


Рис. 12.1. Электрическая и магнитная составляющие электромагнитного поля и направление его распространения

и в других формах; например, нагревание металла приводит к переходу электронов на более высокие энергетические уровни, так что, если металл получил достаточное количество энергии, возвращение в исходное состояние сопровождается излучением видимого света — раскаленный металл светится.

Схема электронных переходов в атоме Na изображена на рис. 12.2, *а*. В большинстве атомов такие переходы сопровождаются появлением довольно простых **линейчатых спектров**. В молекулах происходят более сложные процессы, связанные с наличием нескольких типов энергетических уровней. Кроме того, атомы в молекулах могут колебаться и вращаться вокруг осей, образованных связями, в результате чего возникают **вращательные** и **колебательные подуровни** энергии (рис. 12.2, *б*). Однако в результате дополнительного расщепления энергетических уровней молекул молекулярные спектры обычно выглядят как **полосатые спектры**.

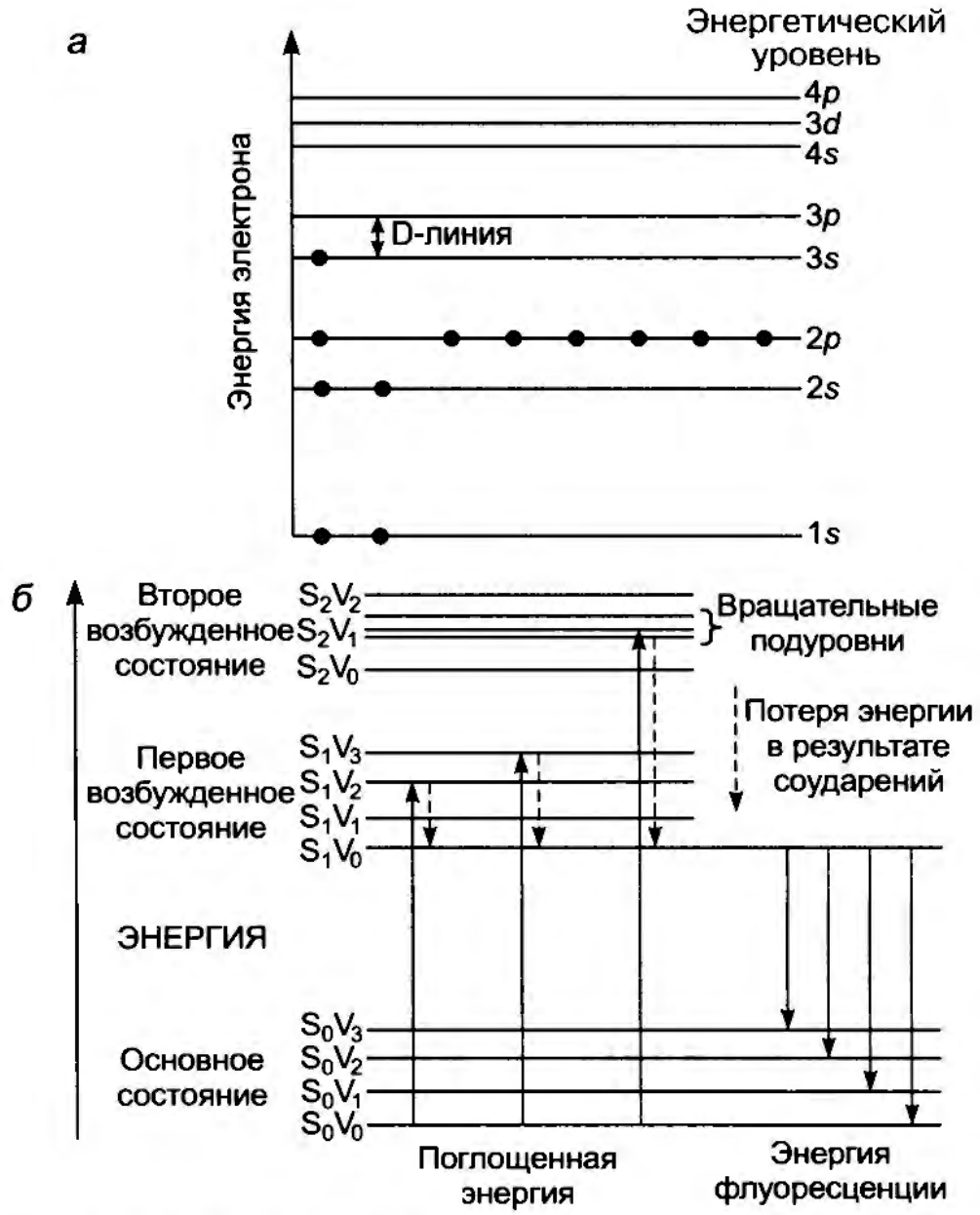


Рис. 12.2. Энергетические уровни и переходы электронов в атоме натрия (*а*) и в флуоресцирующей органической молекуле (*б*). Здесь для простоты вращательные уровни указаны лишь для колебательного подуровня S_2V_1

Изменение энергии при переходе электрона с одного энергетического уровня на другой описывается следующим простым выражением:

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu \qquad (12.1)$$

где ΔE — изменение энергии электрона или энергия электромагнитного излучения, поглощаемого или испускаемого атомом или молекулой, E_1 — энергия электрона в исходном состоянии, E_2 — энергия в конечном состоянии, h — постоянная Планка ($6{,}63 \cdot 10^{-34}$ Дж · с), ν — частота электромагнитного излучения, равная числу осцилляций (колебаний) волны за 1 с. Таким образом, частота имеет размерность обратных секунд ($с^{-1}$). Одна осцилляция в секунду соответствует частоте 1 Гц. Частота связана с длиной волны (λ) соотношением $\nu = c/\lambda$, где c — скорость света ($3 \cdot 10^8$ м/с в вакууме). Длина волны электромагнитного излучения равна $c\bar{\nu}$, где $\bar{\nu}$ — **волновое число** электромагнитного излучения, измеряемое в $см^{-1}$ или в кайзерах. На рис. 12.3 отражено несколько параметров волны. Заметим, что длину волны следует выражать в долях метра, например в нанометрах (нм), микрометрах (мкм), сантиметрах (см) и т.д. (но не ангстремах (Å)), а частоту — в герцах (Гц) (но не циклах в секунду).

Переходы электронов в атомах и молекулах, изображенные на рис. 12.2, *а* и *б*, являются причиной возникновения электронных спектров, обычно наблюдаемых в виде поглощения, испускания или флуоресценции (разд. 12.5) в ультрафиолетовой или видимой части спектра. Понятно, что в других спектральных диапазонах наблюдаются другие энергетические переходы.

Далее мы обсудим по отдельности каждую область электромагнитного спектра с точки зрения происходящих взаимодействий, необходимых для их регистрации приборами и применимости к решению различных биохимических задач. Некоторые методы рассмотрены подробнее других, что отражает широту их применения.

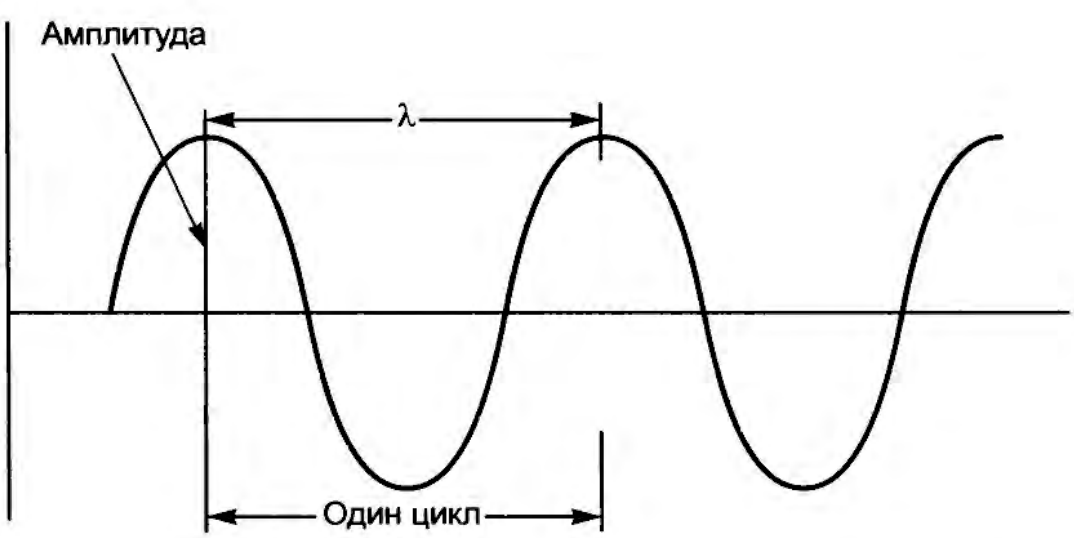


Рис. 12.3. Параметры одной волны (синусоиды). Число циклов, происходящих в единицу времени (секунду), соответствует частоте, измеренной в герцах

12.2 ГАММА-СПЕКТРОСКОПИЯ И ГАММА-РЕЗОНАНСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

12.2.1 Основы метода

Гамма-лучи испускаются ядром. Эта часть электромагнитного спектра исследуется с помощью специального спектрального метода анализа. Благодаря высокой проникающей способности эти лучи используются в биологии главным образом для создания изображений, но также в целях радиотерапии. Гамма-излучение обусловлено энергетическими переходами в ядре. В настоящей книге мы не будем останавливаться на механизме этого явления. Для более детального ознакомления обратитесь к дополнительной литературе в разд. 12.11.

Важное применение гамма-излучения связано с использованием элемента технеция (Tc), который не встречается в природе, а является продуктом ядерной промышленности. Технеций можно использовать в медицинских целях: если получить комплекс технеция с соединениями, которые преимущественно концентрируются в определенных тканях организма, таких как костный мозг, печень или головной мозг, то его локализацию можно определить по спектру испускания. Испускаемое излучение обнаруживают с помощью устройства, называемого гамма-камерой, которое позволяет исследовать форму и структуру анализируемого органа организма. Несмотря на такое название прибора, в основе анализа лежит спектральный метод.

Ядерный гамма-резонанс, называемый также **эффектом Мёссбауэра**, был открыт в 1957 г. Этот эффект характерен для многих изотопов, но ярче всего он проявляется для изотопов, близких к изотопу ^{57}Fe. Хотя применение этого метода имеет ограничения, он обладает значительным потенциалом для анализа важных для биологии комплексов металлов.

12.2.2 Мёссбауэровская (гамма-резонансная) спектроскопия

Основы

Модулировать гамма-излучение от радиоактивного ядра можно путем сообщения источнику излучения доплеровской скорости. **Эффект Доплера** (наблюдаемый для всех типов волн — как звуковых, так и электромагнитных) выражается в изменении частоты при перемещении источника излучения относительно детектора (наблюдателя). Изменение частоты пропорционально скорости перемещения источника. Гамма-лучи определенной энергии могут резонансно поглощаться соответствующими ядрами. Обычно источником излучения служит ^{57}Co. Этот изотоп испускает γ-лучи в определенном диапазоне энергии, что позволяет выбрать необходимое значение. Далее выбранный луч модулируют с помощью эффекта Доплера.

Устройство прибора

На рис. 12.4 представлена сильно упрощенная схема прибора для мёссбауэровской спектроскопии. Обычно доплеровскую скорость источнику можно сообщить путем быстрой вибрации источника.

Рис. 12.4. Принципиальная схема мёссбауэровского спектрометра

Применение

Основным применением данного метода является изучение координации лигандов атомами металлов. Были проанализированы модельные соединения, позволившие лучше понять, каким образом на некоторые металлы влияют изменения связывающей способности лигандов, вызванные либо химической модификацией, либо локальными изменениями окружения. Примером может служить серповидно-клеточная анемия, при которой, в отличие от нормального гемоглобина, атом железа выходит из плоскости гема.

12.3 РЕНТГЕНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

12.3.1 Основы метода

В отличие от гамма-излучения, источником которого является ядро, рентгеновские лучи возникают в результате перехода внутренних электронов атома. Можно схематично представить, что электроны с главными квантовыми числами 1, 2 и 3 занимают оболочки K, L и M соответственно. Если электрон из внешнего источника обладает достаточной энергией, чтобы выбить электрон с внутренней (K) оболочки атома, за время порядка 10^{-4} с образовавшуюся вакансию занимает электрон с L-оболочки; при этом происходит испускание рентгеновских лучей определенной длины волны. Понятно, что переход электрона от L-оболочки на K-оболочку подчиняется законам квантовой механики и для него выполняется уравнение $E = h\nu$; следовательно, частота и длина волны испускаемых рентгеновских лучей предопределены.

Рентгеновские лучи могут поглощаться материей, в результате чего возникает **спектр рентгеновского поглощения**. Соотношение между интенсивностью падающего монохроматического рентгеновского излучения (I_0) и интенсивностью прошедшего через вещество излучения (I) аналогично уравнению Бугера–Ламберта–Бера, описанному в разд. 12.4.1.

$$I = I_0 e^{-\mu x} \qquad (12.2)$$

где x — толщина поглощающего слоя.

Если длина волны рентгеновских лучей меньше так называемого **края полосы поглощения** атома (K-края), падающее излучение может выбить K-электроны атома. В результате возникает рентгеновское излучение, ча-

стота которого отличается от частоты падающего излучения. Данное явление называют **рентгеновской флуоресценцией**, а основанный на нем метод — **рентгеновским флуоресцентным анализом**. Основы флуоресценции изложены в разд. 12.5.

12.3.2 Оборудование. Применение

Лучи от источника рентгеновского излучения фокусируются на камере, в которой находится анализируемый образец. Флуоресцентное (испускаемое) излучение направляется через монохроматор на детектор и регистрирующее устройство, которые позволяют его анализировать. Упрощенная схема анализа представлена на рис. 12.5.

Метод широко применяется в судебной практике и в анализе загрязнений окружающей среды, поскольку он позволяет определять многие элементы и находить их концентрацию. В основном применение метода ограничивается анализом элементов, но он также полезен, например, для обнаружения и количественного определения следов отдельных элементов в составе удобрений. Из удобрений следовые количества веществ могут попадать в пищу и оказывать токсическое действие на организм. В качестве примера можно привести анализ содержания свинца в растениях, находящихся на различных расстояниях от оживленных магистралей.

Спектры испускания и поглощения получают таким же образом, как и в случае видимого/ультрафиолетового диапазона длин волн (см. далее разд. 12.4). В клинической практике для денситометрии костной ткани используется **однофотонная** или **двухфотонная абсорбциометрия**. Эти методы удобно использовать при проведении гормонозаместительной терапии (ГЗТ) у женщин. Рентгеновская спектроскопия проводится с со-

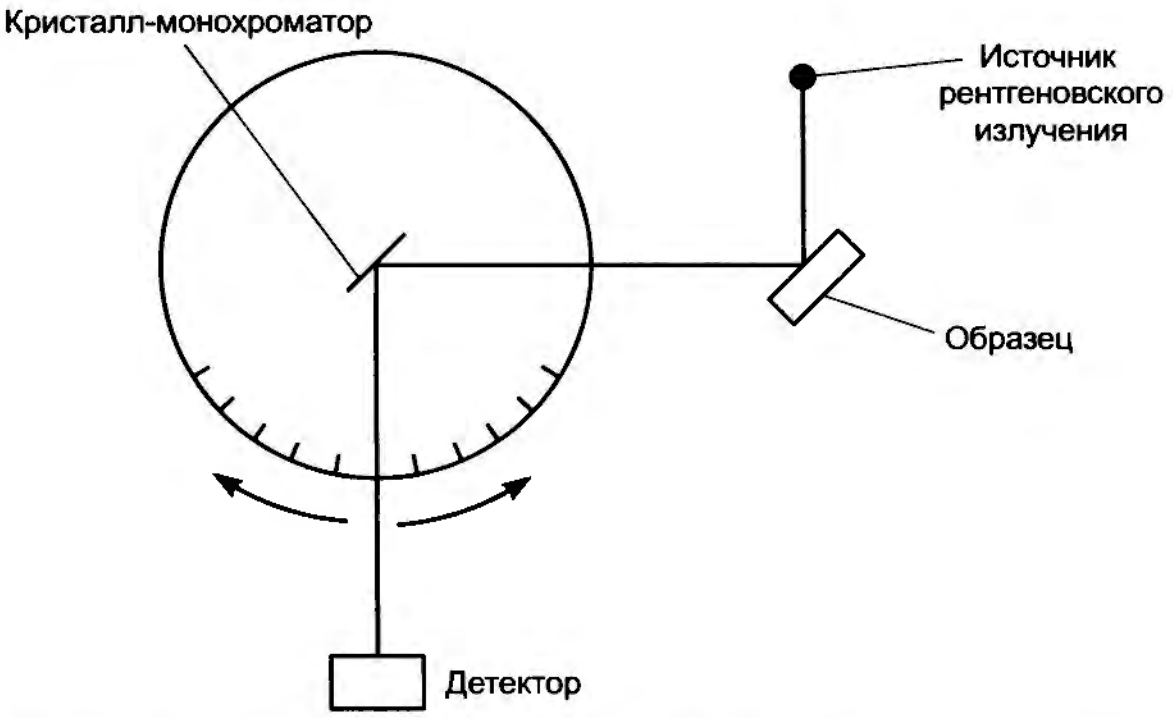


Рис. 12.5. Рентгеновский флуоресцентный анализ. Дисперсию флуоресцентного рентгеновского излучения можно регистрировать под разными углами

блюдением требований техники безопасности; это замечание касается источника излучения, монохроматора и детектора.

12.4 СПЕКТРОСКОПИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ И ВИДИМОМ ДИАПАЗОНЕ

Эти области электромагнитного спектра и связанные с ними методы, по-видимому, используются наиболее широко как в рутинной аналитической практике, так и в биохимических исследованиях. Энергетические переходы, происходящие в этом диапазоне длин волн, точно такие же, что описаны в разд. 12.1.2. Однако для описания процессов в данной области принято оперировать понятием «свет» и теми законами, которые именно для этой области были выведены.

12.4.1 Основы метода

Закон Бугера–Ламберта–Бера основан на двух зависимостях, одна из которых связывает поглощение света с концентрацией поглощающего вещества, а другая — с длиной светового пути или толщиной слоя поглощающего вещества (абсолютным количеством). Если поглощающее вещество лишь частично проницаемо для света, оно пропускает лишь некоторую долю падающего излучения. Отношение интенсивности падающего и проходящего света называется **пропусканием** (T):

$$T = I/I_0 \qquad (12.3)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, I — интенсивность проходящего света. (Обратите внимание: интенсивность = число фотонов в единицу времени (в секунду)).

При T = 100% вещество абсолютно прозрачно и не поглощает излучения, а при T = 0 вещество полностью непрозрачно и полностью поглощает падающее излучение. Вещества с промежуточными значениями пропускания характеризуются также **поглощением** (A) или **экстинкцией** (E)*:

$$A = E = \lg(1/T) = \lg(I_0/I) \qquad (12.4)$$

Вместо термина «поглощение» часто используют термин «**оптическая плотность**» (OD), однако это не всегда верно. Поглощение как логарифмическая величина — безразмерный параметр в диапазоне от нуля (100% пропускания) до бесконечности (0% пропускания). Однако термин «поглощение» некорректен, если измерение основано на рассеянии, а не на поглощении света. Такая ситуация часто встречается, например, при оценке числа бактериальных клеток или анализе отдельных органелл. Именно по этой причине в микробиологии продолжают пользоваться термином оптической плотности при подсчете плотности бактериальных культур

* Иногда в научной литературе различают поглощение $A = \lg I_0/I$ и экстинцию $E = \ln I_0/I$. — *Прим. ред.*

и при других исследованиях. В подобных ситуациях более корректно использовать термин **аттенюация** (ослабление, символ D). Аттенюация совпадает с поглощением в тех случаях, когда рассеяние света пренебрежимо мало.

Теперь можно ввести закон Бугера–Ламберта–Бера, который, как обсуждалось выше, устанавливает прямопропорциональную зависимость между поглощением вещества, его концентрацией и толщиной слоя:

$$A = \varepsilon_\lambda cl \qquad (12.5)$$

где ε_λ — **молярный коэффициент поглощения (экстинкция)** вещества при длине волны λ, c — концентрация раствора, l — **длина светового пути** (или толщина слоя раствора).

В единицах системы СИ концентрация выражается в моль/м^3, а длина пути — в метрах. Поскольку A — величина безразмерная, получаем, что коэффициент экстинкции измеряется в м^2/моль. Этого можно было ожидать, поскольку само значение поглощения также зависит от площади, освещаемой падающим светом. Но данная площадь идентична для образца и стандарта, ее в расчетах можно не учитывать. Более удобной единицей измерения ε_λ является дм^3/моль · см, которая, хотя и не соответствует системе СИ,

ПРИМЕР 1 РАСЧЕТ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ЭКСТИНКЦИИ

Вопрос Раствор вещества с концентрацией 5 г/дм^3 поместили в кювету с длиной светового пути 2 см. Кювету разместили в ячейке спектрофотометра и пропустили через нее свет с длиной волны λ. Получили величину пропускания 80%.

Найдите (1) поглощение раствора и (2) молярный коэффициент экстинкции вещества, если его молекулярная масса 410.

Ответ (1) Поскольку концентрация вещества задана в единицах массы на единицу объема, следует определить удельный коэффициент экстинкции ε_S.

Пропускание выражается как доля ($100 \cdot I_t$) интенсивности падающего света I_0:

$$T = 80\% = 100 \cdot \frac{I_t}{I_0}$$

Если $I_0 = 100\%$, то $I_t = 80\%$,

а $\frac{I_t}{I_0} = \frac{80}{100} = 0{,}8$

Поглощение $A = \lg(1/T) = \lg(1/0{,}8) = \lg(1{,}25) = 0{,}0969$

$A = \varepsilon_S \cdot c \cdot l = \varepsilon_S \cdot 5 \cdot 2$, откуда

$$\varepsilon_S = \frac{0{,}0969}{10} = 9{,}69 \cdot 10^{-3} \text{ дм}^3/(\text{г} \cdot \text{см}).$$

(2) Удельный коэффициент экстинкции и молярный коэффициент экстинкции связаны между собой через молекулярную массу вещества:

$\varepsilon_S \cdot 410 = \varepsilon_\lambda$, т. е.

$9{,}69 \cdot 10^{-3} \cdot 410 = 3{,}973$ дм^3/(моль · см).

зато обеспечивает переход к молярной концентрации и согласуется с часто применяемой длиной светового пути 1 см (см. разд. 1.2.2). Иногда значения молярных коэффициентов экстинкции очень велики и более удобно приводить поглощения образца толщиной 1 см в растворе с концентрацией 1%. В таком случае коэффициент записывается как $A^{1\%}_{1\text{ см}}$.

12.4.2 Оборудование

От рабочего диапазона длин волн зависит, из какого материала выполнены оптические детали прибора. Для работы в ультрафиолетовом диапазоне необходимы кварцевые призмы, решетки, отражатели и кюветы. При работе выше 350 нм можно использовать боросиликатное стекло; кроме того, существуют одноразовые пластиковые кюветы, которые являются прозрачными практически во всем видимом диапазоне длин волн, а также в близкой ультрафиолетовой области.

Понятно, что выбор длины волны играет решающую роль. Если анализируемое вещество не поглощает свет в видимой области, иногда его можно химическим путем превратить в окрашенный продукт; в таком случае для анализа используют цветные фильтры, поглощающие свет на всех длинах волн, за исключением определенного узкого диапазона, называемого **шириной полосы пропускания**. На использовании цветных фильтров и окрашенных продуктов основаны колориметрические методы анализа. Точность таких методов не очень высокая, поскольку даже самые лучшие фильтры (интерференционного типа) имеют недостаточно узкую полосу пропускания. Обычно для анализа используют две оптически совместимые кюветы: в одну помещают раствор сравнения, содержащий все компоненты смеси без анализируемого вещества (вместо которого добавляют эквивалентный объем растворителя), а в другую — раствор с анализируемым веществом. Перед началом работы необходимо выставить «ноль» прибора по раствору сравнения, затем поместить в кюветное отделение кювету с анализируемым веществом и измерить поглощение. Для наибольшей точности анализа выставлять «ноль» прибора требуется перед каждым новым измерением, поскольку как сами приборы, так и фильтры подвержены влиянию температурных изменений. Кроме того, лучше начинать анализ с наиболее разбавленного раствора и заканчивать более концентрированным (даже при условии ополаскивания кюветы), поскольку таким образом снижается вероятность загрязнения последующей пробы. В табл. 12.2 перечислены некоторые наиболее часто используемые методы колориметрического анализа.

Если для выбора длины волны используют призмы или решетки, метод анализа называют **спектрофотометрией**. Как в колориметрическом, так и в спектрофотометрическом анализе обычно готовят серию стандартных растворов, с помощью которых строят **градуировочную кривую** зависимости поглощения от концентрации; такая градуировочная кривая линейна (соответствует уравнению Бугера–Ламберта–Бера). Затем измеряют поглощение анализируемого раствора и его концентрацию находят из градуировочной кривой путем интерполяции. Интерполяция необходима по следующим причинам:

Таблица 12.2. **Методы колориметрического анализа некоторых соединений**

Вещество	Реагент	Длина волны, нм
Неорганический фосфат	Молибдат аммония; H_2SO_4; 1,2,4-аминонафтол; $NaHSO_3$, Na_2SO_3	600
Аминокислоты	а) Нингидрин	570 (420 для пролина)
	б) Соли меди (II)	620
Пептидная связь	Биуретовый реагент (тартратный буфер, соль Cu(II))	540
Фенолы, тирозин	Фолина реагент (фосфомолибдат, фосфовольфрамат, соль Cu(II))	660 или 750 (более чувствительно)
Белки	а) Фолина реагент	660
	б) Биуретовый реагент	540
	в) Бицинхониновый реагент	562
	г) Кумасси бриллиантовый синий	595
Углеводы	а) Фенол, H_2SO_4	Разные, напр. глюкоза 490, ксилоза 480
	б) Антрон, H_2SO_4	620 или 625
Восстанавливающие сахара	Динитросалицилат, щелочной тартратный буфер	540
Пентозы	а) Орцинол, этанол, $FeCl_3$, HCl	665
	б) Цистеин, H_2SO_4	380–415
Гексозы	а) Карбазол, этанол, H_2SO_4	540 или 440
	б) Цистеин, H_2SO_4	380–415
	в) Арсеномолибдат	Обычно 500–570
Глюкоза	Глюкозооксидаза, пероксидаза, *о*-дианизидин, фосфатный буфер	420
Кетогексозы	а) Резорцин, тиомочевина, уксусная кислота, HCl	520
	б) Карбазол, этанол, цистеин, H_2SO_4	560
	в) Дифениламин, этанол, уксусная кислота, HCl	635
Гексозамины	Эрлиха реагент (диметиламинобензальдегид, этанол, HCl)	530
ДНК	Дифениламин	595
РНК	Орцинол, этанол, $FeCl_3$, HCl	665
α-Оксокислоты	Динитрофенилгидразин, Na_2CO_3, этилацетат	435
Стерины	Либерманна–Бурхардта реагент (уксусный ангидрид, H_2SO_4, хлороформ)	625
Стероидные гормоны	Либерманна–Бурхардта реагент	425
Холестерин	Холестеринoксидаза, пероксидаза, 4-аминоантипирин, фенол	500

- никогда нельзя экстраполировать результаты за пределы того диапазона, для которого имеется градуировочная кривая;
- особенно при проведении колориметрического анализа определенную роль может иметь так называемый «эффект Иова» (см. ниже).

Если продолжать проводить измерения за пределами, установленными для окрашенного реагента, выясняется, что линейность графика уравнения Бугера–Ламберта–Бера нарушается; график выходит на плато в той точке, когда количество реагента недостаточно для дальнейшего развития окраски. Данное явление известно как «эффект Иова». Следовательно, экстраполяция градуировочной кривой может привести к очень большой ошибке. Более того, если определенный образец обладает очень высоким поглощением, нельзя разбавлять весь образец, поскольку при этом в равной степени разбавляются все его компоненты. Вместо этого следует вернуться к исходному материалу, осуществить его разведение и вновь провести реакцию для развития окраски.

Если не требуется высокой точности измерений, а анализируемое вещество и стандарт имеют близкие значения поглощения, можно воспользоваться линейностью уравнения Бугера–Ламберта–Бера и найти приблизительную концентрацию образца из соотношения:

$$\text{концентрация} = \frac{\text{поглощение образца}}{\text{поглощение стандарта}} \qquad (12.6)$$

Разумеется, такое приближение приемлемо лишь в том случае, если соотношение Бугера–Ламберта–Бера для конкретной реакции было установлено в предварительном эксперименте.

Важно отметить, что хотя по закону Бугера–Ламберта–Бера нулевой концентрации соответствует нулевое поглощение, а прибор перед экспериментом устанавливается в нулевое положение, не следует в обязательном порядке стремиться проводить градуировочную кривую через начало координат. Точность измерения в этой точке не больше, чем в любой другой. Для построения прямой по точкам лучше всего пользоваться регрессионным методом анализа (разд. 1.6.6).

Еще один момент, на котором следует заострить внимание, заключается в том, что точность прибора неодинакова во всем рабочем диапазоне. В конечном итоге измерение осуществляется гальванометром. Обычно максимальная точность измерений достигается при пропускании 36,8%, а при пропускании от 20 до 80% относительная погрешность составляет около ±2%. Из-за природы гальванометрических устройств погрешность при более высоких и более низких значениях пропускания может быть весьма значительной. Таким образом, эксперимент следует планировать так, чтобы измеряемые значения попадали в середину диапазона.

В колориметре ширина полосы пропускания определяется фильтром. Тот фильтр, который человеческий глаз воспринимает красным, пропускает красный свет и поглощает почти весь остальной. Такой фильтр можно использовать для анализа синих растворов, поскольку они поглощают

красный свет. Общее правило таково, что цвет фильтра должен быть дополнительным к цвету анализируемого раствора.

Устройство подобного рода приборов может быть очень простым; они состоят из источника света (лампы), фильтра, кюветы и светочувствительного детектора, регистрирующего проходящий свет. Еще один детектор нужен для измерения падающего света; в альтернативном варианте один и тот же детектор может поочередно измерять падающий и проходящий свет. Последний вариант и дешевле, и лучше, поскольку позволяет избежать различий между показаниями детекторов.

Спектрофотометр представляет собой гораздо более сложный прибор. Фотометр — это устройство, измеряющее интенсивность света, а приставка «спектро» подразумевает возможность непрерывной регистрации света во всем диапазоне длин волн, производимых источником. Детектором в фотометре обычно служит **фотоячейка**, чувствительная поверхность, которой воспринимаются фотоны и генерируется электрический ток, пропорциональный интенсивности светового пучка, достигающего поверхности ячейки. Для приборов, работающих в видимом и ультрафиолетовом диапазонах, устанавливаются два типа ламп — лампа накаливания с вольфрамовой спиралью производит свет в видимой части спектра, а дейтериевая или водородная лампа излучает в ультрафиолетовой области. Переключение с одной лампы на другую осуществляется при ~350 нм, однако часто на приборе остаются включенными обе лампы. В таком случае «переключение» состоит просто в перемещении светового пучка механическим способом с помощью зеркал или линз. Чаще применяют зеркала, поскольку они дешевле и при их использовании теряется меньше света из-за хроматической аберрации. Устройство прибора может быть простейшим (как устройство колориметра), но в таком случае теряются все преимущества метода. На рис. 12.6, *а* изображена схема однолучевого прибора. В таком варианте на пути луча сначала помещают раствор сравнения, а затем образец. На рис. 12.6, *б* представлена схема двухлучевого прибора. В этом варианте луч расщепляется на два пучка, один из которых проходит сквозь раствор сравнения, а другой одновременно с ним — сквозь образец. В таком случае снимается проблема колебаний интенсивности света, поскольку возможные колебания сказываются в одинаковой степени на растворе сравнения и на образце. Измеряемое поглощение представляет собой разность между интенсивностью света двух прошедших световых пучков. Существуют многолучевые приборы, позволяющие одновременно регистрировать изменения поглощения при нескольких выбранных длинах волн.

Свет, или излучение, от источника покрывает весь диапазон длин волн, которые этот источник способен производить. Как описывалось выше, в колориметрах для выбора рабочей длины волны используются фильтры. В спектрофотометрах ширина полосы определяется **монохроматором**. Теоретически монохроматор выбирает одно значение длины волны монохроматического излучения, причем прошедший через него пучок света движется в параллельном направлении. Ширина полосы в данном случае определяется как удвоенная ширина полосы на половине интенсивности и представляет

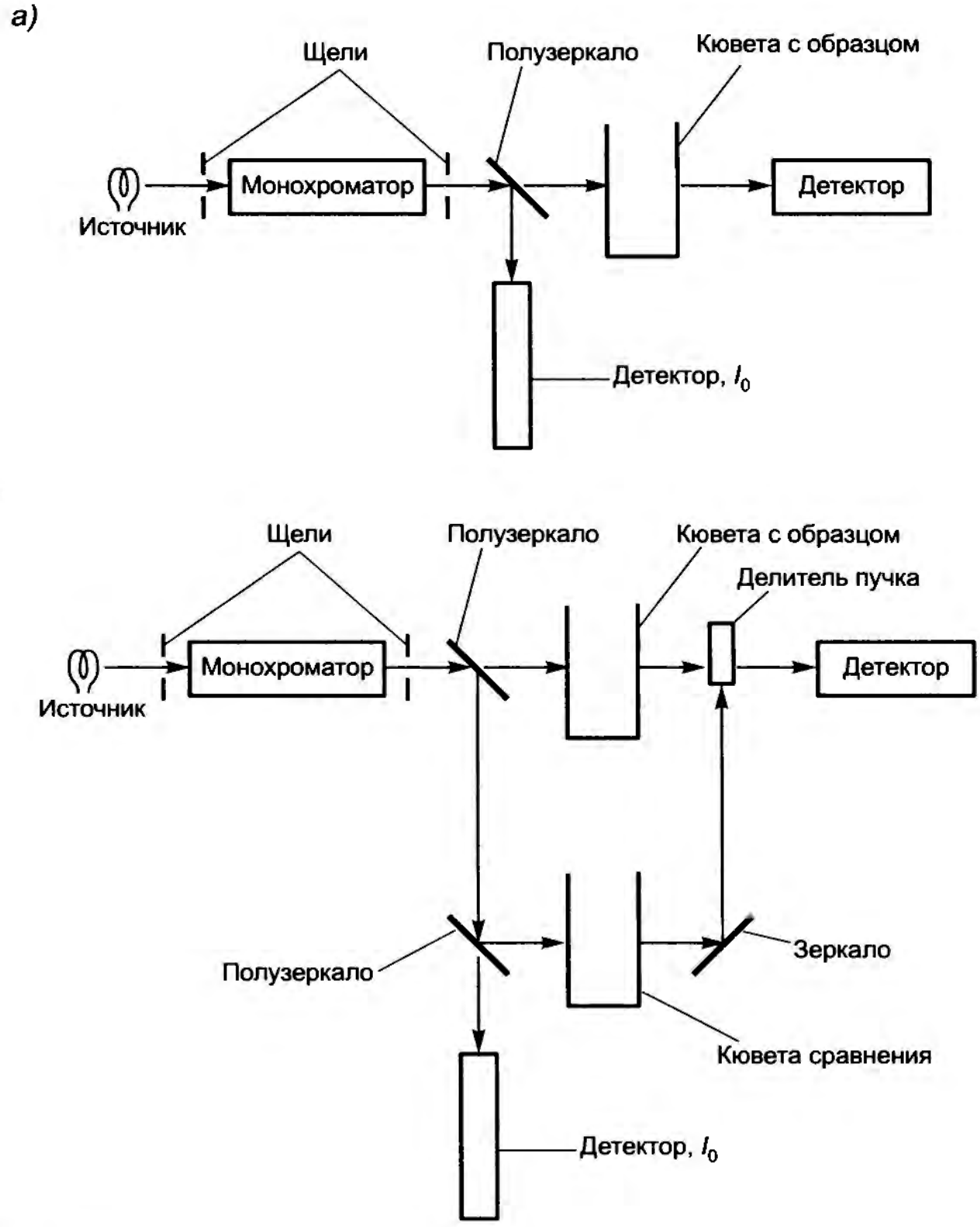


Рис. 12.6. Схемы однолучевого (*а*) и двухлучевого (*б*) спектрофотометра

собой диапазон длин волн, для которых интенсивность пропущенного света больше половины интенсивности света с определенной выбранной длиной волны; этот параметр является функцией ширины оптической щели.

В спектрофотометрах чаще всего используются **призмы**, которые расщепляют многочастотное излучение на составляющие в результате эффекта, называемого **преломлением** или **рефракцией** (по аналогии с каплями воды, создающими радугу), или **решетки**, в которых тот же результат достигается путем **дифракции**. Преломление в плотной среде призмы возникает в результате того, что луч света включает в себя со-

ставляющие (электромагнитные колебания) с разной длиной волны, которые проходят призму по разным путям. Для сохранения скорости луча его составляющие с меньшей длиной волны проходят в плотной среде меньшую дистанцию, чем те, что имеют большую длину волны. Дифракция возникает из-за преломления на поверхности, на которую нанесена серия тонких линий. Для появления дифракции расстояние между линиями должно быть такого же порядка, что и длина волны падающего света. Разрешение длин волн на решетках выше, чем на призмах; ранее только в дорогих приборах использовались решетки, причем изготовленные вручную. С развитием полупроводниковых технологий стало возможным производить решетки высокого качества в большом количестве, что значительно понизило их стоимость.

Ширина оптической щели влияет на ширину полосы, причем чем у́же щель, тем лучше воспроизводятся результаты измерений поглощения. В то же время чувствительность измерений с уменьшением ширины щели падает. В наиболее сложных приборах предусмотрен высокий уровень контроля измерений, обычно осуществляемый с помощью компьютера.

Кюветы для работы на спектрофотометре или колориметре являются неотъемлемой частью приборов. Они должны быть пригодны для точного анализа, иметь параллельные поверхности и одинаковые длины светового пути. В проточных ячейках, используемых в непрерывных проточных системах, параллельность поверхностей и длина пути несколько менее важны, поскольку раствор сравнения и анализируемый образец попадают в одну и ту же ячейку поочередно. Существуют также **микроячейки** и даже микроспектрофотометры, в которых очень узкий параллельный пучок монохроматического излучения проходит сквозь микроячейку, а затем поступает на специальный микроскоп.

Однако главным достоинством спектрофотометра является возможность сканировать полный диапазон длин волн в ультрафиолетовой и видимой областях и получать спектры поглощения. Эти спектры отражают зависимость поглощения от длины волны. Типичный пример приведен на рис. 12.7. Это спектр поглощения восстановленного цитохрома *c* в определенном диапазоне длин волн. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм) и видимой областях (400–700 нм) являются результатом определенных электронных переходов, описанных в разд. 12.1.3; чаще всего это π-электроны, участвующие в образовании двойных связей углерод–углерод, а также электроны неподеленных электронных пар азота и кислорода. Длина волны поглощаемого света определяется соответствующими электронными переходами, поэтому специфические пики поглощения можно связать с известными молекулярными фрагментами.

Термин **хромофор** применяют для обозначения отдельной группы, которая имеет характерный спектр поглощения. Сопряжение двойных связей приводит к снижению энергии (частоты), необходимой для осуществления электронных переходов, и, следовательно, приводит к увеличению длины волны, при которой поглощает хромофор. Данное явление называют **батохромным сдвигом**. Напротив, снижение степени сопряжения (например, протонирование азота в ароматическом кольце) вызывает

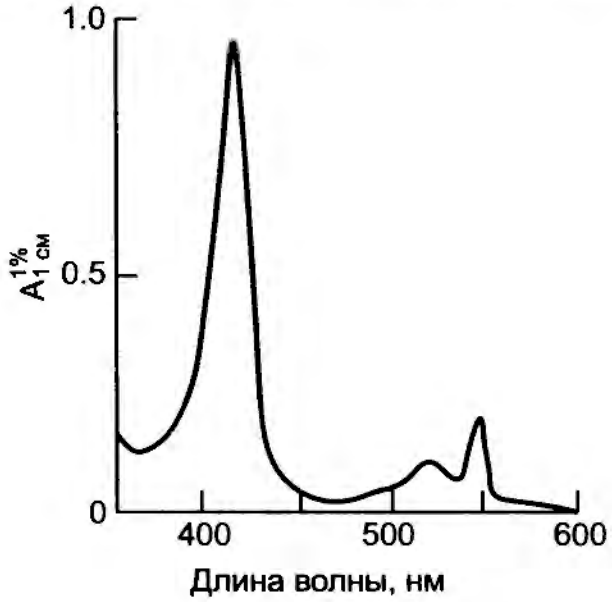


Рис. 12.7. Спектр поглощения восстановленного цитохрома *c*

гипсохромный сдвиг в сторону коротких длин волн. Кроме того, высота пика также может увеличиваться или уменьшаться. **Гиперхромный эффект** соответствует увеличению высоты пика, а **гипохромный** — ее уменьшению.

Кроме описанных выше, разработаны другие типы спектрофотометров, предназначенных для решения специальных задач. Регистрирующие спектрофотометры обычно могут как сканировать спектр (с помощью мотора угол призмы или решетки меняется, что приводит к непрерывному продвижению ширины полосы вдоль оси длин волн), так и следить за изменениями при заданной длине волны. В более простых приборах результаты записываются в виде спектра на бумаге, в более сложных — вносятся в память компьютера. Можно варьировать скорость движения бумаги, скорость сканирования, а также масштаб шкалы поглощения. Кроме того, некоторые автоматические устройства позволяют проводить измерения через заданные промежутки времени (это важно в случае происходящих во времени изменений, например в кинетических исследованиях, см. разд. 15.2.2). Проведение измерений при температуре жидкого азота (–196 °C) повышает разрешение, поскольку снижается интенсивность движения молекул. Обычно при таких измерениях поглощение также увеличивается в результате увеличения кажущейся длины светового пути, так как в замороженном образце имеет место внутреннее отражение.

Отражательные фотометры измеряют поглощение излучения в отражающих свет образцах, таких как паста или суспензия микроорганизмов, которые плохо пропускают свет. В таких случаях происходят внутреннее отражение и преломление света и, следовательно, реальная длина светового пути неизвестна. Понятно, что в такой ситуации закон Бугера–Ламберта–Бера в строгой формулировке применять нельзя и поэтому трудно осуществлять количественные измерения. Для проведения анализа требуется стандартная отражающая поверхность, для изготовления которой часто используют оксид магния.

12.4.3 Применение

Качественный и количественный анализ

Качественный анализ в ультрафиолетовом/видимом диапазоне длин волн может осуществляться с целью идентификации определенных классов веществ как в чистом виде, так и в смесях, например белков, нуклеиновых кислот, цитохромов и хлорофиллов. Метод, кроме того, служит для выявления изменений химической структуры соединения или обнаружения интермедиатов того или иного процесса. Однако более точные данные получаются при проведении анализа в инфракрасной области.

Количественный анализ основан на том, что некоторые хромофорные группы, такие как ароматические аминокислоты в белках или гетероциклические основания в нуклеиновых кислотах, поглощают свет с определенной длиной волны. Белки можно анализировать при длине волны 280 нм, а нуклеиновые кислоты — при 260 нм, хотя в любом случае необходимо учитывать возможность влияния мешающих веществ. Для учета этого влияния обычно измеряют поглощение мешающего вещества при двух длинах волн: при длине волны, при которой поглощает анализируемое вещество, и при длине волны, при которой оно не поглощает. Если известно отношение значений поглощения мешающего вещества при этих двух длинах волн, можно легко скорректировать влияние мешающего вещества; например (разд. 8.3.2), для белков в присутствии нуклеиновых кислот можно использовать отношение A_{280}/A_{260}. Для более сложных случаев применяются более сложные алгебраические выражения, например для определения концентрации витамина А в омыленных маслах используют корректирующий фактор Мортона и Стаббса.

Для веществ, дающих дискретные спектры, таких как хлорофилл *a* и *b* в диэтиловом эфире, их количество удается оценить в том случае, если известны коэффициенты экстинкции при двух различных длинах волн. Для n веществ необходимы соответствующие данные для n длин волн.

Явление **рэлеевского рассеяния света** (разд. 12.7) наблюдается при анализе небольших концентраций некоторых биологических макромолекул (например, крупных фрагментов ДНК) при 260 нм. В результате возникает ошибка измерений, которая, однако, может быть учтена, если измерить рассеяние в той области спектра, где ДНК не поглощает свет (например, при 330–340 нм).

Дифференциальные (разностные) спектры*

Дифференциальный спектр основан на разности поглощений двух спектров поглощения. Существует два способа получения таких спектров: первый (непрямой) заключается в вычитании одного спектра поглощения из другого (рис. 12.8, *а*), второй (прямой) осуществляется путем помещения одного вещества в кювету сравнения, а другого — в кювету для анализируемого вещества (рис. 12.8, *б*). На рис. 12.8, *а* представлены спектры убихинона и убихинола; дифференциальный спектр можно построить путем

---

* Следует обратить внимание на то, что дифференциальным спектром, кроме разностного спектра, называют также спектр, полученный математическим дифференцированием. — *Прим. ред.*

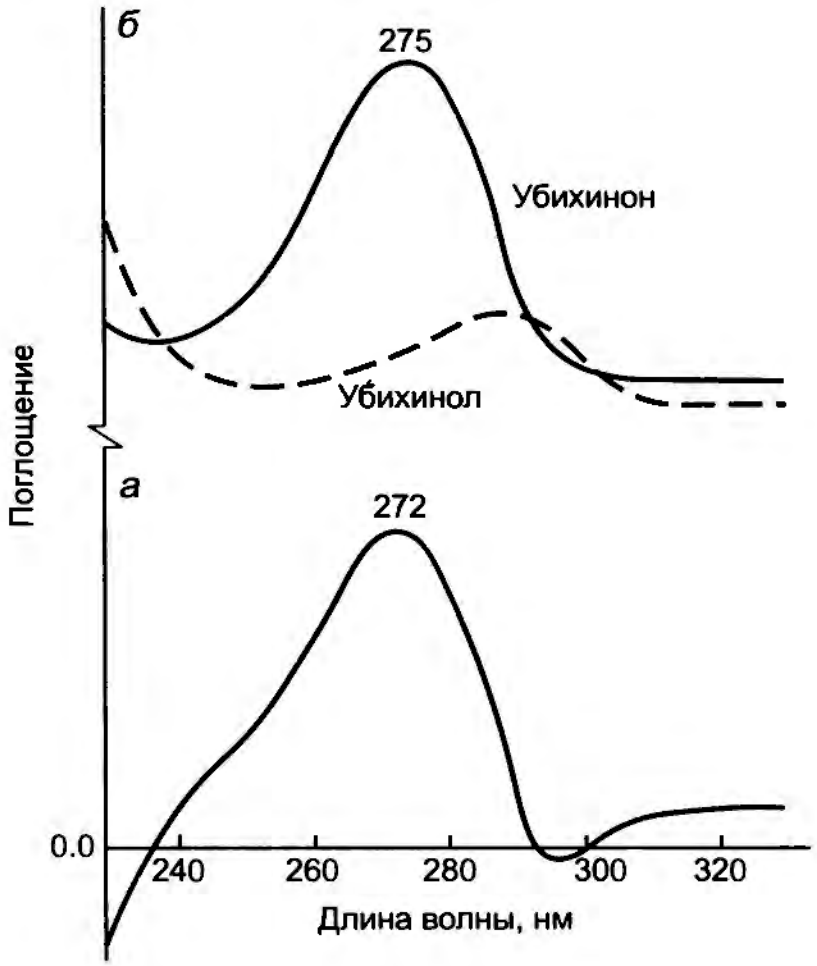


Рис. 12.8. «Абсолютные» (*а*) и дифференциальный (*б*) спектры убихинона и убихинола

вычитания одного спектра из другого. На тот же график наносят разность поглощений. Такой дифференциальный спектр представлен на рис. 12.8, *б*; это точно такой же спектр, только получен он другим путем. Преимуществом дифференциальной спектрофотометрии является возможность детектирования небольших изменений поглощения в системе с высоким фоновым поглощением. Примером такого рода исследований может служить анализ изменений окислительного состояния компонентов дыхательной цепи в интактных митохондриях и хлоропластах.

Сделаем несколько важных замечаний.

- Дифференциальные спектры могут иметь отрицательные значения поглощения.
- Минимумы и максимумы поглощения могут смещаться, а коэффициенты экстинкции могут отличаться от тех, что соответствуют абсолютным спектрам поглощения.
- Точки нулевого поглощения на дифференциальном спектре соответствуют тем длинам волн, при которых вещества обладают одинаковым поглощением (**изобестические точки**); по этим точкам можно судить о присутствии в системе мешающих веществ.

Более сложным примером служит спектр комплекса цитохрома a_3 с CO и спектр самого цитохрома a_3; дифференциальный спектр получают, по-

мещая в кювету сравнения анаэробные бактерии, а в кювету для анализируемого вещества — ту же систему и комплекс с CO. Цитохром a_3 является терминальным переносчиком электронов в дыхательной цепи и лишь он один способен реагировать с CO.

Часто под дифференциальным спектром понимают исключительно разность между спектром полностью восстановленного вещества и полностью окисленного вещества. Например, дифференциальный спектр цитохрома *c* соответствует разности спектров цитохрома c_{red} и цитохрома c_{ox}. Аналогичные дифференциальные спектры можно получить для суспензии митохондрий с помощью так называемого метода **обращения спектра**. Для этого изменения поглощения определяют при каждой длине волны, когда образец переходит из аэробного в анаэробное состояние. В результате получают комбинированный спектр для цитохромов a, a_3, b, c, c_1, а также для NAD^+ и флавопротеина. Плечи пиков на дифференциальных спектрах могут исчезнуть, если получать спектры при температуре –196 °C (низкотемпературные дифференциальные спектры).

Альтернативой для анализа спектров с плохим разрешением (как абсолютных, так и дифференциальных) является применение математического подхода, называемого **производной (дифференциальной) спектроскопией**. Если известно математическое выражение, определяющее форму симметричного пика, его можно продифференцировать и построить график зависимости производной от исходной переменной. Условный пример представлен на рис. 12.9.

Однако почти всегда математическое выражение для спектра неизвестно. Тем не менее результата можно добиться путем дифференцирования кривой через небольшие интервалы длин волн (значения по оси *x*) с помощью компьютера. В результате получают набор значений $\Delta y/\Delta x$ или $\Delta abs/\Delta\lambda$. При бесконечно малых значениях $\Delta\lambda$ отношение $\Delta y/\Delta x$ стремится в пределе к dy/dx. Производные спектры более высокого порядка можно получать, если вновь вносить полученные данные в компьютер и обрабатывать их таким же способом. Производные высоких порядков часто вызывают сомнение, однако производные спектры второго порядка

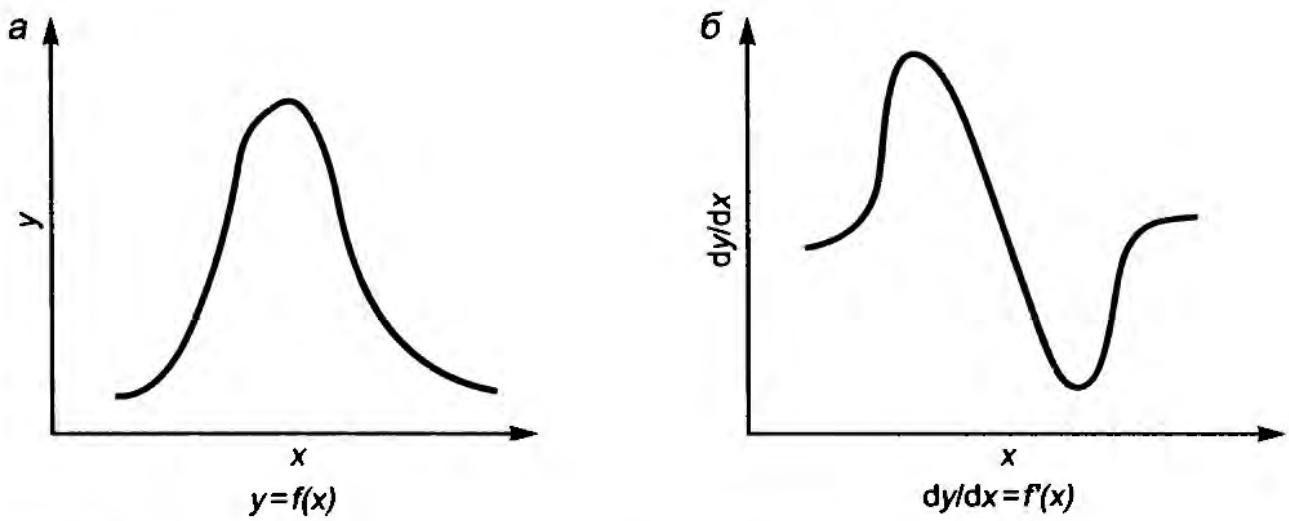


Рис. 12.9. Спектр поглощения (*а*) и его первая производная (*б*)

(d^2y/dx^2) помогают разрешить многие проблемы, которые не удается решить другим путем. Некоторые спектрофотометры позволяют осуществлять подобные расчеты. Например, с помощью производных спектров второго порядка можно анализировать связывание моноклональных антител с антигенами.

Спектр связывания

Спектр связывания используют для изучения взаимодействия фермента с субстратом. Связывание субстрата с гемом, в котором ион железа находится в высокоспиновом состоянии, изменяет вид спектра, поскольку вытесняет воду из шестого положения в координационной сфере железа, что приводит к переходу железа в низкоспиновое состояние. За этом процессом можно следить с помощью спектрофотометра. Пример данной реакции — связывание лекарства (субстрата) с микросомальной монооксигеназой печени (оксидазой со смешанными функциями), приводящее к синему (гипсохромному) сдвигу цитохрома P450 в составе фермента от 420 до 390 нм.

Метод позволяет анализировать структуру некоторых биологических макромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Спектр хромофорных групп в белках в значительной степени определяется полярностью микроокружения. Изменение полярности растворителя, в котором растворен белок, изменяет спектр определенных аминокислот без изменения конформации белка. Понятно, что такое «возмущение растворителем» возможно только в том случае, если соответствующий аминокислотный остаток находится на поверхности молекулы белка. Следует использовать смешивающиеся с водой растворители диметилсульфоксид, диоксан, глицерин, растворы маннита, сахарозы и полиэтиленгликоля.

Ароматические аминокислоты проявляют свойства хромофоров в ультрафиолетовом свете. Этот факт позволяет следить за процессами разворачивания полипептидной цепи при изменении pH, температуры или ионной силы, поскольку при этом оказывается экспонировано большее количество ароматических аминокислотных остатков.

Кроме того, можно изучать и многие другие процессы, особенно в тех случаях, если изменения затрагивают ароматический остаток тирозина, например взаимодействия между белками, белками и металлами или белками и малыми молекулами. Диапазон возможностей метода расширяется при использовании так называемых **репортерных групп** — искусственных хромофоров, присоединенных к соответствующим участкам белка.

Для анализа нуклеиновых кислот, например для оценки числа неспаренных оснований РНК, можно использовать метод возмущения растворителем. Если обычную воду, использующуюся в качестве растворителя, на 50% заменить ^2H_2O, то тяжелая вода изменяет спектральные свойства неспаренных нуклеотидов. Можно анализировать также денатурацию двойной спирали ДНК, если нагревать раствор двухцепочечной ДНК до ее температуры плавления (разд. 5.2.3). Поглощение при 260 нм возрастает (гиперхромный эффект) при денатурации и вновь снижается (гипохромный эффект) при ренатурации, которая имеет место при охлаждении. Аналогичным образом можно изучать зависимость вторичной структуры ДНК от pH и ионной силы.

Спектр действия

В определенных ситуациях пользуются **спектром действия** — графиком зависимости физиологической функции системы (не поглощения) от длины волны. Во многих сложных биологических системах подобные спектры часто соответствуют спектру поглощения какого-то одного ключевого компонента. Примером может служить график зависимости скорости метаболизма кислорода в зеленых растениях от длины волны облучающего света. Данный график очень похож на спектр поглощения хлорофилла.

ПРИМЕР 2 РАСЧЕТ ПОГЛОЩЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ

Вопрос Раствор АТФ в кювете с длиной светового пути 1 см имеет поглощение 0,17; коэффициент экстинкции АТФ $1{,}54 \cdot 10^4$ дм^3/моль · см. Определите:

(1) концентрацию раствора АТФ;

(2) пропускание раствора в данной кювете;

(3) поглощение раствора АТФ с концентрацией $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ мМ в кювете с длиной светового пути 4 см.

Ответ (1) Концентрацию можно найти по уравнению Бугера–Ламберта–Бера:

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \varepsilon_\lambda cl$$

$$0{,}17 = 1{,}54 \cdot 10^4 \cdot c \cdot 1$$

$$c = [\text{АТФ}] = \frac{0{,}17}{(1{,}54 \cdot 10^4 \cdot 1)} = 1{,}104 \cdot 10^{-5}\ \text{М}$$

(2) $$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \lg\left(\frac{1}{T}\right)$$

$$0{,}17 = \lg\left(\frac{1}{T}\right)$$

$$\frac{1}{T} = 10^{0{,}17} = 1{,}4791$$

$$T = 0{,}676 \text{ или } 67{,}6\%$$

(3) Поскольку известно значение молярного коэффициента экстинкции, следует перевести концентрацию в моль/дм^3 (М).

$2{,}5 \cdot 10^{-2}$ ммоль/дм^3 $= 2{,}5 \cdot 10^{-5}$ М

$$A = \varepsilon_\lambda cl = 1{,}54 \cdot 10^4 \cdot 2{,}5 \cdot 10^{-5} \cdot 4 = 1{,}54$$

Напомним, что поглощение (которое представляет собой логарифмическую величину), по определению, является величиной безразмерной. Продемонстрируем это алгебраическим путем:

ε_λ дм^3/(моль · см)

c моль/дм^3

l см

$\varepsilon_\lambda cl$ = дм^3/(моль · см) · моль/дм^3 · см,

где все единицы измерения сокращаются.

12.5 СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЯ

12.5.1 Основы метода

Флуоресценция — это испускание света веществом, т. е. переход молекулы из состояния с более высоким уровнем энергии в состояние с более низким уровнем энергии регистрируется не по поглощению, а именно по интенсивности испускаемого излучения. Для возможности перехода из более высокого энергетического состояния в более низкое необходимо предварительное возбуждение молекулы, например, путем воздействия электромагнитного излучения. Длина волны поглощаемого излучения должна быть меньше (энергия больше), чем длина волны испускаемого света (флуоресценции). Разность этих длин волн называется **сдвигом Стокса**; обычно наилучшие результаты получают с теми соединениями, у которых сдвиг Стокса большой. Некоторые вещества поглощают (возбуждаются) в ультрафиолетовой области спектра, а излучают (или флуоресцируют) в видимой области.

На рис. 12.2, *б* приведен пример различных разрешенных уровней энергии. При комнатной температуре большая часть электронов находится в основном состоянии S_0V_0. Их перемещение на более высокие уровни S_1, S_2 и т. д. может происходить при поглощении электромагнитной энергии (фотонов) за время менее 10^{-15} с. Из-за столкновений молекул поглощенная энергия может очень быстро рассеиваться в виде тепла, а электроны сохраняют минимальную вращательную энергию, соответствующую самому низкому возбужденному состоянию S_1V_0. Из этого состояния электроны возвращаются в основное состояние за время менее 10^{-8} с, испуская энергию, которая может проявляться в виде флуоресценции. Многие органические молекулы поглощают свет в ультрафиолетовой/видимой области, но не флуоресцируют. К счастью, многие представляющие интерес для биологии молекулы все же флуоресцируют. Следует отметить, что хотя знание структуры органической молекулы позволяет предсказать ее спектр поглощения, для флуоресценции это не так. Алифатические молекулы, обычно имеющие гибкую структуру, подвергаются фотодиссоциации, а не флуоресцируют; ароматические же соединения с делокализованными π-электронами флуоресцируют только иногда.

Испускаемое излучение проявляется в виде полосатого спектра, поскольку конечным вращательным и колебательным уровням энергии соответствует множество близких значений длин волн. Эти полосатые спектры обычно не зависят от длины волны возбуждающего света и представляют собой зеркальное отражение пика поглощения, расположенного в более коротковолновой области.

Существует также явление **фосфоресценции**, которое связано с более длительными временами энергетических переходов и обычно проявляется тогда, когда возбуждение уже не действует. Фосфоресценция возникает в результате перехода системы в нижнее триплетное состояние. Обычно такое излучение света происходит при бóльших длинах волн, чем флуоресценция.

Спектры флуоресценции дают информацию о событиях, происходящих за промежуток времени менее 10^{-8} с. **Квантовый выход** Q определяется выражением

$$Q = \frac{\text{количество излученных квантов}}{\text{количество поглощенных квантов}} \qquad (12.7)$$

Этот параметр обычно не зависит от длины волны возбуждающего света. При низких концентрациях вещества интенсивность флуоресценции (I_f) связана с интенсивностью падающего света (I_0):

$$I_f = 2{,}3 I_0 \varepsilon_\lambda c d Q, \qquad \text{т. е. } I_f = \alpha c \qquad (12.8)$$

где c — молярная концентрация флуоресцирующего раствора, d — длина пути света в растворе (см), ε_λ — молярный коэффициент экстинкции вещества при длине волны λ (дм/(моль · см)).

Метод спектрофлуориметрии позволяет получать точные результаты даже при анализе образцов с очень низкими концентрациями, при работе с которыми обычная спектрофотометрия дает сравнительно высокую ошибку. Например, флуориметр позволяет определить 100 пг катехоламинов или NADH, тогда как для анализа катехоламинов серотонина и адреналина спектрофотометрическим методом требуется по 100 мкг каждого из этих веществ. Флуориметры имеют очень высокую чувствительность, причем ее легко регулировать путем усиления сигнала детектора. Кроме того, метод характеризуется высокой селективностью — сдвиг Стокса позволяет использовать два монохроматора — один для возбуждающего света, другой — для испускаемого. Раствор сравнения в данном методе не нужен, но необходимо строить градуировочную кривую.

Недостатками метода являются его чувствительность к изменениям pH, температуры, полярности растворителя, а также невозможность предсказать способность конкретного вещества к флуоресценции. Однако главный недостаток заключается в **тушении флуоресценции**. Причина этого явления состоит в том, что энергия, которая могла бы выделиться в виде флуоресценции, передается другим молекулам при соударениях. Частично это объясняет повышенную чувствительность и высокую точность метода при работе с низкими концентрациями веществ, поскольку при этом каждая молекула имеет в своем окружении меньше соседей и испытывает меньшее число соударений, однако не следует оставлять без внимания и влияние растворителя. Многие материалы, такие как детергенты, смазки, фильтровальная бумага и некоторые ткани, мешают анализу, поскольку могут содержать флуоресцирующие молекулы.

12.5.2 Оборудование

Прямая связь между интенсивностью флуоресценции и концентрацией вещества позволяет использовать довольно простые электронные и оптические системы. Можно использовать два монохроматора; первый моно-

хроматор (M_1) служит для выбора длины волны возбуждающего света. Испускание света происходит во всех направлениях. Выбирают направление под углом 90° к направлению падающего света и ставят на пути излученного света второй монохроматор (M_2), с помощью которого определяют спектр флуоресценции. Источником возбуждения обычно является либо ртутная лампа, либо ксеноновая дуга, причем для возбуждения часто выбирают длину волны в ультрафиолетовом диапазоне, а испускание происходит в видимом диапазоне. В качестве детектора обычно применяют чувствительную фотоячейку, например чувствительный в красной области фотоумножитель для длин волны выше 500 нм. Для получения точных результатов необходим контроль температуры, поскольку интенсивность флуоресценции может изменяться на 10–50% при изменении температуры на 10 °C относительно температуры 25 °C.

Для освещения образца существуют две возможности: в простейшем варианте образце освещают под прямым углом к стенке кюветы (рис. 12.10), другой вариант с фронтальным освещением образца (front-face illumination, FFI; рис. 12.11) позволяет избежать поглощения излучения до достижения флуоресцирующих молекул и снижения интенсивности испускаемого света до его выхода из кюветы. Эти так называемые эффекты внутреннего фильтра сильнее проявляются в концентрированных растворах, поэтому для анализа таких растворов рекомендуется применять микрокюветы, содержащие меньше образца (рис. 12.11, *а*). Метод FFI используют для анализа суспензий, при этом необходимы кюветы с одной оптически прозрачной стороной (рис. 12.11, *б*). Возбуждающий и испускаемый свет проходят сквозь одну и ту же поверхность кюветы. Такой вариант метода менее чувствителен, чем стандартный вариант.

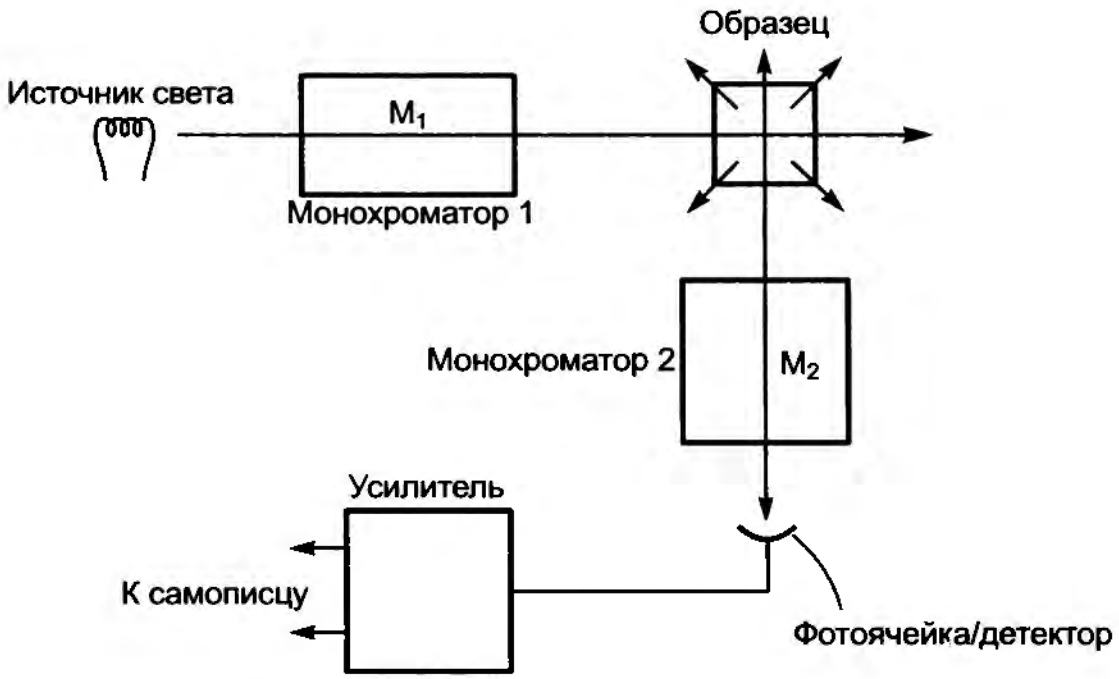


Рис. 12.10. Стандартная схема устройства спектрофлуориметра

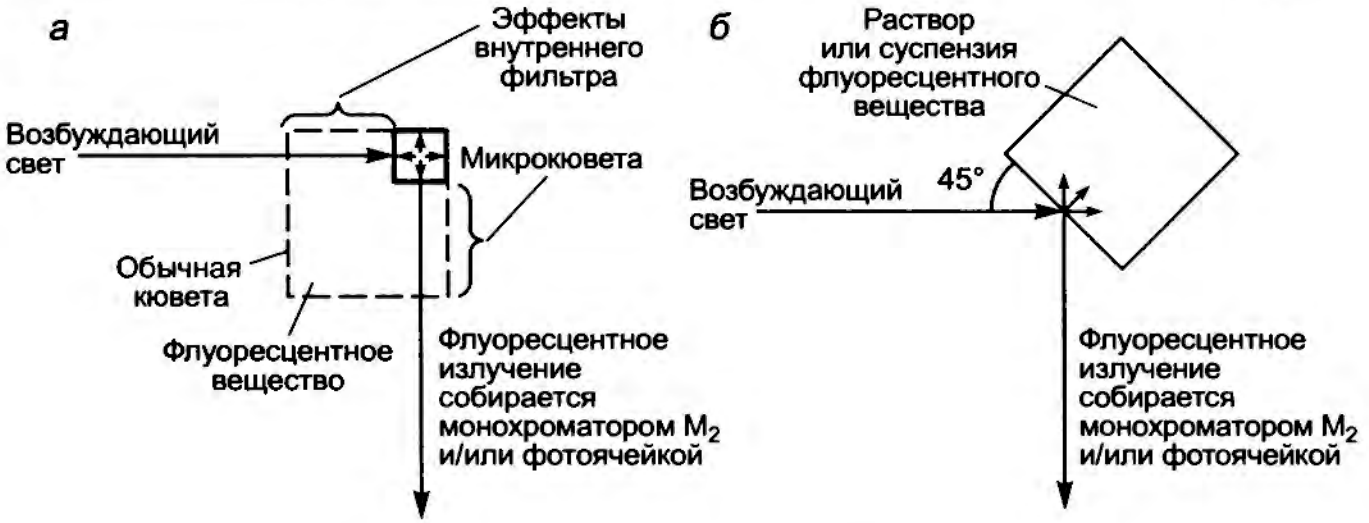


Рис. 12.11. Снижение влияния эффекта внутреннего фильтра с помощью микрокюветы (*а*) и фронтального освещения образца (*б*)

12.5.3 Применение

Флуоресцентные метки

Несмотря на то что лишь немногие молекулы способны флуоресцировать, флуоресцентный анализ применяется очень широко. Для идентификации веществ сравнивают спектры поглощения и флуоресценции, для уточнения структуры анализируют влияние pH и состава растворителя, а также поляризацию флуоресценции. Для идентификации также могут быть использованы результаты фосфоресценцентного анализа и **время жизни фосфоресценции**.

Для анализа нефлуоресцирующих веществ к их молекулам присоединяют **флуоресцентные метки** — таким же образом, как для анализа спектров поглощения используют репортерные группы (разд. 12.4.3). В таком варианте флуоресценции следят за излучением метки, а не ароматических групп в боковых цепях аминокислотных остатков, как при естественной флуоресценции белков. Метку используют для проведения как качественного, так и количественного анализа. Например, для анализа аминокислот и пептидов, разделенных хроматографическим или электрофоретическим методом, их первичные аминогруппы можно связать с дансилхлоридом или *о*-фталевым альдегидом (разд. 8.4.2). В последнем случае конъюгат имеет интенсивную синюю флуоресценцию, так что фингерпринтинг целого пептида можно получить, имея всего лишь 10^{-5} г белка. Если разделение проводили на колонке, количественный анализ можно осуществить после дериваторизации снятых с колонки веществ. Акридиновый оранжевый — это флуоресцентный реагент, который используют для выявления однонитевой и двунитевой формы полинуклеотида, поскольку сдвиги Стокса для конъюгатов этих двух форм различаются: в первом случае флуоресценция красная, во втором — зеленая. Метка должна быть прочно «пришита» на специфическом участке молекулы, ее флуоресценция должна быть чувствительной к изменениям внешних условий и она не должна оказывать нежелательного действия на анализируемую систему. Несколько вариантов флуоресцентных меток представлено на рис. 12.12.

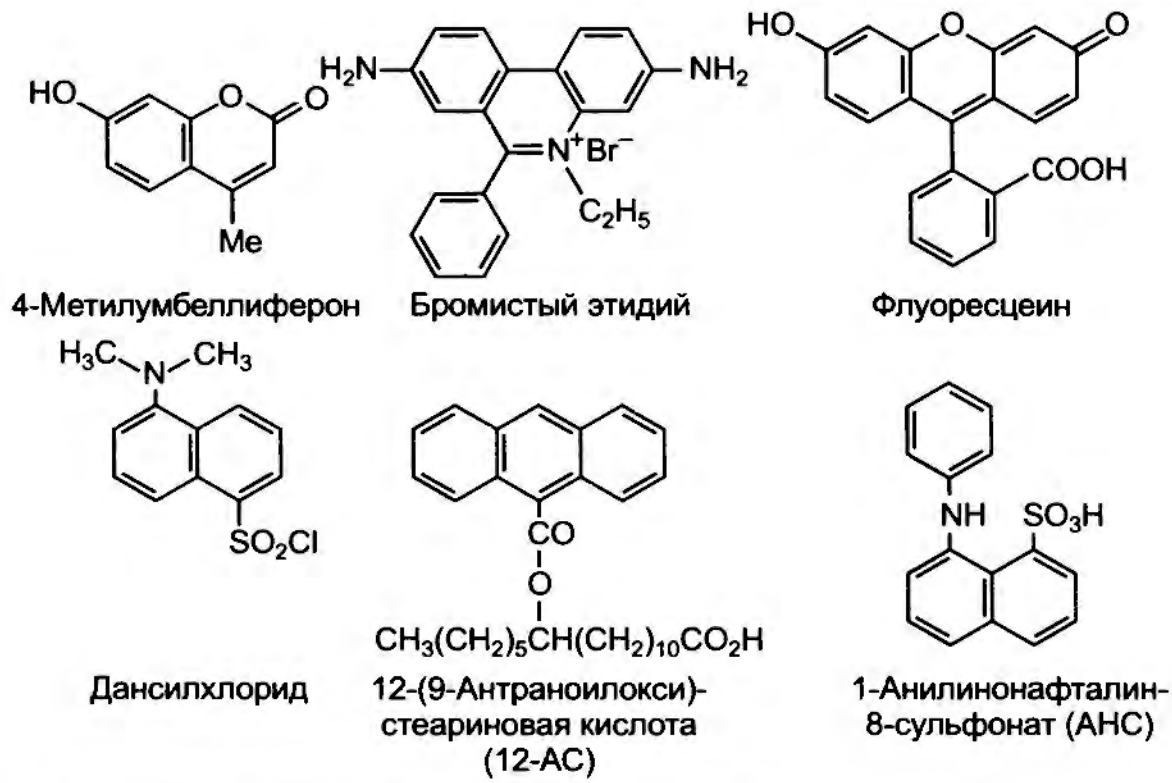


Рис. 12.12. Структура некоторых флуоресцентных меток

Основным применением флуориметрии в биохимии является количественное определение веществ, концентрация которых слишком мала, чтобы их можно было определить по спектрам поглощения. Диапазон подобных исследований очень широк: анализ витамина B_1 в пищевых продуктах, NADH, гормонов, лекарственных препаратов, пестицидов, канцерогенов, хлорофилла, холестерина, порфиринов и некоторых ионов металлов. Самотушение флуоресценции и тушение примесями можно изучать путем добавления известного количества стандарта к неизвестному количеству чистого вещества и измерения флуоресценции до и после добавления.

Для определения ионов кальция в цитоплазме клеток используют хелатирующий агент Quin-2, который связывается преимущественно с металлом. При связывании флуоресценция усиливается примерно в 5 раз. Еще более чувствительные метки — Fura-2 и Indo-1. Хелатирующий агент Quin-1 можно использовать в качестве флуоресцентной метки для анализа внутриклеточных изменений pH в диапазоне от 5 до 9. В этом диапазоне при образовании комплекса флуоресценция усиливается примерно в 30 раз.

Изучение кинетики ферментативных процессов

Ферментативный анализ, общие принципы которого подробно обсуждаются в разд. 15.2.2, часто основан на спектрофотометрическом детектировании. В качестве примера приведем анион 4-метилумбеллиферона, который флуоресцирует при 450 нм. Он образуется в результате ферментативной реакции разложения простого или сложного эфира флуорофора. В качестве ферментов используют специфичные гидролазы, а за кинетикой реакции можно следить по флуоресценции; типичные спектры поглощения и флуоресцен-

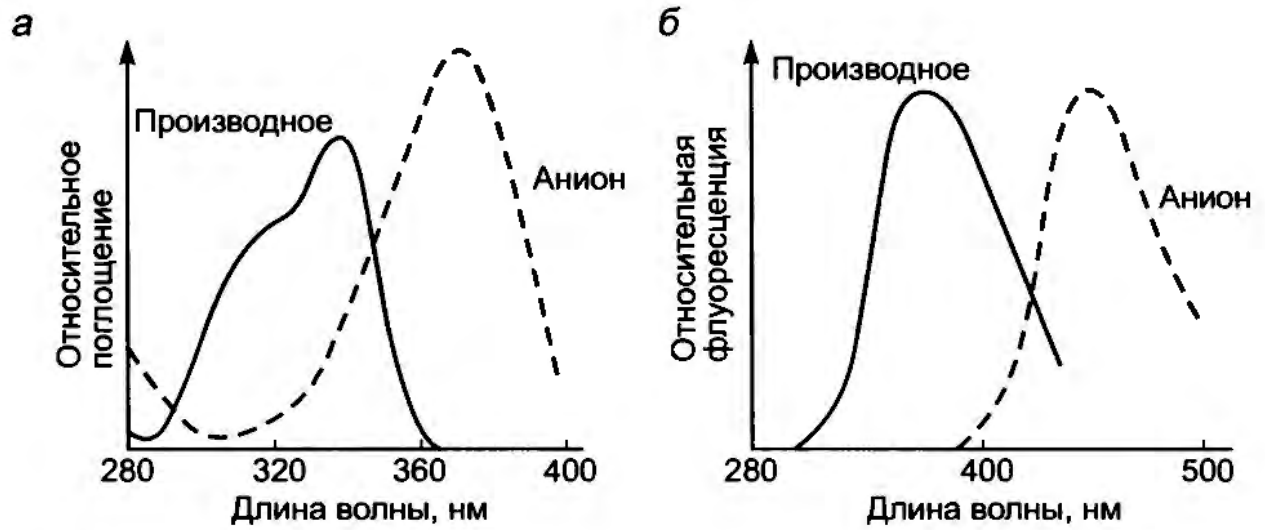


Рис. 12.13. Спектры поглощения (*а*) и флуоресценции (*б*) аниона метилумбеллиферона и производных 4-метилумбеллиферона при pH 10

ции представлены на рис. 12.13, *а* и *б*. Образец обычно облучают светом с длиной волны 350–400 нм, а флуоресценцию, возникающую в результате образования аниона, анализируют при 450–500 нм. Считается, что с помощью флуоресцеин-ди(β-D-галактозида) в качестве субстрата можно обнаружить даже одну-единственную молекулу β-галактозидазы — так высока чувствительность метода. Следовательно, появляется возможность определять реальное количество молекул в отдельной бактериальной клетке, а также следить за синтезом фермента в отдельных клетках популяции.

Спектрофлуориметрический анализ бывает полезен для исследования процессов с участием NAD^+: восстановленные формы (NADH и NADPH) флуоресцируют, а окисленные — нет. Поэтому можно изучать окислительно-восстановительный процесс *in vitro*, используя те же концентрации, при которых процесс происходит *in vivo*, а также следить за интактными клетками или органеллами (например, митохондриями).

Структура белка

Наличие в молекулах белка триптофана и FAD в качестве кофактора объясняет их естественную флуоресценцию. Связывание и высвобождение кофакторов, ингибиторов, субстратов и других веществ вблизи флуоресцирующей группы изменяет спектр флуоресценции, что позволяет получать информацию относительно конформационных изменений, денатурации или агрегации молекул. Если молекула не обладает естественной флуоресценцией, можно использовать подходящую флуоресцентную метку типа анилинонафталин-8-сульфоната (АНС), дансилхлорида и производных флуоресцеина или родамина. Относительно недавно в качестве флуоресцентной метки стали использовать зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) из *Aequorea victoria*. GFP интенсивно флуоресцирует зеленым светом и не требует кофакторов. Генно-инженерные методы позволяют получать химерные белки, в которых GFP соединен с анализируемым белком таким образом, что функция последнего при этом не изменяется. Изменения конформации анализируемого белка, происходящие

при связывании лиганда, отражаются на флуоресценции GFP. Аналогичным образом можно использовать красный флуоресцентный белок, выделенный из *Discosoma striata* (см. разд. 16.3.2).

Структура мембран

На флуоресцентные свойства молекул влияет их подвижность и окружение, в частности его полярность. Изменение этих параметров вблизи флуоресцентной метки можно наблюдать, следя за изменениями флуоресценции. Некоторые метки, имеющие заряженные и гидрофобные участки (например, АНС и N-метил-2-анилино-6-нафталинсульфонат, МНС), способны самопроизвольно выстраиваться вдоль поверхности раздела фаз липид/вода и поэтому используются для изучения структуры мембран и получения информации относительно свойств подобных поверхностей. Внедрение в мембраны фосфолипидов, содержащих 12-(9-антраноилокси)-стеариновую и 2-(9-антраноилокси)пальмитиновую кислоты, позволяет получать информацию о структуре участков, удаленных от фосфатных полярных головок двойного липидного слоя на 0,5 и 1,5 нм соответственно. Метод позволяет анализировать базовую структуру мембраны, а также влияние температуры и некоторых биологических воздействий. С помощью АНС в качестве метки исследовались изменения в мембранах митохондрий в процессах передачи энергии.

Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания
(fluorescence recovery after bleaching, FRAP)

Если флуоресцентная метка подвергается импульсному воздействию облучения высокой интенсивности, она может необратимо обесцветиться, т. е. навсегда потерять свою способность флуоресцировать. Если на несущие флуоресцентную метку фосфолипиды, внедренные в биологическую мембрану, воздействовать таким образом то благодаря постепенно происходящей взаимной диффузии обесцвеченных и необесцвеченных молекул за изменением структуры мембраны можно следить (с помощью облучения низкой интенсивности) по возобновлению флуоресценции. Такой подход используют, например, для изучения латеральной подвижности меченого родопсина в фоторецепторной мембране, полимеризации белков, таких как актин, и диффузии несущих флуоресцентную метку белков, внесенных в клетку путем микроинъекции (см. также разд. 16.3.3).

Флуоресценция за счет резонансной передачи энергии
(fluorescence resonance energy transfer, FRET)

В ряде случаев энергию можно передать путем **резонансной передачи** от флуоресцентной метки-донора к метке-акцептору при условии, что спектр флуоресценции донора перекрывается со спектром поглощения акцептора. Метки должны быть расположены поблизости, поскольку эффективность переноса энергии зависит от расстояния между ними. Эффективность переноса можно оценивать либо по тушению флуоресценции донора акцептором, либо по интенсивности флуоресценции акцептора, когда последний облучают как в присутствии, так и в отсутствие донора.

Природные флуоресцирующие группы типа остатка триптофана или метки, прикрепленные искусственным путем к аминокислотным остаткам, –SH-группам и сахарам, а также флуоресцентные аналоги субстратов, ингибиторов, кофакторов или фосфолипидов могут использоваться в экспериментах по переносу энергии для определения расстояний внутри белковых молекул. Точность метода составляет ±5 нм. Такой подход позволяет определить локализацию металлов в металлопротеинах, конформационные изменения в ферментах и рецепторах при связывании субстратов или лигандов (разд. 16.3.2), расстояние между различными парами белков на рибосоме и трехмерную структуру транспортных РНК.

Поляризация и деполяризация флуоресценции

Возбуждающий свет можно **поляризовать**, если разместить между первым монохроматором (M_1) и образцом подходящий поляризатор. Испускаемое излучение может быть абсолютно неполяризованным или частично поляризованным, и для его детектирования можно использовать второй поляризатор, размещенный между монохроматором M_2 и детектором.

Вращательные колебания молекул влияют на **деполяризацию флуоресценции**: например, колебания хромофорной группы и энергетические переносы между хромофорами усиливают деполяризацию. Измерения при высокой концентрации хромофора и высокой вязкости среды отображают главным образом энергетические переносы, а при низкой концентрации хромофора и малой вязкости основное влияние оказывают молекулярные перемещения.

Метод позволяет изучать перемещение отдельных молекул или их фрагментов. Время жизни естественных флуоресцентных меток в белках и нуклеиновых кислотах обычно слишком мало, поскольку в этих макромолекулах происходят лишь слабые колебания. Следовательно, для анализа метку обычно вводят искусственным путем. Примерами подобного рода анализов может служить связывание флуоресцентного субстрата, ингибиторов и кофакторов с ферментами и рецепторами (разд. 16.3.2), снижение подвижности из-за инерции и при увеличении массы а также реакция образования комплекса антигена с антителом. Кроме того, метод позволяет изучать сборку и диссоциацию субъединичных белков, таких как лактатдегидрогеназа и химотрипсин, а также измерять вязкость в живых клетках.

Интересный исторический пример состоит в использовании вязкого раствора глицерина для ослабления вращения и перемещения крупных молекул в экспериментах по деполяризации. Именно этот факт, не имеющий по сути никакой связи с методом бомбардировки быстрыми атомами, стал причиной использования глицерина в качестве матрицы в этом варианте масс-спектрометрии.

Микроспектрофлуориметрия

В данном методе микроскоп соединен со спектрофлуориметром, оснащенным оптоволоконной оптикой, что позволяет анализировать связывание антител, меченных флуоресцентной меткой, с отдельными бактериальными клетками, а также интенсивность флуоресценции внутриклеточных структур. Обычно злокачественные клетки содержат больше нуклеиновых кислот, чем нормаль-

ные клетки, и поэтому они захватывают больше флуоресцентного красителя акридинового оранжевого. Оказалось, что это наблюдение можно использовать для обнаружения злокачественных клеток в тканях при биопсии.

Активируемый флуоресценцией сортировщик клеток

Эта система, описанная в разд. 7.8.5, использует свет, который испускают клетки, несущие меченные флуоресцентной меткой антитела, для физического отделения таких клеток от немеченых клеток при их прохождении через тонкую капиллярную трубочку (разд. 16.3.2).

Флуоресцентный иммуноанализ

Этот метод подробно обсуждался в разд. 7.7.6, но следует кратко упомянуть о нем и здесь.

Существует несколько типов иммуноанализа с использованием меченых антигенов или антител. Связывание меченого гаптена с антителом может влиять на интенсивность флуоресценции, что позволяет следить за образованием комплекса. Об использовании изменения поляризации для проведения иммуноанализа говорилось выше. Главным недостатком названных методов является высокий уровень фоновой флуоресценции, который часто мешает проведению измерений. В этой связи наибольшими преимуществами обладает метод **флуоресцентного иммуноанализа с разрешением во времени**. Снижение фона и, следовательно, увеличение чувствительности достигается двумя путями. Во-первых, в качестве метки обычно применяют хелатные комплексы европия, поскольку для них характерно большая величина сдвига Стокса и длительная флуоресценция. Во-вторых, этот флуориметр сконструирован таким образом, что задерживает измерение испускаемого света на 400 мкс, на протяжении которых неспецифическая фоновая флуоресценция практически полностью исчезает. Такой подход привел к появлению метода **усиленного диссоциацией флуоресцентного иммуноанализа с лантаноидами** (dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay, DELFIA).

Многокомпонентный анализ методом синхронной люминесцентной спектрометрии*

Несмотря на такое название, метод представляет собой вариант флуоресцентного анализа и позволяет одновременно изучать многокомпонентные смеси без привлечения сложных технологий и компьютерных программ.

В обычной **люминесцентной спектрометрии** спектр испускания получают путем сканирования соответствующих длин волн $\lambda_{исп}$, а возбуждение люминесценции (флуоресценции) происходит на фиксированной длине волны $\lambda_{возб}$. Например, спектр возбуждения получают путем сканирования $\lambda_{возб}$, а испускание регистрируют при фиксированном значении $\lambda_{исп}$.

Комбинированный метод состоит в сканировании $\lambda_{исп}$ и $\lambda_{возб}$, например, путем изменения длин волн одновременно или синхронно. В отличие от обычного метода здесь это возможно, несмотря на снижение энергии возбуждения.

---

* Другое название — метод синхронной спектрофлуориметрии. — *Прим. ред.*

Интенсивность люминесценции $I_в$ определяется по уравнению 12.9, правая часть которого вытекает из уравнения Бугера–Ламберта–Бера:

$$I_в = KcdE_X(\lambda - \Delta\lambda)E_M(\lambda) \qquad (12.9)$$

где K — совокупная константа, c — концентрация анализируемого вещества, d — длина оптического пути, λ — длина волны излучаемого света, $E_M(\lambda)$ — спектр испускания, $E_X(\lambda - \Delta\lambda)$ связана с экспериментально определенным спектром возбуждения (при длине волны возбуждающего света λ'). Особое требование данного метода заключается в том, чтобы разность между длинами волн возбуждения и испускания оставалась постоянной, т. е. $\Delta\lambda = \lambda - \lambda'$. Следовательно, в приведенном выше уравнении $\lambda' = \lambda - \Delta\lambda$. Часто на практике удобно, чтобы разность $\Delta\lambda$ соответствовала сдвигу Стокса.

К числу преимуществ метода относится то, что сложные спектры могут быть сведены к единственному пику, спектральные линии обычно узкие, а спектры многокомпонентных систем упрощаются. Кроме того, дополнительным преимуществом метода является возможность варьировать скорость сканирования на обоих монохроматорах.

Среди возможных применений метода — определение флуоресценции молекул бензо(*a*)пирена (БП), связанных ковалентной связью с нуклеиновыми кислотами (как ДНК, так и РНК), выделенными из эпидермиса мышей, обработанных БП. Измерения проводили при 77 К в замерзших водных растворах с помощью флуориметра со счетчиком фотонов, работающего в режиме синхронного сканирования. Была выбрана разность $\Delta\lambda = 28$ нм, которая при флуоресценции связанного БП соответствует сдвигу Стокса. Среди других применений — определение канцерогенного полициклического углеводорода дибензо(*a*,*h*)антрацена в экстрактах табачного дыма, разделение триптофана и тирозина в белках и полипептидах, а также количественное определение галлюциногенов (например, ЛСД). Возможно получать производные спектры, что позволяет отделять примеси фенилаланина, тирозина и триптофана, белков и катехоламинов. Метод может быть использован в клиническом анализе.

ПРИМЕР 3 ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ И ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Вопрос Из спинномозговой жидкости был выделен метаболит М. После возбуждения светом с длиной волны λ_1 280 нм вещество флуоресцирует при длине волны λ_2 360 нм. Использовали стандартный спектрофлуориметр.

(1) Значения шкалы прибора выставили на «ноль» по используемому буферу, а на 100% — по чистому стандартному образцу М в концентрации 100 нг/100 см^3.

(2) В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий все компоненты, за исключением вещества М; показание для раствора сравнения составило 11,2%.

(3) Для экстракт с веществом М получена флуоресценция 67%.

(4) При добавлении к экстракту вещества М в качестве внутреннего стандарта чистого вещества М в концентрации 1 мкг/дм^3 (эта концентрация эквивалентна 100 нг/100 см^3) суммарная флуоресценция составила 92%.

Найдите концентрацию вещества М в образце спинномозговой жидкости (в мкг/дм^3) и уровень тушения флуоресценции, если оно существует. Установите величину сдвига Стокса.

Ответ Лучший путь решения данной задачи состоит в определении отдельных интенсивностей.

Пусть I_s — 100% флуоресценции (стандарт),

I_b — 11,2% флуоресценции (раствор сравнения),

I_t — 67% (общая флуоресценция),

I_f — 92% (суммарная флуоресценция образца с внутренним стандартом),

I_u — 55,8% (значение с поправкой на раствор сравнения): I_t–I_b (67–11,2),

I_{as} — 25% (тушение внутреннего стандарта): I_f–I_t (92–67).

Тогда

$$\frac{\text{флуоресценция неизвестного М}}{\text{флуоресценция вн. ст.}} = \frac{\text{количество неизвестного М}}{\text{количество вн. ст.}}$$

$$\frac{I_u}{I_{as}} = \frac{\text{количество неизвестного М}}{1 \text{ мкг/дм}^3}$$

$$\text{Количество неизвестного М} = \frac{I_u \cdot 1 \text{ мкг/дм}^3}{I_{as}} = \frac{55{,}8}{25} = 2{,}2 \text{ мкг/дм}^3.$$

Степень тушения флуоресценции определим следующим образом:

Чистый стандарт дает значение $I_s = 100\%$

Эквивалентное количество стандарта в эксперименте $I_{as} = 25\%$

Отсюда тушение $Q = 100 \cdot (100 - 25)/100 = 75\%$

Величину сдвига Стокса найдем как разность длин волн возбуждения и испускания:

$\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1 = 360 - 280 = 80$ нм.

12.6 КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ

12.6.1 Основы метода

Известно, что оптические изомеры (изомеры, чьи зеркальные отражения нельзя совместить) обладают способностью поворачивать плоскость поляризации луча плоскополяризованного света. Электромагнитное излучение осциллирует во всех направлениях, но существует возможность отбирать волну, распространяющуюся в какой-то одной плоскости. Для этого необходимо поляризующее устройство типа поляроида или призмы Николя. Поляриметрия основана на измерении угла поворота плоскости поляризации после прохождения поляризованного света через раствор, содержащий хиральное (или оптически активное) вещество. **Дисперсия оптического вращения** (ДОВ) — это метод определения способности поворачивать плоскость поляризации как функции длины волны. Однако такие оптически активные вещества могут также поглощать плоскополяризованный свет с некоторыми длинами волн. Такие хромофоры называют оптически активными хромофорами или хиральными центрами, поскольку они могут существовать только как часть сложной молекулы. Метод ДОВ в значительной степени вытеснен

спектроскопией **кругового дихроизма** (КД), который позволяет получать гораздо больше информации о трехмерной структуре макромолекул, содержащих хиральные центры. Плоскополяризованный свет можно представить как сумму двух циркулярно (по кругу) поляризованных лучей с правой (R) и левой (L) поляризацией. Асимметричные по своей природе хиральные молекулы по-разному взаимодействуют с R- и L-компонентами, поэтому лучи распространяются в образце с разной скоростью (имеют разные показатели преломления). В результате плоскость поляризации прошедшего через образец пучка света поворачивается относительно плоскости поляризации исходного пучка. В этом суть метода поляриметрии.

В областях спектра, где вещество поглощает свет, наблюдается круговой дихроизм. Правый и левый лучи не только по-разному преломляются хиральным веществом, но и в разной степени поглощаются. В результате изначально плоскополяризованный свет становится эллиптически поляризованным.

Поляриметрия оперирует величиной удельного вращения $[\alpha]_\lambda$, а спектрометрия КД — величиной **эллиптичности** (θ), которая определяется по уравнению

$$\theta = 2{,}303\Delta A = 33\Delta A \text{ (градусов)} \qquad (12.10)$$

где ΔA — разность поглощения R- и L-лучей.

Непосредственно измерить эллиптичность трудно, поэтому измеряется отдельно поглощение R- и L-лучей. Циркулярно поляризованный свет получается в результате разложения вектора плоскополяризованного излучения на две взаимно перпендикулярные составляющие и сдвига одной из них по фазе на четверть длины волны относительно другой. Эту функцию выполняет электрооптический модулятор.

Спектр КД обычно представляет собой зависимость эллиптичности от длины волны; этот спектр позволяет получать информацию о структуре некоторых частиц.

12.6.2 Оборудование

Схема КД-спектрофотометра представлена на рис. 12.14. При пропускании плоскополяризованного света от монохроматора через **электрооптический модулятор** поляризованные по кругу R- и L-лучи регистрируются поочередно. Модулятор представляет собой кристалл, который под действием переменного тока в зависимости от полярности электрического поля пропускает либо R-, либо L-компонент. Фотоумножитель создает напряжение, пропорциональное эллиптичности образующегося светового пучка, выходящего из камеры с образцом.

12.6.3 Применение

Основным применением метода КД является изучение конформации биологических макромолекул и получение дополнительных данных для интерпретации результатов метода ядерного магнитного резонанса (гл. 13).

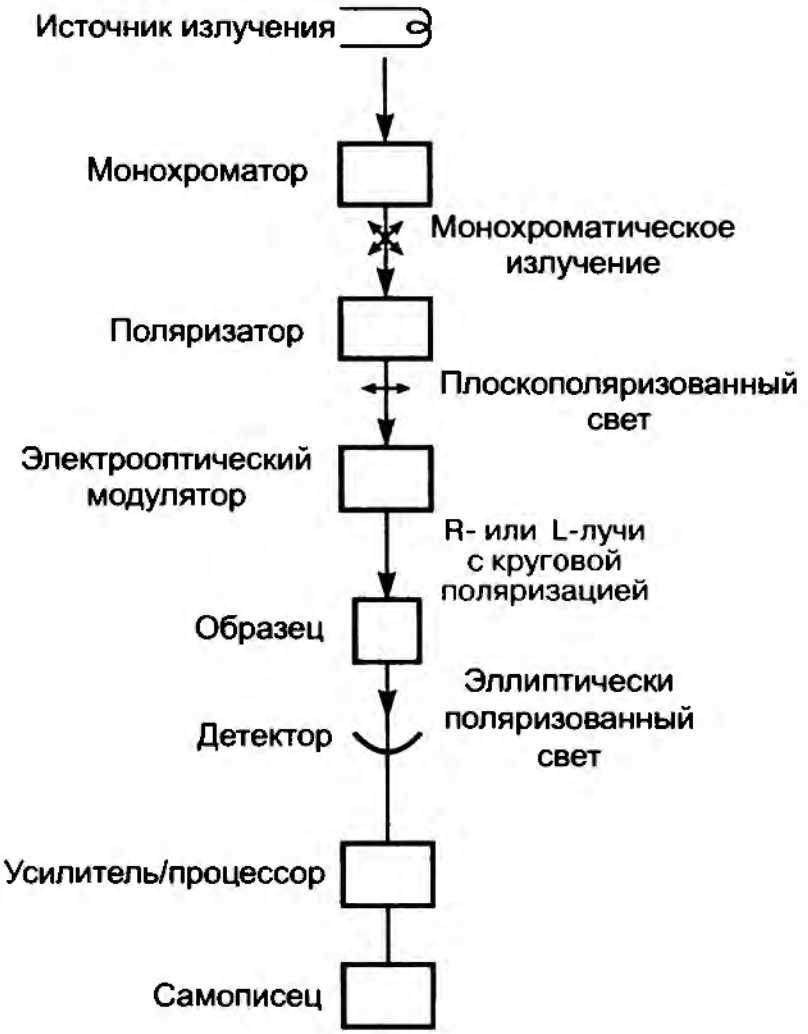


Рис. 12.14. Принципиальная схема устройства спектрометра для анализа КД

Белки

Метод КД позволяет получать информацию об относительном содержании элементов вторичной структуры белка (α-спиралей, β-слоев и нерегулярных последовательностей) в растворе. Применимость КД к анализу третичной структуры ограничена из-за недостаточного понимания влияния отдельных частей молекул на образование этого уровня структуры. Были получены спектры КД поли-L-аминокислот, которые использовались в качестве стандартов при определении содержания каждой формы вторичной структуры в белках. Для исследования неизвестных белков применялся метод аппроксимации кривых.

Важное преимущество метода КД состоит в том, что этим методом можно изучать конформационные изменения различных веществ при взаимодействиях с другими частицами. Таким образом были определены константы связывания субстратов, кофакторов, ингибиторов или активаторов почти для всех белков. Связывание ингибитора 3-цитидиловой кислоты в активном центре панкреатической рибонуклеазы изменяет спектр КД расположенного вдалеке остатка тирозина. Таким образом, связывание этого ингибитора способно вызывать конформационные изменения в удаленной от активного центра области фермента. Метод КД очень чувствительный и может использоваться для наблюдения за превращением α- и β-структур в нерегулярные последовательности при денатурации белка.

Нуклеиновые кислоты

Возможно рассчитать спектр КД однинитевой ДНК, зная частоту встречаемости нуклеотидов. Найденные в эксперименте отклонения от расчетного спектра указывают на изменения структуры, например наличие двойной спирали. По-видимому, спектр КД двойной спирали ДНК не зависит от нуклеотидного состава в том диапазоне длин волн, который обычно используют для анализа.

При образовании даже коротких цепей олигонуклеотидов из отдельных нуклеотидов наблюдается резкое усиление спектра КД. Это наблюдение доказывает тот факт, что гидрофобные взаимодействия между основаниями играют важную роль в стабилизации двойной спирали ДНК.

Все нуклеотиды обладают хиральными свойствами, при образовании спиральной структуры КД сильно увеличивается. Следовательно, данный метод можно использовать для изучения изменений структуры нуклеиновых кислот, например потерю спиральной структуры однонитевой формы ДНК при изменении температуры и pH, структурные изменения при связывании катионов и белков, связывании транспортных РНК и соответствующих аминокислот, переходы между однонитевой и двунитевой формами ДНК, взаимодействие с гистонами в составе хроматина, структуру рибосомной РНК в рибосомах, а также взаимодействие двунитевой ДНК со встраивающимися в нее лекарственными препаратами.

12.7 ТУРБИДИМЕТРИЯ И НЕФЕЛОМЕТРИЯ

Два похожих метода — **турбидиметрия** и **нефелометрия** — предназначены для оценки концентрации разбавленных суспензий. В методе турбидиметрии измеряют кажущееся поглощение излучения суспензией. Кажущееся поглощение следует измерять при той длине волны, при которой не происходит *истинного* поглощения; следовательно, закон Бугера–Ламберта–Бера не применим в турбидиметрии. При прохождении света через прозрачную среду, например через раствор в кювете, могут иметь место оба физических явления. Может происходить реальное поглощение энергии, сопровождающееся изменением энергетических состояний электронов, магнитных параметров, колебанием молекул и т. д. Если происходят только перечисленные явления, то среда, через которую проходит излучение и в которой оно поглощается, называется **оптически пустой**. Однако, когда мы имеем дело с суспензией, могут происходить явления другого рода, при которых взвешенные частицы вещества рассеивают свет. Это рассеяние является результатом отражения и преломления и лежит в основе **эффекта Тиндаля**; рассеяние такого рода происходит во всех направлениях и представляет собой частный случай более общего явления **рэлеевского рассеяния**.

В методе турбидиметрии падающее и проходящее излучение можно измерять с помощью обычного колориметра или спектрофотометра, однако вклад истинного поглощения очень мал, а закон Бугера–Ламберта–Бера

не выполняется, поскольку он справедлив лишь для очень тонких слоев очень разбавленных суспензий.

Рассеянный свет, или рассеяние Тиндаля, также можно измерить; обычно измерение проводят под прямым углом к падающему свету. Так получают **отношение Тиндаля** — отношение интенсивности рассеяния Тиндаля к интенсивности падающего света. Для прямого измерения этого отношения требуется прибор тиндаллометр. Для сравнения интенсивности рассеяния Тиндаля с аналогичной интенсивностью стандартной суспензии с известной концентрацией используют **нефелометр**, который измеряет мутность среды. Нефелометрия позволяет определять концентрацию суспензии микроорганизмов, а турбидиметрия — белков и некоторых других биологических макромолекул (разд. 12.4.1).

Эти методы непросты в исполнении, но в умелых руках могут оказаться весьма полезными. Соотношение между поступающей в систему энергией (падающее излучение) и измеряемой энергией на выходе (прошедший или рассеянный свет), однако, является сложным и нелинейным. Следует заметить, что эти методы не относятся, строго говоря, к спектральным методам, и включены в данный раздел лишь для полноты изложения.

12.8 ЛЮМИНОМЕТРИЯ

12.8.1 Основы метода

Описанные выше методы анализа связаны с определенными физическими явлениями, происходящими в молекулах. Эти явления, в свою очередь, зависят от предварительной передачи энергии, часто в виде электромагнитного излучения. Люминесценция представляет собой испускание электромагнитного излучения в видимой части спектра; возникает она, в частности, в результате химической реакции. Для измерения люминесценции служит метод **люминометрии**. Данный метод не относится к спектрофотометрическим методам, он включен в данную главу в связи с его важной ролью в анализе биологических систем.

Хемилюминесценция возникает в результате возвращения возбужденного электрона в основное состояние (рис. 12.2б). Причиной возбуждения является химическая реакция, приводящая к образованию флуоресцентного продукта; спектр хемилюминесценции определенной реакции, например реакции взаимодействия люминола с кислородом с образованием 3-аминофталата, совпадает со спектром флуоресценции продукта реакции. Похожее явление **биолюминесценции** отличается лишь тем, что испускание света возникает в реакциях, катализируемых ферментом (разд. 15.2.2), обычно люциферазой. В последнем случае цвет испускаемого излучения зависит от источника фермента и варьирует от 560 нм (зеленовато-желтый) до 620 нм (красный). Метод отличается очень высокой чувствительностью, поскольку квантовый выход таких реакций при оптимальных условиях близок к 100%.

12.8.2 Оборудование

Источник возбуждения в данном случае не электромагнитное излучение, поэтому в схеме прибора нет монохроматора. Следовательно, люминометрический анализ можно осуществлять на довольно простых фотометрах. Существуют, правда, два небольших усложняющих момента: 1) необходимость усиления сигнала до его регистрации и 2) необходимость поддержания довольно строго температурного режима. Последнее объясняется высокой чувствительностью реакций к температуре, особенно это относится к ферментативным реакциям.

Принципиальная схема устройства прибора изображена на рис. 12.15. Реагирующие вещества вносят в защищенный от света реакционный сосуд, в котором осуществляют перемешивание. Испускаемый свет попадает в фотоумножительную трубку, соединенную с усилителем тока, обеспечивающим широкий диапазон чувствительности и линейности.

12.8.3 Применение

Люцифераза светляков

Подробно реакционная система с участием люциферазы светляков описана в разд. 15.2.2. Данный метод позволяет определять концентрацию АТФ быстро и с высокой точностью, сравнимой с точностью спектрофотометрического и флуоресцентного анализа. Однако чувствительность метода гораздо выше: предел обнаружения составляет 10^{-15} М, а линейный диапазон от 10^{-12} до 10^{-6} М АТФ. Кроме того, можно определять концентрацию АДФ, АМФ и циклического АМФ с помощью соответствующих ферментов, например пируваткиназы для реакции АДФ → АТФ, аденилаткиназы для АМФ → АДФ и фосфодиэстеразы для цАМФ → АМФ. В принципе метод позволяет проводить анализ всех ферментов и метаболитов, участвующих в превращениях АТФ. В качестве примеров назовем ферменты креатинкиназу, гексокиназу и АТФ-сульфуразу, а также субстраты креатинфосфат, глюкозу, ГТФ, фосфоенолпируват и 1,3-дифосфоглицерат.

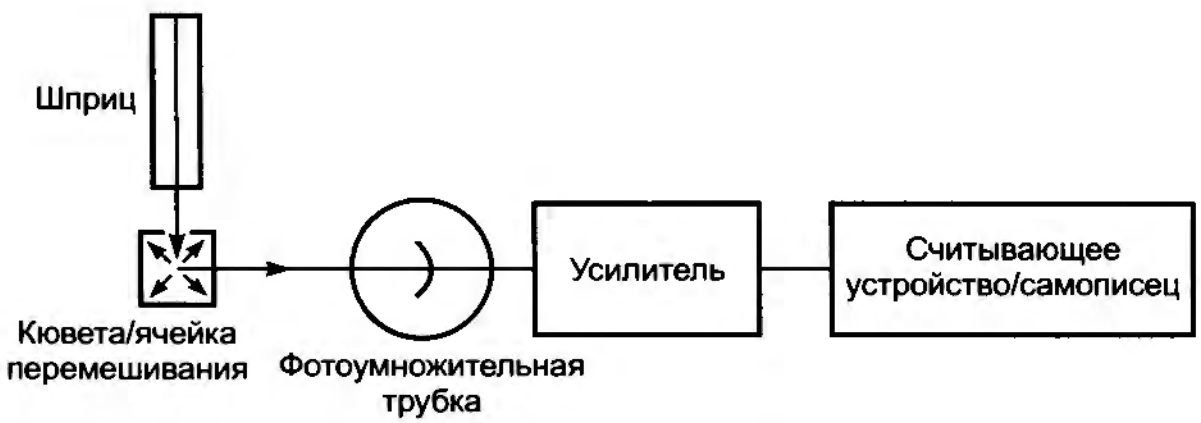


Рис. 12.15. Схема устройства простого люминометра

Люцифераза бактерий

Подробно реакционная система с участием люциферазы бактерий также описана в разд. 15.2.2. Данная система позволяет анализировать никотинамидадениндинуклеотид (и соответствующий фосфат) и флавинмононуклеотиды в восстановленной форме (например, NADH, NADPH и $FMNH_2$). Измерения можно проводить в диапазоне от 10^{-9} до 10^{-12} М, что обеспечивает гораздо более высокую чувствительность, чем соответствующие спектрофотометрические и флуоресцентные методы, хотя чувствительность определения NADPH примерно в 20 раз ниже, чем чувствительность определения NADH. Метод применим для анализа целого ряда сопряженных ферментативных реакций окислительно-восстановительного типа, протекающих с участием данных нуклеотидов в качестве кофакторов.

Экворин

Наряду с использованием специфических электродов для определения кальция существует возможность чувствительного определения ионов кальция внутри клетки с помощью фосфопротеина экворина. Белок выделяют из люминесцентной медузы; он практически не обладает способностью к флуоресценции. Однако в присутствии ионов Ca^{2+} он теряет свою естественную желтую окраску и превращается в синий флуоресцентный белок (blue fluorescent protein, BFP). Спектр биолюминесценции данной реакции соответствует спектру флуоресценции системы BFP : $2Ca^{2+}$, но отличен от спектра BFP : Ca^{2+}.

Преимущества метода заключаются в высокой чувствительности, сравнительно высокой специфичности к ионам кальция и нетоксичности экворина для живых клеток. Недостатки метода — дефицит белка, его высокая молекулярная масса, значительный расход при анализе и отсутствие линейной зависимости испускания света от концентрации кальция. Кроме того, реакция чувствительна к химическому составу среды и сравнительно медленно реагирует на быстрые изменения концентрации кальция, например его приток и отток, в различных клетках.

Хемилюминесценция

Люминол и его производные участвуют в реакциях хемилюминесценции с высокой эффективностью. Например, образование H_2O_2 в результате ферментативной реакции можно наблюдать по излучению света при длине волны 430 нм в системе, содержащей люминол и микропероксидазу (разд. 15.2.2).

Метод конкурентного связывания позволяет определять низкие концентрации гормонов, лекарств и метаболитов в биологических жидкостях. Анализ основан на способности белков (например, антител) и клеточных рецепторов связывать с высоким сродством специфические лиганды. Происходит конкуренция меченых и немеченых лигандов за связывание с определенными участками белков или клеток. Если известна концентрация связывающего вещества (например, концентрация центров связывания), а в систему вносят небольшое известное количество меченого лиганда, в условиях насыщения оказываются занятыми все центры связывания и можно

определить концентрацию немеченого лиганда. Использование меченого лиганда позволяет определять только концентрацию связывающего вещества (число центров связывания). Существует множество вариантов меток, в том числе и радиоактивных, позволяющих различать фракции свободных и связанных компонентов. Мечение с помощью производных люминола, связывание и последующее разделение связанной и свободной фракции позволяет анализировать белки по их хемилюминесценции. Данную систему необходимо калибровать с помощью стандартов; в оптимальных условиях можно определять до 10^{-12} М образца.

При фагоцитозе полиморфноядерные лейкоциты образуют синглетный молекулярный кислород, для которого характерна хемилюминесценция. Путем мониторинга этого люминесцентного излучения можно изучать воздействие фармакологических и токсических агентов на этот и другие типы фагоцитирующих клеток.

12.9 АТОМНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Все описанные выше методы, за исключением процессов в ядре, связанных с гамма-излучением и рентгеновским излучением, имели отношение к спектроскопии молекул. Общая теория электронных переходов обсуждалась в разд. 12.1.2, где для простоты процесс рассматривался на примере атома, а распространение изложенных принципов на целые молекулы не представляет особой сложности. Уже было сказано, что обычно молекулы образуют полосатые спектры, а атомы — четко определенные линейчатые спектры. Глазом эти линии могут восприниматься либо как светлые линии определенной длины волны (**атомные спектры испускания**) или черные линии на ярком фоне (**атомные спектры поглощения**). Некоторые элементы, в частности металлы, играют в биологических системах важную роль, выступая в качестве кофакторов ферментов, входя в состав биологических макромолекул (как железо в гемоглобине или магний в хлорофилле), либо оказывая токсическое воздействие на метаболизм. Методы атомной спектроскопии позволяют изучать биологическую функцию подобных элементов.

Длины волн поглощения или испускания в спектре элемента связаны с переходами электронов, сопровождающимися наименьшими изменениями энергии. Например, на рис. 12.2, *а* показан переход $3s$–$3p$ в атоме натрия (D-линия, с которой связан оранжевый цвет излучения этого элемента). Переходы электронов в атоме ограничены наличием свободных орбиталей (уровней энергии). Заполнение орбиталей происходит в соответствии с принципом Паули. Чтобы изменения энергии были минимальными, переходы электронов должны ограничиваться ближайшими по энергетическому состоянию уровнями. Эти ограничения приводят к тому, что линии поглощения и испускания абсолютно специфичны для каждого конкретного элемента. По крайней мере для самых простых атомов теоретически возможно вывести электронную структуру на основании линейчатого спектра. Длину волны испускаемого излучения можно определить с помощью спек-

троскопа, спектрографа или спектрофотометра, в которых детектором служит соответственно человеческий глаз, фотографическая пластинка или фотоэлектрическая ячейка.

В отличие от методов молекулярной спектроскопии эти методы не позволяют определить напрямую концентрацию атомов в растворе. Атомы необходимо перевести в газообразное состояние либо в пламени, либо электротермически — в электропечи. В таком состоянии атомы элементов легко испускают или поглощают монохроматическое излучение соответствующей длины волны. Обычно для впрыскивания стандартного или анализируемого раствора в пламя, сквозь которое проходит луч света, используют атомизаторы. В другом варианте пучок света в печи проходит через ячейку с анализируемым веществом.

12.9.1 Основы метода пламенной спектрометрии

Данный метод позволяет проводить количественный анализ отдельных элементов. Испускание света лежит в основе метода **пламенной эмиссионной спектрометрии (ПЭС)**, а поглощение — в основе метода **атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС)**.

Поглощение и испускание энергии пропорционально количеству атомов, находящихся на пути светового пучка. В случае испускания это относится исключительно к атомам в возбужденном состоянии, однако в воспроизводимых стандартных условиях это число будет таким же, как и для стандартного вещества. Достижение стандартных условий, однако, затрудняется из-за неустойчивости пламени — вариаций температуры и состава пламени. Натрий дает высокий фон и, следовательно, его следует измерять первым, а затем добавлять такое же количество ко всем другим стандартам. В анализируемые смеси принято добавлять избыток хлорсодержащих соединений, поскольку хлориды часто очень летучи. Испускание кальция и магния усиливается при добавлении щелочных металлов и подавляется фосфатами, силикатами и алюминатами из-за образования недиссоциирующих солей. Этот эффект удается ослабить добавлением солей лантана и стронция. Можно провести циклический анализ, в котором в анализируемой смеси сначала определяют все мешающие элементы, а затем в стандарт для каждого анализируемого элемента добавляют эти мешающие вещества. Процесс обычно повторяют два или три раза, уточняя каждый раз количество мешающего вещества, пока не получат удовлетворительные значения для каждого анализируемого компонента. В результате удается учесть влияние всех мешающих веществ примерно в тех концентрациях, в которых они находятся в анализируемых образцах.

Неустойчивость пламени вызывает необходимость повторять каждый эксперимент трижды; для большей точности следует проводить анализ образца сразу до или сразу после соответствующего стандарта. Повысить точность результатов удается, если в качестве внутреннего стандарта использовать литий. Для хранения образцов и стандартов лучше использовать полиэтиленовые емкости, поскольку стекло может как абсорбировать, так и высвобождать в раствор ионы металлов.

Перед определением ионов металлов биологические образцы обычно превращают в золу. Это достигается либо путем **сухого озоления** (при условии предотвращения сублимации), либо **мокрого озоления** (в растворе). Во втором случае используют окислительное расщепление, аналогичное методу Кьельдаля (см. разд. 8.3.2).

12.9.2 Оборудование

Пламенная эмиссионная спектрофотометрия (ПЭС)

С помощью распылителя поток воздуха поступает в капиллярную трубку, другой конец которой опущен в анализируемый раствор. При прямом впрыскивании образца более крупные капли не удерживаются достаточно долго в самой горячей части пламени, а скапливаются в конденсационной камере. При горении смеси воздуха и природного газа создается температура 1500 °С, которая подходит для определения натрия. Кальций лучше анализировать при температуре от 2000 до 2500 °С, а для определения магния и железа нужна температура 2500 °С, которая достигается при сжигании смеси воздуха и ацетилена. Для рутинного анализа, не требующего особенно высокой точности, с целью выбора ширины полосы пропускания можно использовать фильтр. Для более точных измерений требуется монохроматор. Максимально возможное разрешение 0,1–0,2 нм достигается в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм. В табл. 12.3 представлены значения длин волн, используемые для определения некоторых металлов, а также соответствующие пределы обнаружения. В качестве детекторов обычно служат фотоячейки, однако из-за нестабильности пламени их теоретическая точность не достигается. Использование многоканальных полихроматоров позволяет одновременно анализировать излучение до шести различных элементов. Принципиальная схема устройства атомно-эмиссионного (пламенного) спектрофотометра представлена на рис. 12.16.

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия (ААС)

В данном методе для создания излучения с очень малой шириной полосы пропускания используют либо двойной монохроматор и источник белого света, либо лампу с полым катодом. Разрядные лампы излучают свет с определенными длинами волн, подходящими для анализа каждого элемента. Анализ можно проводить только с чистыми образцами элементов; воз-

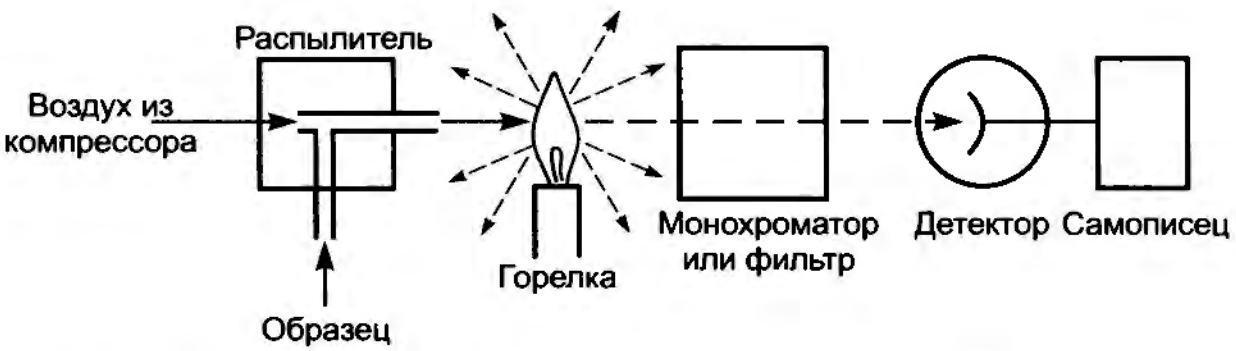


Рис. 12.16. Схема устройства пламенного эмиссионного спектрофотометра

Таблица 12.3. **Пределы обнаружения различных элементов методами пламенной эмиссионной спектрофотометрии (ПЭС), атомно-абсорбционной спектрофотометрии (ААС) и с использованием ион-селективных электродов**

Элемент	Испускание		Поглощение			Ион-селективный электрод: предел обнаружения, ppm
	Предел обнаружения, ppm	Длина волны, нм	Предел обнаружения, ppm		Длина волны, нм	
			ПЭС	ААС		
Кальций	0,005	442,7	0,1	0,00007	442,7	0,02
Медь	0,1	324,8	0,1	0,0001	342,8	0,0006
Железо	0,5	372,0	0,2	0,0001	248,3	
Свинец			0,5	0,0002	283,3	0,21
Литий	0,0001	670,7	0,03	0,001	670,7	
Магний	0,1	285,2	0,01	0,00001	285,2	
Марганец	0,02	403,3	0,05	0,00004	279,5	
Ртуть			10,0	0,018	253,8	
Калий	0,001	766,5	0,03	0,00003	766,5	0,04
Натрий	0,0001	589,0	0,03	0,00001	589,0	0,02
Стронций	0,01	460,7	0,06	0,0001	460,9	

буждение достигается электрическим способом и приводит к образованию спектральной дуги. На сегодняшний день созданы безэлектродные разрядные лампы. Распылители и горелки аналогичны тем, что используются в эмиссионной спектрофотометрии, однако для увеличения оптического пути высота пламени часто достигает 10 см. Существуют как однолучевые, так и двухлучевые системы, причем в последнем варианте используют прерыватель, создающий импульсы света и не позволяющий свету пламени напрямую попадать на детектор. Чаще всего измерения проводят при длинах волн от 190 до 850 нм.

Непламенная ААС

Непламенная атомно-абсорбционная спектрофотометрия требует наличия графитовой трубки, которую можно электротермическим путем нагревать до 3000 °С. Монохроматический свет, специфический для анализируемого образца, создается либо с помощью лампы с полым катодом, либо безэлектродной разрядной лампы. В графитовой трубке существует полость, в которой находится образец и через которую проходит монохроматический свет. Поглощение измеряют непрерывно по мере повышения температуры; компьютер одновременно регистрирует профили температуры и поглощения. Такой подход позволяет выбрать оптимальные условия для последующего анализа. Непламенные методы в 100 раз более чувствительны, чем пламенные; их явным преимуществом также является возможность автоматизации, поскольку они не сопряжены с работой с потенциально опасными горючими газами.

12.9.3 Применение

С помощью простых фотометров с фильтрами можно определять концентрацию натрия и калия на уровне нескольких частей на миллион (< 5 ppm). Более сложные эмиссионные пламенные спектрофотометры позволяют анализировать порядка 20 элементов в биологических образцах; чаще всего в таких анализах определяют кальций, магний и марганец. Абсорбционные пламенные спектрофотометры обычно более чувствительны, чем их аналоги эмиссионного типа, и позволяют определять более 20 элементов в концентрации даже ниже 1 ppm. Исключение составляют щелочные металлы. Относительная погрешность метода составляет около 1% в диапазоне концентраций, в 20–200 раз превышающих предел обнаружения (табл. 12.3).

Ранее данные методы широко применялись в клинической практике для определения содержания металлов в жидкостях организма. Однако теперь они в значительной степени вытеснены ион-селективными электродами (ИСЭ). ИСЭ легко совместимы с автоматическими устройствами и позволяют проводить измерения в очень малых объемах образца (разд. 1.5.2 и 1.7.2). Анализ содержания элементов помогает в диагностике, а также при мониторинге разных методов лечения. Для целей физиологического и фармакологического исследования натрий, калий, кальций, магний, кадмий и цинк можно измерять непосредственно в биологическом образце, а вот медь, свинец, железо и ртуть необходимо предварительно экстрагировать.

Метод широко применяется также для определения элементов в почве и растительном сырье, а после озоления образцов может также использоваться для определения металлов в макромолекулах, клетках, клеточных органеллах и тканях.

12.9.4 Атомно-флуоресцентная спектрофотометрия

В данном случае требуется предварительное возбуждение атомов не с помощью нагревания, а с помощью электромагнитного излучения (ср. с флуоресценцией молекул, разд. 12.8.1). Атомы опять же переводят в газообразное состояние, поскольку, в отличие от молекул, данное явление в растворе не наблюдается. Пучок света от источника должен обладать достаточной интенсивностью, но может быть менее спектрально чистым, чем этого требует атомно-абсорбционная спектрофотометрия, поскольку только свет с определенной длиной волны будет поглощаться и приводить к флуоресценции. Прямой регистрации детектором испускания света из пламени следует избегать; этого можно достичь путем настройки усилителя на ту же частоту, на которой излучает первичный источник. Применимость метода ограничена лишь несколькими металлами, однако метод обладает чрезвычайно высокой чувствительностью по сравнению со всеми другими методами. Например, цинк и кадмий можно обнаружить в концентрации всего 1 и 2 части на 10^{10} соответственно.

12.10 ЛАЗЕРЫ

Слово laser (лазер) представляет собой аббревиатуру слов *l*ight *a*mplification by *s*timulated *e*mission of *r*adiation — усиление света в результате вынужденного излучения. Детально описать возникновение лазерного излучения в данной книге не представляется возможным. В упрощенном виде электромагнитное излучение, использующееся в качестве источника возбуждения, рассматривается как набор фотонов, передаваемых поглощающему материалу. В результате электроны оказываются способными перейти на более высокий энергетический уровень (разд. 12.1.2). Если после перехода электрона на возбужденный уровень в систему поступает новый фотон с точно определенным значением энергии, то электрон не перемещается далее на еще более высокий энергетический уровень, а возвращается в основное состояние. Это событие сопровождается испусканием двух когерентных фотонов, т. е. находящихся между собой в фазе. Для работы лазера его активное вещество следует накачивать, для чего часто используют импульсную лампу, создающую большое количество фотонов.

Испускаемое когерентное излучение имеет значительные преимущества, в частности, для возбуждения атомов или молекул можно выбрать с высокой точностью одно постоянное значение длины волны. Кроме того, с помощью подходящего источника можно создавать группы волн заданной длины. Спектральная чистота лазерного излучения является весьма при-

влекательной для применения лазеров в различных спектрофотометрических и спектроскопических устройствах.

Метод лазерного отражения позволяет анализировать комплементарную ДНК (кДНК). С помощью обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы (разд. 6.2.5) можно синтезировать нуклеотидную последовательность, которая будет соответствовать первичной последовательности пептидного фрагмента или белка. Рост цепи начинается с 3'-конца праймера, а заканчивается при встраивании в цепь дидезоксинуклеотида (гл. 5). Осуществляют одновременно четыре реакции, в каждую из которых вводят праймер, все четыре дезоксинуклеотида, а также в каждом случае по одному дидезоксисоединению. Во всех реакционных смесях остановка реакции происходит в разных местах. Кроме того, на 5'-конце праймеров имеются различные флуоресцентные метки, которые не должны мешать синтезу, но необходимы для идентификации образующихся фрагментов в каждой реакционной смеси. После проведения реакции образующиеся фрагменты разделяют методом электрофореза в геле (см. разд. 10.2.2), при этом расстояние, пройденное в геле каждым фрагментом, обратно пропорционально массе фрагмента. Гель освещают узким лучом лазерного света и наблюдают флуоресцентное излучение каждой метки (все метки излучают при разных длинах волн). Полосы на геле можно идентифицировать путем наложения вращающегося диска с четырьмя секторами, каждый из которых пропускает лишь свет одной длины волны. Поскольку известно, какая метка связана с определенным дидезоксинуклеотидом, можно определить расположение и количество определенного фрагмента. Данная система автоматизирована и позволяет избежать использования радиоактивных изотопов. Метод точен и воспроизводим, а интерпретация результатов осуществляется с помощью компьютера.

12.11 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

BRAND, L. and JOHNSON, M.L. (eds.) (1997) *Fluorescence Spectroscopy*. Methods in Enzymology, vol. 278. Academic Press, San Diego. Хороший обзор применения различных видов спектроскопии в биохимии.

HARWOOD, L.M. and CLARIDGE, D.W. (1997) *Introduction to Organic Spectroscopy*. Oxford Chemistry Primers no. 43, Oxford University Press, Oxford. Полезное издание для более углубленного изучения основ спектроскопии.

HOLLAS, J.M. (2002) *Basic Atomic and Molecular Spectroscopy*, Wiley/RSC, London. Множество примеров, необходимых для самостоятельного изучения вопроса.

PAVIA, D.L., LAMPMANN, N.G.M., and KRIZ, G.S. (2001) *Introduction to Spectroscopy*, 3rd edn. Harcourt, New York. Хороший обзор всех спектральных методов со множеством примеров.

Глава 13

Спектральные методы. II. Колебательная спектроскопия. Спектроскопия ЭПР и ЯМР

13.1 ВВЕДЕНИЕ

Как обсуждалось в гл. 12, электромагнитный спектр включает все частоты от высокоэнергетического гамма-излучения до длинноволнового диапазона радиочастот. Согласно квантовой теории, энергия электромагнитного излучения уменьшается от высокочастотных областей к низкочастотным. Следовательно, для рассмотрения спектральных методов именно в двух отдельных главах, как это сделано в данной книге, не существует какой-либо реальной причины. Разделение это условное и основано оно исключительно на прагматических соображениях. Биолог или медик, изучающий «новое» вещество, в первую очередь сталкивается с проблемой его идентификации. Среди всех существующих методов спектроскопии и спектрометрии в первую очередь используют те, что описаны в данной главе (при условии достаточного количества образца). На это есть две основные причины: во-первых, эти методы дают достаточно много информации из «одного» эксперимента, и, во-вторых, данные методы анализа не приводят к разрушению образца. По этой последней причине анализ можно повторять многократно, улучшая отношение сигнал/шум, а ценные образцы могут быть использованы далее в других анализах.

В гл. 9 были рассмотрены методы масс-спектрометрического анализа. Они обеспечивают другую (комплементарную) информацию по отношению к той, что получают методами спектроскопии. Их преимущество состоит в значительно более высокой чувствительности, поэтому исследователь, не имеющий достаточно большого количества материала, вынужден обращаться к методам масс-спектрометрии. Однако необходимо учитывать, что спектроскопические методы позволяют получать другую информацию, которую нельзя извлечь, изучая только масс-спектр. Кроме того, недостатком масс-спектрометрии является разрушение образца в процессе анализа, так что определенная часть вещества теряется, хотя благодаря развитию новых высокочувствительных систем потери могут быть незначительными.

13.2 ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

13.2.1 Теоретические основы

Как уже было сказано во введении, области электромагнитного спектра от гамма-лучей до ближнего ультрафиолетового/видимого диапазона (0,1–800 нм) соответствует достаточно высокая энергия, чтобы вызывать переходы электронов, а обладающие наибольшей энергией гамма-лучи приводят к изменениям в ядре. Напротив, по другую сторону ближней ИК-области энергия слишком мала, чтобы вызывать подобные изменения. Диапазон от 0,8 до 25 мкм называется **колебательным спектром**. Данный термин следует трактовать шире — он подразумевает также разного рода деформации связей.

Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия КР (рамановская)

Эти два метода спектроскопии дополняют друг друга; они дают похожую информацию, но в их основе лежат разные явления. Кроме того, следует заметить, что поглощение энергии асимметричными молекулами приводит к возникновению обоих видов спектров, причем содержащаяся там информация примерно одинакова. Однако в случае молекул с центром симметрии основные частоты рамановского спектра не проявляются в инфракрасном спектре, и наоборот. Эти два метода действительно взаимо дополняют друг друга.

Причина состоит в том, что явления, лежащие в основе этих двух методах, обусловлены разными механизмами. Обсудим оба механизма на примере простой молекулы ацетальдегида (рис. 13.1). Для наглядности химическую связь моделируют как атомы с точечной массой, соединенных пружинками, что позволяет атомам находиться в постоянном **колебательном движении**; т. е. считают молекулы не жестко связанными структурами.

Связи могут как **растягиваться**, так и **деформироваться** (изгибаться). Если молекула состоит из n атомов, в ней может реализоваться $3n$–6 типов независимых (фундаментальных) колебательных движений. Из них $2n$–5 связаны с деформацией связей, а n–1 — с растяжением связей. В табл. 13.1 перечислены наиболее важные фундаментальные частоты колебаний в молекуле ацетальдегида.

Диапазон электромагнитных волн охватывает область спектра от видимой, начиная с красной до микроволн. Передача энергии осуществляется при излучении соответствующей длины волны. Для возникновения ИК-спектра молекула или ее фрагмент должен иметь **диполь**, т. е. смещение заряда. Напротив, если происходит изменение **поляризуемости** молекулы, часть рассеянного излучения будет иметь иную частоту, нежели частота падающего излучения. Эти отличающиеся частоты формируют рамановский спектр. Заметим, что дополнительную информацию о колеба-

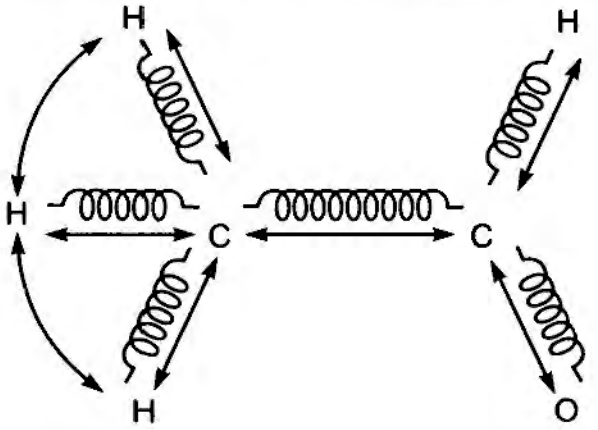


Рис. 13.1. Возможные колебания в молекуле ацетальдегида

ниях в молекулах можно получить, если сдвинуться еще дальше в область микроволн и использовать метод **микроволновой спектроскопии**.

Наблюдаемые фундаментальные (основные) частоты являются характеристическими для функциональных групп молекулы и абсолютно специфичны. Поэтому инфракрасный спектр часто называют отпечатком пальцев вещества. Поскольку сложные молекулы содержат несколько функциональных групп, полосы поглощения в инфракрасном спектре труднее интерпретировать. Чаще всего используют частоты поглощения **функциональных групп**. Полосы поглощения одинаковых функциональных групп в разных соединениях наблюдаются примерно при одних и тех же длинах волн, причем это справедливо и для определенного набора функциональных групп в молекуле (точно так же хромофоры поглощают в определенной области ультрафиолетового или видимого диапазона). При структурных исследованиях используется имено поглощение определенного набора функций — групповые частоты. Заметим, что при работе в инфракрасной области получают колебательные спектры, поэтому здесь принято оперировать не длинами волн, а частотами, измеряемыми в герцах (Гц).

В зависимости от окружения групповые частоты колебательного спектра могут слабо изменяться. Это очень важно учитывать в структурных

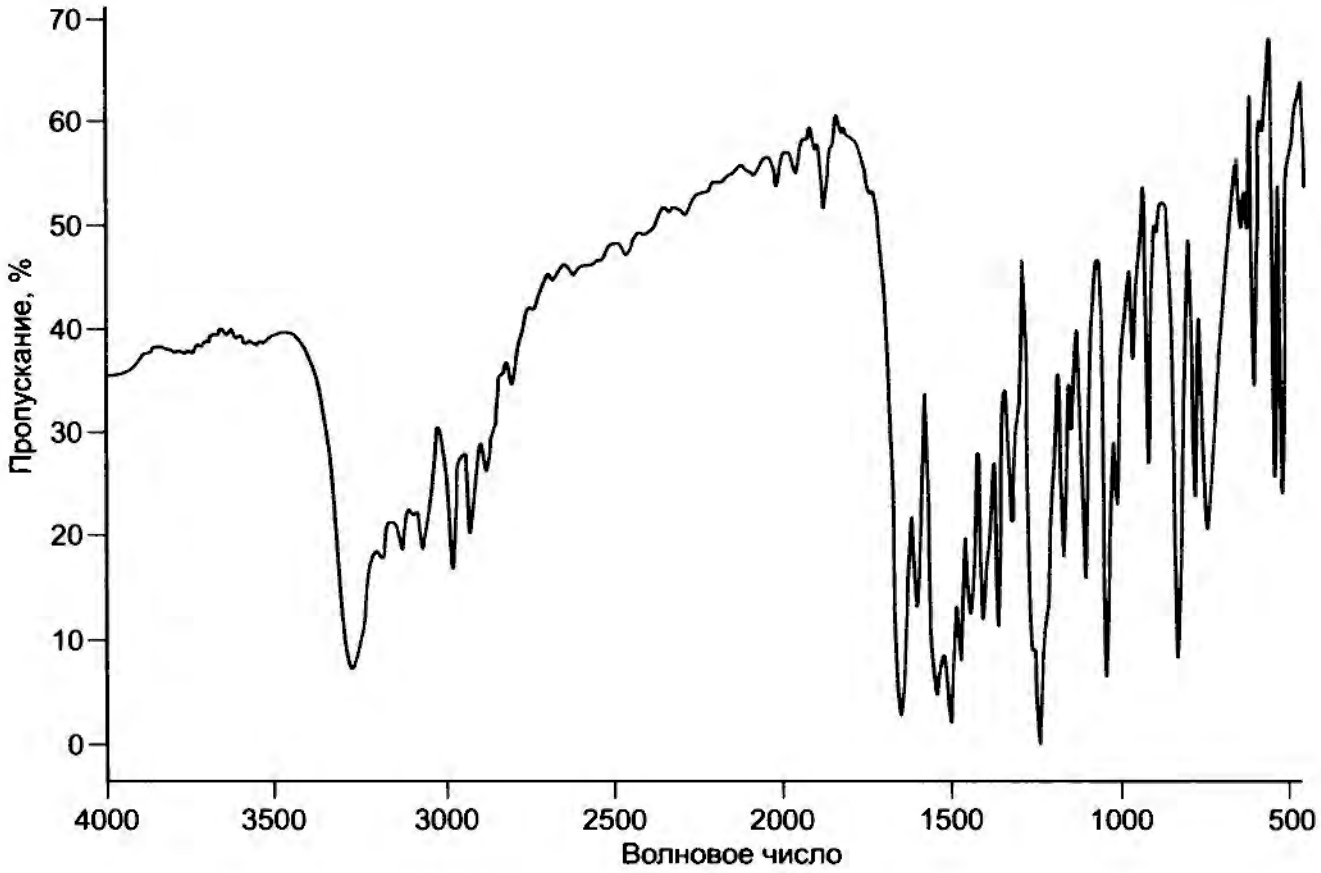
Таблица 13.1. **Некоторые фундаментальные частоты колебаний в молекуле ацетальдегида**

Функциональная группа	Тип колебания	Частота, $см^{-1}$
$-CH_3$	Деформация изгибом	1460
		1365
–C–C–	Валентное	1165
–C=O	Валентное	1730
–C–H (в CH_3)	Валентное	2960
		2870
–C–H (в CHO)	Валентное	2720

биохимических исследованиях; так, колебания C–H в метиленовой (CH_2) и метильной (CH_3) группах дают различимые полосы при разных частотах. При наличии двойной связи наблюдается уменьшение длины волны полосы поглощения, т. е. частота валентного колебания увеличивается.

13.2.2 Оборудование

Чаще всего в качестве источника излучения используют раскаленную нихромовую спираль. Тепловые волны относятся именно к этому диапазону электромагнитного спектра. Образцы твердого вещества готовят либо в виде суспензии в минеральном масле и размещают между солевыми пла-



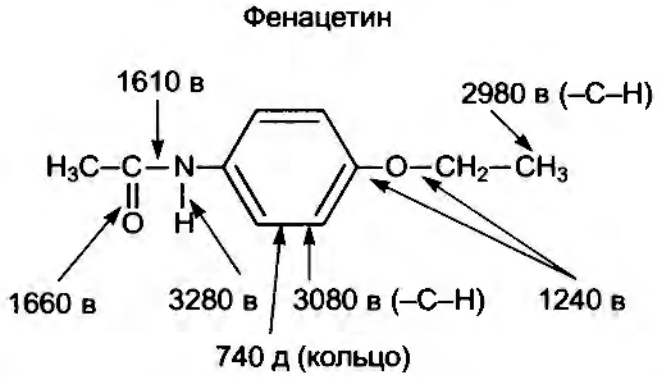


Рис. 13.2. ИК-фурье-спектр фенацетина. Показаны полосы на соответствующих частотах ($см^{-1}$), а также обозначены связи, к которым они относятся, с указанием типа колебания (в — валентное, д — деформационное)

стинками, например из NaCl, или спрессовывают в таблетки с KBr. Для размещения образцов в оптической системе следует использовать материалы, где нет ковалентных связей, поскольку они прозрачны для инфракрасного излучения.

Детекторы — это обычно термочувствительные устройства. **Ячейка Голея** содержит газ или жидкость, которые расширяются при поглощении энергии. Кроме того, могут использоваться термопары. Интерферометр Майкльсона позволяет осуществлять метод **инфракрасной фурье-спектроскопии** (FT-IR). В этом устройстве имеются закрепленные и вращающиеся зеркала, с помощью которых пучок падающего света расщепляется на два. По прохождении через образец пучки вновь соединяются, но поскольку длины путей различны, возникает интерференция, которую можно анализировать с помощью преобразования Фурье (метод преобразования Фурье рассмотрен в разд. 13.4.1). Закон Бугера–Ламберта–Бера применим во всех случаях, за исключением сложных смесей, для анализа которых требуются более сложные математические преобразования.

13.2.3 Применение

Применение методов инфракрасной и рамановской спектроскопии ограничено в основном биохимическим анализом молекул среднего размера, таких как лекарственные препараты, промежуточные продукты метаболизма и субстраты. В качестве примеров можно привести идентификацию пенициллина и его производных, небольших белков и загрязнителей окружающей среды. Это самый подходящий и быстрый метод измерения концентрации некоторых примесей в продуктах питания; для анализа метаболизма лекарств удобна комбинация метода с газо-жидкостной хроматографией (ГХ–ИК; разд. 11.9.3). На рис. 13.2 представлен ИК-фурье-спектр лекарственного препарата фенацетина. Этим методом можно быстро осуществить анализ газов, например концентрации CO_2, CO и ацетилена C_2H_2 в биологических образцах. При изучении процессов фотосинтеза и дыхания растений метод применяется для анализа метаболизма CO_2.

13.3 ЭЛЕКТРОННЫЙ СПИНОВЫЙ РЕЗОНАНС

13.3.1 Магнитные явления

Прежде чем обратиться к рассмотрению методов **электронного спинового резонанса*** (ЭСР) и **ядерного магнитного резонанса** (ЯМР) (разд. 13.4), остановимся на сути явлений, лежащих в их основе.

Скажем несколько слов о природе магнетизма. В любом веществе магнитные явления возникают при перемещении заряженных частиц под действи-

* В русскоязычной литературе этот метод обычно называют электронным парамагнитным резонансом (ЭПР). — *Прим. ред.*

ем внутренних сил системы, а основной вклад в магнитные свойства молекул вносит спин заряженных частиц.

Рассмотрим химические связи в молекуле, учитывая, что значение спина электронов строго следует квантовым законам. В простейшем виде химическую связь можно представить как пару электронов с противоположными спинами. Во многих химических системах электроны могут быть делокализованы, т. е. потерять связь с конкретным атомом, но общее правило гласит, что спаренные электроны на молекулярных орбиталях имеют противоположные спины (вспомним принцип Паули: в атоме два электрона не могут иметь одинаковый набор квантовых чисел). Заряд каждого электрона, обладающего спином, оказывает магнитный эффект, но в па́рах электронов этот эффект практически полностью гасится. Математические выкладки для молекул сложны, а значение магнитной восприимчивости атомов можно рассчитать: она имеет порядок -10^{-6} г$^{-1}$. Свойством **диамагнетизма** обладают все вещества, поскольку все вещества содержат внутри себя мельчайшие магнитики — электроны. Диамагнетизм не зависит от температуры.

Если электрон не спарен, т. е. нет уравновешивающего влияния противоположного спина, магнитная восприимчивость имеет порядок от $+10^{-3}$ до $+10^{-4}$ г$^{-1}$. В таких ситуациях проявление диамагнитных свойств настолько ничтожно, что его можно не учитывать, а свободный электрон является причиной возникновения **парамагнитных свойств**. Свободные электроны могут возникать в целом ряде ситуаций, в частности они существуют в таких металлах, как железо, кобальт и никель. Эти металлы демонстрируют особенно ярко выраженное магнитное поведение, которое называют **ферромагнетизмом**. Из этих материалов изготавливают постоянные магниты, знакомые каждому школьнику. Свободные электроны существуют в некоторых кристаллических структурах, но в биологических системах наиболее важную роль, пожалуй, играют **свободные радикалы** (частицы, несущие неспаренный электрон).

Поведение вещества во внешнем магнитном поле позволяет различить диамагнитные и парамагнитные свойства. Парамагнитные вещества притягиваются внешним магнитным полем, а диамагнитные отталкиваются. Этот принцип лежит в основе устройства **магнитных весов**, позволяющих провести количественную оценку магнитных свойств вещества. Рычаг весов подвешивают между полюсами электромагнита, создающего внешнее магнитное поле. Анализируемый образец взвешивают на воздухе при выключенном электрическом токе. Затем тот же образец взвешивают при включенном электрическом токе. При втором взвешивании парамагнитное вещество весит больше, а диамагнитное — меньше.

Теперь обратимся к ядру атома. Нас будут интересовать не электроны вокруг ядра, а находящиеся внутри ядра заряженные частицы, обладающие спином. Строго говоря, парамагнитные свойства определяются числом нуклонов (протонов и нейтронов) в ядре атома. В данной книге мы не будем детально обсуждать, почему незаряженные нейтральные нейтроны (разд. 14.1.1) также играют в этом определенную роль. Достаточно сказать, что атомы водорода в любой молекуле обладают ядерным магнетизмом и что если все атомы водорода или некоторые из них заменить на дейтерий, маг-

нитные свойства становятся менее выраженными. В ядре водорода — только один протон, в ядре дейтерия — один протон и один нейтрон (четное число нуклонов). Изотоп углерода ^{12}C имеет шесть протонов и шесть нейтронов, т. е. четные числа обоих нуклонов, — ядерный магнетизм отсутствует. Изотоп ^{13}C содержит шесть протонов и семь нейтронов, т. е. нечетное число нуклонов, и поэтому обладает нулевым магнитным моментом.

13.3.2 Условия резонанса

Методы ЭСР и ЯМР (разд. 13.4) основаны на том, что при наложении внешнего магнитного поля реализуются два энергетических состояния.

- *Состояние с низким уровнем энергии* E_1 возникает в том случае, если магнитный момент заряженной частицы направлен параллельно внешнему полю.
- *Состояние с высоким уровнем энергии* E_2 возникает тогда, когда магнитный момент заряженной частицы направлен антипараллельно к внешнему полю.

Условие резонанса выполняется при переходе с низкого энергетического уровня на высокий; при этом соблюдается уравнение 13.1 (см. ниже). Для таких переходов необходимо поглощение одного кванта энергии ($h\nu$; h — постоянная Планка). В условиях подходящего внешнего магнитного поля частота ν достигается в микроволновом диапазоне в случае ЭСР и в радиочастотной области в случае ЯМР. В обоих методах существуют две возможности для определения поглощения электромагнитной энергии (в условиях резонанса):

- изменяют параметры внешнего магнитного поля при постоянной частоте;
- изменяют частоту в определенных пределах спектра при постоянном значении внешнего магнитного поля.

По техническим причинам чаще используют первый вариант анализа, но те же результаты можно получить и при реализации второго подхода.

13.3.3 Основы метода

Для появления резонанса необходимо поглощение кванта энергии. В случае ЭСР в количественном виде энергетический переход можно записать следующим уравнением:

$$h\nu = g\beta H \qquad (13.1)$$

где g — фактор спектроскопического расщепления (g-фактор, фактор Ланде, константа), β — магнитный момент электрона (магнетон Бора), H — напряженность внешнего магнитного поля.

Частота поглощаемого в микроволновом диапазоне излучения является функцией парамагнитных свойств частицы (β) и приложенного магнитного

поля (H) (уравнение 13.1). Это означает, что вариации любого из этих двух параметров могут приводить к одному и тому же результату. В спектре ЭСР поглощение энергии проявляется в виде пика и указывает на наличие парамагнитных частиц. Площадь пика пропорциональна концентрации этих частиц, строго говоря, числу неспаренных электронов. Калибруя прибор с помощью подходящих стандартов, можно определить концентрацию анализируемого вещества. Для надежности расчетов стандарт с известным количеством неспаренных электронов должен иметь такую же форму спектра, что и анализируемое вещество. В качестве примеров стандартов назовем раствор нитрозодисульфоната (соль Ферми) или твердый 1,1-дифенил-2'-пикрилгидразил. Твердый стандарт содержит $1{,}53 \cdot 10^{21}$ неспаренных электронов на 1 г вещества, а для получения более низких концентраций его можно смешивать с сажей.

В случае делокализации электрона (в некоторых свободных радикалах) $g = 2{,}0023$, но для локализованных электронов, например в атомах переходных металлов, g изменяется и его значение дает информацию относительно природы связей вокруг неспаренного электрона в молекуле. В условиях резонанса пик поглощения расширяется из-за **спин–решеточного взаимодействия**, т. е. взаимодействия неспаренного электрона с остальной частью молекулы. Это дает дополнительную информацию о структуре молекулы.

ЭСР высокого разрешения осуществляется путем анализа сверхтонкого расщепления пика поглощения, возникающего в результате взаимодействия неспаренного электрона с соседними ядрами. Такие данные несут информацию относительно пространственного расположения атомов в молекуле. В свободных радикалах для атома водорода (^{1}H) величина сверхтонкого расщепления находится в диапазоне от 0 до $3 \cdot 10^{-3}$ Тл (1 тесла = 10^4 гаусс, мера магнитной индукции, которая линейным образом связана с напряженностью магнитного поля); получаемые при этом результаты аналогичны тем, что получают методом ЯМР высокого разрешения. Значительного улучшения эффективного разрешения спектра ЭСР можно добиться с помощью метода **двойного электрон-ядерного резонанса** (ENDOR). В данном случае образец одновременно подвергают воздействию микроволнового излучения для ЭСР и радиочастотного излучения для ЯМР. В фиксированной точке спектра ЭСР радиочастота изменяется в диапазоне, отвечающем величинам сверхтонкого взаимодействия в данной спиновой системе. На выходе регистрируют зависимость величины сигнала ЭСР от радиочастоты. Данный метод особенно полезен в тех случаях, когда из-за большого числа ядерных состояний происходит уширение линий электронного резонанса. Существует также метод **двойного электрон-электронного резонанса**, при котором образец облучают на двух частотах микроволнового диапазона. Одна частота используется для наблюдения за сигналом ЭСР в определенной точке спектра, а другая — для сканирования остальных частей спектра. Результатом является зависимость сигнала ЭСР от разности двух частот. Данный вариант метода находит применение для разрешения перекрывающихся спектров радикалов, а также для изучения явлений релаксации, например спинового обмена.

13.3.4 Оборудование

На рис. 13.3 представлена схема спектрометра ЭСР. Электромагниты создают магнитное поле с напряженностью порядка 50–500 мТл, причем для достижения высокой точности анализа колебания поля не должны превышать 10^{-6}. Монохроматрическое микроволновое излучение получают с помощью специальной лампы — клистрона; длина волны составляет около $3 \cdot 10^{-2}$ м (9000 МГц).

Образцы для анализа должны находиться в твердом состоянии, поэтому биологические образцы обычно замораживают в жидком азоте. Чаще всего строят зависимость первой производной dA/dH от H, а не просто A от H. При этом получают зависимости, аналогичные той, что представлена на рис. 12.9, *б*. Обычно в молекуле имеется всего несколько неспаренных электронов, поэтому чаще всего получают менее десяти линий, сравнительно далеко отстоящих друг от друга.

13.3.5 Применение

Металлопротеины

Спектроскопия ЭСР — один из основных методов анализа металлопротеинов, особенно тех, что содержат молибден (ксантиноксидаза), медь (ци-

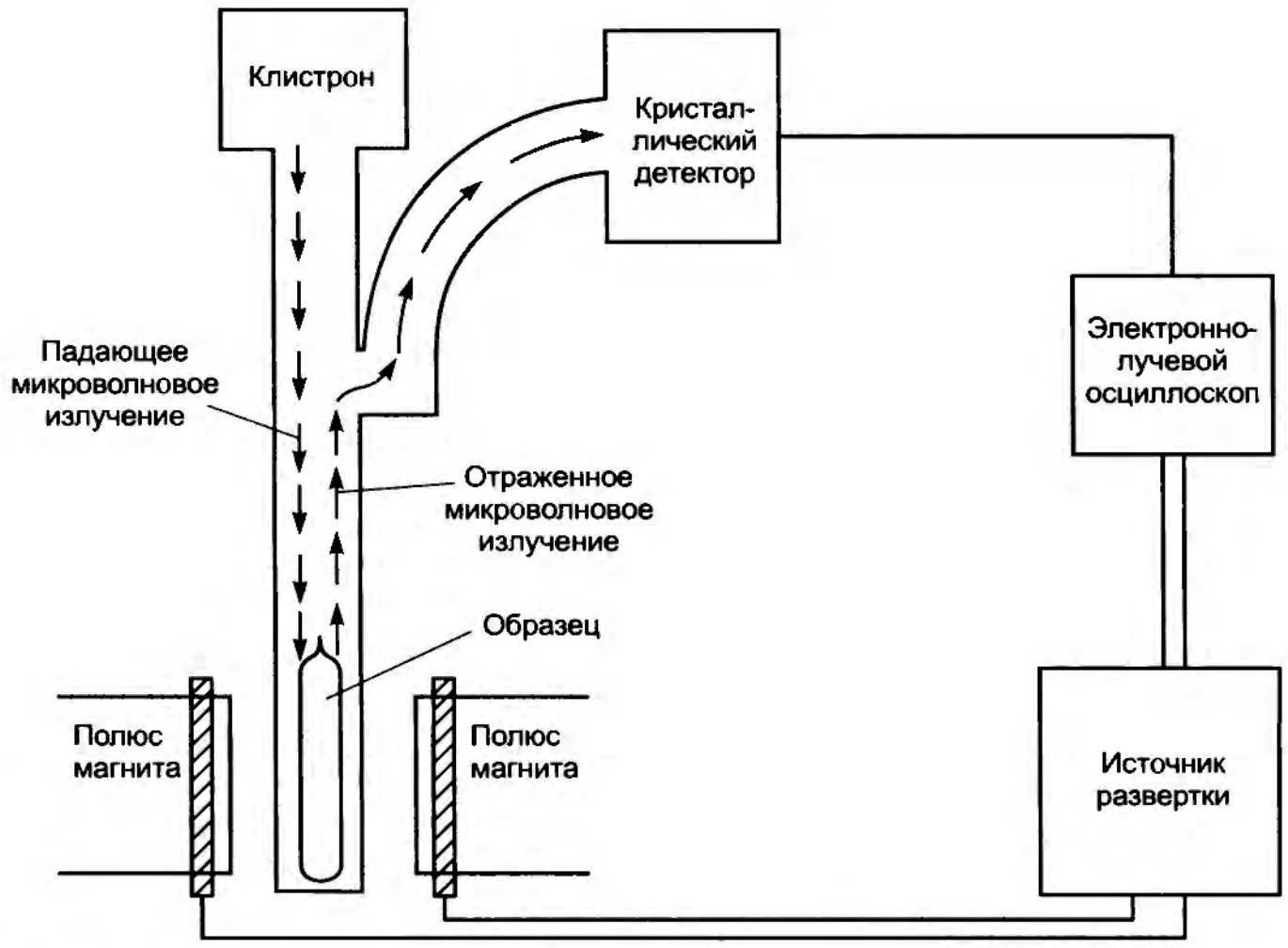


Рис. 13.3. Устройство спектрометра ЭСР

тохромоксидаза и «синие ферменты») и железо (цитохром, ферредоксин). Медь и железо (не в составе гема), которые не поглощают в ультрафиолетовом/видимом диапазоне, в спектре ЭСР имеют пики поглощения, соответствующие одному из их окисленных состояний. Появление и исчезновение соответствующих сигналов ЭСР позволяет следить за поведением таких белков в полиферментных системах (например, в интактных митохондриях и хлоропластах), а также за состоянием выделенных ферментов. Металлопротеины имеют специфическую пространственную структуру, в которой с металлом координировано определенное число лигандов (часто это аминокислотные остатки белка). Метод ЭСР показывает, что геометрия молекул часто отличается от модельной системы и что эти отличия могут быть связаны с биологическими функциями молекул.

Спиновые метки

Спиновые метки — это стабильные и неактивные свободные радикалы, которые используются в качестве **репортерных групп**, или **зондов**. Процедура мечения состоит в прикреплении таких меток к биологическим молекулам, которые теряют неспаренные электроны. Метка может быть прикреплена как к субстрату, так и к лиганду. В качестве спиновых меток часто используют радикалы нитроксильных производных. Такие метки позволяют изучать события, происходящие с частотой от 10^7 до 10^{11} $с^{-1}$. Если перемещение по каким-либо направлениям ограничено, удается анализировать только **анизотропное движение** (движение в одном направлении), например при изучении мембран. В этом случае метка закреплена таким образом, что NO-группа располагается параллельно длинной оси липида.

Метод позволяет исследовать внутримолекулярный транспорт и латеральную диффузию липидов в мембране. Для этого либо концентрируют несущие спиновую метку липиды в одном участке двойного слоя, либо размещают метку случайным образом (обычно в модельных мембранах). Диффузия спиновых меток позволяет им входить в контакт друг с другом, что вызывает уширение спектральных линий. Еще одна метка, используемая при изучении транспорта липидов в двойных слоях, — 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО). Мечение этим веществом глицерофосфолипидов позволяет измерять скорость их транспорта между внешней и внутренней поверхностью мембраны, а также латеральную диффузию.

Свободные радикалы

Спиновый захват — это процесс, при котором нестабильные свободные радикалы приобретает устойчивость в реакции с такими соединениями, как 5,5-диметилпирролин-1-оксид. При этом наблюдается сверхтонкое расщепление, зависящее от природы радикала R•.

Метод ЭСР позволяет также изучать молекулы в триплетном (фосфоресцирующем) состоянии (разд. 12.5.1). Такой анализ дополняет результаты, полученные в ультрафиолетовой/видимой области. Например, по триплетному состоянию триптофана свободные радикалы были обнаружены в хрусталике глаза при катаракте.

Свободные радикалы обнаруживаются во многих метаболических процессах, а также при биодеградации лекарств и токсинов. Механизмы переноса электрона в митохондриях и хлоропластах протекают с участием парамагнитных частиц, таких как Fe–S-центры. Другие окислительно-восстановительные процессы с участием флавиновых производных FAD, FMN и семихинонов также можно изучать с помощью данного метода. Значение $g = 2{,}003$ относится главным образом к митохондриям, а различные клеточные линии характеризуются разной интенсивностью сигнала. Сигнал зависит также от метаболического состояния системы. Факторы, повышающие метаболическую активность, усиливают сигналы органических радикалов. Во многих исследованиях используют свободные радикалы полимера меланина и аскорбиновой кислоты. Последнюю использовали для изучения влияния некоторых лекарств на сперматогенез.

Одна из областей, в которой активно изучаются и используются свободные радикалы, — это канцерогенез. В опухолевых тканях концентрация свободных радикалов обычно ниже, чем в здоровых тканях. Кроме того, имеет место градиент концентрации свободных радикалов: концентрация выше во внешних, не подвергшихся некрозу тканях по сравнению с внутренней областью опухоли. Свободные радикалы, безусловно, могут стать причиной развития новообразований. Рост имплантированных опухолей уже долгое время изучается на мышах. Химические канцерогены также часто действуют через образование свободных радикалов. Пример — предсказанное канцерогенное действие некоторых полициклических углеводородов. Полициклические углеводороды содержат конденсированную ароматическую систему на основе бензольных колец. Примерами таких соединений являются нафталин (два кольца), а также антрацен и фенантрен (по три кольца). По мере увеличения числа колец структура все более усложняется. Поскольку такие структуры обладают ароматическими свойствами, свободный электрон радикала легко там «устраивается», т. е. радикалы такого типа более стабильны и, следовательно, более долгоживущие. Из-за этого подобные частицы могут нанести больше вреда. Многие предшественники радикалов существуют в природных источниках, таких как деготь, табачный дым и другие продукты горения, что создает определенную опасность.

Еще один источник свободных радикалов — облучение биологических материалов, например гамма-лучами. Так, дисульфидные мостики в белках можно обнаружить путем облучения белков, а свободные электроны образующихся при этом свободных радикалов локализованы в области –S–S-связей. Еще один вариант анализа — определение остаточных количеств свободных радикалов в продуктах питания после их облучения. Метод позволяет установить, подвергались ли продукты облучению или нет. Другое биомедицинское применение метода — анализ плотных биологических тканей, таких как кости и зубы. Если такие ткани подвергаются воздействию ионизирующего излучения, в них накапливается энергия, которая может стать причиной возникновения свободных радикалов. ЭСР можно использовать для определения содержания этих радикалов; метод применяют для оценки полученной дозы радиации при авариях, связанных с утечкой радиоактивного излучения.

Метаболические исследования

Анализ многих метаболических процессов включает в себя проведение ЭСР. В качестве примеров назовем метаболизм лекарств, процессы в микросомах печени, механизмы образования пероксидов и свободных радикалов кислорода. Супероксиддисмутаза разрушает свободные радикалы $O_2^{-\bullet}$, которые образуются, в частности, при воспалительных процессах и сопровождают старение. Оксид азота NO действует как физиологический переносчик в нервной, иммунной и сердечно-сосудистой системах организма. Он принимает участие в развитии септического (токсического) шока, гипертонии, инсульта и нейродегенеративных процессов. Хотя в норме NO участвует в синаптической передаче, его избыток токсичен для нервной системы. Супероксиддисмутаза смягчает нейротоксический эффект, удаляя радикалы $O_2^{-\bullet}$ и ограничивая тем самым возможность их реакции с NO с образованием пероксинитрита.

13.4 ЯДЕРНЫЙ МАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС

Теоретические основы метода ЯМР обсуждались в разд. 13.3.1. В ЯМР главную роль играют магнитные свойства не электронов, а нуклонов (прежде всего протонов).

13.4.1 Основы метода

Существует довольно много общего между методом ЯМР и методом ЭСР. В большинстве исследований используют протонный резонанс (^1H; отсюда название метода — **протонный магнитный резонанс**, ПМР), но при анализе биологических объектов применяются ядра ^{13}C, ^{15}N и ^{31}P.

Условия резонанса в случае ЯМР выполняются при величине внешнего магнитного поля порядка нескольких сотен миллитесла; резонанс в ядрах ^1H имеет место при поглощении радиоволн с частотой 40 МГц. Реальное поле сканирования небольшое по сравнению с общим наложенным полем, а поглощаемые радиочастоты устанавливаются на спектре специфическим образом.

От окружения протона внутри молекулы в значительной степени зависит, при какой частоте внешнего поля происходит резонанс в ядрах. Отличие такого сигнала ЯМР от сигнала внутреннего стандарта позволяет определить так называемый **химический сдвиг** (τ); в качестве внутреннего стандарта часто используют тетраметилсилан $(CH_3)_4Si$, в молекуле которого 12 идентичных протонов. Химический сдвиг возникает по той причине, что наложенное внешнее поле в результате взаимодействия с расположенными поблизости электронами, участвующими в образовании связей, индуцирует вторичные поля (от $15 \cdot 10^{-4}$ до $20 \cdot 10^{-4}$ Тл). Если индуцированное поле направлено противоположно внешнему полю, для возникновения резонанса внешнее поле должно иметь чуть более высокое значение. И напротив, если направление индуцированного и внешнего полей

совпадают, для возникновения резонанса внешнее поле должно иметь чуть меньшее значение. В случае противоположно направленных полей говорят об **экранировании ядра**, причем величина экранирования пропорциональна электронодонорным свойствам ближайших заместителей. Если же направления полей совпадают, ядро **дезэкранировано**. Ось магнитного поля на спектре можно калибровать от 0 до 10, причем максимальное значение соответствует тетраметилсилану*. Таким образом, по положению пика поглощения (химическому сдвигу) можно определить тип протона, а площадь под кривой пропорциональна числу таких протонов в конкретной химической группе. На рис. 13.4 представлен упрощенный спектр этилового спирта, в котором имеются три метильных протона, два метиленовых протона и один протон спиртовой группы — площади пиков соотносятся как 3 : 2 : 1.

ЯМР высокого разрешения позволяет извлекать дополнительную информацию благодаря **тонкой структуре сигналов**. Расщепление сигналов возникает в результате **спин-спинового взаимодействия** неэквивалентных магнитных ядер в молекуле. Это взаимодействие осуществляется при участии электронов связей и, как правило, распространяется на ядра, удаленные друг от друга не более чем на четыре или пять связей. В спектре это выглядит как расщепление пиков, уже разделенных за счет химического сдвига.

Спектры ЯМР оказывают неоценимую помощь в определении строения вещества. Из них можно извлечь как качественную, так и количественную информацию, а расщепление сигналов позволяет изучить ближайшее окружение резонирующего ядра.

Компьютерные методы способствовали еще более активному развитию методов спектроскопии ЯМР. Слабые сигналы можно усилить путем проведения нескольких сканирований и накопления данных; при этом случайные отклонения базовой линии сглаживаются, а реальные сигналы усиливаются. Такой подход значительно улучшает отношение сигнал/шум; данный метод называют **CAT-сканированием** (*от англ.* computer averaging of transients). Сочетание CAT-сканирования с быстрыми методами обработки данных с помощью импульсного фурье-спектрометра является очень мощным инструментом для анализа. Кроме того, широкие возможности обработки данных и построения производных спектров значительно расширили возможности и применимость метода.

Хотя «обычный» (с разверткой по частоте или магнитному полю) протонный ЯМР продолжает использоваться, гораздо больше информации о структуре молекул можно получить с помощью импульсного ЯМР (см. далее). Такой подход привел к созданию целого ряда методов, позволяющих получать многомерные спектры ЯМР (в наиболее сложных экспериментах — четырехмерные), спектры ЯМР ^{13}C и других магнитных ядер.

Как и в других обсуждавшихся выше спектроскопических методах, энергия поступает в систему в виде электромагнитного излучения и приводит к переходу «объектов» с более низкого на более высокий энергетический

* В настоящее время общепринята δ-шкала: $\delta = 10 - \tau$. — *Прим. ред.*

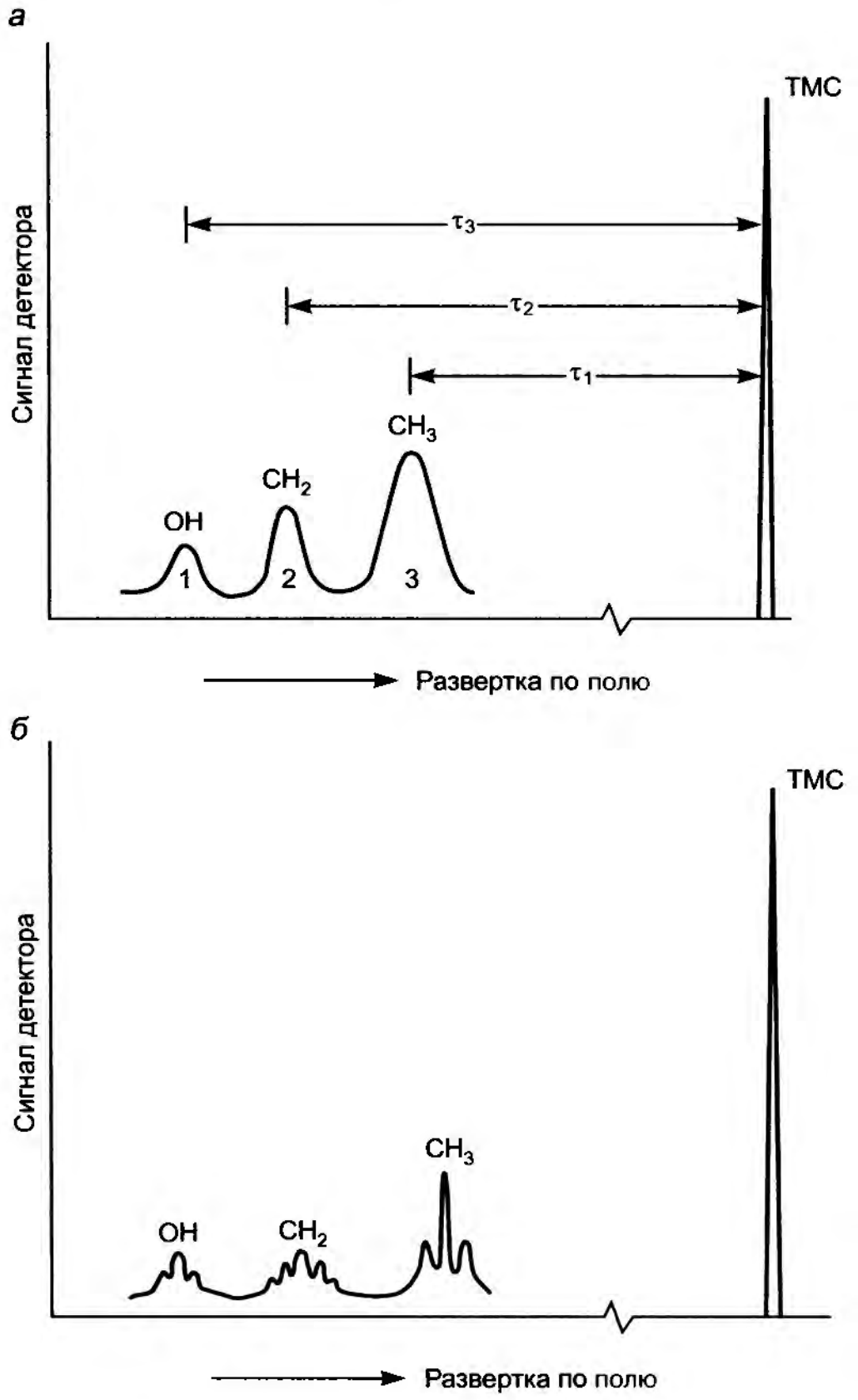


Рис. 13.4. Спектр ЯМР этилового спирта при низком (*а*) и при высоком (*б*) разрешениях. Высокое разрешение достигается только с очень чистыми образцами. ТМС — тетраметилсилан

уровень. В ультрафиолетовой/видимой спектроскопии «объекты» — электроны, в ИК, рамановской и микроволновой спектроскопии — колебания и деформация связей, в ЭСР и ЯМР — ориентация ядерного спина. Все эти процессы строго подчиняются квантовым законам. После краткого промежутка времени «объекты» могут возвращаться с более высокого

энергетического уровня в исходное состояние. Общий термин для описания подобного явления — **релаксация**. Очень просто это понять, если провести аналогию с ультрафиолетовым/видимым спектром: спектр поглощения возникает при поступлении и поглощении энергии, а спектр испускания — при релаксации системы.

Импульсный ЯМР и преобразование Фурье

Существуют разные варианты получения спектра ЯМР, но каждый из них базируется на одном из двух основных режимов. В «обычной» спектроскопии ЯМР электромагнитная энергия от источника подается путем постепенного изменения частоты в заранее выбранных пределах. Сигнал регистрируется с помощью подходящего устройства путем сканирования либо от коротких длин волн к длинным (от более высоких частот к более низким), либо наоборот. Принципиально в данном случае то, что изменение частоты осуществляется постепенно в заданных пределах. Другой возможный режим состоит в одновременной подаче всей энергии (т. е. всех резонансных частот в заданных пределах). Это достигается путем облучения образца широкополосным импульсом, включающем все эти частоты, в один прием. Одновременно, естественно, регистрируют сигнал, который обычно имеет очень сложную форму. К счастью, такие сигналы поддаются анализу с помощью преобразования Фурье. Применение метода Фурье — довольно сложная математическая процедура, однако ее легко осуществляют современные компьютеры.

Данный метод отличается от остальных спектроскопических методов. Как отмечалось в разд. 13.2.2, метод ИК-фурье-спектроскопии (FT-IR) связан с проведением **интерферометрии**, регистрирующей частоты, при которых излучение проходит сквозь образец, не поглощаясь. В фурье-спектроскопии ЯМР регистрируют так называемый **спад свободной индукции** (ССИ). Здесь существует некая аналогия с эмиссионными спектрами, наблюдаемыми в ультрафиолетовой/видимой области, поскольку ССИ возникает при испускании поглощенного излучения возбужденными частицами.

Дальнейшее объяснение, для простоты, мы сведем к рассмотрению одного «объекта», т. е. одного-единственного ядра.

Магнитные свойства реального образца являются суммарным результатом проявления магнитных свойств всех микроскопических ядерных магнитов. С помощью статистики Больцмана можно показать, что при помещении образца во внешнее магнитное поле при установлении теплового равновесия имеет место небольшой избыток спинов, располагающихся параллельно внешнему полю — так называемых **α-спинов**. Здесь речь идет об уровне с низким значением энергии; состояние в высоким уровнем энергии соответствует антипараллельным **β-спинам**. Отсюда возникает вектор общей намагниченности $\boldsymbol{M}$, который, по договоренности, считают ориентированным вдоль оси z в трехмерной декартовой системе координат, а ось z параллельна направлению внешнего магнитного поля. Магнитную индукцию внешнего поля обозначают B_0.

Теперь рассмотрим воздействие импульса радиочастотного излучения. Вспомним, что такое электромагнитное излучение имеет электрическую и магнитную составляющие. Магнитный вектор радиочастотного излучения

образует магнитное поле, индукцию которого обозначают B_1. Если передающая катушка, излучающая импульсы радиочастотного излучения, располагается таким образом, что B_1 перпендикулярна оси z, вдоль которой направлен вектор общей намагниченности $\boldsymbol{M}$, то $\boldsymbol{M}$ будет поворачиваться под углом θ по отношению к плоскости xy. Значение θ зависит от величины B_1 и длительности импульса. На рис. 13.5, *а* и *б* схематично изображен описанный выше процесс; здесь для простоты $\theta = \pi/2$ (подробности см. в разд. «Многомерный ЯМР»). Обусловливающие намагниченность $\boldsymbol{M}$ спины уже не параллельны внешнему магнитному полю, а $\boldsymbol{M}$ не располагается более вдоль оси z. Если не подается следующий импульс, происходит релаксация системы, а $\boldsymbol{M}$ возвращается в исходное положение. Именно это возвращение в исходное состояние, происходящее по экспоненциальному закону, является причиной возникновения упоминавшегося выше спада свободной индукции, и именно в этот момент прибор регистрирует данные. Такой эксперимент называют **импульсным** ЯМР.

Использование серий из нескольких разночастотных импульсов (возможно, разной частоты и длительности) лежит в основе целого ряда специальных методов ЯМР, которые позволяют получать очень ценную информацию. В методах ЯМР важны два типа процессов релаксации. Экспоненциальный спад свободной индукции связан с потерей энергии в результате спин-решеточной (продольной) релаксации. При этом энергия передается матрице (окружающей среде). Характеристическое время такого процесса обозначают T_1. Альтернативный процесс — спин–спиновая (поперечная) релаксация с характеристическим временем T_2, когда энергия распределяется между спинами, а не передается в окружающую среду. Всегда $T_1 \geq T_2$, а в случае малых органических молекул эти времена равны.

В данной книге мы не будем подробно описывать суть преобразования Фурье. Достаточно сказать, что эта математическая процедура позволяет преобразовать полученный во временно́м представлении сигнал в соответствующий «пик» в частотном представлении. Для синусоидальной волны с частотой ν (герц, цикл/с), один цикл завершается за $1/\nu$ секунд. Синусоидальная волна обычно изображается во временно́м представлении как серия колебаний с постоянной амплитудой. Соответствующая частота наблюдается в виде единственного пика (также с фиксированной амплитудой). На рис. 13.6, *а* изображено применение преобразования Фурье к одной синусоидальной волне, а на рис. 13.6, *б* — аналогичное преобразование одного сигнала ССИ. С помощью преобразования Фурье сложные спектры можно разложить на синусоидальные и косинусоидальные составляющие и перевести спектр из временно́го представления в частотное. На рис. 13.7 изображено преобразование трех синусоидальных волн с разными частотами и амплитудами.

Осциллограмма во временно́м представлении, соответствующая ССИ из реального эксперимента ЯМР, выглядит, конечно, намного сложнее, поскольку она складывается из множества синусоидальных и косинусоидальных волн. С помощью преобразования Фурье их выделяют, переводят в частотное представление и отображают в виде пиков на спектре.

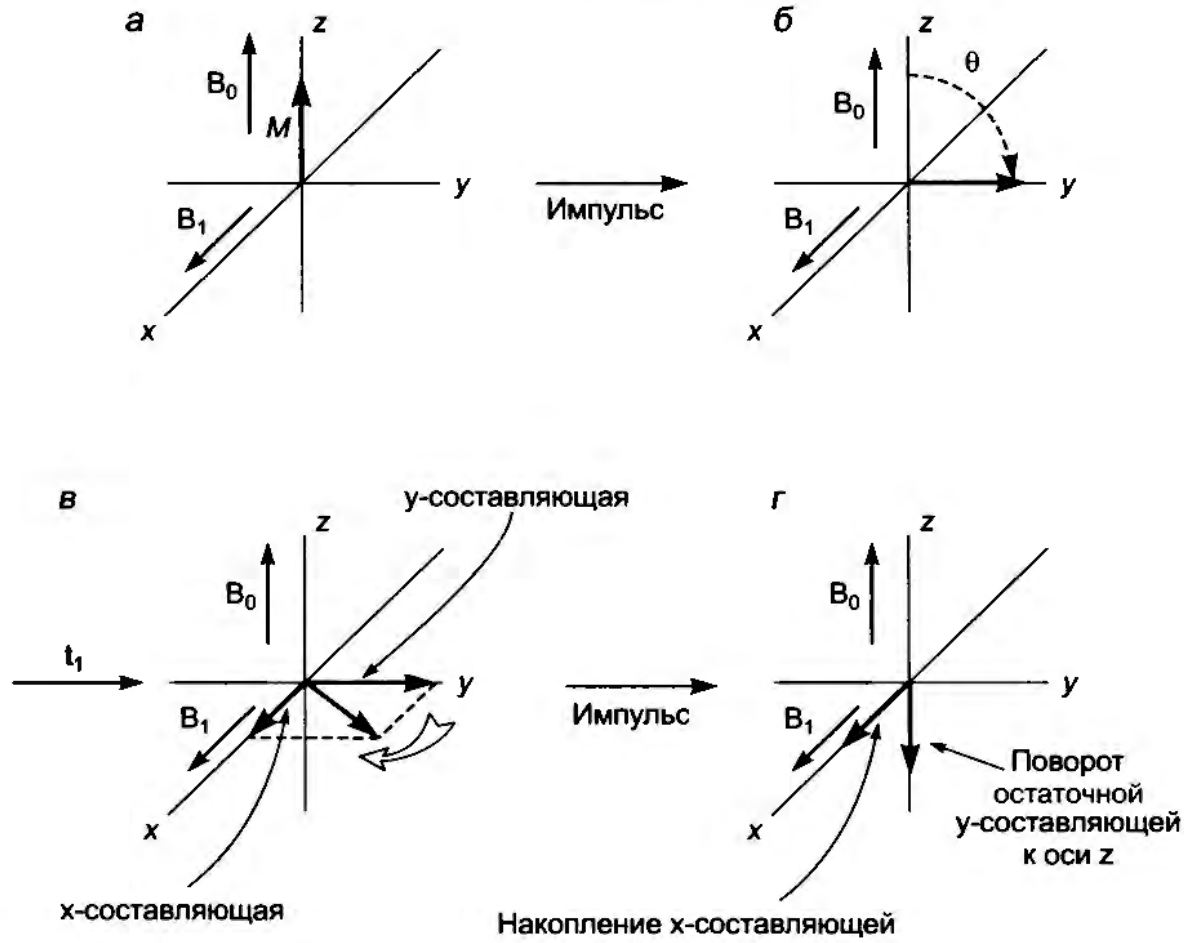


Рис. 13.5. Вращение намагниченности при радиочастотных импульсах

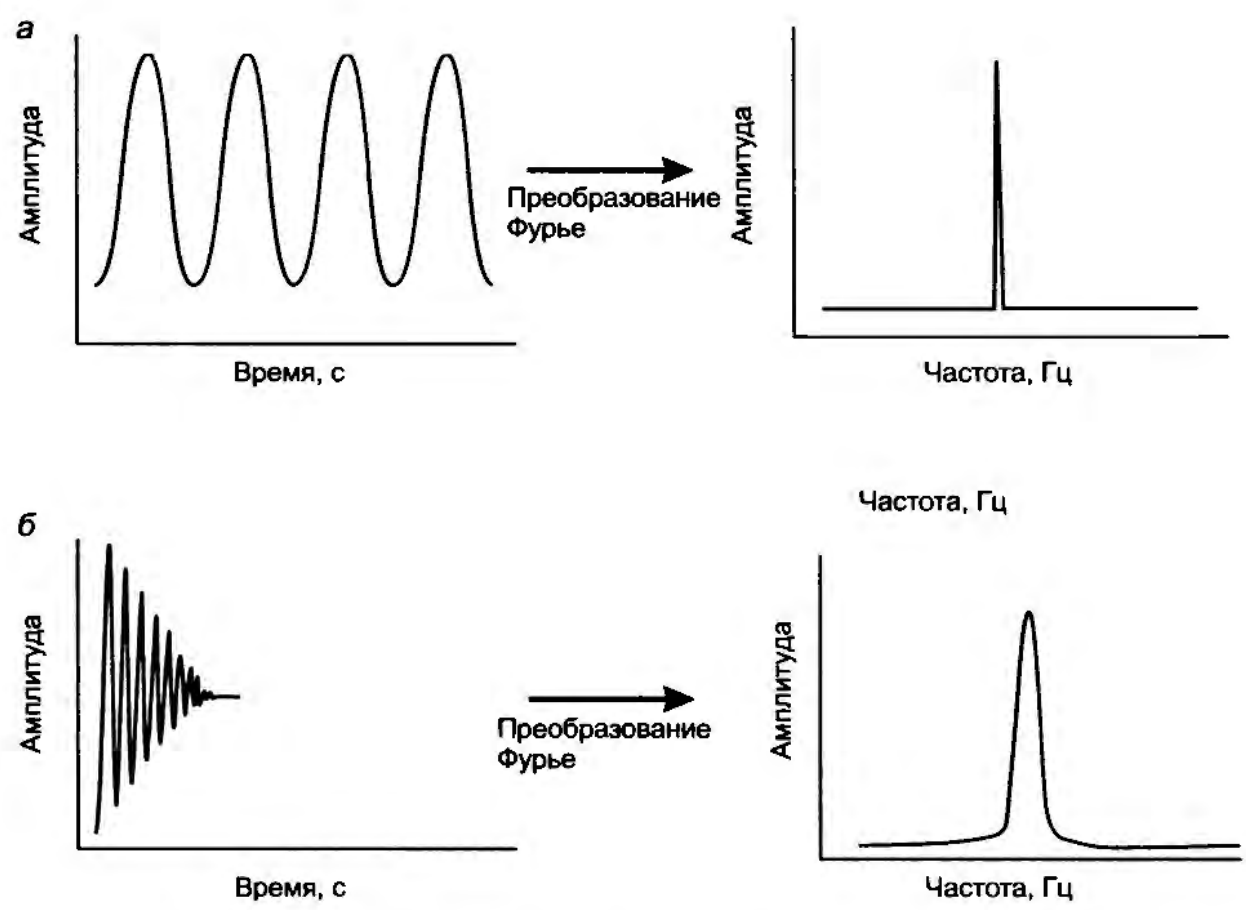


Рис. 13.6. Схематичное изображение преобразования Фурье для одной синусоидальной волны постоянной частоты (*а*) и одного спада свободной индукции (*б*)

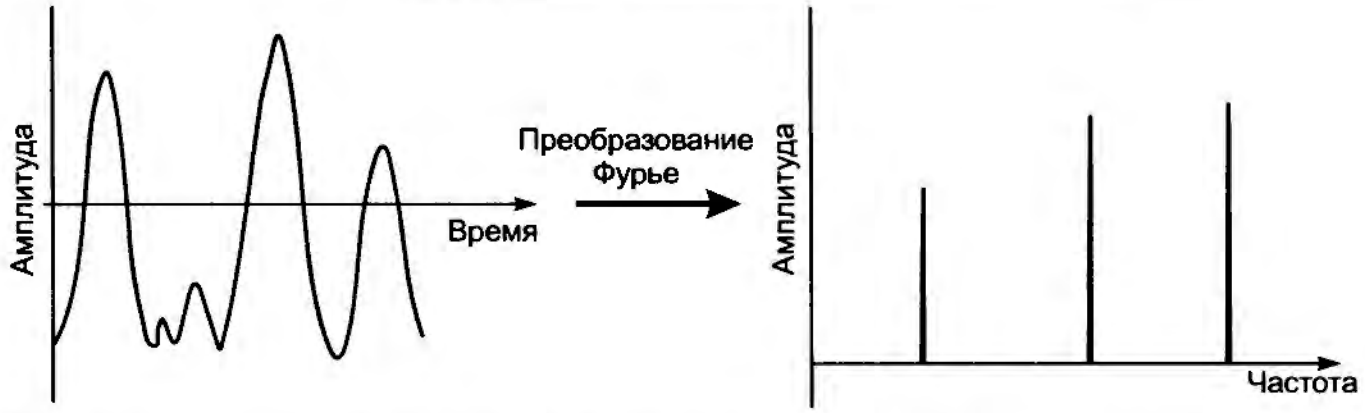


Рис. 13.7. Преобразование Фурье для комбинации трех синусоидальных волн

В разд. 13.3.2 говорилось, что обладающие спином ядра создают вокруг себя магнитное поле. Ближайшее окружение испытывает его воздействие непосредственно; основной вклад при этом вносит диполь-дипольное взаимодействие. Если интенсивность резонансного сигнала изменяется при отклонении состояния ближайшего окружения от равновесного, говорят о проявлении **ядерного эффекта Оверхаузера** (ЯЭО). Этот эффект играет важнейшую роль для определения трехмерной структуры молекул. Диполь-дипольное взаимодействие распространяется в пространстве на ограниченное расстояние; для проявления ЯЭО расстояние между ядрами не должно превышать 0,4 нм. Это ограничение в сочетании с информацией о спин–спиновом взаимодействии, распространяющемся через химические связи, помогает исследовать трехмерную структуру молекул.

Спиновую систему можно насытить путем облучения под углом 90°, в результате чего появляется возможность получить протонный спектр, в котором проявляются взаимодействия ^1H–^1H, порождающие эффект Оверхаузера. Если далее подвергнуть образец облучению на радиочастоте, удаленной от резонансных частот (нерезонансное возбуждение), можно получить контрольный спектр (без ЯЭО) и вычесть его из полученного ранее; в результате такой процедуры будут удалены все сигналы, не усиленные действием ЯЭО. Полученный результат называют **стационарным ЯЭО**, а данный метод анализа носит название **разностного эксперимента ЯЭО**.

Одним из основных преимуществ метода импульсной спектроскопии ЯМР с преобразованием Фурье в сочетании с усреднением сигнала от многих сканирований и использованием мощных магнитов является возможность получать спектры ядер ^{13}C. Доля этого изотопа в природе составляет лишь 1,108% всего углерода, поэтому он дает сигналы малой интенсивности, особенно по сравнению с сигналами ^1H, содержание которого составляет практически 100%. Несмотря на все успехи метода ЯМР, для получения спектра ЯМР ^{13}C в большинстве случаев требуются в 10 раз большие количества образца, чем для получения спектра ЯМР ^1H.

Поскольку содержание ядер ^{13}C низкое, вероятность обнаружения двух таких ядер поблизости друг от друга чрезвычайно мала (см. подробности в гл. 9). В результате **гомоядерное взаимодействие** ^{13}C–^{13}C не наблюдается. Возможно **гетероядерное взаимодействие** ^1H–^{13}C, но по ряду технических причин, таких как перекрывание полос, обычно получают

спектры ЯМР ^{13}C с полным подавлением спин-спинового взаимодействия с протонами (так называемые спектры «с развязкой» от протонов). В результате спектры ^{13}C часто гораздо проще, чище и имеют более высокое отношение сигнал/шум (хотя и нуждаются в большем количестве образца) по сравнению с протонными спектрами. Метод имеет ряд преимуществ, но все-таки один существенный недостаток — невозможно оценить, относится ли конкретное ядро ^{13}C к метильной (CH_3), метиленовой (CH_2) или метиновой (CH) группе. Некоторую информацию все же можно получить с помощью нерезонансного возбуждения, как в случае разностного эксперимента ЯЭО. Однако существует и другая возможность — ставший уже рутинным метод **неискаженного усиления переносом поляризации** (distortionless enhancement by polarisation transfer, DEPT). Метод состоит в осуществлении серии импульсов разной длительности — обычно под углом 45°, 90° или 135°. Хотя спин-спиновое взаимодействие ядер подавлено, сигналы имеют положительную или отрицательную интенсивность (фазу) в зависимости от числа протонов, непосредственно связанных с ядром углерода. Например, в эксперименте DEPT-135 сигналы CH и CH_3 положительные, а сигнал CH_2 отрицательный. Понятно, что при отсутствии метильных групп будет достаточно одного эксперимента DEPT-135. Сигналы DEPT первичных, вторичных и третичных атомов углерода при облучении импульсами 45° и 90° либо положительны, либо равны нулю.

Многомерный ЯМР

Рассмотрим далее процесс, изображенный на рис. 13.5, *а–г*. Вектор общей намагниченности $\boldsymbol{M}$ изначально направлен вдоль оси z параллельно внешнему магнитному полю B_0. При действии импульса B_1 под прямым углом (т. е. параллельно оси x) вектор $\boldsymbol{M}$ поворачивается на 90° к оси y (при условии достаточной интенсивности и длительности импульса) (рис. 13.5, *а* и *б*). Кроме неизбежного ослабления, вектор будет прецессировать (поворачиваться) в плоскости xy в сторону оси x (рис. 13.5, *в*) с характеристической частотой (**частотой Лармора**) в течение времени t_1. Этот процесс отличается от процесса ССИ, с которым, впрочем, перекрывается. В любой точке плоскости xy вектор $\boldsymbol{M}$ можно разложить на составляющие по этим осям. Если на протяжении периода времени t_1 подается следующий импульс B_1, y-составляющая вектора опять будет поворачиваться, но в данном случае в сторону оси $-z$. При этом x-составляющая не изменяется, поскольку она параллельна B_1. Если $t_1 = 0$, т. е. импульсы следуют непрерывно один за другим, то $\boldsymbol{M}$ поворачивается от оси z к оси y с одним импульсом, а сразу после этого со следующим импульсом — к $-z$. Для случая $t_1 = 0$ x-составляющая отсутствует, поскольку для ее образования нет времени. При $t_1 > 0$ x-составляющая вектора $\boldsymbol{M}$ успевает сформироваться, а ее величина зависит от времени t_1. Чем больше t_1, тем больше x-составляющая вектора $\boldsymbol{M}$, поскольку $\boldsymbol{M}$ будет перемещаться ближе к этой оси. Последовательно увеличивая время t_1 между импульсами можно добиться увеличения x-составляющнй общей намагниченности и измерить серию ССИ, каждый их которых сохранить в компьютере. Составляющие y и z измерить нельзя. Такое накопление ССИ порождает

второе измерение во временно́м представлении, причем к каждому ССИ можно применить преобразование Фурье.

Двумерные частотные диаграммы представляют в виде контурных карт. Диагональные пики соответствуют химическим сдвигам, которые можно получить в одномерном эксперименте. Новой является информация от асимметрично расположенных недиагональных пиков при корреляции взаимодействий между ядрами, причем основное преимущество состоит в том, что вся эта информация может быть получена из одного эксперимента с многоимпульсным возбуждением. На корреляции протон-протонных взаимодействий основан метод **гомоядерной корреляционной спектроскопии** (COSY), а на корреляции протон-углеродных взаимодействий — метод **гетероядерной корреляционной спектроскопии** (гетеро-COSY или HETCOR).

Уже достигнутые потенциальные возможности развития методов ЯМР поистине феноменальны; двумерные спектры уже стали классическими, но развиваются также трехмерный и четырехмерный варианты ЯМР. Вернемся вновь к рис. 13.5, *а–г*, отражающему последовательность стадий эксперимента COSY. Второй импульс 90° заставляет вектор намагниченности повернуться вдоль оси $-z$. Различные поперечные составляющие ликвидируются с помощью электронных методов, а вектор вдоль оси $-z$ возрастает (см. выше). Третий импульс 90° создает намагниченность, которую уже можно измерить. Повторение последовательности импульсов с увеличивающимися временны́ми интервалами t_1 приводит к изменениям, которые можно наблюдать во время последнего импульса. Так построен двумерный эксперимент, позволяющий определять ЯЭО; он носит название **двумерного эксперимента по наблюдению ядерного эффекта Оверхаузера** (NOESY). Дальнейшее усложнение метода состоит в замене неподвижной декартовой системы координат вращающейся системой координат (эксперимент ROESY). Существует, однако, проблема: полезные данные из эксперимента ^{1}H NOESY можно извлечь в том случае, если удается разрешить все ЯЭО. В случае крупных биологических макромолекул это затруднительно. Сочетание последовательности импульсов с тремя различными временны́ми интервалами с методикой COSY или NOESY позволяет получать трехмерный спектр. Эта процедура несколько напоминает складывание двумерных спектров, как кубиков, один на другой (здесь, однако, только упрощенная аналогия, а не реальная процедура!). В анализируемую молекулу необходимо включить изотоп ^{13}C или ^{15}N. В таком случае возникают новые взаимодействия между ^{1}H, ^{13}C и/или ^{15}N. Для получения четырехмерного спектра следует ввести в молекулу как ^{13}C, так и ^{15}N, причем изотоп углерода следует ввести в углеродную цепь таким образом, чтобы он оказался связанным с атомами водорода определенных алифатических групп. Для получения спектра следует объединить результаты трех отдельных двумерных экспериментов, рассматривая взаимодействия ^{1}H–^{1}H, ^{1}H–^{13}C и ^{1}H–^{15}N. Интересно отметить, что в случае четырехмерного спектра обработка данных с помощью мощной компьютерной программы приводит к существенному улучшению разрешения без дополнительного усложнения эксперимента.

13.4.2 **Оборудование**

Схема спектрометра ЯМР представлена на рис. 13.8. Устройство прибора очень напоминает то, что мы видели в случае ЭСР, с той разницей, что вместо клистрона для генерирования микроволнового излучения имеется две катушки — передающая и приемная. Растворы образцов помещают в герметично закрытые пробирки, которые вращаются с высокой скоростью (во избежание возможной неравномерности распределения вещества); таким образом на приемное устройство попадает усредненный сигнал, который обрабатывается и записывается. Новые методы твердотельного ЯМР и ЯМР в сильном поле позволяют справляться с задачами, которые ранее нельзя было разрешить. С помощью многомерного ЯМР можно исследовать вещества с очень сложной структурой. Оборудование для таких экспериментов довольно сильно отличается от упрощенной схемы, представленной на рис. 13.8; в приборах применяются катушки со сложной геометрией, электронные процессоры нового поколения и более мощные компьютеры.

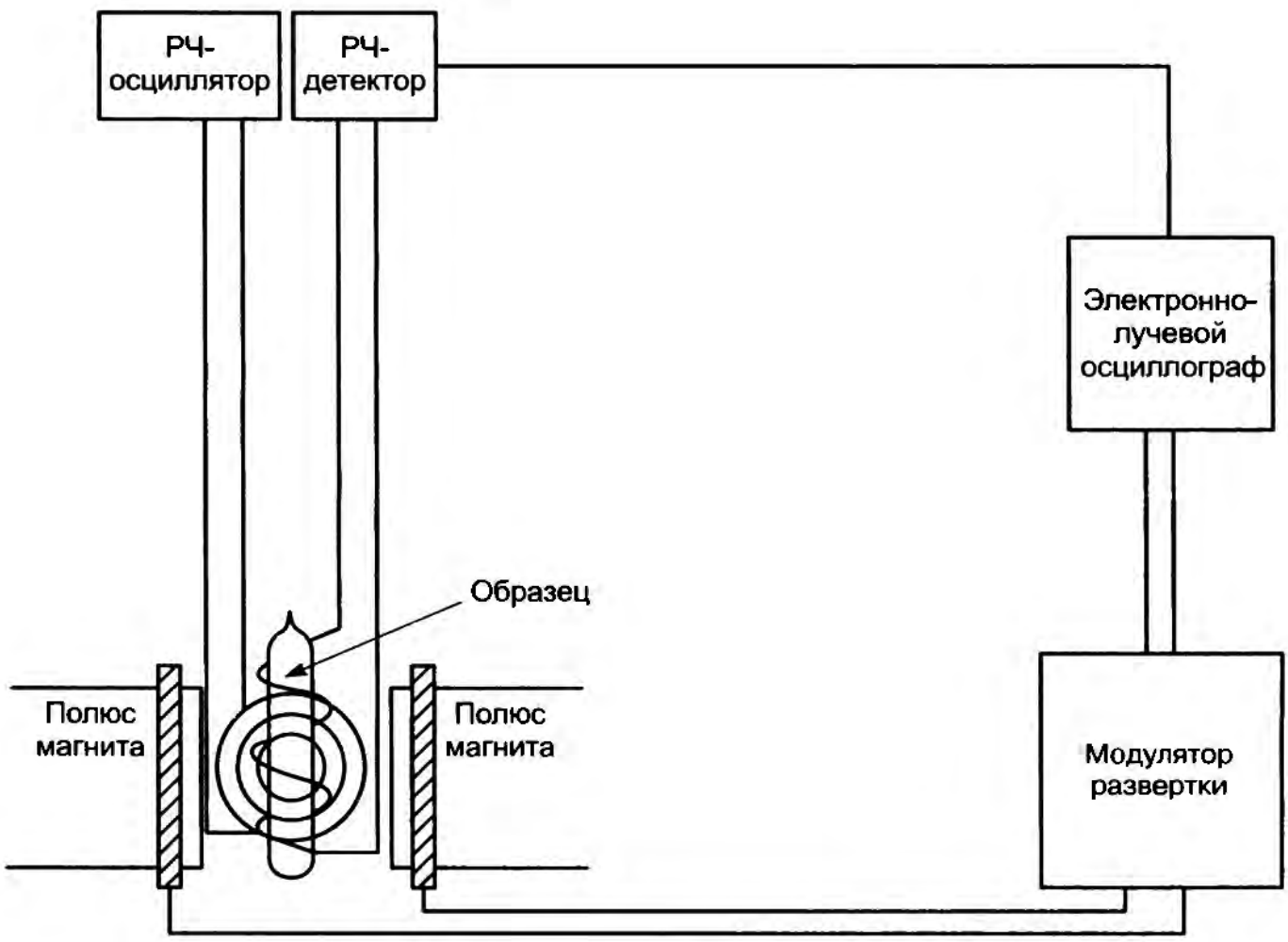


Рис. 13.8. Схема устройства спектрометра ЯМР. РЧ — радиочастотная область

13.4.3 Применение

Определение структуры молекул

В биологии метод ЯМР чаще всего применяют для изучения строения молекул и конформационных изменений, а также при кинетических исследованиях. Как правило, эксперимент проводится в растворе; чтобы устранить влияние растворителя, используют дейтерированный растворитель. Все чаще ЯМР применяют для изучения метаболизма лекарств, особенно в сочетании с ИК-спектроскопией и рентгенодифракционным методом. Получаемые данные затем используют при компьютерном моделировании действия лекарств. На рис. 13.9 представлен спектр протонного резонанса высокого разрешения для фенацетина; в сочетании с ИК-фурье-спектроскопии (рис. 13.2) это позволяет получить важную структурную информацию. Для сравнения на рис. 13.10 представлен спектр фенацетина, полученный методом 2D-COSY: диагональные пики дают ту же информацию, что представлена на рис. 13.9. Недиагональные пики содержат дополнительную информацию (объяснение см. в подписи к рис. 13.10).

Анализ научной литературы демонстрирует обилие данных о биологических макромолекулах, полученных всеми перечисленными выше методами. Некоторые методы используются для анализа белков и пептидов с молекулярной массой ниже 15 000, а другие — для белков с молекулярной массой от 15 000 до 30 000. Спектры ЯМР низкого разрешения получены для *lac*-репрессора и ингибитора трипсина из поджелудочной железы быка (BPTI). Некоторые примеры белков, структура которых проанализирована с высоким разрешением, — это антигипертензивный белок BDS-1, компоненты комплемента C3a и C5a, пластоцианин, тиоредоксин, фактор роста эпидермиса и интерлейкины. Твердотельный ЯМР применяли, например, для изучения β-амилоида, задействованного в патогенезе болезни Альцгеймера, а также меланостатина. Для анализа белков с массой выше 30 000 нужны еще более сложные методы, тем не менее такой анализ возможен и с его помощью была изучена структура некоторых антител.

Структура молекул в водных растворах

Очевидным преимуществом метода ЯМР является возможность изучать поведение молекул в растворе. Любое состояние молекулы, естественно, усредняется, но метод часто позволяет получить гораздо более ценную информацию по сравнению с той, что можно извлечь из анализа жестких структур рентгенодифракционными методами. В частности, с помощью ЯМР изучали фолдинг таких белков, как рибонуклеаза A, цитохром *c*, барназа, α-лактальбумин, лизоцим, убиквитин и BPTI.

Метод позволяет анализировать кинетику поведения ферментов как *in vitro*, так и *in vivo*. Среди изученных ферментов назовем химотрипсин, трипсин, папаин, пепсин, термолизин, аденилаткиназу, креатинкиназу, пируваткиназу, щелочную фосфатазу, АТФазу и рибонуклеазу (разд. 15.4.7). Другие примеры — гликогенфосфорилаза, дигидрофолатредуктаза и триозофосфатизомераза.

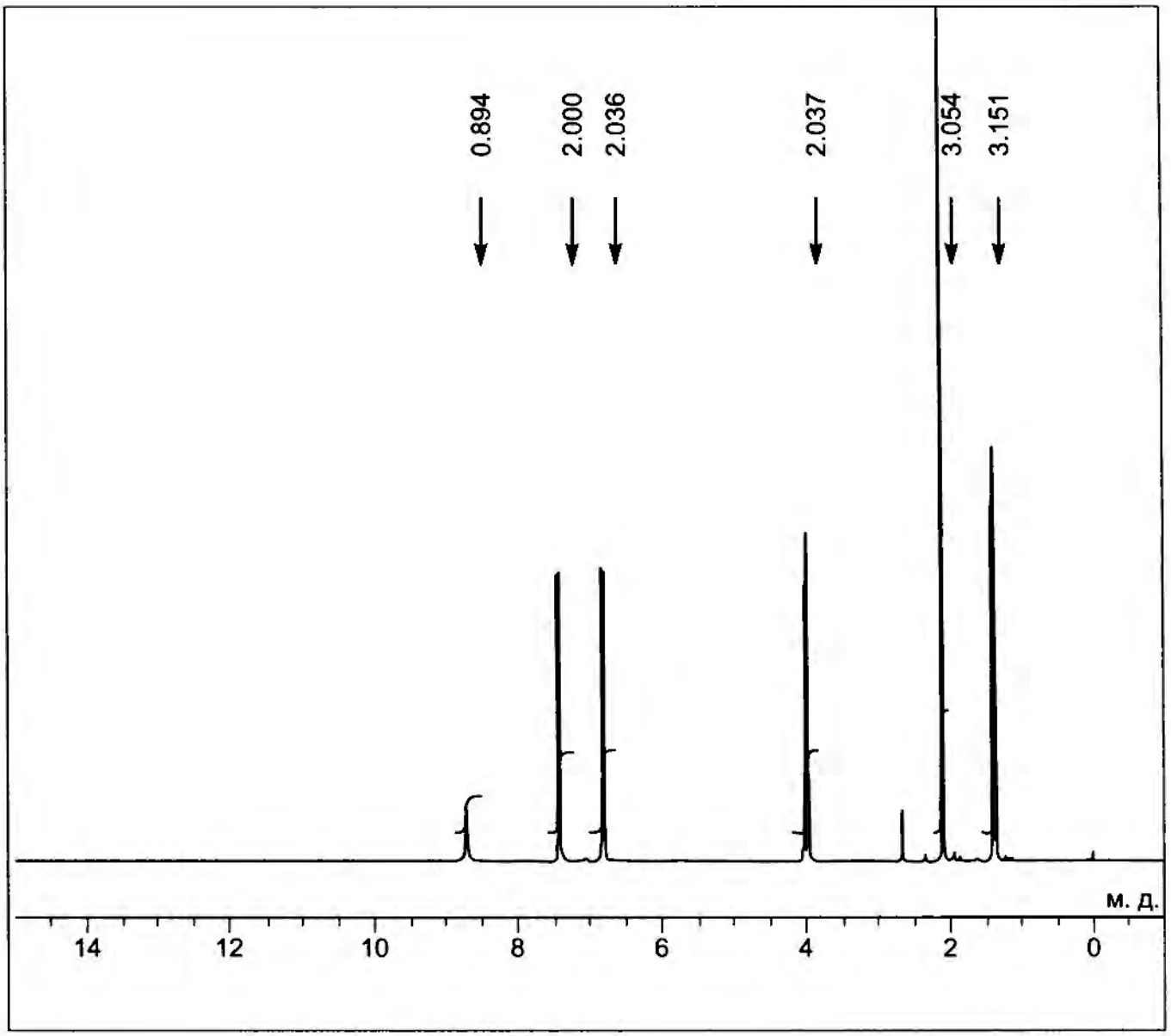
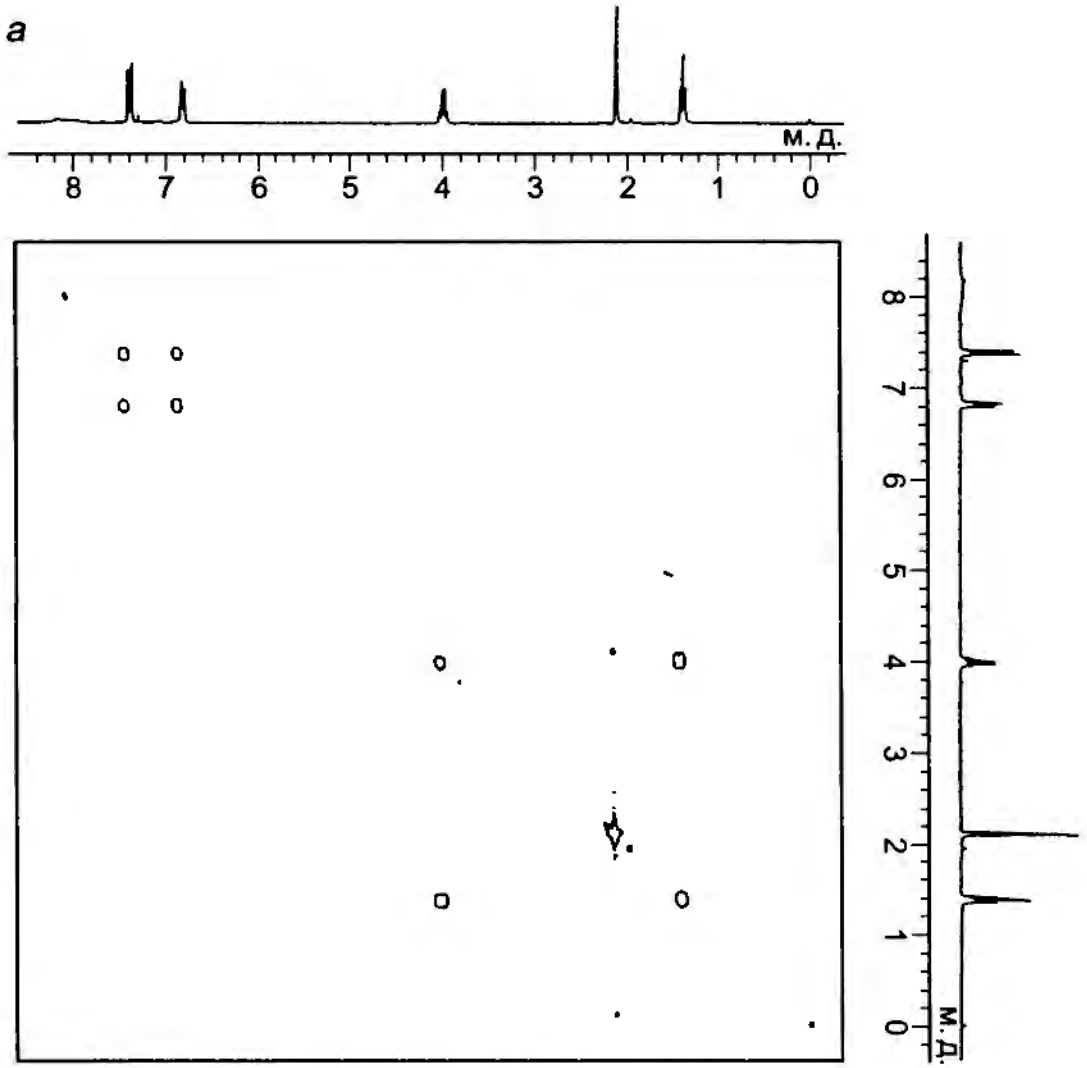
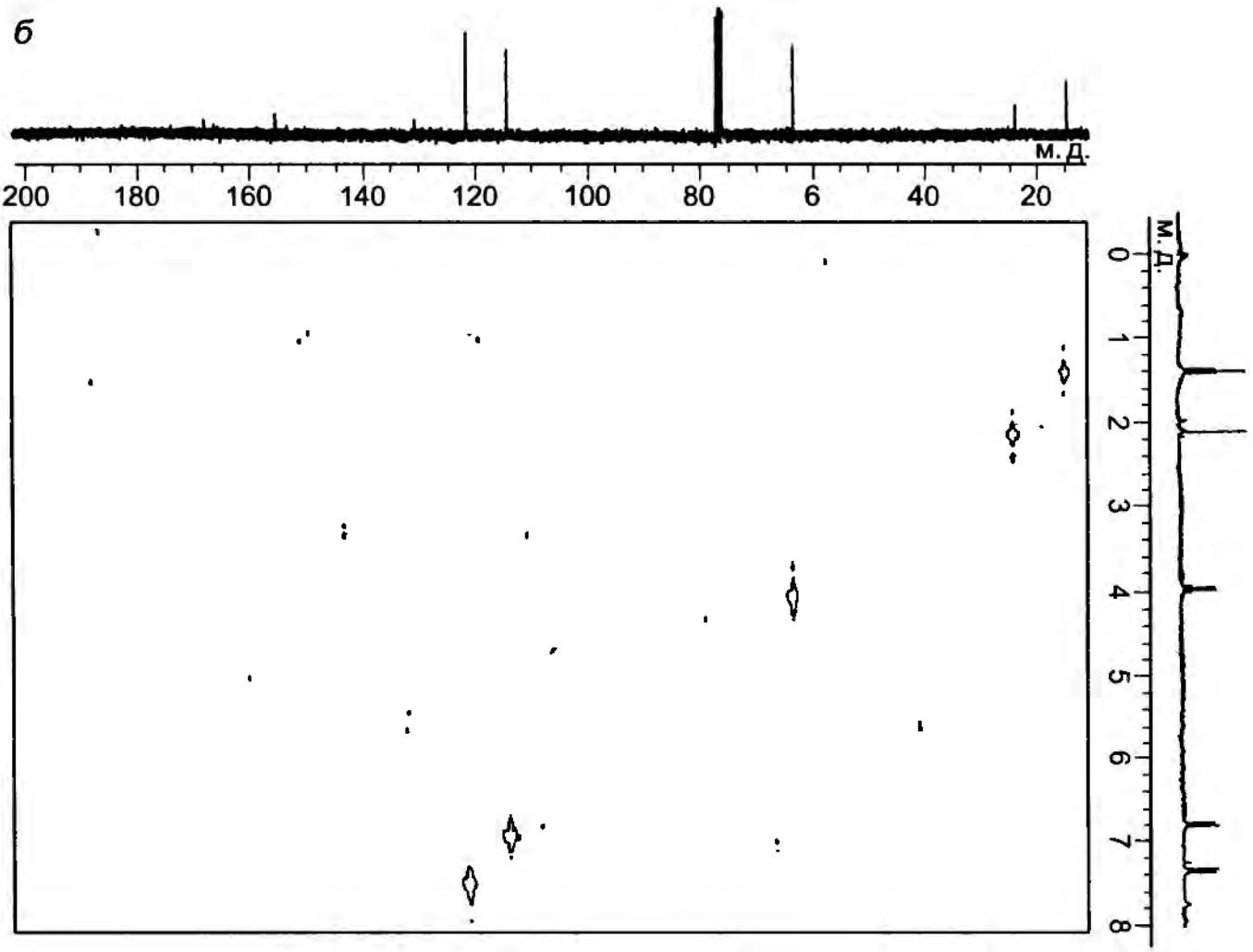


Рис. 13.9. Спектр ЯМР фенацетина. *Вверху* — стрелки, на которых указано примерное число протонов чуть правее соответствующего пика. *Внизу* приведены значения химических сдвигов (в м.д.). Пик при 1,3 м.д. является триплетом, поскольку рядом с ним расположена группа CH_2, а пик при 4,0 является квадруплетом, поскольку рядом находится группа CH_3. Пики при 6,8 и 7,4 м.д. характерны для замещения по положениям 1 и 4 в ароматическом кольце

Нуклеиновые кислоты

Анализ нуклеиновых кислот подразумевает не только структурные исследования ДНК и РНК, но также изучение взаимодействий ДНК с лекарственными препаратами и различными белками. Удается определять


а
м. д.
8 7 6 5 4 3 2 1 0
м. д.
0 1 2 3 4 5 6 7 8


б
м. д.
200 180 160 140 120 100 80 6 40 20
м. д.
0 1 2 3 4 5 6 7 8

последовательность олигосахаридов, но работа с интактными гликопротеинами не всегда удается, особенно в случае многомерного ЯМР, из-за сложности деконволюции данных. Были исследованы взаимодействия между белками и двойным липидным слоем в мембранах, а структуру некоторых мембранных белков удалось соотнести с их предсказанной биологической функцией. Среди таких белков можно назвать грамицидин А, бактериородопсин и родопсин, белки оболочки фагов и аламетицин.

Метаболизм фосфатов

Изотоп ^{31}P детектируется методом ЯМР, что и используется довольно широко при изучении метаболизма фосфатов. Удается измерять соотношение и изменение концентраций АТФ, АДФ и АМФ и, следовательно, следить за их метаболизмом в живых клетках и тканях. В живых клетках и тканях, кроме того, можно определять внутриклеточную и внеклеточную концентрацию неорганических фосфатов, поскольку химический сдвиг неорганического фосфата зависит от pH.

Рис. 13.10. Чтобы было понятно, как выглядит двумерный спектр ЯМР, представьте себе лес, в котором все деревья (пики на спектре) срублены на одной и той же высоте. От более высоких деревьев на этой высоте останется более широкий пень. В случае спектра — это более широкие контуры, соответствующие более высоким пикам в одномерном спектре.

а — Спектр ЯМР фенацетина, полученный методом COSY и отражающий гомоядерные взаимодействия ^{1}H–^{1}H. Спектры, приведенные вдоль каждой оси, идентичны, а линии по диагонали двумерного спектра представляют вид «обрубленных» пиков «с высоты птичьего полета». Недиагональные пики расположены симметрично относительно диагонали (как зеркальные отражения) и содержат в себе новую информацию. Например, если провести горизонтальную линию на уровне 1,3 м.д. (по шкале справа, триплет) и вертикальную линию на уровне 4,0 м.д. (по верхней шкале, квадруплет), то в точке пересечения обнаруживается пик, соответствующий взаимодействию протонов в соседних группах CH_2 и CH_3.

б — Гетероядерный корреляционный спектр, отражающий взаимодействие ^{13}C–^{1}H. Пики на двумерном спектре соответствуют взаимодействиям между ядрами ^{13}C и связанными с ними протонами. Спектр ^{1}H расположен вертикально вдоль правой оси, а спектр ^{13}C расположен сверху. О расположении линий на спектре см. объяснение к пункту *а*, химические сдвиги указаны в м.д. и соответствующие им взаимодействия приведены ниже в таблице.

м.д.		
^{13}C	^{1}H	Взаимодействия
14	1,3	CH_3– (Этил–О)
24	2,1	CH_3– (Ацетил)
63	4,0	CH_2– (Этил–О)
115	6,8	С (цикл) (Этил–О)
122	7,4	С (цикл) (= N–H)
132	—	С (цикл) (= N–H)
156	—	С (цикл) (Этил–О)
167	—	= C = O
	7,8	= N — H

ЯМР в клинической практике

Аналитические возможности метода ЯМР используются в клинической практике. Физиологические жидкости организма (моча, кровь и спинномозговая жидкость) можно анализировать непосредственно. Это же относится и к образцам тканей при биопсии. Например, можно измерять концентрации метаболитов в специфических участках тканей. С развитием сверхпроводящих магнитных систем и с появлением других усовершенствований стало возможным анализировать целиком небольших животных (в рамках фармакологических исследований), а также организм человека. Например, можно измерять содержание АТФ в тканях здорового и больного человека, а также изменение его содержания при физической нагрузке.

Однако основным клиническим применением метода является получение изображений — метод магнитно-резонансной томографии (МРТ) (magnetic resonance imaging, MRI). К сожалению, из-за невысоких энергий в радиочастотном диапазоне электромагнитного спектра метод ЯМР обладает сравнительно небольшой чувствительностью. Это накладывает ограничения на возможности применения метода, поэтому в МРТ используют почти исключительно резонанс ядер ^{1}H. Тому есть две причины: во-первых, протон — это один из наиболее «чувствительных» нуклонов, а во-вторых, он присутствует в биологических системах в достаточном количестве. Однако не все типы протонов и не во всяком окружении легко обнаружить. Основной вклад в сигнал ЯМР вносят протоны, входящие в состав быстро движущихся молекул. К таким молекулам в первую очередь относится вода, которая содержит два протона и является главным компонентом всех биологических систем. Вклад протонов из других соединений можно измерять при определенных условиях.

Резонансная частота для каждого конкретного нуклида пропорциональна напряженности внешнего магнитного поля. При наложении градиента внешнего магнитного поля можно наблюдать некоторый диапазон резонансных частот, отражающий пространственное распределение вращающихся ядер. Наиболее широко используются три способа получения изображения: реконструкция проекций, создание фурье-образа и эхопланарное представление. Для детального ознакомления с этими методами рекомендуем читателю обратиться к специальной литературе (разд. 13.5).

Одним из преимуществ МРТ является определенная свобода в выборе изучаемого физического параметра. Например, можно регистрировать спиновую плотность, т. е. количество спинов в заданном участке пространства. Кроме того, можно определять времена релаксации (T_1 и T_2). Дополнительную информацию дает изображение диффузного потока — как общего, так и локальной диффузии. Создание «общей картины» при сканировании всего организма представляет собой реконструкцию образов прилегающих друг к другу срезов; такой анализ, очевидно, был бы невозможен не только без технологии ЯМР, но и без наличия мощных компьютеров и соответствующих программ. Основные критерии оценки такого изображения — разрешение и контрастность — продолжают постоянно совершенствоваться. Дополнительными факторами, влияющими на развитие МРТ, являются стоимость оборудования и скорость получения информации.

Содержание воды в тканях организма различается, но в целом организме она составляет около 55% массы тела «среднего» человека. В мягких тканях содержание воды варьирует от 60 до 90% общей массы. Различие в содержании воды в белом и сером веществе головного мозга, а также в здоровых и опухолевых тканях делает возможным получать изображения этих тканей с высоким разрешением. На рис. 13.11 представлено вертикальное сечение головы и головного мозга человека. Можно определить сигнал ^1H жиров адипозных тканей, а различия химических сдвигов групп CH_2 позволяют отличить их от воды. На рис. 13.12 представлены фотографии распределения жира в брюшной полости полного и худого человека, полученные с помощью МРТ-сканирования. Астеничный человек в данном случае служил в качестве контроля.

Кроме того, можно анализировать различные релаксационные характеристики вещества. Поведение воды в тканях сильно отличается от поведения чистой воды. Поперечная релаксация (время T_2), в отличие от про-

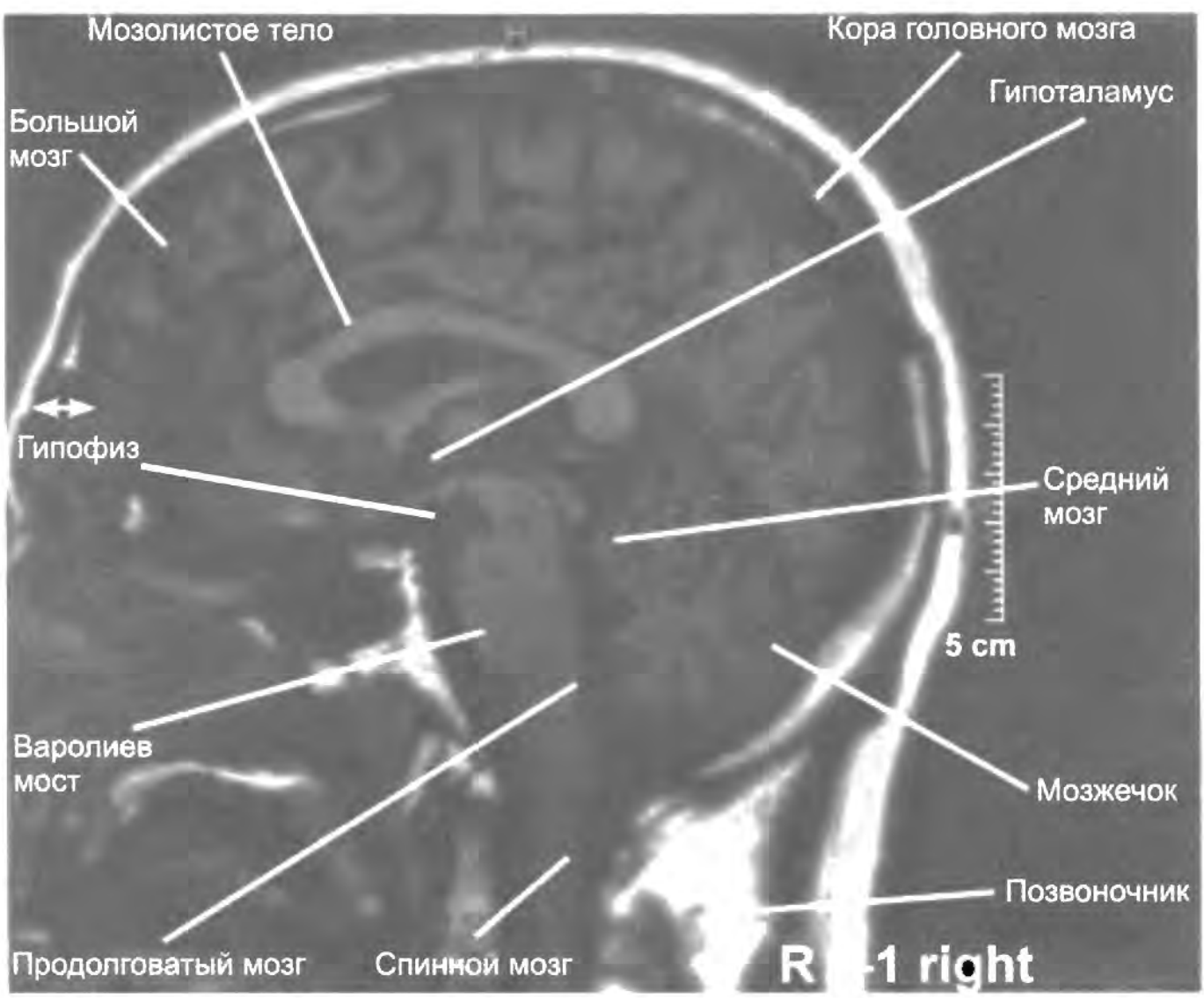


Рис. 13.11. Изображение вертикального сечения головы человека, полученное методом ЯМР. Основные отделы идентифицированы и обозначены, а другие, такие как гипофиз и гипоталамус, лишь слабо просматриваются. Данный рисунок — модифицированное изображение МРТ-скана, любезно предоставленного отделением радиологии госпиталя Stepping Hill, Стокпорт, графство Чешир

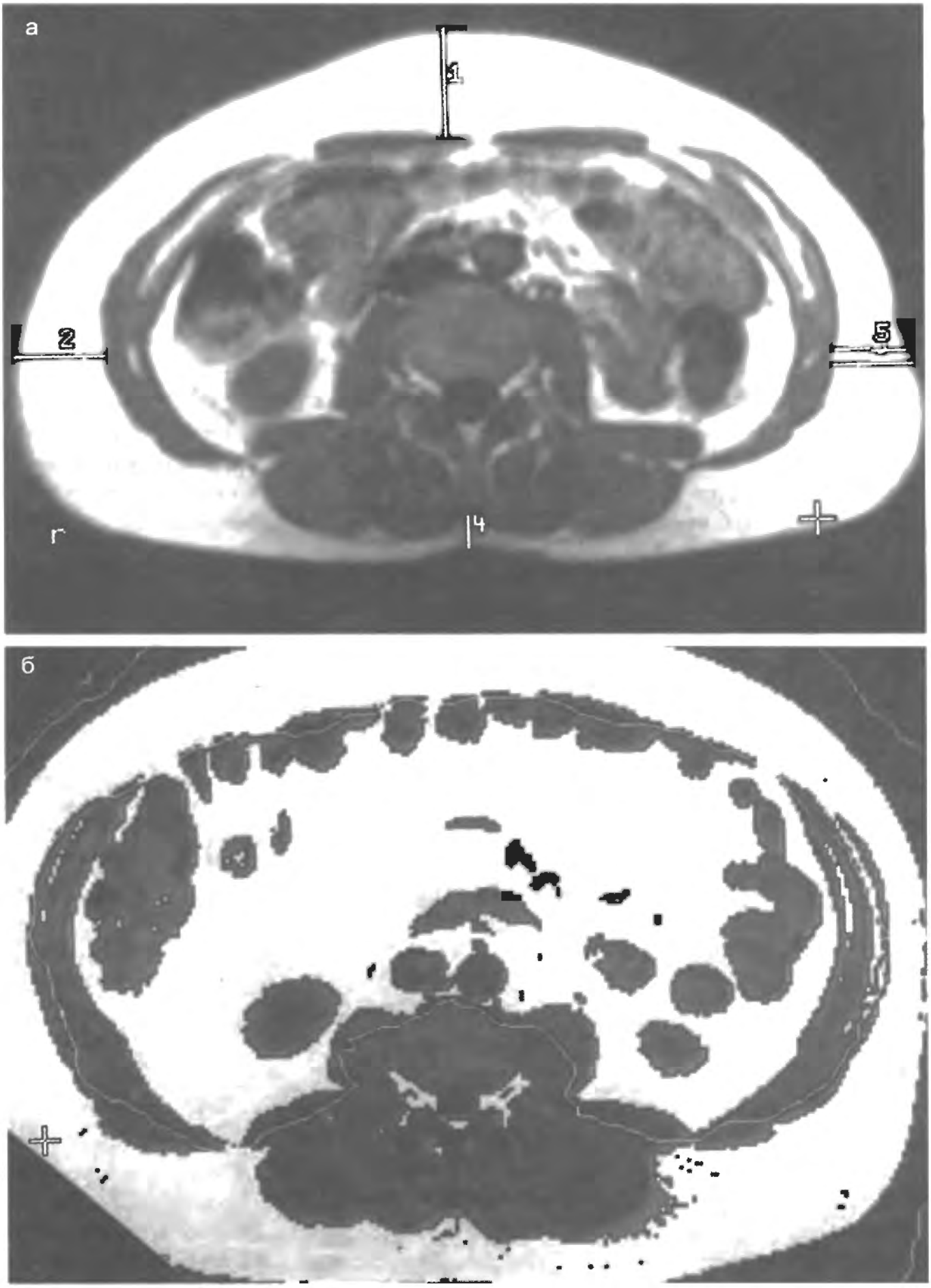


Рис. 13.12. МРТ-сканирование поперечного сечения (прилегающие срезы) брюшной полости полного и худого индивидов. Отложения жира выглядят как обширные белые области: резонанс связан с протонами метиленовых групп длинноцепочечных жирных кислот. Фотографии воспроизводятся с любезного разрешения научной группы по изучению метаболизма липидов в отделении клинической медицины в Наффилде, Университет Оксфорда

дольной релаксации (время T_1), обычно не изменяется по одной экспоненте. Поперечная релаксация следует по крайней мере двум экспоненциальным законам, а время T_2 составляет обычно от 20 до 100 мс. Время T_1 обычно в пределах 100–500 мс. Для чистой воды соответствующие величины существенно выше; различие, по всей вероятности, возникает из-за присутствия в тканевом окружении различных гидрофобных макромолекул. Более того, в случае опухоли значение T_1 возрастает по сравнению с нормой; однако в опухолях человека увеличение менее выражено, чем в культуре опухолевых клеток. Недостаток метода заключается в перекрывании значений параметров; кроме того, увеличение T_1 наблюдается не только при опухолевых заболеваниях, но и в нормальных быстро регенерирующихся тканях. Следует также учитывать другие параметры ЯМР и возможности дифференциальной диагностики. При постановке диагноза радиолог, изучающий изображение, должен обращать внимание на форму, размер и локализацию исследуемого органа.

В настоящее время возможности метода ЯМР очень широки, что связано с применением различных импульсных последовательностей, протоколов сканирования, измерением химического сдвига или времени релаксации. Создаются трехмерные изображения или изображения прилегающих срезов как всего тела, так и отдельных органов — головы, грудной клетки, брюшной полости, печени, поджелудочной железы, почек и костно-мышечной системы. С помощью контрастных веществ можно контролировать работу органов, например функции почек, если контрастное вещество попадает в мочу. Если такое вещество вводить в вену, то можно анализировать кровоток, тканевую перфузию и проницаемость барьера кровь/головной мозг и обнаружить возможные нарушения в работе сосудистой системы. Контрастные агенты для МРТ должны обладать парамагнитными свойствами. Понятно, что как и в других инвазивных методах диагностики, они должны быть нетоксичными.

ЯМР и связанный с ним метод визуализации МРТ предлагают аналитикам и клиницистам большой спектр возможностей. Обе области применения методов продолжают постоянно развиваться. Понятно, что любой метод анализа сопряжен с определенной опасностью, однако, насколько известно в настоящее время, метод ЯМР относительно безопасен, в частности он не связан с ионизирующим излучением.

13.5 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

EVANS, J.N.S. (1995) *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, Oxford. Книга содержит несколько превосходных глав, посвященных применению ЯМР для изучения ферментов.

REID, D.G. (1997) *Protein NMR Techniques*. Humana Press, Totowa, NJ. Несколько хороших примеров применения одномерного и многомерного ЯМР для анализа белков.

Глава 14
Радиоизотопные методы

14.1 ПРИРОДА РАДИОАКТИВНОСТИ

14.1.1 Строение атома

Атом состоит из положительно заряженного ядра и окружающих его отрицательно заряженных электронов (так называемое электронное облако). Масса атома сконцентрирована в ядре, хотя на ядро приходится только небольшая часть общего объема атома. Ядро атома состоит из частиц двух видов — **протонов** и **нейтронов**. Протоны — положительно заряженные частицы с массой в ~ 1850 раз больше, чем масса электрона. Число электронов в атоме равно числу протонов в ядре, поскольку атом в целом нейтрален; это число совпадает с **атомным номером** (Z) в Периодической системе. Нейтроны — незаряженные частицы с массой, приблизительно равной массе протона. Сумма всех протонов и нейтронов в ядре называется **массовым числом атома (элемента)** (A):

$$A = Z + N$$

где N — число нейтронов.

Число нейтронов в ядре не связано с атомным номером, и оно не влияет на химические свойства атома. Атомы данного элемента могут содержать разное число нейтронов. Атомы одного и того же элемента, имеющие различную массу (число протонов одинаково, но число нейтронов разное), называются **изотопами**. Чтобы различить изотопы, слева при символе элемента в нижнем индексе записывают номер элемента в Периодической системе, а в верхнем индексе массовое число. Например:

Изотопы углерода ${}^{12}_{6}C$ ${}^{14}_{6}C$ *Изотопы кислорода* ${}^{16}_{8}O$ ${}^{18}_{8}O$

Однако обычно указывают только массовое число изотопа (например, ^{14}C). Число изотопов у разных элементов варьирует: у водорода есть три изотопа ^{1}H, ^{2}H и ^{3}H, у углерода — семь изотопов (от ^{10}C до ^{16}C) и у некоторых элементов с большим атомным номером — 20 или более.

14.1.2 Устойчивость атомных ядер и радиоактивность

Как правило, от отношения числа нейтронов к числу протонов в ядре атома зависит стабильность изотопа, т. е. отсутствие у него самопроизвольного радиоактивного распада. Стабильные изотопы элементов с малыми атомными номерами обычно содержат равное число нейтронов и протонов, а у элементов с большими атомными номерами отношение числа нейтронов к числу протонов >1; среди изотопов этих элементов как раз и встречаются нестабильные изотопы (у тяжелых элементов все изотопы нестабильные). Некоторые нестабильные изотопы — радиоизотопы (или радионуклиды) получают искусственно, но многие нестабильные изотопы встречаются в природе. Радиоизотопы испускают частицы и/или электромагнитное излучение разной энергии, при этом происходят изменения состава атомного ядра. Эти процессы называются **радиоактивным распадом** и могут происходить самопроизвольно; конечный результат радиоактивного распада — получении стабильного изотопа.

14.1.3 Виды радиоактивного излучения

Существует несколько типов радиоактивного распада; ниже рассматриваются только те из них, которые имеют непосредственное отношение к биохимии. В табл. 14.1 представлены их основные характеристики.

Распад с испусканием электронов

При этом распаде нейтрон превращается в протон с испусканием отрицательно заряженной **бета** (β) **частицы** — негатрона* (β^-):

нейтрон → протон + негатрон

Термин «негатрон» подчеркивает ядерное происхождение частицы, но используется редко (негатрон по сути своей представляет собой **электрон**).

Таблица 14.1. **Свойства различных видов радиоактивного излучения**

Альфа-излучение	Бета-излучение	Гамма-излучение (Х-лучи) и тормозное излучение
Тяжелые заряженные частицы	Легкие заряженные частицы	Электромагнитное (эм) излучение
Более токсично, чем другие виды радиации	Токсичность на единицу энергии такая же, как и для электромагнитного излучения	Токсичность на единицу энергии такая же, как и для бета-излучения
Проникающая способность очень низкая	Проникающая способность зависит от источника	Высокопроникающее излучение

* Это устаревший, неукоренившийся термин. Мы в дальнейшем будем использовать термин «электрон». — *Прим. перев.*

В результате испускания электрона (негатрона) ядро теряет нейтрон, но приобретает протон, следовательно N уменьшается на 1, а Z увеличивается на 1, масса A остается постоянной. В биологических исследованиях наиболее часто используется изотоп ^{14}C, распад которого происходит с испусканием электронов.

$$^{14}_{6}C \rightarrow {}^{14}_{7}N + e^-$$

Радиоактивный распад с испусканием электронов имеет важное значение в биохимической практике, поскольку именно так распадаются радионуклеотиды, используемые обычно в качестве радиоактивных (изотопных) меток в органических молекулах. Примеры изотопных меток: ^{3}H и ^{14}C — для мечения любых органических структур, ^{35}S — для мечения метионина, например при изучении синтеза белка, ^{32}P — мощный инструмент молекулярной биологии для мечения нуклеиновых кислот.

Распад с испусканием позитрона

Некоторые изотопы при распаде испускают положительно заряженные β-частицы, называемые **позитронами** (β^+). Этот распад происходит, когда протон превращается в нейтрон:

протон → нейтрон + позитрон

Позитроны очень нестабильны и существуют только непродолжительное время. После того как они растратили свою энергию, они взаимодействуют с электронами и исчезают. Масса и энергия этих двух частиц (позитрона и электрона) превращаются в два γ-луча, испускаемых под углом 180° друг к другу.

В результате испускания (эмиссии) позитрона ядро теряет протон и приобретает нейтрон, отношение N/Z увеличивается, Z уменьшается на 1 и A остается постоянным. ^{22}Na — пример изотопа, распадающегося с эмиссией позитрона:

$$^{22}_{11}Na \rightarrow {}^{22}_{10}Ne + \beta^+$$

Излучатели позитронов детектируют с помощью тех же самых приборов, что и прямую γ-радиацию. Эти же детекторы применяются и в медико-биологических исследованиях, например при сканировании мозга методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) для определения активных и неактивных областей мозга.

Распад с испусканием альфа-частиц

Изотопы с большими атомными номерами часто претерпевают распад, испуская **альфа** (α) **частицы**. α-Частица представляет собой ядро гелия; она состоит из двух протонов и двух нейтронов ($^{4}He^{2+}$). Испускание α-частиц приводит к значительному уменьшению массы ядра: атомный номер уменьшается на 2 и массовое число на 4. Изотопы, которые распадаются с α-эмиссией, редко встречаются в биологических исследованиях. Радий-226 (^{226}Ra) распадается с испусканием α-частиц до радона-222 (^{222}Rn), который

также радиоактивен. Распад радия-226 в конечном итоге завершается образованием стабильного (нерадиоактивного) ^{206}Pb:

$$^{226}_{88}Ra \rightarrow {}^{4}_{2}He^{2+} + {}^{222}_{86}Rn \rightarrow \rightarrow \rightarrow {}^{206}_{82}Pb$$

Из-за большой массы и ионизирующей способности α-частиц α-излучатели очень токсичны.

Захват электрона

В этом механизме радиоактивного распада протон захватывает электрон вблизи ядра (из К-оболочки):

протон + электрон → нейтрон + рентгеновские лучи

Протон превращается в нейтрон, и выделяется электромагнитая радиация (рентгеновские лучи). Например:

$$^{125}_{53}I \rightarrow {}^{125}_{52}Te + \text{рентгеновское излучение}$$

Распад с испусканием гамма-лучей

В отличие от α- и β-частиц **γ-лучи** представляет собой электромагнитное излучение, подобное рентгеновским лучам, но с более короткой длиной волны. γ-Лучи имеют ядерную природу (в отличие от рентгеновских лучей, которые испускаются вследствие возбуждения электронов) и часто сопровождают эмиссию α- и β-частиц. Испускание γ-радиации не приводит к изменению номера или массы атома.

Гамма-радиация имеет низкую ионизирующую способность, но высокую проникающую способность, например γ-излучение ^{60}Co проникает через слой стали толщиной 15 см. Токсичность гамма-радиации близка к токсичности рентгеновского излучения.

Например:

$$^{133}_{53}I \rightarrow {}^{131}_{54}Xe + \beta^{-} + \gamma$$

14.1.4 Энергия радиоактивного распада

Единицей энергии радиоактивного распада является **электрон-вольт**. 1 эВ (*англ.* eV) представляет собой энергию, приобретенную одним электроном при его ускорении в электростатическом поле с разностью потенциалов в 1 В, 1 эВ = $1{,}6 \cdot 10^{-19}$ Дж. Большинство изотопов имеют энергию радиоактивного распада порядка мегаэлектрон-вольт (МэВ, MeV). Изотопы, испускающие α-частицы, обычно обладают энергией 4,0–8,0 МэВ, тогда как β- и γ-излучатели, как правило, обладают энергиями распада менее чем 3,0 МэВ.

14.1.5 Скорость радиоактивного распада

Радиоактивный распад представляет собой спонтанный (самопроизвольный) процесс; он происходит с определенной скоростью, характерной для данного источника радиоактивности. Скорость радиоактивного распада

изменяется по экспоненциальному закону. Таким образом, число атомов, распадающихся в единицу времени, пропорционально числу атомов N в момент времени t. Математически экспоненциальная кривая (рис. 14.1) описывается уравнением:

$$-\frac{dN}{dt} \propto N$$

или

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \qquad (14.1)$$

где λ — **постоянная радиоактивного распада** — характеристический параметр изотопа, определяемый как доля атомов, распадающихся в единицу времени (t^{-1}). Интегрируя уравнение 14.1, можно перевести его в логарифмическую форму:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -\lambda t \qquad (14.2)$$

где N_t — число радиоактивных атомов в данное время t, N_0 — число первоначально взятых радиоактивных атомов. На практике удобнее выражать постоянную распада через **период полураспада** ($t_{1/2}$) — время, в течение которого радиоактивность уменьшается вдвое (рис. 14.1). Если N_t в уравнении 14.2 равно $\frac{1}{2}N_0$, то t равно периоду полураспада изотопа. Таким образом:

$$\ln \frac{1}{2} = -\lambda t_{1/2} \qquad (14.3)$$

$$\text{или } 2{,}303 \lg (1/2) = -\lambda t_{1/2} \qquad (14.4)$$

$$\text{или } t_{1/2} = 0{,}693/\lambda \qquad (14.5)$$

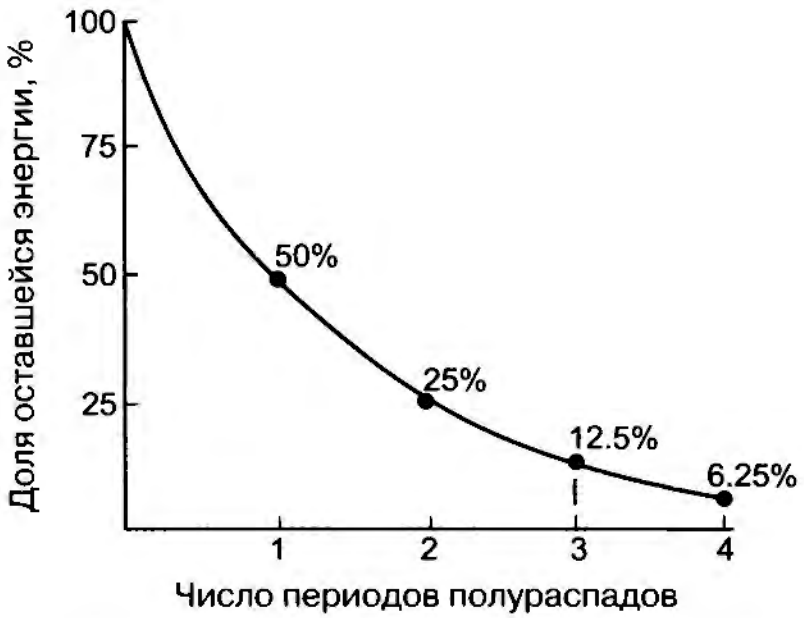


Рис. 14.1. График, демонстрирующий экспоненциальный закон радиоактивного распада

Период полураспада $t_{1/2}$, например, свинца-204 (^{204}Pb) составляет 10^{19} лет, полония-212 (^{212}Po) — $3 \cdot 10^{-7}$ с. Периоды полураспадов некоторых изотопов, часто используемых в биологических исследованиях, даны в табл. 14.2. Заметьте, что два важных элемента кислород и азот отсутствуют в этой таблице, поскольку для большинства биологических исследований радиоактивные изотопы этих элементов имеют слишком короткий период полураспада (^{15}O $t_{1/2}$ 2,03 мин, ^{13}N $t_{1/2}$ 10,00 мин). Преимущества и неудобства работы с короткоживущими изотопами представлены в табл. 14.3.

ПРИМЕР 1 ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРИОДА ПОЛУРАСПАДА В РАСЧЕТАХ

Вопрос $\ln(N_t/N_0) = -\lambda t$. Период полураспада ^{32}P составляет 14,2 сут. За какое время радиоактивность раствора ^{32}P уменьшится от 42 000 расп./мин до 500 расп./мин?

Ответ Используем уравнение 14.5 для того, чтобы рассчитать λ. Получаем $\lambda = 0{,}0488$ сут$^{-1}$. Затем из уравнения 14.2 находим время, необходимое для заданного уменьшения радиоактивности: $N_0 = 42\,000$ и $N_t = 500$, отсюда $t = 90{,}8$ сут.

Таблица 14.2. **Периоды полураспада некоторых изотопов, используемых в биологических исследованиях**

Изотоп	Период полураспада	Изотоп	Период полураспада
^{3}H	12,26 лет	^{42}K	12,40 ч
^{14}C	5760 лет	^{45}Ca	165 сут
^{22}Na	2,58 лет	^{59}Fe	45 сут
^{32}P	14,20 сут	^{125}I	60 сут
^{33}P	25,4 сут	^{131}I	8,05 сут
^{35}S	87,20 сут	^{135}I	9,7 ч

Таблица 14.3. **Преимущества и недостатки работы с короткоживущими изотопами**

Преимущества	Недостатки
Высокая удельная активность (см. разд. 14.3.4) делает эксперимент более чувствительным	Планирование эксперимента на длительное время затруднено распадом изотопа во время эксперимента
Более легкий и дешевый способ утилизации	Высокие затраты на дальнейшие эксперименты из-за необходимости обновления запасов изотопа
Низкие дозы (важно, например, в клинической диагностике)	Необходимость постоянного контроля оставшейся активности с целью оценки ее достаточности

14.1.6 Единицы радиоактивности

В Международной системе единиц (СИ) в качестве единицы радиоактивности используется беккерель (Бк). 1 Бк определяется как один распад за секунду (1 расп./с). Однако известна также старая внесистемная, но часто используемая единица — кюри (Ки). 1 Ки определяется как количество радиоактивного материала, в котором число распадов в секунду равно таковому для 1 г радия, а именно $3{,}7 \cdot 10^{10}$ расп./с (или 37 гигабеккерель, ГБк, см. табл. 14.10). Для биологических задач эта единица слишком большая, поэтому используют микрокюри (мкКи) и милликюри (мКи). Важно отметить, что кюри характеризует действительное число распадов в образце, а не распады, регистрируемые счетчиком радиоактивности, который, как правило, считает только часть происходящих распадов и измеряет их в импульсах в минуту или секунду (имп./мин, имп./с).

Обычно в экспериментах с радиоизотопами используют носитель — стабильный изотоп этого же элемента. Поэтому указывают удельную радиоактивность — количество радиоизотопа в единице массы радиоактивного образца. Удельная радиоактивность может быть выражена различными способами: через скорость распада (расп./мин, расп./с), число импульсов (имп./мин, имп./с) или в кюри (мКи или мкКи) в единице массы или как количество радиоактивного изотопа в смеси (в молях или граммах). Известен также другой способ выражения удельной радиоактивности, не так часто применяемый, когда указывают число радиоактивных атомов на 100 атомов вещества. В табл. 14.10 приведены единицы и определения, часто используемые в радиобиологии.

14.1.7 Взаимодействие радиоактивного излучения с веществом. Ионизирующее излучение

α-Частицы

Все α-частицы данного изотопа обладают одинаковой (значительной) энергией (3–8 МэВ). α-Излучение реагирует с веществом двумя способами. Во-первых, они могут переводить атомы в возбужденное состояние. При этом энергия переносится от α-частицы к электронам соседних атомов, и такие электроны переходят на более высокие орбитали. α-Частица продолжает двигаться по своей траектории с энергией, немного меньшей, чем количество энергии, отданное орбитальному электрону. Со временем возбужденный электрон возвращается на свою исходную орбиталь, излучая энергию в виде фотонов света в видимой или близкой к видимой области. Во-вторых, α-частицы могут вызывать ионизацию атомов на своем пути. Когда это происходит, орбитальный электрон-мишень совсем выбивается из ядра, а атом превращается в ион и образует ионную пару, состоящую из положительно заряженного иона и электрона. α-Частицы из-за своих размеров, медленного движения и двукратного положительного заряда часто сталкиваются с атомами на своем пути. Поэтому они могут вызывать значительную ионизацию атома и возбуждение других электронов на своем пути, и их энергия быстро растрачивается. Таким

образом, несмотря на исходную высокую энергию, α-частицы обладают не очень большой проникающей способностью.

β-Частицы

По сравнению с α-частицами β-частицы (электроны) очень маленькие, движутся с высокой скоростью и несут единичный отрицательный заряд. Они взаимодействуют с веществом, вызывая ионизацию атома и возбуждение орбитальных электронов в атомах на своем пути точно так же, как и α-частицы. Однако из-за высокой скорости и малого размера электроны с меньшей вероятностью, чем α-частицы, способны взаимодействовать с веществом и поэтому это более слабое ионизирующее излучение с более высокой проникающей способностью, чем α-радиация. Другое различие между α-частицами и электронами состоит в том, что тогда как для данного α-излучателя все частицы обладают одинаковой энергией, β-излучение, а, значит, и β-излучатель характеризуется энергетическим спектром (см. рис. 14.5, *б*). Энергии E_{max} различных β-излучателей варьирует от 0,018 МэВ для ^{3}H до 4.81 МэВ для ^{38}Cl. От энергии излучения E_{max} зависит проникающая способность радиации: α-частицы из ^{3}H могут перемещаться по воздуху только на несколько миллиметров, тогда как из ^{32}P — на расстояние более 1 м. Характеристический энергетический спектр различных β-излучателей было объяснен в 1931 г., когда В. Паули постулировал, что при любом радиоактивном превращении энергия излучения E_{max} распределяется между двумя частицами — электроном и нейтрино. Энергия, поглощаемая электроном и нейтрино, различна при распаде различных изотопов. Нейтрино не имеют заряда, обладают незначительной массой и не взаимодействуют с веществом.

γ-Лучи и Х-лучи

Эти лучи (с этого момента для простоты и те, и другие мы будем называть γ-лучами) представляют собой электромагнитное излучение; они не несут заряда и не имеют массы. Они редко сталкиваются с соседними атомами и проходят большие расстояния до того, как растрачивают всю свою энергию (т. е. они обладают высокой проникающей способностью). Они взаимодействуют с веществом многими способами. Три наиболее важных способа взаимодействия с веществом приводят к образованию вторичных электронов, которые в свою очередь оказывают возбуждающее действие и вызывают ионизацию. При фотоэлектронном поглощении γ-лучи с низкой энергией взаимодействуют с орбитальными электронами, перенося всю свою энергию на электрон, который затем выталкивается как **фотоэлектрон**. Фотоэлектрон далее ведет себя полностью как электрон. В противоположность этому **рассеяние Комптона**, вызываемое γ-лучами со средним уровнем энергии, приводит к тому, что только часть энергии переносится на выбиваемый электрон-мишень. При этом γ-луч изменяет направление и далее при движении его энергия продолжает уменьшаться. Когда с ядром атома взаимодействуют γ-лучи с очень высокой энергией, вся энергия γ-лучей превращается в позитроны и электроны.

Когда в веществе атомы с большим атомным номером поглощают β-частицы с высокой энергией, они испускают вторичные Х-лучи (рентге-

новские лучи), называемые **тормозным излучением**. По этой причине средства защиты для работы с ^{32}P изготавливают из материалов, например, Perspex, содержащих элементы с малым атомным номером.

14.2 МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ И ИЗМЕРЕНИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ

Существует три общепринятых метода детектирования и количественного определения радиоактивности. Они основаны на ионизации газов, на возбуждении твердых или жидких веществ и на способности радиоактивности воздействовать на фотографическую эмульсию — метод авторадиографии.

14.2.1 Методы, основанные на ионизации газа

Влияние напряжения на ионизацию

По прохождении заряженной частицы в газе создается электростатическое поле, она выбивает орбитальные электроны из атомов вблизи ее траектории, что вызывает ионизацию (рис. 14.2). Способность индуцировать ионизацию уменьшается в ряду

$$\alpha > \beta > \gamma \qquad (10000 : 100 : 1)$$

Поэтому α- и β-частицы можно детектировать с помощью приборов, регистрирующих ионизацию газа, но эти приборы не могут измерять уровень γ-радиации. Если между двумя электродами, помещенными в специальную камеру, под действием радиоактивного излучения появляются ионы (т.е. происходит ионизация), между электродами течет электрический ток, величина этого тока связана с приложенным напряжением и числом α- и β-частиц, попавших в камеру (рис. 14.3). Рассмотрим теперь различные участки кривой, изображенной на рис. 14.3.

Итак, внутри **ионизационной камеры** каждая частица ионизирующего излучения производит только одну ионную пару за одно столкновение. Поэтому возникает небольшой электрический ток, который можно измерять с помощью очень чувствительных приборов. Эти измерения очень редко используется в количественных расчетах, но различные типы электроскопов, работающие на принципе ионизации, успешно применяются при демонстрации свойств радиоактивности. При более высоком напряжении, чем в простых ионизационных камерах, электроны, получающиеся при ионизации, движутся к аноду быстрее; соответственно они вызывают вторичную ионизацию газа в камере, производя вторичные электроны, которые вызывают дальнейшую ионизацию и т. д. Следовательно, анода достигает целый поток электронов. Возникающий эффект газового усиления известен как **лавина Таунсенда** — по имени его открывателя. Вследствие такого усиления электрический ток значительно увеличивается. Как можно видеть из рис. 14.3, в **пропорциональной области** число ионных пар прямопропорционально приложенному напряжению до тех пор, пока не будет достигнута определенное напряжение — плато. Перед плато нахо-

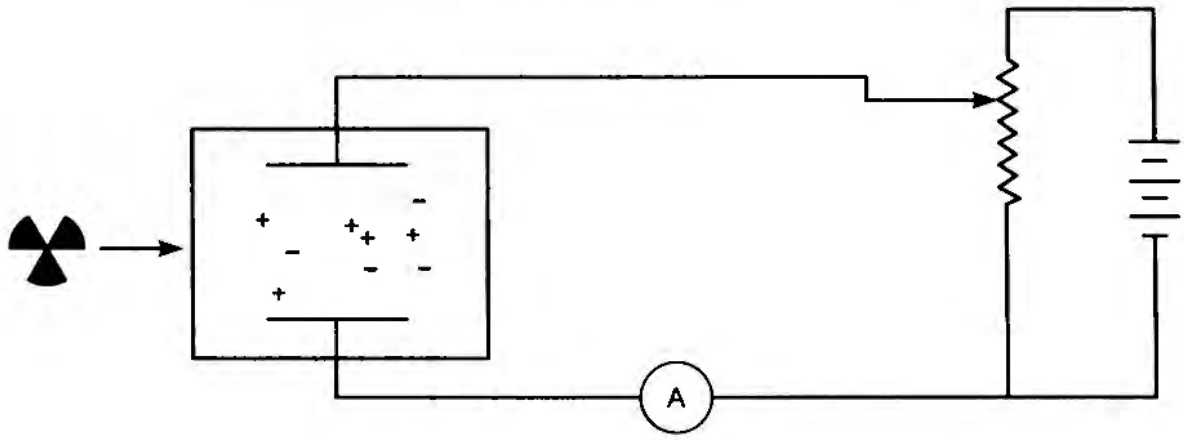


Рис. 14.2. Принципы работы счетчиков радиоактивности, основанных на ионизации газов

Рис. 14.3. Влияние напряжения на число импульсов

дится **область ограниченной пропорциональности**, которая нечасто используется в детекторах радиоактивности и количественном измерении радиоактивности и поэтому не будет здесь обсуждаться.

Основным недостатком счетчиков, изготавливаемых для работы в пропорциональной области, является то, что они нуждаются в очень стабильном источнике напряжения, так как небольшие флуктуации напряжения приводят к значительным изменениям амплификации. Пропорциональные счетчики особенно удобны для обнаружения и количественного определения изотопов, излучающих α-частицы, но необходимо отметить, что в биологических исследованиях используется относительно немного таких изотопов.

В **области Гейгера–Мюллера** все частицы ионизирующего излучения, включая β-частицы, вызывают полную ионизацию газа в камере. Таким образом, ток в счетчиках Гейгера–Мюллера не зависит от числа первичных ионов. Поэтому в этой области происходит максимальное усиление,

сила тока на выходе счетчика постоянна в большом диапазоне напряжения (так называемое **плато Гейгера–Мюллера**). В этих счетчиках измеряют число импульсов, а не интенсивность импульсов. Поэтому с помощью счетчиков Гейгера–Мюллера нельзя различить изотопы.

Поскольку для того, чтобы ионы достигли соответствующих электродов, требуется определенное время, другие ионизирующие частицы, входящие в трубку в это время, не производят ионизации и поэтому не регистрируются, т. е. уменьшается эффективность счета импульсов. Это время называют **мертвым временем** трубки, и оно составляет от 100 до 200 микросекунд. Когда ионы достигают электрода, они превращаются в нейтральные частицы. Неизбежно происходит некоторая потеря ионов, которые производят свою лавину ионизации. Таким образом, если не контролировать этот процесс, в трубке Гейгера–Мюллера будет происходить постоянный разряд. Чтобы преодолеть это, в трубку добавляют подходящий газ, поглощающий энергию ионизации. Наиболее распространенными гасящими агентами являются этанол, этилформиат и галогены.

Пример 2 **ВЛИЯНИЕ МЕРТВОГО ВРЕМЕНИ СЧЕТЧИКА**

Вопрос Повысится ли эффективность счета в счетчике Гейгера–Мюллера, если увеличится скорость распада?

Ответ Эффективность будет падать, поскольку повысится вероятность того, что две или более β-частиц входят в трубку в период мертвого времени.

Оборудование

Счетчики, основанные на газовой ионизации, раньше очень широко применялись для количественного определения радиоизотопов в биологических образцах. В настоящее время эту задачу решают с помощью **сцинтилляционных счетчиков** (разд. 14.2.2). Однако все лаборатории используют маленькие ручные мониторы радиоактивности, основанные на газовой ионизации, наиболее популярен торцевой счетчик (рис. 14.4). Эти счетчики имеют тонкий торец, сделанный из алюминия, и могут определять β-радиацию из эмиттеров с высокой (^{32}P) и со слабой (^{14}C) энергиями, но неспособны детектировать ^{3}H, поскольку его излучение не может проникать через торец. По тем же причинам они не очень эффективны как детекторы α-радиации.

Торцевые ионизационные счетчики используются при контроле радиоактивного загрязнения в лаборатории. Они также полезны в экспериментальных ситуациях, где, скорее, необходима информация о присутствии или отсутствии радиоактивности, чем о ее абсолютном количестве, например для быстрой проверки радиоактивных гелей до авторадиографии или хроматографических фракций на присутствие меченых компонентов.

Неспособность торцевых счетчиков детектировать слабое β-излучение не позволяет обеспечить радиоактивный контроль в лаборатории, где работают с ^{3}H. Для этих целей можно применять так называемый безоконный счетчик, где используется поток газа. Однако такие инструменты

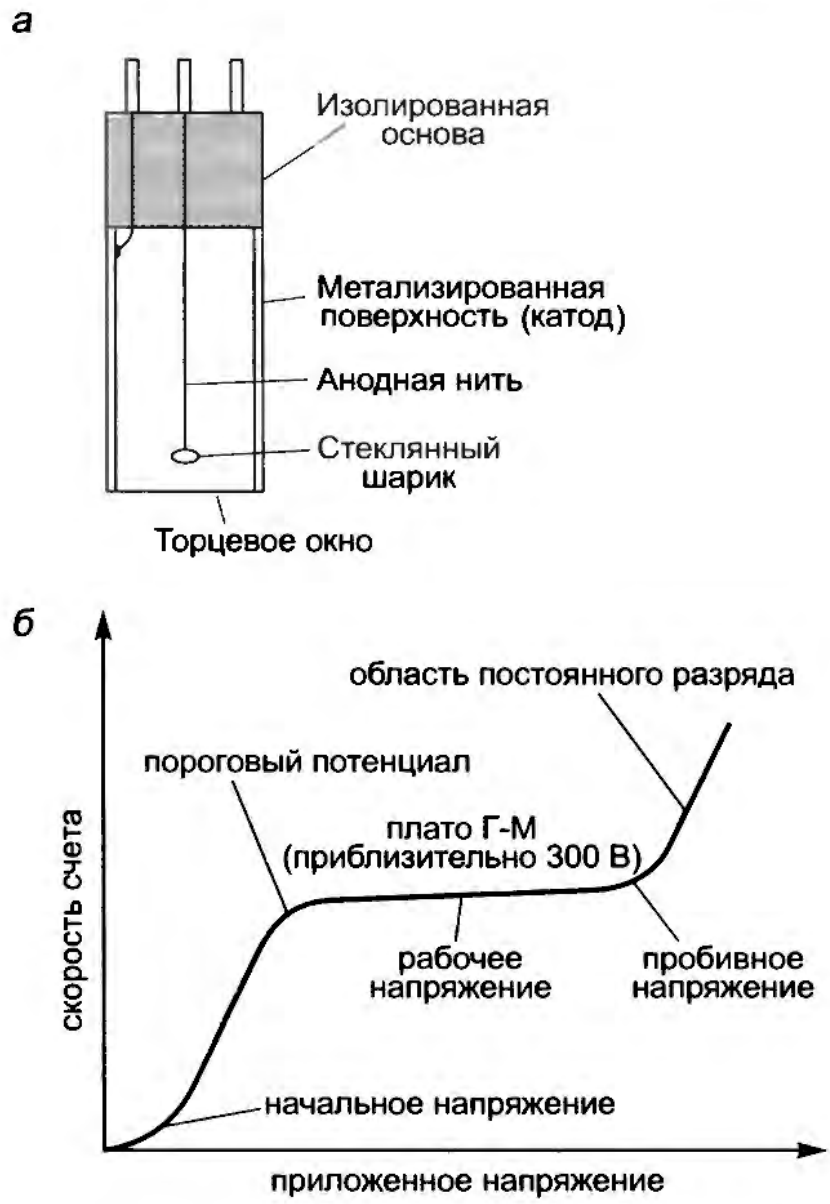


Рис. 14.4. Трубка Гейгера–Мюллера (Г-М) (*а*) и влияние приложенного напряжения на скорость распада (*б*)

громоздки и должны передвигаться вокруг объекта на специальной подставке, напоминающей тележку для гольфа. Они пригодны для массового скрининга помещений в случае загрязнения ^{3}H, но редко используются в рутинных целях. В большинстве лабораторий конроль загрязнений ^{3}H осуществляют с помощью ватного тампона, которым протирают различные поверхности, а затем в сцинтилляционном счетчике определяют наличие на нем радиоактивности.

14.2.2 Методы, основанные на возбуждении электронов в атомах

Как изложено в разд. 14.1.7, радиоактивные изотопы взаимодействуют с веществом, во-первых, вызывая ионизацию, которая лежит в основе работы счетчика Гейгера–Мюллера, и, во-вторых, возбуждая электроны в атомах. Возбужденное атомы могут испускать фотоны света (флуоресцирующий агент), их флуоресценцию можно измерить количественно. Флуоресценцию под действием радиоактивного излучения называют также **сцинтилляцией**; это физическое явление лежит в основе работы сцинтилляцион-

ного счетчика (световой сигнал усиливается с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ)). Электрический импульс, возникающий в ФЭУ при превращении энергии света в электрическую энергию, прямопропорционален энергии исходного радиоактивного излучения. Это имеет большое значение — можно обнаруживать и количественно определять сразу два или несколько изотопов в одном образце при условии, что энергетические спектры излучения этих изотопов значительно различаются (см. ниже). Принцип работы ФЭУ показан на рис. 14.5.

Итак, сцинтилляционный счетчик позволяет получать количественные и качественные данных.

- *Количественные данные* — число вспышек, пропорциональное скорости радиоактивного распада в образце, т. е. его радиоактивности.
- *Качественные данные* связаны с интенсивностью испускаемого излучения, при этом сигналы ФЭУ пропорциональны энергии радиации.

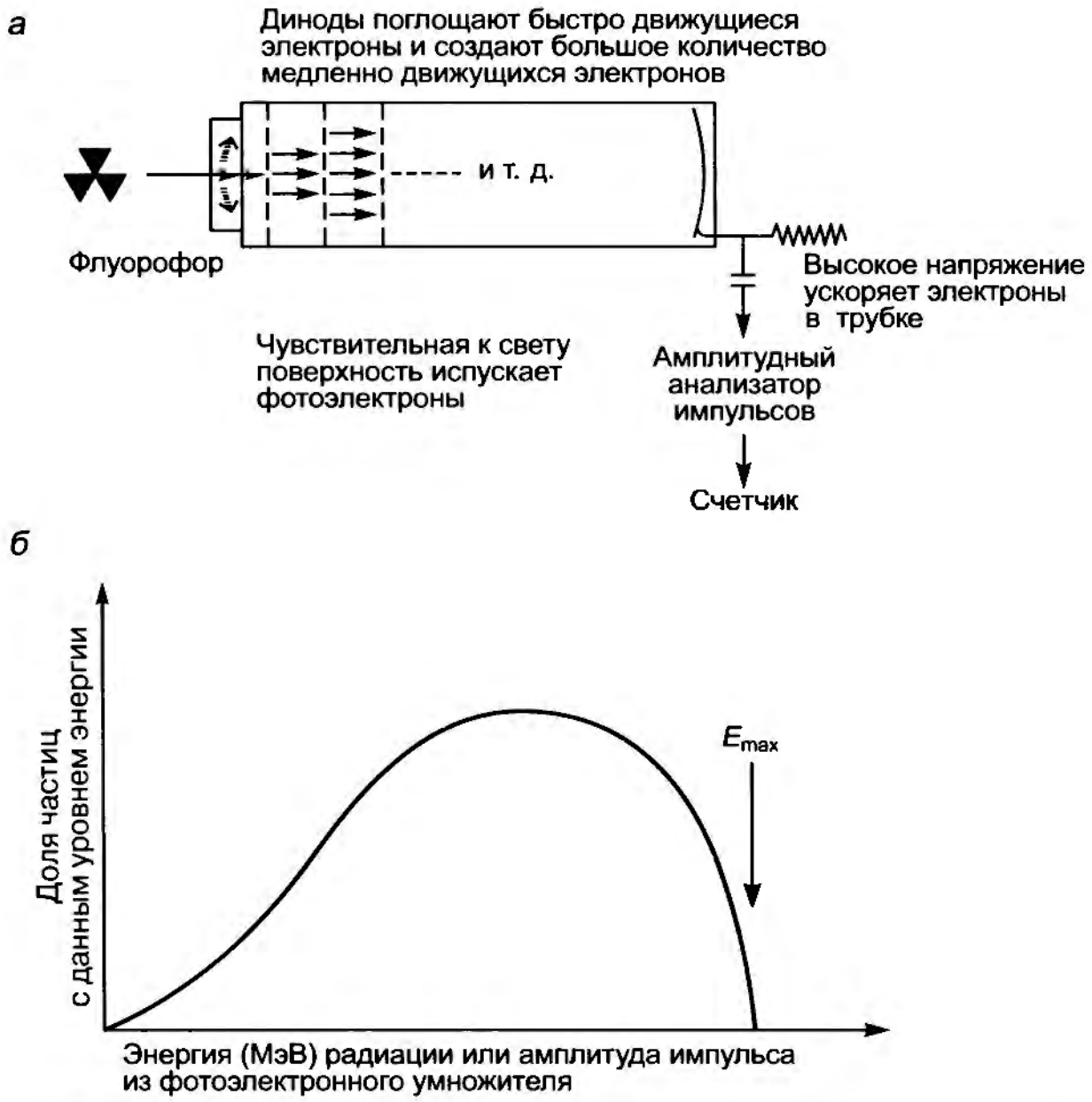


Рис. 14.5. Принцип работы фотоэлектронного умножителя (*а*) и энергетический спектр типичного β-излучателя (*б*)

Типы сцинтилляционных счетчиков

Существует два типа сцинтилляционных счетчиков, схематично изображенных на рис. 14.6. В **твердотельном сцинтилляционном счетчике** флакон с образцом помещают вблизи кристаллов флуоресцентного материала. В детекторах γ-излучения обычно используются кристаллический иодид натрия, тогда как для α-эмиттеров предпочтительны кристаллы сульфида цинка, а для β-излучателей используются органические сцинтилляторы, например антрацен. Кристаллы помещают вблизи ФЭУ, который соединен с источником высокого напряжения и с скейлером (преобразователем масштаба). Твердотельный сцинтилляционный счетчик особенно удобен для анализа γ-излучающих изотопов. Как объяснялось в разд. 14.1.7, γ-лучи имеют электромагнитную природу и, проходя через вещество, они слабо взаимодействуют с атомами, почти не вызывая ионизации и не возбуждая орбитальные электроны в атомах. Понятно, что в кристалле атомы плотно упакованы, что делает взаимодействие с излучением более вероятным. И наоборот, такие сцинтилляционные счетчики не подходят для регистрации слабых β-излучающих изотопов, таких как ^{3}H и ^{14}C, поскольку излучаемые этими изотопами электроны даже с высокой энергией вряд ли будут иметь энергию, достаточную для того, чтобы проникать через стенки флаконов, в которые помещены образцы. Так как в радиоиммуноанализе (разд. 7.7) используются в основном γ-излучающие изотопы, в биологических лабораториях чаще всего работают с твердотельными сцинтилляционными счетчиками.

В **жидкостных сцинтилляционных счетчиках** (рис. 14.6, *б*) образец смешивается со сцинтилляционным «коктейлем», содержащим растворитель и одно или несколько флуоресцирующих веществ. Этот метод особенно удобен при счете слабых β-эмиттеров, таких как ^{3}H, ^{14}C и ^{35}S — обычных меток при биологических исследованиях. Эти изотопы обычно

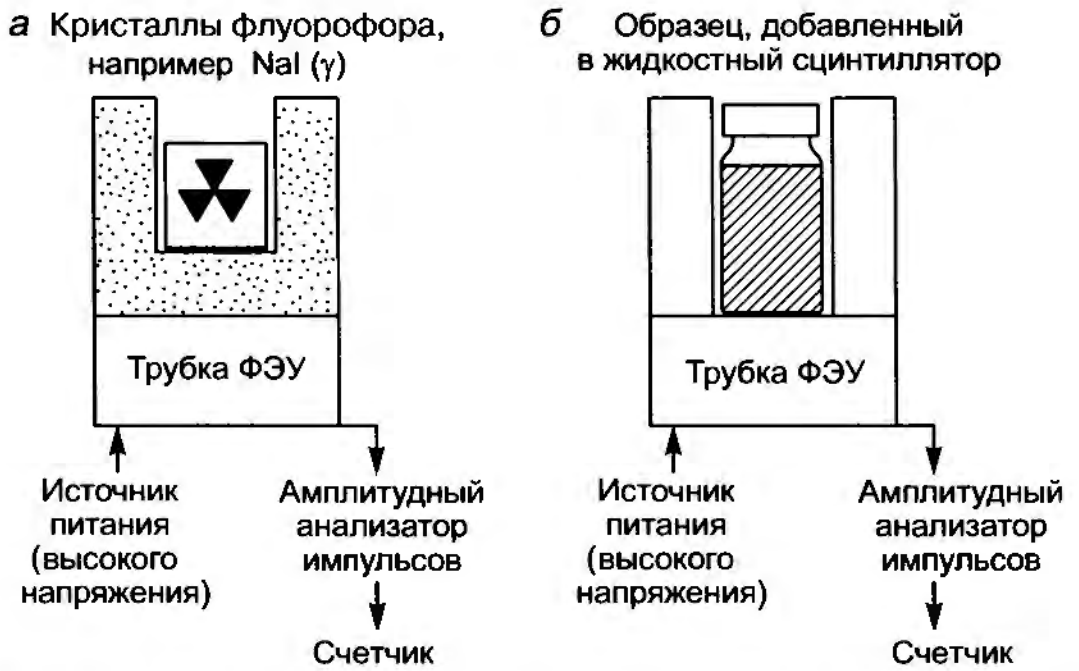


Рис. 14.6. Схема твердотельного (*а*) и жидкостного (*б*) сцинтилляционных счетчиков

анализируют именно с помощью жидких сцинтилляторов. Таким образом, далее изложение касается именно этого метода (многое из изложенного ниже применимо равным образом к твердым сцинтилляционным счетчикам, используемым для количественого анализа γ-эмиттеров).

Перенос энергии в жидкостном сцинтилляционном счетчике

Лишь немногие органические растворители флуоресцируют при бомбардировании радиоактивными частицами. Испускаемое излучение является коротковолновым (рис. 14.7) и не детектируется эффективно многими ФЭУ. Однако если приготовить раствор вещества, которое может принять энергию от растворителя и флуоресцировать на более длинных волнах, то детекция происходит с высокой эффективностью. Такое вещество называют **первичным флуоресцирующим агентом**; чаще всего используют 2,5-дифенилоксазол (PPO). К сожалению, свет, излучаемый PPO, не всегда детектируется с хорошей эффективностью (в зависимости от ФЭУ), но эту проблему можно преодолеть, добавляя вторичный флуоресцирующий агент, или «переключатель волны», например 1,4-бис(5-фенилоксазол-2-ил) бензол (POPOP). Таким образом начинается процесс переноса энергии.

Естественно, возникает вопрос, зачем необходимы первичный и вторичный флуоресцирующие агенты, если только вторичный излучает свет на

Рис. 14.7. Спектр излучения различных флуорофоров и чувствительность трубок ФЭУ

лучшей для детектирования длине волны. Ответ прост: растворитель не может переносить свою энергию прямо на вторичный флуорофор.

Самыми первыми флуорофорами в жидкостных сцинтилляционных счетчиках были PPO и POPOP, которые широко используются и до сих пор. Однако самый хороший первичный флуорофор — 2-(4'-*трет*-бутилфенил)-5-(4"-бифенилил)-1,3,4-оксадиазол (BUTYL-PBD) — имеет высокую стоимость, кроме того он чувствителен к экстремальным значениям pH.

Многие лаборатории в настоящее время покупают готовые сцинтилляционные смеси, которых на рынке очень много. Конкуренция между производителями этих смесей и возрастающая осведомленность покупателей о риске для здоровья и технике безопасности привели к тому, что сцинтилляционные коктейли постепенно становятся менее токсичными и менее пожароопасными. И последнее: некоторые коктейли (как это было только что описано) разработаны для органических образцов, тогда как другие — для водных сред (такие смеси имеют в своем составе эмульгатор, например детергент тритон X-100); важно, чтобы используемый состав коктейля подходил для данного исследования.

Преимущества сцинтилляционных счетчиков

Тот факт, что сцинтилляционные счетчики широко используются при биологических исследованиях, указывает на то, что они имеют определенные преимущества по сравнению со счетчиками, основанным на газовой ионизации.

- Быстрота распада флуоресценции (10^{-9} с) по сравнению с мертвым временем для счетчика Гейгера–Мюллера (10^{-4} с) означает возможность регистрации более высокой скорости распада.
- Гораздо более высокая эффективность регистрации импульсов, особенно для β-излучателей с низкой энергией; эффективность счета сцинтилляционным счетчиком более 50%, а для излучателей с высокой энергией доходит до 90%. Это объясняется отчасти тем, что электроны не должны перемещаться по воздуху или проникать через торцевое окно трубки Гейгера–Мюллера (таким образом растрачивая большую часть энергии до начала ионизации), но взаимодействуют непосредственно с флуорофором; следовательно, до начала счета потери энергии минимальны.
- Возможность анализировать образцы любого типа, включая жидкости, твердые вещества, суспензии и гели.
- Как правило, легкость приготовления образцов (см. ниже).
- Возможность проводить анализ разных изотопов в одном образце, что означает, что могут выполняться эксперименты с **двойными метками**.
- Сцинтилляционные счетчики автоматизированы — можно проводить анализы сотен образцов в автоматическом режиме, а встроенные компьютерные устройства выполняют многие операции при обработке данных, например коррекцию эффективности, графопостроение, расчеты для радиоиммуноанализа и т. д.

Недостатки сцинтилляционных счетчиков

Изложив некоторые преимущества сцинтилляционных счетчиков, нельзя не указать недостатки этого метода. К счастью, большинство недостатков было преодолено при улучшении конструкции приборов.

- Стоимость анализа любого образца достаточно высокая. Однако другие факторы, включая чувствительность, легкость проведения анализа и точность, во многих случаях перевешивают этот недостаток.
- При высоком напряжении, приложенном к ФЭУ, в системе происходят электронные превращения, которые не зависят от радиоактивности, но вносят вклад в высокий фон при счете. Это явление называют фоновым шумом ФЭУ; шум может быть частично уменьшен путем охлаждения ФЭУ. Поскольку температура влияет на эффективность анализа, а при охлаждении осуществляется контроль температуры, это может быть полезным. Однако разработаны также ФЭУ с низким фоном, в которых большая температурная стабильность обеспечивается в системах без охлаждения. Использование анализатора амплитуды импульсов позволяет отфильтровывать большинство фоновых импульсов, имеющих низкую энергию. Недостатком такой системы является то, что при этом также отфильтровываются импульсы с низкой энергией, испускаемые изотопами с низкой энергией излучения (например, ^{3}H). В большинстве сцинтилляционных счетчиков другой способ уменьшения фона — **система синхронизации счета**. При этом используют два ФЭУ. Они устанавливаются таким образом, что только когда импульс генерируется одновременно в обеих трубках, он проходит к счетчику. Такой вариант более вероятен в случае импульса, генерируемого радиоактивным превращением, чем в случае фоновых импульсов, в так называемое **разрешающее время** системы, обычно ~20 нс. Как правило, в таких счетчиках фон ФЭУ понижается до очень низкого уровня.
- Самым большим недостатком сцинтилляционного счетчика является **тушение сигнала**. Оно происходит при наличии помех в процессе переноса энергии, описанном ранее. Корректировка тушения сильно повышает стоимость сцинтилляционного счетчика. Тушение может быть трех видов.
  - (а) **Оптическое тушение** возникает, если используют непригодные или грязные сцинтилляционные флаконы. Они абсорбируют часть испускаемого света до того, как он достигнет ФЭУ.
  - (б) **Цветовое тушение** возникает, если образец окрашен, и приводит к поглощению испускаемого света внутри сцинтилляционного коктейля до того, как он покинет флакон с образцом. Цветовое тушение можно уменьшить, как это описано ниже.
  - (в) **Химическое тушение** возникает, когда какой-то компонент образца мешает переносу энергии от растворителя к первичному флуорофору или от первичного ко вторичному флуорофору; это преодолеть трудно, и, например, в серии похожих образцов $^{14}CO_2$,

выделяющийся при метаболизме [^{14}C]глюкозы, и CO_2, поглощенный из воздуха щелочью, которую затем добавляют в сцинтилляционный коктейль для анализа, различаются незначительно по химическому тушению. В таких случаях лучше получать относительные результаты, сравнивая число распадов в минуту для различных образцов. Однако в большинстве биологических экспериментов с радиоизотопами однородность образцов маловероятна, и расчет относительных величин (по числу импульсов в минуту) дает неточные результаты. Вместо этого должен быть использован подходящий метод стандартизации. Он требует изучения эффективности счета импульсов по каждому образцу и преобразования числа импульсов в минуту в число распадов в минуту, как описано ниже. Следует отметить, что тушение не представляет собой такой большой проблемы для твердых сцинтилляционных счетчиков.

- **Хемилюминесценция** тоже может усложнить анализ с помощью жидких сцинтилляторов, так как приводит к химическим реакциям между компонентами образца и сцинтилляционного коктейля и к излучению света, не имеющего отношения к возбуждению растворителя и флуорофора радиоактивностью. Такие типы излучения обычно характеризуются низкой энергией; их можно устранить путем установки фильтра ФЭУ таким же способом, как при шуме. Когда хемилюминесценция все же мешает анализу, образец надо на время отстранить и, лишь когда хемилюминесценция закончится, начать регистрировать радиоактивность. Многие современные приборы способны детектировать хемилюминесценцию и вычитать или указывать ее вклад при выводе на печатное устройство.
- **Фосфолюминесценция** бывает вызвана самим образцом или чем-то, связанным с его приготовлением, включая сам флакон, и состоит в поглощении и повторном испускании света. Фосфолюминесценция, в отличие от хемилюминесценции, может возникать даже при экспонировании образца на свету. Образцы, содержащие пигмент, фосфоресцируют чаще остальных. Если фосфолюминесценция мешает анализу, образцы до начала счета числа импульсов следует сохранять в темноте, и во время счета кювета с образцом должна быть закрыта.

Несмотря на все описанные выше недостатки, сцинтилляционные счетчики считают универсальными приборами в биологических лабораториях, поскольку они имеют автоматические системы для вычисления эффективности определения числа импульсов. Другими словами, сам прибор выполняют все трудоемкие операции!

Использование сцинтилляционных счетчиков для образцов с двойной меткой

Особенность сцинтилляционного процесса заключается в том, что электрический импульс в ФЭУ обусловлен превращением световой энергии и связан с энергией исходного радиоактивного превращения. Поскольку у разных β-излучателей разные энергетические спектры, раздельное коли-

чественное определение двух изотопов в одном образце возможно при условии, что их энергетические спектры значительно различаются. Примерами таких изотопов являются ^{35}S, ^{3}H и ^{32}P, ^{14}C и ^{32}P, ^{35}S и ^{32}P. Принцип метода иллюстрирует рис. 14.8; видно, что спектры двух изотопов (S и T) перекрываются незначительно. С помощью анализатора амплитуды импульсов можно отфильтровывать все импульсы с энергией ниже порога X, все импульсы с энергией выше окна Y, а также импульсы ниже порога A и выше окна B и таким образом полностью разделить два изотопа. Анализатор амплитуды импульсов, установленный с порогом и окном для определенного изотопа, называется **каналом** (например, ^{3}H-канал).

Современные счетчики оснащены так называемыми многоканальными анализаторами, где электронные сигналы из ФЭУ преобразуются в цифровые сигналы. В этих приборах анализируется полный энергетический спектр. Это сильно облегчает одновременный анализ нескольких изотопов и, в частности, позволяет оценивать влияние тушения при анализе двух изотопов.

Метод двойного мечения используется при решении многих задач молекулярной биологии (например, гибридизация и транскрипция нуклеиновых кислот), при изучении метаболизма (например, синтеза стероидов) и разработке лекарств.

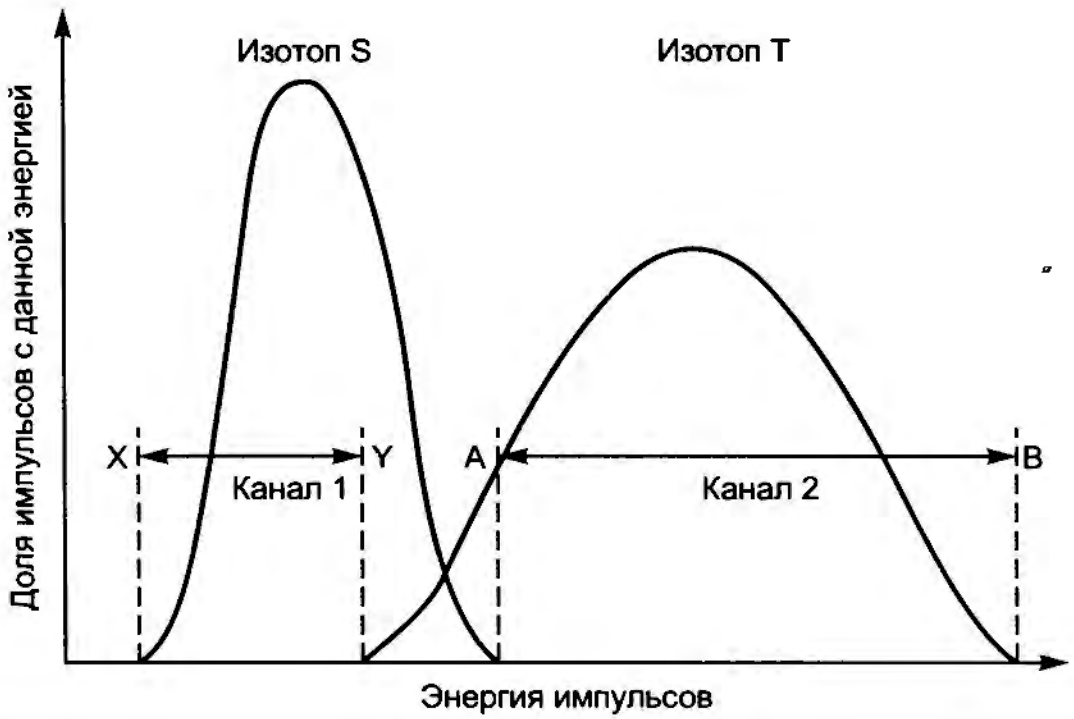


Рис. 14.8. Диаграмма, иллюстрирующая принцип анализа образцов с двойной меткой

Определение эффективности счета импульсов

Как отмечено выше, главной проблемой, с которой сталкиваются при использовании сцинтилляционных счетчиков, является тушение, которое делает необходимым экспериментальное определение эффективности подсчета числа импульсов в некоторых, если не во всех, образцах. Для этого можно использовать несколько стандартных методов, как в твердом, так и в жидкостном сцинтилляционном счетчиках, хотя в этом разделе мы вновь больше внимания уделим последнему методу.

Метод внутреннего стандарта. Сначала считают образец (получают, например, A имп./мин), вынимают образец из счетчика и добавляют к нему небольшое количество стандартного вещества с известной активностью (B расп./мин). Затем образец с добавкой вновь считают (C имп./мин) и определяют эффективность счета импульсов:

$$\text{Эффективность счета импульсов} = [100\,(C - A)/B]\% \qquad (14.6)$$

Очевидно, что надо использовать внутренний стандарт, содержащий тот же изотоп, что и в образце, а также быть уверенным, что добавленный стандарт не действует как тушитель. Соответствующие ^{14}C-меченные стандарты [^{14}C]толуол, [^{14}C]гексадекан, [^{3}H]бензойная кислота и $^{3}H_2O$ — тушители и любой из них может использоваться только в очень малых количествах. При всех типах тушения внутренняя стандартизация — простой метод достоверного определения поправок для коррекции тушения. В то же время надо помнить, что при добавлении стандарта необходимо очень тщательное перемешивание, на что также требуется время, поскольку каждый образец анализируют дважды. Надо учитывать также, что в случае неправильного измерения сам образец нельзя заново измерить, поскольку там уже содержится стандарт. Кроме того, время между первым и вторым измерениями может отрицательно влиять на точность измерений. Тем не менее именно этот метод использовался для градуировки в двух описанных определениях.

Пример 3 **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЧЕТА ИМПУЛЬСОВ МЕТОДОМ ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА**

Вопрос В жидкостном сцинтилляционном счетчике была измерена радиоактивность образца ^{3}H в виде раствора сцинтилляционной жидкости на фильтровальной бумаге; 1450 имп./мин. После этого на тот же фильтр, который был вынут из счетчика, наносили тот самый изотоп с активностью 5064 расп./мин. При повторном измерении радиоактивность составила 2878 имп./мин. Какова радиоактивность (в расп./мин) экспериментального образца?

Ответ Чтобы определить эффективность счета импульсов, надо использовать уравнение 14.6.

Эффективность счета = [100(2878 – 1450)/ 5064]%

Получаем 28,2%; вводим поправку:

(1450/28,2)100 = 5142 расп./мин.

Метод отношения каналов. При наличии тушения сцинтилляционный процесс менее эффективен: при заданном уровне энергии выделяется меньше света. Таким образом, энергетический спектр образца при тушении оказывается ниже, чем для образца без тушения (рис. 14.9). Чем сильнее тушение, тем ниже интенсивность. Исходя из этого факта для определения эффективности счета импульсов применяется метод отношения каналов. По результатам счета импульсов в двух каналах строят градуировочную кривую; каналы должны относиться к перекрывающимся областям спектра. Когда происходит тушение и спектр перемещается в область более низких энергий, отношение числа импульсов в двух каналах будет изменяться. Для построения градуировочного графика готовят набор стандартных образцов с известной абсолютной радиоактивностью, и поэтому эффективность счета импульсов в каждом канале может быть легко определена.

График строят в координатах эффективность счета — отношение числа импульсов в двух каналах и получают стандартную кривую (рис. 14.10). Типичные результаты для набора ^{14}C-стандартов с тушителем приведены в табл. 14.4. Важно отметить, что стандартная кривая применима только к конкретному набору условий — один и тот же радиоизотоп, счетчик и сцинтилляционная жидкость.

Как только построена градуировочная кривая, может быть определена эффективность счета импульсов в экспериментальных образцах. Измерения проводят в тех же двух каналах, вычисляют отношение числа импульсов для этих двух каналов, наносят на график и находят эффективность счета. На практике все данные могут храниться в памяти компьютера счетчика, а скорректированные значения распечатываются автоматически.

Многоканальные сцинтилляционные счетчики работают на том же принципе, однако в них анализируется весь спектр. Результат — цифровой параметр уже с учетом эффективности счета. Фирмы-производители называют

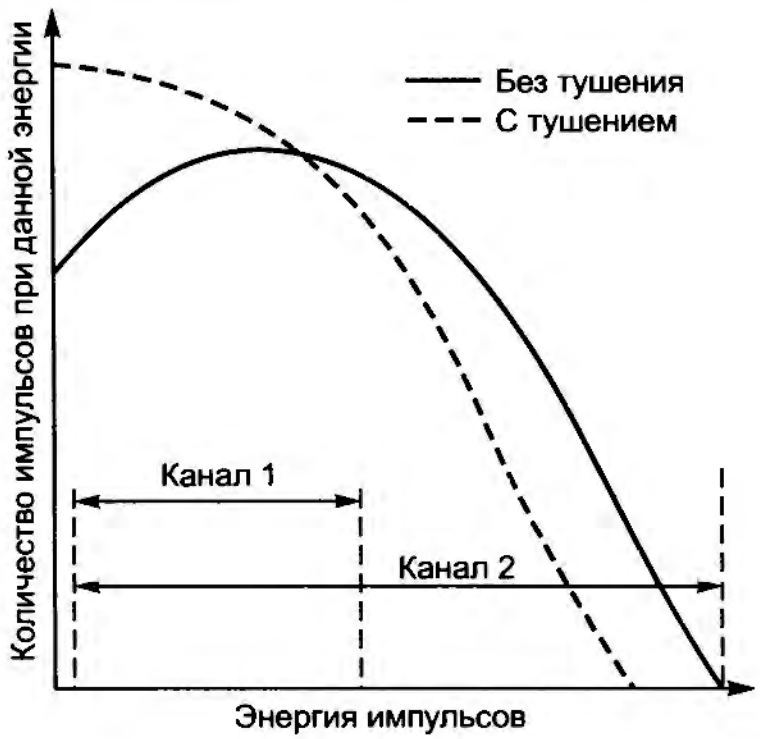


Рис. 14.9. Влияние тушения на энергетический спектр β-излучения

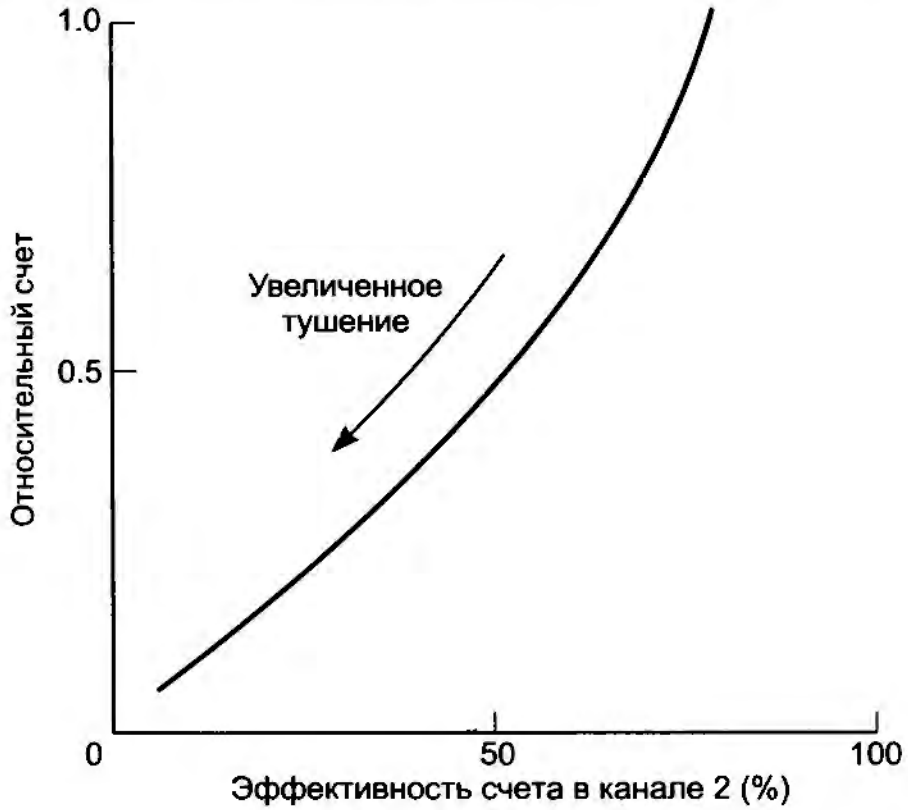


Рис. 14.10. Градуировочная кривая, позволяющая ввести поправку на тушение, полученная методом отношения каналов

Таблица 14.4. **Радиоактивность, зарегистрированная в двух каналах сцинтилляционного счетчика при усилении тушения**

Образец	имп./мин Канал 1	Канал 2	Отношение $\frac{\text{Канал 1}}{\text{Канал 2}}$	Эффективность счета в канале 2,%
^{14}C-стандарт (203 600 расп./мин) без тушения	171930	184250	0,93	90,5
^{14}C-стандарт (203 600 расп./мин) с усилением тушения	146610	168840	0,87	82,9
	94240	135090	0,70	82,9
	52260	102030	0,51	50,1
	16030	58320	0,27	28,6
	5920	34740	0,17	17,1
	2060	20270	0,10	9,9
	1130	13260	0,08	6,5

эти параметры по-разному, например LKB Instruments' Automatic Quench Compensation или Packard's Automatic Efficiency Control. Эти системы обладают более высокой точностью, чем в двухканальном варианте, так как для анализа используется весь спектр. Метод отношения каналов подходит для всех типов тушения и даже для высокой степени тушения. Кроме того, во всех каналах счет происходит одновременно, поэтому такой метод занимает меньше времени, чем метод с внутренним или внешним стандартом. На практике этот подход также является достаточно точным для определения эффективности счета импульсов при условии, что построение градуировочной кривой выполняется тщательно. Однако известно, что при

низких скоростях распада метод не точен, поскольку ошибка счета за минуту высокая, а при расчете числа импульсов в двух каналах еще выше — результат рассчитывается из двух значений числа импульсов в минуту. Метод еще менее точный для образцов с очень высокой степенью тушения. По этим причинам часто более предпочтителен следующий метод.

Пример 4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЧЕТА МЕТОДОМ ОТНОШЕНИЯ КАНАЛОВ

Вопрос Эффективность счета числа импульсов в растворе [^{14}C]лейцина с радиоактивностью 100 000 расп./мин была определена в сцинтилляционном счетчике с использованием двух каналов *А* и *Б* в сцинтилляционной жидкости, содержащей увеличивающуюся концентрацию хлороформа. Были получены следующие данные:

Хлороформ, см^3	*А*, имп./мин	*Б*, имп./мин
0	48 100	54 050
1	31 612	42 150
2	17 608	28 400
3	7 400	15 000

Для неизвестного образца [^{14}C]лейцина получен следующий результат:
Канал *А* 1890 имп./мин
Канал *Б* 2700 имп./мин
Какое количество радиоактивности присутствует в неизвестном образце?

Ответ Нанесите на график эффективность счета в канале *А* или *Б* (например, 48000 · 100/100 000 или 54050 · 100/100 000, затем 31612 · 100/100 000 или 42150 · 100/100 000 и т. д.) против отношения имп./мин *А*/ имп./мин *Б* (например, 48 000/54 050, 31 612/42 150 и т.д.). Для экспериментального образца рассчитайте *А*/*Б* = (1890/2700), нанесите на график и найдите эффективность счета. Корректируйте полученные результаты (имп./мин) в канале *А* или *Б* (в зависимости от того, для какого канала вычисляете эффективность счета) для определения эффективности счета (например, 1980 · 100/26,5, если вы выбрали канал *А* (26,5% — это эффективность счета, полученная из графика отношения каналов против эффективности в канале *А*).
Постарайтесь построить два графика (эффективность в канале *А* и в канале *Б* против отношения *А*/*Б* (в имп./мин) и найдите ответ, используя по очереди оба графика; вы должны получить одинаковый ответ 7130 расп.мин.

Метод внешнего стандарта. В счетчик встроен γ-излучающий **внешний стандарт**. Каждый образец подвергают воздействию этого внешнего источника, автоматически перемещаемого от свинцового экрана к камере счетчика. γ-Излучение проникает в счетный флакон и возбуждает сцинтилляционную жидкость. Результирующий спектр является характеристическим для применяемого внешнего источника и отличается от спектра образца во флаконе. Какой γ-источник используется (например, ^{137}Cs, ^{133}Ba или ^{226}Ra), зависит от типа прибора. Спектр с внешним стандартом ^{226}Ra показан на рис. 14.11.

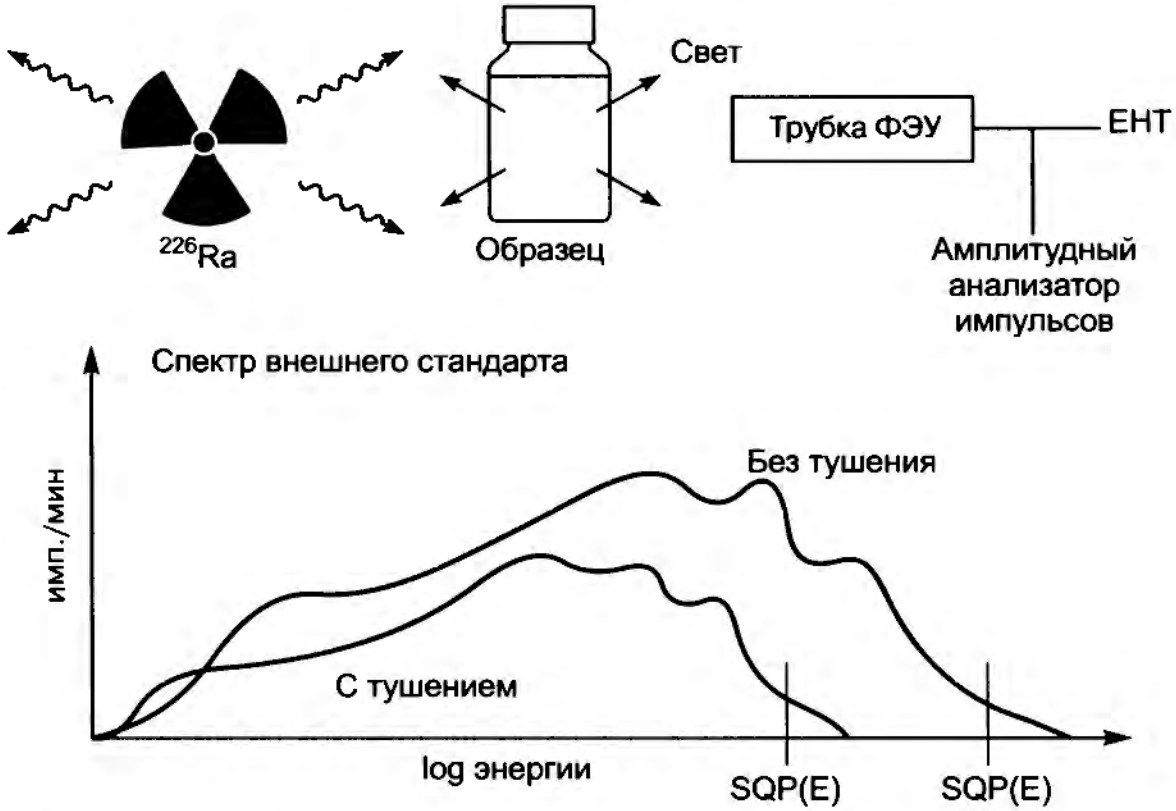


Рис. 14.11. Оценка эффективности счета импульсов методом внешнего стандарта. Внешний источник облучает образец. Счетчик анализирует спектр, который, если происходит тушение, смещается в низкоэнергетическую область. SQP(E), т. е. стандартный параметр тушения (внешний), безразмерная величина, наносится по оси энергии и связан с тушением. Чем больше тушение в образце, тем ниже SQP(E) и ниже эффективность счета (см. табл. 14.5)

Таблица 14.5. **Радиоактивность стандартного ^{14}C-образца с возрастающим тушением, определенным с помощью внешнего стандарта**

Образец	имп./мин тушения[a]	Параметр внешнего счета, %	Эффективность
^{14}C-стандарт (203600 расп./мин) без тушения	194 930	810	95,7
^{14}C-стандарт (203600 расп./мин) с возрастающим тушением	146 141	422	93,5
	181 171	207	89,0
	167 731	126	82,4
	145 879	76	71,6
	126 913	55	62,3
	108 641	42	53,3
	96 103	37	47,2

[a] Например, SQP(E), см. рис. 14.11.

Тушитель, присутствующий в сцинтилляционной жидкости, значительно влияет на спектр. Прибор анализирует этот спектр и устанавливает параметр тушения. Метод коррекции зависит от фирмы-производителя счетчика; LKB Instruments используют стандартный параметр тушения для внешнего источника (SQP(E), standard quench parameter for the external source) (рис. 14.11). Другие изготовители применяют немного другие подходы, но принцип остается тем же: спектр для внешнего стандарта (источ-

ника) зависит от тушения в пробирке и, следовательно, от эффективности счета (определения радиоактивности экспериментального образца).

Для применения метода отношения каналов необходима стандартная кривая, которую строят с помощью серии стандартов тушения, и в каждом случае анализируют спектр внешнего стандарта. Данные (табл. 14.5) используют для построения стандартной кривой, которая хранится в памяти компьютера прибора. Затем таким же способом анализируют неизвестные образцы, с помощью стандартной кривой определяют эффективность счета и корректируют результаты для образца.

В настоящее время в большинстве лабораторий метод внешнего стандарта является рутинным, а его главное преимущество по сравнению с методом отношения каналов состоит в том, что он подходит для образцов с низкими скоростями распада. Однако и этот метод не лишен недостатков: требуется построение стандартной кривой для каждого случая (как для отношения каналов), при этом пользователь может не учесть некоторых обстоятельств. Система так высокоавтоматизирована, что теряются основные принципы ее действия, и метод не всегда подходит. Один из таких случаев — определение радиоактивности ^{3}H, осажденного на фильтрах для анализа в сцинтилляционной жидкости. Метод внешнего стандарта позволяет найти степень тушения в жидкости, которая, вероятно, окажется очень низкой, но при этом не учитывается слабая проникающая способность β-излучения от ^{3}H на фильтре в сцинтилляционную жидкость. Поэтому результат — искусственно завышенное значение эффективности счета.

Во всех случаях, где применяется автоматизированная система расчета эффективности счета, разумно анализировать несколько стандартных образцов с известной радиоактивностью.

Пример 5 **ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СЧЕТА С ПОМОЩЬЮ ВНЕШНЕГО СТАНДАРТА**

Вопрос Эффективность счета ^{14}C в сцинтилляционном счетчике была определена методом внешнего стандарта с использованием стандартного образца с активностью 105 071 расп./мин при различной степени тушения.

имп./мин	SQP
87451	0,90
62361	0,64
45220	0,46
21014	0,21

SQP — стандартный параметр тушения.

Экспериментальный образец имел радиоактивность 2026 имп./мин при SQP 0,52. Какова скорость распада?

Ответ Нанесите на график эффективность счета против SQP (например, (87451 · 100/105 071)%). Получите для экспериментального образца эффективность счета (48%) и внесите эту поправку в значение 2026 имп./мин. Ответ: 4221 расп./мин.

Подготовка образца

Невозможно здесь описать подробно все рабочие операции при подготовке образца для анализа в сцинтилляционном счетчике. Однако ниже излагаются некоторые общие приемы, а дополнительные детали читатель найдет в книгах, цитируемых в разд. 14.7.

Флаконы для образцов. Подготовка образцов для измерения в твердых сцинтилляционных счетчиках простая и состоит в переносе образца в стеклянный или пластиковый флакон (или пробирку), подходящий для этого счетчика. Подготовка образца для жидкостного сцинтилляционного счетчика более сложная, и прежде всего надо решить, какой флакон использовать для образца. Флаконы могут быть из стекла, стекла с низким содержанием ^{40}K, что уменьшает фон, или полиэтилена. Последний вариант дешевле, но не подходит для повторного использования, тогда как стеклянные флаконы могут многократно использоваться при условии, что они тщательно вымыты. Полиэтиленовые флаконы лучше пропускают свет, что приводит к немного более высоким эффективностям счета импульсов, но они могут сильнее фосфоресцировать, чем стеклянные флаконы. В последнее время применяются мини-флаконы для гораздо меньших объемов дорогих сцинтилляционных коктейлей. Современные счетчики адаптированы для многих типов флаконов; следует использовать как можно меньший флакон (ограничения обусловлены объемом образца), чтобы снизить стоимость анализа и учесть проблемы загрязнения окружающей среды, поскольку сцинтилляционные жидкости токсичны. Некоторые счетчики разработаны для анализа очень маленьких образцов в специальных полиэтиленовых мешочках, состоящих из множества отсеков; они особенно успешно применяются, например, в фармацевтических лабораториях, которые выполняют большое число анализов по связыванию веществ с рецепторами.

Сцинтилляционный коктейль. Наиболее эффективны коктейли на основе толуола, но они не позволяют анализировать водные образцы, поскольку толуол и вода не смешиваются, и происходит массивное тушение. Могут быть использованы коктейли, основанные на 1,4-диоксане и нафталине, которые могут содержать до 20% (об./об.) воды, но их производство было прекращено из-за токсичности. Коктейли, основанные на эмульгаторе, чаще применяются для анализа водных образцов. Они содержат эмульгатор тритон X-100 и могут содержать до 50% (об./об.) воды; однако по мере увеличения содержания воды происходит переход от однофазной системы к двухфазной или гелю. Нельзя правильно провести анализ в двухфазных образцах. В продаже имеется множество готовых коктейлей с подробными инструкциями в соответствии с типом образца.

Объем коктейля. Необходимо отметить, что эффективность сцинтилляционного анализа зависит от объема образца, хотя в современных счетчиках это не слишком большая проблема. Тем не менее следует уделять внимание тому, чтобы во всех флаконах в одной серии образцов был оди-

наковый объем образца, а градуировка выполнена с такими же объемами стандартов, как для экспериментальных образцов.

Преодоление цветового тушения. Если цветовое тушение мешает анализу, можно обесцветить образцы до анализа. Однако необходимо соблюдать осторожность, так как обесцвечивающие агенты, например пероксид водорода, могут усилить хемилюминесценцию в некоторых сцинтилляционных коктейлях.

Растворители для тканей. Твердые образцы, такие как растительные и животные ткани, лучше всего анализировать после растворения с помощью четвертичных аминов, таких как N-хлорсукцинимид или Soluene®. Неудивительно, что эти растворы очень токсичны, и при работе с ними требуется большая осторожность. Образец добавляют во флакон, содержащий небольшое количество растворителя. По завершении растворения добавляют сцинтилляционный коктейль, и образец анализируют. При использовании растворителей также может возникать хемилюминесценция.

Сжигание. Кроме обесцвечивания окрашенных образцов или разрушения тканей при подготовке образцов используют сжигание. Образец сжигают в атмосфере кислорода, обычно в специальных аппаратах для сжигания. Таким образом, ^{14}C-образцы сгорают до $^{14}CO_2$, который собирают с помощью улавливающего агента, например гидроксида натрия, и затем анализируют; ^{3}H-содержащие образцы превращаются в $^{3}H_2O$.

Итак, здесь мы обсудили только самые важные особенности подготовки образцов для анализа, не вдаваясь в детали. Однако отметим, что радиоактивный образец, содержащий β-излучатель, можно подготовить для анализа в жидкостном сцинтилляционном счетчике тем или другим способом, в том числе вырезая кусочки хроматографической бумаги или фильтра, что еще раз подтверждает важность этого метода для определения радиоактивности.

Счетчик Черенкова

Эффект Черенкова возникает, когда частица проходит через вещество со скоростью выше, чем скорость света в том же самом веществе. Если β-излучатель имеет энергию распада, превышающую 0,5 МэВ, то он заставляет воду испускать голубовато-белый свет, обычно называемый **излучением Черенкова**. Детектировать это излучение можно, используя обычный жидкостной сцинтилляционный счетчик.

Поскольку не нужны ни органические растворители, ни флуорофоры, этот метод относительно дешев, подготовка образца очень простая, и не существует проблемы химического тушения. В табл. 14.6 приведены изотопы, подходящие для этого метода детектирования. Большинство работ выполняется с применением ^{32}P, у которого 80% энергетического спектра находятся выше порога Черенкова и который определяется приблизитель-

Таблица 14.6. **Некоторые изотопы, применяемые в счетчике Черенкова**

Радиоактивный изотоп	E_{max}, МэВ	Доля спектральной области с энергией выше 0,5 МэВ, %	Эффективность счета числа импульсов, %
^{22}Na	1,39	60	30
^{32}P	1,71	80	40
^{36}Cl	0,71	30	10
^{42}K	3,5	90	80

но с 40%-ной эффективностью. Отметим (табл. 14.6), что при энергии выше 0,5 МэВ эффективность детектирования увеличивается.

Сцинтилляционный анализ с использованием SPA

Сцинтилляционный анализ с использованием молекулярно-импринтированных полимеров (SPA, Scintillation proximity assay) упрощает автоматизацию и увеличивает производительность экспериментов. Поэтому он в большой степени подходит для таких работ, как скрининг новых лекарств с определенной биологической активностью. Принцип SPA иллюстрируется на рис. 14.12. Из полистирола (или иногда из других материалов) изготовляют бусинки, с помощью которых соединяются участок для связывания изучаемой молекулы и сцинтиллятор. Необходимо помнить, что некоторые типы радиации не распространяются на далекие расстояния, в частности β-излучение со слабой энергией от таких излучателей, как ^{3}H и ^{14}C. Если молекулы, содержащие такие радиоизотопы, находятся в растворе с суспензией бусинок, радиация не стимулирует сцинтиллятор в бусинках и не может быть эффективно детектирована сцинтилляцион-

Рис. 14.12. Принцип метода SPA

Таблица 14.7. **Преимущества метода SPA**

Множество применений: использование для исследования ферментов, рецепторов, любых молекулярных взаимодействий
Работает с такими изотопами, как ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S и ^{33}P
Нет этапа разделения (например, свободного и связанного лиганда)
Меньше манипуляций, следовательно, ниже токсичность
Возможность автоматизации

ным счетчиком. Это происходит из-за того, что радиация поглощается раствором; она не доходит до сцинтиллятора. Но если радиоизотоп связывается с бусинками, он находится достаточно близко, чтобы стимулировать сцинтиллятор в бусинке, так что при этом испускается свет и изотоп детектируется.

Существует множество применений этого метода, например изучение ферментов и рецепторов; метод может применяться в любой ситуации, где нужно исследовать взаимодействие между двумя молекулами, например связывание рецептора с лигандом. В этом случае рецептор определенного лиганда (такого, как лекарство или гормон) прикрепляется к бусинкам. Лиганд метят радиоактивной меткой и смешивают с бусинками. Связавшийся лиганд стимулирует свечение и детектируется. Если нужно изучить вещество, которое мешает этому связыванию (именно так действуют многие лекарства), их можно добавлять в повышающейся концентрации, чтобы изучить действие и, например, определить оптимальную дозу (см. также разд. 16.3.2).

Преимущества метода суммированы в табл. 14.7.

14.2.3 Методы, основанные на экспозиции фотоэмульсии

Ионизирующая радиация гораздо сильнее действует на фотоэмульсию, создавая негатив, чем это делает видимый свет. Для фотографии требуются источник излучения, изображаемый объект и фотоэмульсия. Для авторадиографа необходимо присутствие в анализируемом веществе (объекте) источника радиоактивного излучения, а также чувствительная фотоэмульсия. Эмульсия состоит из большого числа кристаллов галогенида серебра, включенных в твердую фазу, например желатин. Энергия радиоактивного распада рассеивается в эмульсии галогенида серебра, выбивая отрицательно заряженные частицы (электроны), при этом галогенид серебра восстанавливается до металлического серебра, формируя тем самым определенное латентное (скрытое) изображение. Разработаны фотопроявители, которые позволяют делать видимыми эти частицы серебра в виде почернения пленки, а фиксаторы затем удаляют оставшийся галогенид серебра. Таким образом, можно определить локализацию радиоактивного вещества.

Этот процесс, называемый **авторадиографией**, очень чувствителен и используется в широком спектре биологических экспериментов, в которых часто требуется локализовать распределение радиоактивности в различных биологических образцах. Например, места локализации меченых лекарств в теле экспериментального животного могут быть определены путем наложения срезов всего тела животного на чувствительную эмульсию, например на рентгеновскую пластинку. После экспозиции пластину помещают в проявитель и получают изображение срезов тканей и органов, в которых находилась радиоактивность. Подобным же образом радиоактивные метаболиты, выделенные и разделенные методом хроматографии или электрофореза, могут быть локализованы на хроматограмме или электрофореграмме, и радиоактивные участки могут быть выделены для определения уровня радиоактивности и идентификации.

Метод авторадиографии (рис. 14.13) приобрел важное значение в связи с последними достижениями в молекулярной биологии (гл. 5 и 6). Поэтому ниже более детально представлены основные принципы метода.

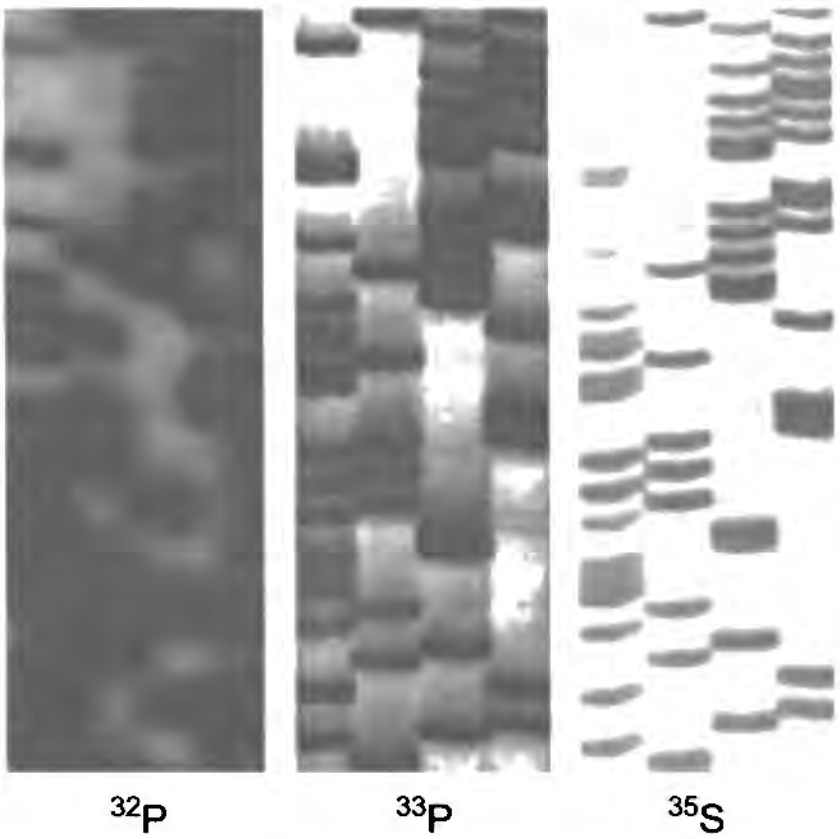


Рис. 14.13. Три авторадиограммы, демонстрирующие использование различных радиоизотопов при секвенировании ДНК. Изотоп с наиболее высокой энергией (^{32}P) приводит к худшему разрешению, поскольку радиация распространяется на большое расстояние, что делает полосы ДНК толще. Радиация с более низкой энергией (^{35}S) дает лучшее разрешение. (Представлено с разрешения M.W. Cunningham, A. Patel, A.C. Simmonds and D. Williams (2002). *In vitro* labelling of nucleic acids and proteins, in *Radioisotopes in Biology*, (2nd edn.), R.J. Slaten (ed.), Oxford University Press, Oxford.)

Используемые изотопы

Вообще говоря, слабые β-излучатели (например, ^{3}H, ^{14}C и ^{35}S) наиболее подходят для авторадиографии, особенно в экспериментах по определению клеточной и тканевой локализации веществ. Причина заключается в том, что благодаря низкой энергии электронов ионизирующий след изотопа короткий и дает четкое изображение. Это особенно важно, когда радиоактивность связана с внутриклеточными органеллами, локализацию которых необходимо определить. Для этого наилучшим радиоизотопом представляется ^{3}H, поскольку вся его энергия быстро рассеивается в эмульсии. Для проявления изображения на пленке может быть использована электронная микроскопия. Для анализа локализации веществ в целых организмах или тканях подходят либо ^{14}C, либо ^{3}H; более активные изотопы (например, ^{32}P) менее пригодны, поскольку их электроны с высокой энергией дают более длинные следы и приводят к менее четким изображениям. Наоборот, для локализации, например, полос ДНК в электрофоретическом геле успешно применяется ^{32}P. В этом случае электроны из ^{3}H с низкой энергией в значительной степени рассеивают энергию в геле (и в подкладке под гель, которая обычно используется для предотвращения прилипания геля к эмульсии), таким образом уменьшая чувствительность метода. Электроны из ^{32}P, обладающие более высокой энергией, покидают гель и дают более контрастное изображение. Если приготовлен очень тонкий гель, могут быть детектированы с высоким разрешением ^{35}S или ^{14}C, например в гелях для секвенирования ДНК, когда в качестве метки применяется ^{35}S.

Выбор эмульсии и пленки

Производится много эмульсий с различной плотностью кристаллов галогенида серебра. Требуется взвешенный подход при выборе эмульсии, подходящей для целей эксперимента, поскольку чувствительность этого материала к излучению влияет на разрешение. При сомнениях следует изучить рекомендации фирм-изготовителей. Рентгеновская пленка обычно подходит для макроскопических образцов: среза мелких млекопитающих, хроматограмм или электрофореграмм. При анализе в световом или электронном микроскопе (клеточная или субклеточная локализация радиоактивности) необходимы очень чувствительные пленки. В этих случаях может быть использована техника пленки со съемным слоем. Пленка отделяется от подложки и накладывается непосредственно на образец. При другом способе готовят жидкую эмульсию путем плавления лент из эмульсии нагреванием примерно до 60 °С. Затем либо эмульсию выливают на образец, либо образец, прикрепленный к подложке, погружают в эмульсию. После этого эмульсии дают возможность отвердеть. Такой метод часто называют методом погруженной пленки, и именно ему оказывают предпочтение, когда требуются очень тонкие пленки.

Фон

Случайное попадание света, химикаты в образце, естественный фон радиоактивности (особенно ^{40}K в стекле) и даже нажим при манипуляциях с пленкой будут вызывать фоновую вуаль (т. е. нечеткое изображение) на

проявленной пленке. Этого следует избегать, особенно если требуется высокое разрешение (например, в методе микроскопии), и, чтобы свести к минимуму отрицательные последствия, необходимо быть очень осторожным в работе. Фон усиливается при увеличении времени экспозиции, которое поэтому всегда следует сводить к минимуму.

Время экспозиции и обработка пленки

Время экспозиции зависит от изотопа, типа образца, уровня радиоактивности, типа пленки и целей эксперимента. То же самое относится к обработке пленки. Как правило, все должно быть адаптировано к целям эксперимента, и часто для достижения наилучшего результата приходится пользоваться методом проб и ошибок.

Прямая авторадиография

При прямой авторадиографии рентгеновскую пленку или пластинку с эмульсией помещают как можно ближе к образцу и экспонируют при подходящей температуре. Количественное изображение получается при наступлении насыщения. Метод обеспечивает высокое разрешение, но ограничен по чувствительности: требуются изотопы с энергией, выше или равной энергии изотопа ^{14}C (E_{max} = 0,156 МэВ).

Радиофотография

Многие из наиболее применяемых в настоящее время методов молекулярной биологии основаны на разделении макромолекул с помощью гель-электрофореза (разд. 10.3 и 10.4). Разделенные макромолекулы или фракции образуют на электрофореграмме полосы (дорожки). Часто при этом используют радиоактивные метки ^{3}H или ^{14}C, что позволяет далее провести авторадиографию геля. Поскольку эти изотопы — слабые β-излучатели, большая часть их энергии теряется в геле, и требуется длительное время экспозиции даже при использовании источников с очень высокой удельной активностью. Однако для определения распределения флуоресцентного вещества (например, PPO или силикат натрия) в геле последний сушат и затем приводят в контакт с предварительно засвеченной пленкой (см. ниже); чувствительность метода может быть повышена на несколько порядков величины. Это происходит потому, что электроны, испускаемые изотопом, вызывают возбуждение флуоресцирующего вещества и заставляют его испускать свет, который взаимодействует с пленкой. Таким образом, при радиофотографии используются и ионизация, и флуоресценция.

Усиливающие экраны

Когда необходимо определить локализацию образцов, меченных ^{32}P или γ-изотопом (например, [^{32}P]ДНК или меченные ^{125}I белковые фракции в геле), возникает проблема, противоположная той, что существует для изотопов с низкой энергией. В данном случае имеют дело с частицами с гораздо большей проникающей способностью, и лучи, проходя пленку, мало реагируют с ней — получается плохое изображение. Изображение может быть значительно улучшено путем размещения на противоположной от образ-

ца стороне пленки толстого усиливающего экрана, состоящего из твердого фосфо́ра. Электроны, проникающие в пленку, вызывают флуоресценцию фосфо́ра и испускание света, который накладывает свое изображение на пленку, поэтому возникает увеличение чувствительности, но также снижение разрешения из-за рассеяния испускаемого от экрана света.

Экспозиция при низкой температуре

Если энергия ионизирующей радиации превращается в свет (например, при медицинской флюорографии или в экспериментах с усиливающими экранами), меняется кинетика ответной реакции пленки. Свет имеет низкую интенсивность, и возникает обратная реакция, которая аннулирует образование латентного изображения. Экспозиция при низкой температуре (–70 °С) замедляет эту обратную реакцию и поэтому обеспечивает более высокую чувствительность. При низкой температуре нет необходимости в проведении прямой авторадиографии, так как кинетика реакции в пленке другая. Никакого выигрыша от использования предэкспонированной пленки при низкой температуре нет (см. ниже).

Предварительная вспышка

Как сказано выше, реакция фотоэмульсии на радиацию не является линейной и обычно состоит из медленной начальной фазы (лаг-фаза) с последующей линейной фазой. Чувствительность пленок может быть увеличена предварительной вспышкой. До размещения образца пленку облучают светом несколько миллисекунд. Это прием часто используется, если необходима высокая чувствительность или если требуется количественный анализ.

Количественный анализ

Как отмечалось выше, авторадиография чаще применяется, чтобы локализовать, а не определять радиоактивность количественно. Однако возможно получать количественные данные прямо из авторадиографов, используя денситометр, который регистрирует интенсивность изображения, соответствующую количеству радиоактивности в исходном образце. Существует множество разновидностей денситометров, и выбор зависит от целей эксперимента. Количественный анализ не является достоверным при низких или высоких уровнях экспозиции из-за лаг-фазы (т. е. обратной реакции, см. выше) или насыщения соответственно; однако предварительная вспышка в комбинации с флюорографией или усиливающими экранами устраняет эту проблему для малых количеств радиоактивности. В этом случае все фотоны вносят равный вклад в изображение на предэкспонированной пленке.

14.3 ДРУГИЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗМЕРЕНИЯ РАДИОАКТИВНОСТИ

14.3.1 Характеристики счетчика

Фоновая радиоактивность

Счетчики любого типа постоянно регистрируют радиоактивные частицы, даже если радиоактивного материала в приборе нет. Это может происходить из-за таких помех, как космическая радиация, природная радиоактивность в данной местности, наличием поблизости генераторов рентгеновских лучей и/или помехами в электросети. С помощью различных уже отмеченных выше методов и при использовании свинцовой защиты радиационный фон может быть значительно понижен, но должен всегда регистрироваться и учитываться в любых экспериментах. Некоторые промышленные приборы имеют автоматические устройства для вычитания фона.

Мертвое время

При очень высоких скоростях в счетчике Гейгера–Мюллера часть радиоактивности теряется из-за мертвого времени трубки Гейгера–Мюллера. Существуют корректирующие таблицы, которыми пользуются, чтобы учесть потерянную радиоактивность. Проблемы мертвого времени не возникает в жидкостных сцинтилляционных счетчиках.

Геометрия

При проведении относительных (сравнительных) измерений образцов на торцевом ионизационном счетчике, например счетчике Гейгера–Мюллера, важно стандартизировать положение образца в трубке, от этого зависит воспроизводимость результатов измерений.

14.3.2 Образец и характеристики изотопа

Поглощение излучения образцом

В случае слабых β-излучателей важная проблема — поглощение излучения самим образцом. Для источников с низкой энергией это затрудняет определение радиоактивности с помощью сцинтилляционных счетчиков, если образец является сыпучим веществом или, например, собран на мембранном фильтре. Необходимо уделять внимание сопоставлению результатов для образцов, поскольку методы стандартизации, описанные ранее, не могут корректировать поглощение излучения в образце. Если образец не гомогенный, до проведения измерений его следует разложить или перевести в раствор. Поглощение образцом значительно уменьшает чувствительность анализа (на счетчике Гейгера–Мюллера) и ухудшает достоверность получаемых результатов. Такими счетчиками очень трудно определять активность излучателей с низкой энергией, и это послужило главной причиной перехода к использованию сцинтилляционных счетчиков.

Период полураспада

Период полураспада изотопа может быть коротким (разд. 14.1.5), и это должно приниматься во внимание при анализе результатов.

Статистическая обработка данных

Испускание (эмиссия) частиц при радиоактивном распаде — это случайный процесс, что можно продемонстрировать, повторяя измерения активности одного и того же образца долгоживущего изотопа через равные промежутки времени. Результаты окажутся разные, они будут колебаться вблизи среднего значения. Если сделать достаточно большое число таких измерений и нанести данные на график (на оси абцисс — время или номер измерения), можно получить нормальную кривую распределения. Таким образом, нельзя получить результат на основе одного измерения, а следует взять среднее из большого числа измерений. Для некоторого набора данных точность этого среднего характеризуется стандартным отклонением (σ). Согласно статистической теории, для нормального распределения, такого как показано на рис. 14.14, 68,2% полученных значений лежит в области $\bar{x} \pm \sigma$ и 95,5% — в области $\bar{x} \pm 2\sigma$ (разд. 1.6.3).

Очевидно, что, если мы хотим сравнить образцы и, в частности, утверждать, что два образца содержат различные количества радиоактивности, необходима статистическая обработка данных. Вспомнив распределение Пуассона, можно упростить задачу:

$$\sigma = \sqrt{\text{общее число зарегистрированных импульсов}} \qquad (14.7а)$$

или

$$\sigma = \sqrt{\frac{\text{скорость счета}}{\text{время}}} \qquad (14.7б)$$

Поэтому при достоверности 95,5%

$$\text{общее число импульсов} \pm 2\sqrt{\text{общее число импульсов}} \qquad (14.8)$$

Например, в счетчике регистрируется 1600 имп., но результат измерения счета следует записать как 1600 ± 80. Отсюда при достоверности 95,5% истинное значение лежит в интервале от 1520 до 1680.

Результат счета можно указать в расп./мин или имп./мин. При достоверности 95,5%

$$\text{ошибка определения скорости распада} = 2\sqrt{\frac{\text{скорость распада}}{\text{время}}} \qquad (14.9)$$

Пусть 1600 имп. регистрируется за 1 мин, тогда

$$\text{ошибка определения скорости распада} = 2\sqrt{\frac{1600}{1}} = 80$$

Результат измерения: 1600 имп./мин ± 80 имп./мин.

Пусть регистрируется за 10 мин 1600 имп., тогда

$$\text{ошибка определения скорости распада} = 2\sqrt{\frac{160}{10}} = 8$$

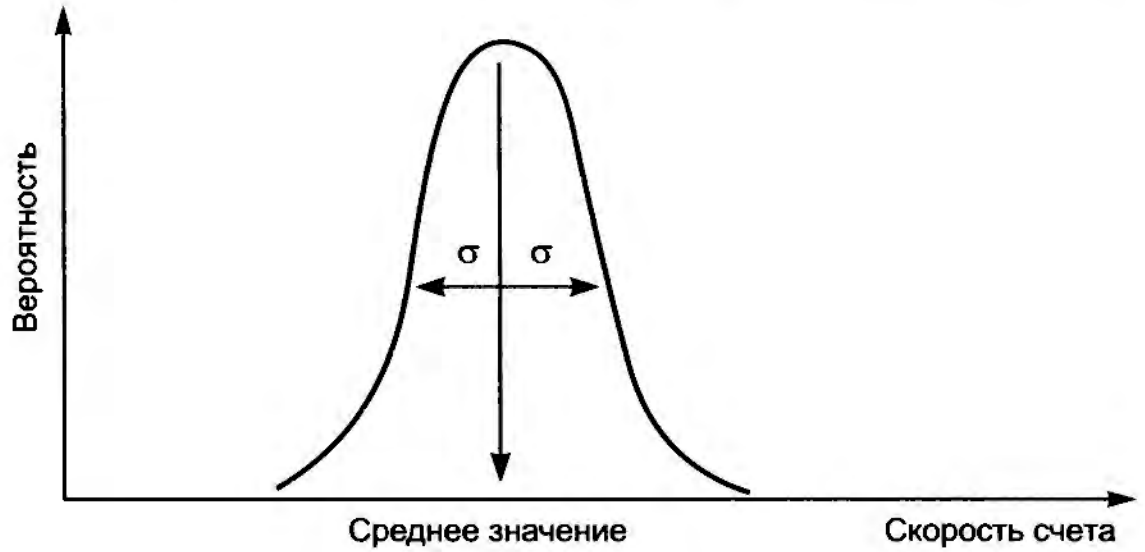


Рис. 14.14. Разброс значений скорости распада относительно среднего при стандартном отклонении σ

Результат измерения: 160 имп./мин ± 8 имп./мин. Отметьте, что ошибка измерений та же самая. Это происходит по той причине, что и в том и в другом случаях измеряется одинаковое число импульсов.

Пусть регистрируется 160 имп. всего за 1 мин, тогда

$$\text{ошибка определения скорости распада} = 2\sqrt{\frac{160}{1}} = 25$$

Результат измерения: 160 имп./мин ± 25 имп./мин.

Рассмотрим другие простые примеры измерений. Пусть за 1 мин регистрируется

число импульсов = 100	$\sigma = \sqrt{100}$,	т. е. при достоверности 68,2% ошибка составляет ± 10%
число импульсов = 1000	$\sigma = \sqrt{1000}$,	т. е. при достоверности 68,2% ошибка составляет ± 3%
число импульсов = 10000	$\sigma = \sqrt{10000}$,	т. е. при достоверности 68,2% ошибка составляет ± 1%.

Итак, измерение числа импульсов в минуту более точное при увеличении скорости распада и/или времени измерения. Обычно принято продолжать измерение до 10 000 имп. или 10 мин, хотя в случае очень низкой скорости распада требуется более длительное время измерения.

Пример 6 **ТОЧНОСТЬ СЧЕТА ЧИСЛА ИМПУЛЬСОВ**

Вопрос Измеряли в течение 10 мин радиоактивность образца; 564 имп./мин. Рассчитайте стандартное отклонение измерения при достоверности 95,5%.

Ответ По уравнению 14.9 найдем стандартное отклонение σ:

$\sigma = 2\sqrt{264/10} = 15$

При достоверности 95,5% результат надо записать так: 564 ± 15.

14.3.3 Поставка, хранение и чистота радиоактивно меченных соединений

Существует несколько поставщиков радиоактивно меченных соединений, главные из них — Amersham Biosciences, Du Pont, NEN и ICN. Поставщики обычно прилагают детальное описание условий хранения и требований контроля качества продукции. При хранении может произойти загрязнение в результате «внутреннего» радиоактивного распада, например $^{14}C \rightarrow {}^{14}N$, и «внешнего» разложения, при котором испускаемая радиация поглощается присутствующими в образце органическими молекулами — из-за этого образец загрязняется посторонними соединениями. Степень загрязнения зависит от многих факторов, таких как температура, энергия радиации, концентрация и состав соединения. Следовательно, необходимо строго соблюдать условия хранения радиоизотопов, рекомендованные поставщиком. При необходимости для проверки чистоты меченых соединений можно провести хроматографический анализ.

14.3.4 Удельная активность

Удельная активность радиоизотопа определяется как радиоактивность, отнесенная к количеству материала (например, Бк · моль$^{-1}$, Ки · ммоль$^{-1}$ или расп./мин · мкмоль$^{-1}$). Поставщики предлагают изотопы с разной удельной активностью; чаще всего цена связана с величиной удельной активности. Использование образцов с очень высокой удельной активностью имеет следующие преимущества:

- Продукты реакции с меченым предшественником имеют высокую удельную активность (например, для ДНК-зондов, см. разд. 5.10).
- Можно использовать малые количества меченых соединений, что почти не нарушает баланс метаболических реакций.
- Упрощается вычисление количества вещества, требуемого для приготовления радиоактивных растворов с известной удельной активностью, поскольку вклад в концентрацию, вносимый запасным меченым раствором часто незначителен (см. ниже).

Однако не всегда необходимо покупать радиоактивные вещества с высокой удельной активностью. Например, исследование ферментов *in vitro* часто требует относительно высокой концентрации субстрата, и поэтому удельная активность должна быть снижена. Рассмотрим представленный ниже пример (единицы измерения радиоактивности см. в табл. 14.10):

В продажу поступает [^{3}H]лейцин с удельной активностью 5,55 ТБк · ммоль$^{-1}$ (150 Ки · ммоль$^{-1}$) и в концентрации 9,25 МБк/250 мм$^{-3}$ (250 мкКи/250 мм$^{-3}$). Пусть требуется 10 см^3 раствора с концентрацией 250 мМ и активностью 3,7 кБк · см$^{-3}$ (0,1 мкКи · см$^{-3}$). Это делается следующим образом:

- 10 см^3 с активностью 3,7 кБк · см$^{-3}$ содержат 37 кБк (1 мкКи), следовательно, нужно перенести пипеткой 1 мм^3 запасного раствора радио-

изотопа в пробирку (или, что более точно, отобрать пипеткой 100 мм^3 для 100-кратного разведения запасного раствора в воде).
- Добавить 2,5 см^3 1 М запасного раствора немеченого лейцина и довести объем до 10 см^3 дистиллированной водой.

Нет необходимости учитывать количество немеченого лейцина в препарате [^{3}H]лейцина, так как оно ничтожно мало при такой высокой удельной активности. Если необходимо (например, для работы с растворами с относительно низкой удельной активностью), может быть использована следующая формула:

$$W = Ma[(1/A') - (1/A)] \qquad (14.10)$$

где W — масса добавленного немеченого носителя (мг), M — радиоактивность (МБк), a — молекулярная масса вещества, A — исходная удельная активность (МБк · ммоль$^{-1}$), и A' — требуемая удельная активность (МБк · ммоль$^{-1}$).

Пример 7 **ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА С ИЗВЕСТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Вопрос Требуется приготовить 1 л раствора [^{3}H]уридина с концентрацией 100 мкмоль · см$^{-3}$ и активностью 50 000 имп./(мин · см^3). Если все измерения проводить в сцинтилляционном счетчике с эффективностью 40%, как приготовить этот раствор при условии, что продажный [^{3}H] уридин имеет удельную активность 20 Ки · моль$^{-1}$?
[NB: M_r уридина = 244; 1 Ки = 22,2 · 10^{11} расп./мин]
Повторите вычисления в беккерелях.

Ответ Эта задача подобна примеру с лейцином, приведенному выше. Учтем, что эффективность измерений 48%: 50 000 имп./мин соответствуют 125 000 расп./мин. Умножаем это значение на 10^3 для перехода к литрам и получаем 125 · 10^6/ 22,2 · 10^5 = 56,3 мкКи. Поскольку мы имеем раствор с активностью 20 Ки · моль$^{-1}$, найдем, сколько молей вещества содержится в растворе с активностью 56,3 мкКи (56,3/20 · 10^6 = = 2,815 мкмоль). Нам требуется раствор уридина 100 000 мкмоль/л; учитывая молекулярную массу уридина, это составляет 24,4 г. Внесенная радиоактивность (2,815 мкмоль) составляет только 0,685 мг и поэтому может не учитываться.
Ответ: 56,3 мкКи (2,08 МБк) [^{3}H]уридина плюс 24,4 г уридина.

14.3.5 Выбор радионуклида

Это сложный вопрос, зависящий от требований эксперимента. В табл. 14.8 отражены некоторые ключевые свойства радиоизотопов, используемых обычно в биологических исследованиях.

Таблица 14.8. **Сравнение часто используемых β-излучателей**

Изотоп	Преимущества	Недостатки
^{3}H	Безопасность	Низкая эффективность детектирования
	Высокая удельная активность	Обмен изотопа с окружающей средой
	Широкий выбор положений в органических соединениях	Изотопный эффект
	Очень высокое разрешение при авторадиографии	
^{14}C	Безопасность	Низкая удельная активность
	Широкий выбор положения метки в органических соединениях	
	Хорошее разрешение при авторадиографии	
^{35}S	Высокая удельная активность	Короткий период полураспада
	Хорошее разрешение при авторадиографии	Относительно длительный биологический период полужизни
^{33}P	Высокая удельная активность	Более низкая удельная активность, чем для ^{33}P
	Хорошее разрешение при авторадиографии	Менее чувствителен, чем ^{32}P
	Менее опасный, чем ^{32}P	Стоимость
^{32}P	Легкость определения	Короткий период полураспада влияет на стоимость и экспериментальный дизайн
	Высокая удельная активность	
	Короткий период полураспада упрощает утилизацию	Опасность внешней радиации
	Использование эффекта Черенкова	Плохое разрешение при авторадиографии

Цитируется в соответствии с *Radioisotopes in Biology, A Practical Aproach*, 2nd edn, ed. R.J. Slater (2002), Oxford University Press, с разрешения издательства.

14.4 ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ

Вероятно, самым большим преимуществом методов с радиоактивной меткой по сравнению с большинством других химических и физических методов является их чувствительность. Например, меченные тритием соединения можно детектировать при разведении до 10^{12} раз. Таким образом, можно определить в тканях присутствие продуктов метаболизма обычно в таких низких концентрациях, которые не удается обнаружить чувствительными химическими методами. Вторым главным преимуществом использования радиоактивных меток является то, что они дают воз-

можность выполнения исследований *in vivo* в гораздо большей степени, чем другие методы.

Несмотря на эти преимущества, надо принимать во внимание и ограничения. Во-первых, если у элемента несколько изотопов, реакции с ними протекают с разными скоростями. Этот эффект носит название **изотопного эффекта**. Различия скоростей реакций для разных изотопов приблизительно пропорциональны различиям в массах изотопов. Изотопные эффекты особенно существенны для изотопов водорода ^{1}H и ^{3}H, небольшой эффект наблюдается для ^{12}C и ^{14}C и почти незначительный — для ^{33}P и ^{32}P. Во-вторых, количество используемой радиоактивности должно сводиться к необходимому минимуму, который позволяет получать разумные величины скорости распада в анализируемых образцах, иначе радиация из метки может вызвать ответную реакцию экспериментального организма и, следовательно, исказить результаты. В-третьих, при введении метки автоматически повышается нормальный уровень вещества в организме. Поэтому результаты всегда являются спорными.

14.5 ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Серьезным практическим недостатком использования радиоизотопов является токсичность ионизирующего излучения. При поглощении организмом радиация вызывает ионизацию и образование свободных радикалов, которые взаимодействуют с клеточными макромолекулами, приводя к мутациям ДНК и гидролизу белков. Токсичность радиации зависит не просто от ее количества, но от количества, поглощенного организмом, энергии поглощенной радиации и ее биологического действия. Поэтому для описания этих параметров введены специальные единицы измерения. Опасность радиационного излучения характеризовали ранее в единицах **экпозиционной дозы**, т. е. как количество ионов в воздухе. Единицей экспозиционной дозы является **рентген** (Р), количество радиации, которое образует $1{,}61 \cdot 10^{15}$ ионных пар · (кг воздуха)$^{-1}$(или $2{,}58 \cdot 10^{-4}$ кулонов · (кг воздуха)$^{-1}$).

Количество энергии, требуемое для образования ионных пар в воздухе, составляет $5{,}4 \cdot 10^{-18}$ джоулей (Дж), и, таким образом, количество энергии, поглощенной воздухом при экспозиционной дозе 1 Р, равно:

$$1{,}61 \cdot 10^{15} \cdot 5{,}4 \cdot 10^{-18} = 0{,}00869 \text{ Дж} \cdot (\text{кг воздуха})^{-1}$$

Хотя рентген использовался при указании опасности радиационного излучения, в настоящее время от этого отказались: во-первых, эта единица определена только для Х-лучей (или γ-лучей); и, во-вторых, количество ионов или поглощенной энергии в разных материалах, включая живые ткани, по всей вероятности, отличается от таковой в воздухе.

Для того чтобы преодолеть эти ограничения, было введено понятие **радиационной поглощенной дозы** (рад). Рад определяется как доза радиации, соответствующая поглощению энергии 0,01 Дж · (кг поглощающего

вещества)$^{-1}$; в системе СИ вместо рад используют грэй, соответствующий поглощению 1 Дж · кг$^{-1}$ (т. е. 100 рад).

Грэй (Гр) вполне полезная единица, но все еще неудовлетворительно описывает опасность для живых организмов. Причина заключается в том, что разные типы радиации связаны с различной степенью биологической опасности. Следовательно, необходимо ввести корректирующий множитель, известный как **весовой фактор** (W), который вычисляется сравнением биологических воздействий любого типа радиации с воздействием Х-лучей. Единицей поглощенной, или эквивалентной, дозы, которая учитывает весовой фактор, является **зиверт** (Зв).

$$\text{эквивалентная доза (Зв)} = \text{Гр} \cdot W \tag{14.11}$$

Большинство изотопов, используемых в биологических исследованиях, излучают β-радиацию. Принято считать, что она обладает биологическим воздействием, очень сходным с действием Х-лучей, и имеет весовой фактор, равный 1. Следовательно, для β-радиации Гр = Зв. Альфа-частицы с их сильной ионизирующей энергией являются более токсичными и имеют весовой фактор 20. Поэтому для α-радиации 1 Гр = 20 Зв. Поскольку наше знание действия различных видов радиации прогрессирует, вероятно, что количественный фактор для различных типов радиации может в будущем измениться. Зная скорость распада радиоисточника, энергию радиации, проникающую способность радиации и расстояние между источником и работающим сотрудником, можно вычислить поглощенную дозу от облучения известных источников. Так как радиация испускается источником во всех направлениях, уровень облучения зависит от площади поверхности сферы $4\pi r^2$. Таким образом, поглощенная доза обратно пропорциональна квадрату расстояния от источника (r); или, другими словами, если расстояние удваивается, то доза уменьшается в 4 раза.

$$\text{доза}_1 \cdot \text{расстояние}_1^2 = \text{доза}_2 \cdot \text{расстояние}_2^2 \tag{14.12}$$

Взаимосвязь между расстоянием от радиоактивного источника и величиной поглощенной дозы иллюстрируется на рис. 14.15.

Скорость, с которой поглощается доза, называется **мощностью дозы**, выражаемой в Зв · ч$^{-1}$. Она может быть использована, для расчетов **общей (суммарной) дозы**. Например, источник излучает 10 мкЗв · ч$^{-1}$. Если вы работали с этим источником на протяжении 6 часов, общая поглощенная доза составит 60 мкЗв.

В настоящее время предельная доза для работников, подвергаемых радиации, составляет 15 мЗв в год для всего организма; но такое количество крайне редко получают даже те, кто находится в контакте с радиоактивным веществом, так как используемые уровни радиации очень низкие. Установлены предельные дозы для отдельных органов организма. Наиболее важно знать, что для рук он составляет 500 мЗв в год и для хрусталика глаза — 150 мЗв в год. Предельные дозы находятся под постоянным контролем, более того, в соответствии с международными нормами действует правило — всегда работать при уровне радиационного воздействия, который является «предельно разумно достижимо низким» (принцип ALARA,

Рис. 14.15. Зависимость доз радиоактивного облучения от расстояния и активности

as low as reasonbly achievable). Работа, при которой человек может получить 0,3–0,1 предельной дозы, должна выполняться в контролируемой зоне. На практике исследователи, работающие в области биологии, чаще всего получают незначительные дозы радиации. Рабочие места для экспериментов с ^{3}H или ^{14}C не требуют специального наблюдения. Контролируемые зоны требуются только при определенных обстоятельствах, например при хранении изотопов или при работе с радиоактивным иодом. Однако главная проблема при биологических исследованиях — **опасность внутреннего облучения**. Оно вызывается радиацией, проникающей в тело, например, при вдыхании, проглатывании, впитывании в кожу или прокалывании кожи. С наибольшей вероятностью это может произойти при работе с **открытыми источниками**, т. е. жидкостями и газами; большая часть биологических экспериментов проводится с радиоактивными жидкостями. Не допустить загрязнения организма удается при соблюдении секдующих правил безопасности:

- выполнение внутреннего регламента по технике безопасности, установленного в лаборатории,
- сознательного поведения персонала лаборатории,
- регулярного дозиметрического контроля,
- выполнения работы в специально отведенных местах.

Расчет дозы, полученной вследствие поглощения радиоизотопа, является сложным. Детальная информация опубликована Международной комиссией по радиологической защите, и оценочные данные, например для экспериментов с добровольцами, могут быть получены в Совете по национальной радиологической защите. Однако существует одно простое

Таблица 14.9. **Годовая поглощенная доза (ALI) для некоторых часто используемых изотопов**

Изотоп	Годовая доза поглощения (МБк)
^{3}H	480
^{14}C	34
^{32}P	6,3
^{125}I	1,3

понятие — **годовая поглощенная доза** (ALI, annual limit on intake). Поглощение одного ALI приводит к получению человеком предельной дозы для всего тела или отдельного органа. Некоторые предельные значения приведены в табл. 14.9. Правила радиационной безопасности одинаковы во многих странах. В США существует Свод федеральных нормативных актов. В Великобритании — Закон о радиоактивных веществах (1993) и Положения об ионизирующей радиации (1999). Каждая организация должна иметь соответствующие свидетельства (проверяемые Агентством по охране окружающей среды в США или Агентством окружающей среды в Великобритании) и консультанта по радиационной защите.

При работе с радиоактивными изотопами необходимо:

- соблюдать максимальную дистанцию между собой и источником,
- сводить к минимуму время облучения,
- использовать средства защиты.

14.6 РАДИОИЗОТОПЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

14.6.1 Изучение метаболизма

Радиоизотопы часто применяются для изучения метаболических путей. Для этого используют радиоактивный субстрат и отбирают образцы экспериментального материала в различное время, экстрагируя и разделяя продукты либо хроматографически, либо другим способом. Детекторы радиоактивности можно соединять колонкой для газо-жидкостной хроматографии или колонкой ВЭЖХ с целью контроля радиоактивности, выходящей из колонки во время разделения. В другом варианте радиоактивность может быть обнаружена методом бумажной или тонкослойной хроматографии с применением хроматографического сканера Гейгера–Мюллера или с помощью авторадиографии. Если предполагается, что вещество усваивается в определенном метаболическом пути, для подтверждения может быть ис-

пользован радиоизотоп. Так, возможно предсказать судьбу отдельных атомов углерода из [^{14}C]ацетата в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса). Путем выделения промежуточных продуктов цикла было установлено распределение углерода в цикле. Это так называемая **специфическая картина мечения**. Если полученная картина совпадает с теоретической, это очень хорошее доказательство предполагаемой схемы функционирования цикла Кребса.

Другим примером использования радиоизотопов для изучения метаболического пути являются исследования катаболизма глюкозы. Существует множество путей окисления глюкозы, два наиболее важных в аэробных организмах — гликолиз с последующим циклом Кребса и пентозофосфатный путь. Зачастую организмы или ткани обладают необходимыми ферментами для обоих путей, и интересно установить относительный вклад каждого из них в окисление глюкозы. Оба пути приводят к полному окислению глюкозы до диоксида углерода, но источник диоксида углерода — глюкоза, содержащая шесть атомов углерода, различен (по крайней мере, на начальных стадиях окисления субстрата экзогенного происхождения). Если можно собрать диоксид углерода, выделенный при окислении меченой глюкозы (например, [6-^{14}C]глюкозы или [1-^{14}C]глюкозы), можно оценить вклад каждого пути в окисление глюкозы.

Применение радиоизотопов в изучении цикла Кребса или катаболизма глюкозы — лишь два примера того, как такие изотопы могут использоваться для установления метаболических путей. Дополнительные детали и другие примеры, включая методы двойного мечения, можно найти в дополнительной литературе к разд. 14.7.

Скорость метаболизма

Радиоизотопы — это удобный инструмент для установления скорости метаболизма веществ в организме. В качестве примера рассмотрим метаболизм белков у крыс. Подопытной группе крыс ввели путем инъекции аминокислоту, содержащую радиоактивную метку, и оставили животных на 24 ч; в течение этого времени почти все аминокислоты входят в состав белков. Через определенные интервалы времени крыс умерщвляли и измеряли радиоактивность в интересующих органах или тканях. Таким способом можно было установить скорость метаболизма белка. Например, было показано, что белок печени обновляется за 7–14 дней, белок кожи и мышц — каждые 8–12 недель, коллаген — со скоростью менее 10% в год.

Изучение всасывания, накопления и перемещения веществ в организме

Радиоизотопы широко использовались при изучении механизмов и скоростей всасывания, накопления и перемещения неорганических и органических соединений в организмах растений и животных. Такие эксперименты обычно просты в исполнении и помогают устанавливать пути переноса и участки накопления молекул, представляющих биологический интерес.

Фармакологические исследования

Широко применяются радиоизотопы также при разработке новых лекарств. Это особенно сложный процесс, поскольку до начала использования препарата в клинических условиях необходимо продемонстрировать не только его положительное действие, но и многое другое. Например, должны быть определены место накопления лекарства, скорость накопления, скорость метаболизма и продукты метаболизма. Для целей каждого такого исследования радиоактивные метки являются особенно полезными, если не сказать незаменимыми. Например, авторадиография всех срезов экспериментальных животных (разд. 14.2.3) дает информацию об участке и скорости накопления, тогда как обычные методы, используемые для исследования метаболизма, могут применяться для определения скорости и продуктов метаболизма.

14.6.2 Аналитические применения

Изучение ферментов и процессов связывания лигандов

Любую ферментативную реакцию можно изучать, используя радиоактивную метку, как это описано в разд. 15.2.2, при условии, что имеется субстрат, содержащий радиоактивную метку. Изучение ферментов с помощью радиоактивного мечения обходится дороже, чем другие методы, но часто дает более высокую чувствительность. Радиоизотопы также используют для изучения механизма действия фермента и связывания лиганда с мембранными рецепторами (разд. 16.3.1).

Метод изотопного разбавления

В живых организмах есть много соединений, которые не могут быть изучены достоверно традиционными методами, поскольку они находятся в очень малых количествах и в смесях с другими соединениями. Метод изотопного разбавления удобен для преодоления этой проблемы, при этом нет необходимости количественного выделения соединений из организма. Например, если нужно определить количество железа в белковом препарате, это трудно сделать обычными методами, но возможно, если доступен радиоизотоп ^{59}Fe. В организм вводят подходящий белок, содержащий радиоизотоп железа, выделяют фракцию, содержащую связанное железо, и определяют общее содержание железа и радиоактивность.

Если исходная удельная активность составляла 10 000 расп./мин на 10 мг и удельная активность выделенной фракции 9000 расп./мин на 10 мг, то разница объясняется наличием железа в белке (x), т. е.

$$\frac{9000}{10} = \frac{10000}{10} + x$$

следовательно, $x = 1{,}1$ мг.

Этот метод широко применяется, например, при изучении роли и судьбы микроэлементов в различных организмах.

Пример 8 **ИЗОТОПНОЕ РАЗБАВЛЕНИЕ**

Вопрос При изучении белкового состава пищи измеряли содержание лизина с помощью метода изотопного разбавления. К кислотному гидролизату белка (1 мг) добавили 0,5 мкМ [^{3}H]лизина (1 Ки · моль$^{-1}$). Образец лизина был очищен от гидролизата хроматографически, удельная радиоактивность измерялась на сцинтилляционном счетчике при 25%-й эффективности счета и составила 2071 имп./(мин · мкг). Какова массовая доля лизина в соевом белке? 1 Ки = 22,2 · 10^{11} расп./мин; M_r лизина 148.

Ответ Для решения задачи надо использовать уравнение 14.13. Поскольку эффективность счета только 25%, необходимо умножить полученный ответ на 4.

0,5 мкмоль лизина = 74 мкг. Поэтому, используя уравнение 14.13, получим:

$(2071 \cdot 4)/1 = (22{,}2 \cdot 10^{11} \cdot 0{,}5 \cdot 10^{-6})/(74 + x)$

где x — содержание лизина в образце. Из этого уравнения получаем, что x = 60 мкг, т. е. в образце массой 1 мг содержание лизина 6%.

Радиоиммуноанализ

Наиболее значительные успехи биохимических технологий в последние годы связаны с разработкой метода радиоиммуноанализа. Этот метод подробно обсуждается в разд. 7.7.

Радиоизотопное датирование

Радиоизотопы применяют для датирования (т. е. определения возраста) пород, окаменелостей и отложений. Этот метод основан на определении доли природного радиоактивного элемента, которая распалась за время существования образца. Определяя количество оставшегося радиоизотопа (или количество продуктов радиоактивного распада) и зная периоды полураспада членов соответствующего радиоактивного ряда, можно найти возраст образца. Например, если обычное содержание радиоизотопа составляет 1%, а в исследуемом образце 0,25%, можно предположить, что возраст отложений — два периода полураспада. Если период полураспада равен 10^6 лет, возраст образцов $2 \cdot 10^6$ лет.

Для долгосрочного датирования необходимы изотопы с длинными периодами полураспада, например, ^{235}U, ^{238}U и ^{40}K, тогда как для датирования более близких событий широко используется радиоуглеродный метод (^{14}C). Понятно, что этот метод содержит в себе достаточно много допущений, поэтому палеонтологи и антропологи, которые используют этот метод, только приблизительно могут определить возраст своих образцов.

14.6.3 Другие применения

Методы молекулярной биологии

Последние достижения в молекулярной биологии, которые привели к успехам в генетических манипуляциях, в большой степени связаны с

использованием радиоизотопов при определениях первичных последовательностей ДНК и РНК, анализе репликации ДНК, транскрипции, в синтезе комплементарной ДНК, в технологии рекомбинантной ДНК и других новейших исследованиях. Многие из этих методов более полно обсуждаются в гл. 5 и 6.

Клиническая диагностика

Радиоизотопы широко применяются в медицине, особенно для диагностических целей. Проверка функции легких, выполняемая обычно с использованием ксенона-133 (^{133}Xe), особенно полезна для диагностики нарушения легочной вентиляции. Исследование функции почек с использованием [^{133}I]иодогиппуровой кислоты применяется для диагностики почечных инфекций, с целью обнаружения окклюзии почечных канальцев или при нарушениях функций двух почек.

Различные гематологические заболевания также изучаются с использованием радиоизотопов. Например, анализируют продолжительность жизни кровяных клеток, объем крови и время циркуляции крови, т. е. все те параметры, которые могут изменяться при определенных клинических состояниях.

Экологические исследования

В основном радиоактивные метки применяют при выполнении различных биохимических, клинических или фармакологических анализов, а также при экологических исследованиях. В частности, радиоактивное мечение широко применяется при изучении миграции и поведения многих животных. Другое применение в экологии — изучение природных пищевых цепей; для этого первые члены пищевой цепи можно пометить радиоизотопами, тогда путь радиоактивности может быть прослежен во всей пищевой цепи.

Стерилизация пищи и оборудования

Очень сильные γ-излучатели в настоящее время широко применяются в пищевой промышленности для стерилизации уже упакованных продуктов, таких как молоко и мясо. Обычно используется либо ^{60}Co, либо ^{137}Ce, но следует удостовериться, что при этом сам продукт не изменяет своего качества. Допускается неполная стерилизация при необходимости уменьшения дозы облучения с тем, чтобы уменьшить риск порчи продукта от облучения. ^{60}Co и ^{137}Ce также используются для стерилизации одноразовой пластиковой посуды, например чашек Петри и шприцев, а также для стерилизации препаратов, вводимых путем инъекции.

Мутагены

Радиоизотопы могут вызывать мутации, особенно в микроорганизмах. В различных микробиологических исследованиях, особенно в промышленной микробиологии, мутантов получают для определенных целей. Например, в разработке новых штаммов микроорганизмов, которые производят высокий уровень желаемого микробного продукта, часто применяют мутагенез с помощью радиоизотопов.

Таблица 14.10. **Единицы, обычно используемые в радиоактивности**

Единица	Сокращение	Определение
Число импульсов в минуту или секунду	имп./мин имп./с	*Зарегистрированная* скорость распада
Число распадов в минуту или секунду	расп./мин расп./с	*Реальная* скорость распада
Кюри	Ки	Число расп./с, эквивалентное излучению 1 г радия ($3.7 \cdot 10^{10}$ расп./с)
Милликюри	мКи	Ки $\cdot 10^{-3}$ или $2{,}22 \cdot 10^{9}$ расп./мин
Микрокюри	мкКи	Ки $\cdot 10^{-6}$ или $2{,}22 \cdot 10^{6}$ расп./мин
Беккерель (единица в системе СИ)	Бк	1 расп./с
Терабеккерель	ТБк	10^{12} Бк или 27,027 Ки
Гигабеккерель	ГБк	10^{9} Бк или 27,027 мКи
Мегабеккерель	МБк	10^{6}Бк или 27,027 мкКи
Электронвольт	эВ	Энергия, приобретаемая ускоряющимся электроном при разности потенциалов 1 В. Эквивалентна $1{,}6 \cdot 10^{-19}$ Дж
Рентген	Р	Радиации, которая продуцирует $1{,}61 \cdot 10^{15}$ ионных пар на кг
Рад	рад	Доза радиоактивного облучения, которая соответствует поглощению энергии 0,01 Дж $\cdot$ кг$^{-1}$
Грэй	Гр	Доза радиоактивного облучения, которая соответствует поглощению энергии 1 Дж $\cdot$ кг$^{-1}$. Таким образом, 1 Гр = 100 рад
Рем	рем	Радиация, соответствующая поглощению человеком дозы радиоактивного облучения, эквивалентной 1 рад Х-лучей
Зиверт	Зв	Радиация, соответствующая поглощению человеком дозы радиоактивного облучения, эквивалентной 1 Гр Х-лучей. Таким образом, 1 Зв = 100 рем

14.7 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

BILLINGTON, D., JAYSON, G. and MALTBY, P.J. (1992). *Radioisotopes*. Bios Scientific, Oxford. Принципы и основное применение метода в биологических науках; для аспирантов и научных сотрудников.

KONNOR, K.J. and MCLINTOCK, I.S. (1994). *Radiation Protectiom Handbook for Laboratory Workers*. HHSC, Leeds. Руководство по безопасному проведению работ в лаборатории.

SLATER, R.J. (1996). Radioisotopes in molecular biology. In *Molecular Biology and Molecular Medicine,* ed. R.A. Myers, pp. 209–219. VCH, New York. Обзор применения радиоизотопов в молекулярной биологии.

SLATER, R.J. (2002). *Radioisotopes in Biology — A Practical Approach,* 2nd edn. Oxford University Press, Oxford. Детальное описание методов работы с радиоактивными веществами в биологических исследованиях.

Глава 15
Ферменты

15.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА. НОМЕНКЛАТУРА

Ферменты — белки, построенные из одной или нескольких аминокислотных цепей и выступающие в роли биологических катализаторов, т. е. они способствуют протеканию специфических химических реакций в мягких условиях, характерных для большинства живых организмов. Ферменты имеют три важнейших свойства.

- *Специфичность*. Ферменты высокоспецифичны в той реакции, которую они катализируют, и к тем субстратам, с которыми они взаимодействуют. В общем анаболические ферменты более специфичны, чем катаболические. При **разрыве связи** «работаю» специфические ферменты пептидазы и эстеразы, которые гидролизуют соответствующие связи. Эти ферменты проявляют активность только в том случае, если расщепляемая связь соединяет строго определенные функциональные группы. **Групповая специфичность** характерна для ферментов, способствующих протеканию определенной реакции в группе структурно родственных субстратов. Так, киназы катализируют фосфорилирование субстратов, имеющих нечто общее в структуре: определенную аминокислоту (например, тирозинкиназы) или сахар (гексокиназа). **Абсолютную** или **почти абсолютную специфичность** имеют ферменты, катализирующие одну из реакций анаболизма. Кроме того, ферменты могут обладать стереоспецифичностью к оптическим и геометрическим изомерам или, например как NAD^+- или $NADP^+$-зависимая дегидрогеназа, различать почти идентичные атомы водорода, расположенные на противоположных сторонах никотинамидного кольца (см. разд. 15.4.4).
- *Высокая скорость катализа*. Ферменты ускоряют химические реакции до 10^{12} раз по сравнению с некатализируемыми реакциями. Ускорение достигается благодаря образованию энергетически выгодного переходного состояния, что снижает энергию активации катализируемой реакции. Ферменты, как и любые катализаторы, не смещают положения равновесия обратимой реакции, но ускоряют его установление (см. разд. 15.3.5).

- *Возможность регуляции*. Активность ферментов, катализирующих конкретную реакцию метаболизма, повышается или понижается в ответ на изменения внутриклеточных и внеклеточных условий. Регуляторные механизмы вызывают краткосрочные, среднесрочные и долгосрочные изменения активности. В качестве примеров можно привести ингибирование по механизму обратной связи, ковалентную модификацию и индукцию или репрессию гена (см. разд. 15.5.2).

Участки связывания

Обратимое связывание субстратов молекулами ферментов происходит в специфических участках, которые обычно называют **активными** (или **каталитическими**) **центрами**. Такие участки сформированы трехмерной структурой белка, а их непосредственное функционирование осуществляется за счет нескольких специфических аминокислотных остатков. Образующийся **фермент–субстратный комплекс** благодаря действию специфических аминокислотных остатков активного центра фермента способствует протеканию химической реакции. В связывании субстрата в правильной пространственной ориентации могут участвовать различные аминокислотные остатки. Кроме того, фермент может иметь **регуляторные** или **аллостерические участки**, с которыми связываются другие, регуляторные молекулы (обычно не субстраты), например ключевые метаболиты типа АТФ или АМФ, что приводит к конформационным изменениям в активном центре, приводящим к усилению или ослаблению активности фермента. Регуляторные молекулы называют **эффекторами**; участки связывания эффекторов иногда находятся на той же субъединице белка, что и активный центр, а иногда на другой (см. разд. 15.3.3).

Связывание фермента с субстратом происходит путем слабых обратимых взаимодействий, в которые включаются:

- образование ионных пар (солевых мостиков) между ионизированными группами ($-NH_3^+$, $-COO^-$) субстрата и противоположно заряженными группами каталитического центра фермента;
- водородные связи между такими группами, как –OH, $-NH_2$, –COOH;
- вандерваальсовы взаимодействия между атомами;
- гидрофобные взаимодействия;
- π-взаимодействия, имеющие электростатическую природу, между катионом, например протонированной аминогруппой субстрата, и отрицательным электростатическим потенциалом, обусловленным π-системой ароматических групп в боковых цепях фенилаланина, тирозина или триптофана, находящихся в активном центре фермента.

Кофакторы

Каталитическая активность ферментов часто зависит от присутствия небелковых молекул, называемых **кофакторами** или **коферментами**. Такие молекулы связаны с ферментом или слабыми, или очень напряженными

(непрочными) связями; в последнем случае их называют **простетическими группами**. В качестве примеров коферментов можно назвать NAD^+, $NADP^+$, FMN и FAD, а в качестве примеров простетических групп — гем, олигосахариды, а также ионы металлов Mg^{2+}, Fe^{2+} или Zn^{2+}. Фермент без кофактора называют **апоферментом**, а содержащий кофактор активный фермент — **холоферментом**.

Номенклатура и классификация

На основании типа катализируемой химической реакции все известные ферменты делятся на шесть классов. Каждый класс ферментов включает в себя подклассы в соответствии с природой химических групп и кофакторов, задействованных в реакции. Согласно правилам, разработанным номенклатурным комитетом Международного биохимического союза, каждому ферменту присвоен **код** из четырех цифр (КФ) и систематическое название, основанное на катализируемой данным ферментом реакции.

- *Класс 1.* **Оксидоредуктазы** катализируют перенос или атома кислорода, или атома водорода, или электрона от одного субстрата к другому. Относятся: дегидрогеназы, редуктазы, оксидазы, гидроксилазы, пероксидазы и каталазы.
- *Класс 2.* **Трансферазы** катализируют перенос химических групп между субстратами. Относятся: киназы, аминотрансферазы, ацетилтрансферазы, карбамоилтрансферазы и фосфорилазы.
- *Класс 3.* **Гидролазы** катализируют гидролитическое расщепление связей. Относятся: пептидазы, эстеразы, фосфатазы и сульфатазы.
- *Класс 4.* **Лиазы** катализируют удаление электронов с образованием двойной связи. Относятся: аденилатциклазы, енолазы и альдолазы.
- *Класс 5.* **Изомеразы** катализируют взаимные превращения изомеров путем внутримолекулярных перегруппировок. Относятся: фосфоглюкомутазы и глюкозо-6-фосфат-изомеразы.
- *Класс 6.* **Лигазы** (или **синтетазы**) катализируют образование ковалентной связи с сопутствующим расщеплением нуклеотидтрифосфата, обычно АТФ. Относятся: карбамоилфосфатсинтетазы и ДНК-лигазы.

Как образуется название фермента? Пример — алкогольдегидрогеназы, которая катализирует следующую реакцию:

$$\text{спирт} + NAD^+ \rightleftarrows \text{альдегид или кетон} + NADH + H^+$$

Систематическое название фермента — алкоголь : NAD^+-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1. Первая единица в номере означает, что фермент относится к классу оксидоредуктаз, вторая — в качестве донора выступает группа –CH–OH, третья — акцептором служит NAD^+ или $NADP^+$, а четвертая

единица — в классе 1.1.1 этот фермент первым получил свое название. Систематические названия ферментов употребляются редко, гораздо чаще применяют тривиальные названия. При правильном использовании они указывают на суть катализируемой реакции, но с их помощью нельзя d полной мере идентифицировать фермент. Например, название фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа ничего не говорит об участии в реакции ортофосфата и NAD^+, а название киназа фосфорилазы не передает информации о том, что именно фосфорилаза b подвергается фосфорилированию при участии АТФ.

Изоферменты

Некоторые ферменты существуют в нескольких формах, называемых **изоферментами**, которые различаются аминокислотными последовательностями. Например, фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ; КФ 1:1:1:27) имеет пять изоформ. ЛДГ представляет собой тетрамер, который может быть собран из двух субъединиц — H (*от англ.* heart) и M (*от англ.* muscle). Возможно существование пяти изоформ состава H4, H3M, H2M2, HM3 и M4. Эти изоферменты разделяются методом электрофореза; они имеют разное сродство к субстратам лактату и пирувату и к их аналогам. Кроме того, изоформы отличаются по максимальной каталитической активности и тканевому распределению, что используется в диагностических целях (разд. 1.7.3).

Полиферментные комплексы

Некоторые ферменты, участвующие в последовательных реакциях определенных метаболических путей, образуют полиферментные комплексы. В качестве примера можно назвать синтазу жирных кислот (КФ 2.3.1.86; семь каталитических центров), пируватдегидрогеназу (КФ 2.7.1.99; три каталитических центра) и ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7; три каталитических центра). Полиферментные комплексы обладают некоторыми преимуществами перед отдельными ферментами; например, в них сокращается время диффузии продукта первой реакции до каталитического центра следующего фермента, уменьшается вероятность расходования продуктов промежуточных реакций в посторонних реакциях, а также возрастает возможность активации одного фермента другим (разд. 15.4.7).

Единицы ферментативной активности

В СИ единица ферментативной активности — **катал** (моль расходуемого субстрата или образующегося продукта в секунду), но чаще применяются **международные единицы** МЕ (мкмоль расходуемого субстрата или образующегося продукта в минуту). Кроме того, используется **удельная активность** в МЕ/мг белка или катал/кг белка (60 МЕ/мг белка ~ 1 катал/кг белка).

15.2 МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

15.2.1 Общие замечания

Ферментативный анализ предследует разные цели, но чаще всего — это решение одной из двух указанных ниже задач.

- Количественное определение (концентрация или активность) фермента в конкретном образце (особенно важная задача для диагностической энзимологии, см. разд. 1.7.3).
- Изучение кинетических закономерностей ферментативной реакции и нахождения констант K_M, V_{MAX} и k_{cat}.

Методы ферментативного анализа можно подразделить на **кинетические** и **фиксированные по времени**. Кинетические методы позволяют регистрировать изменения определенных параметров (например, поглощения или флуоресценции) в реакционной среде, а методы анализа, фиксированные во времени, требуют периодических отборов проб из реакционной смеси и их анализа каким-либо подходящим методом. Понятно, что кинетические методы являются более точными, так что при возможности следует пользоваться ими.

Начальная скорость

После смешивания фермента с избытком субстрата сначала имеет место краткий период (сотни микросекунд), когда образуются промежуточные продукты, в конечном итоге превращающиеся в продукты (рис. 15.1). Для изучения этого так называемого **предстационарного состояния** необходимы специальные методы, которые обсуждаются в разд. 15.2.3. Далее скорость реакции и концентрации промежуточных продуктов изменяются довольно медленно — наступает **стационарное состояние**. Соотношение концентраций субстратов [S] и продуктов [P] реакции по достижении стационарного состояния показано на рис. 15.2. По тангенсу угла наклона кривых в начале координат можно рассчитать **начальную скорость** реакции v_0. При заданных концентрациях фермента и субстрата эта величина соответствует максимальной скорости ферментативной реакции при этих экспериментальных условиях. Определение начальной скорости ферментативной реакции необходимо для установления механизма этой реакции, а также для оценки активности фермента в биологическом образце. Численное значение этого параметра зависит от множества факторов, в том числе от концентрации фермента, субстрата, pH, температуры и присутствия ингибиторов или активаторов.

Начальную скорость реакции иногда определяют даже на основании одного-единственного измерения расхода субстрата или накопления продукта в определенный момент времени. Такой упрощенный подход оправдан только для очень короткого времени, когда реакция действительно протекает с постоянной скоростью. Линейная зависимость соблюдается лишь в начале измерения в течение не более 10% общего време-

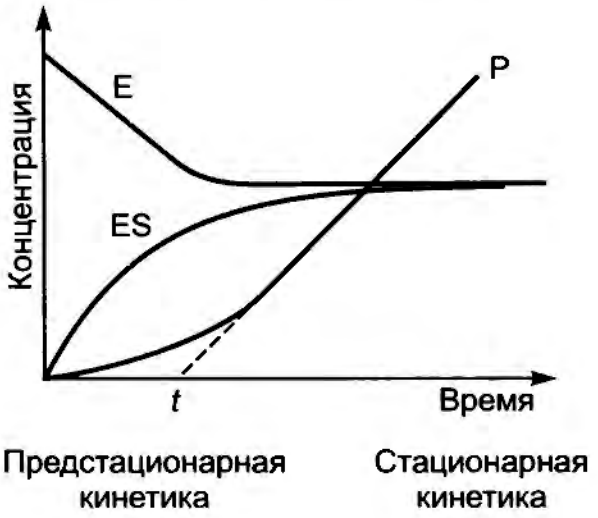


Рис. 15.1. Предстационарная кинетика взаимодействия фермента (E) с субстратом (S); P — продукт, t — индукционный период

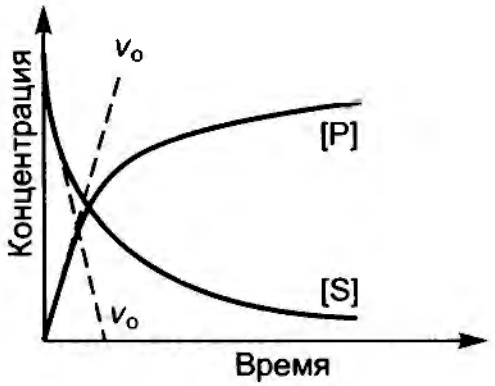


Рис. 15.2. Определение начальной скорости ферментативной реакции (v_0) по кинетическим кривым расхода субстрата (S) и накопления продукта (P)

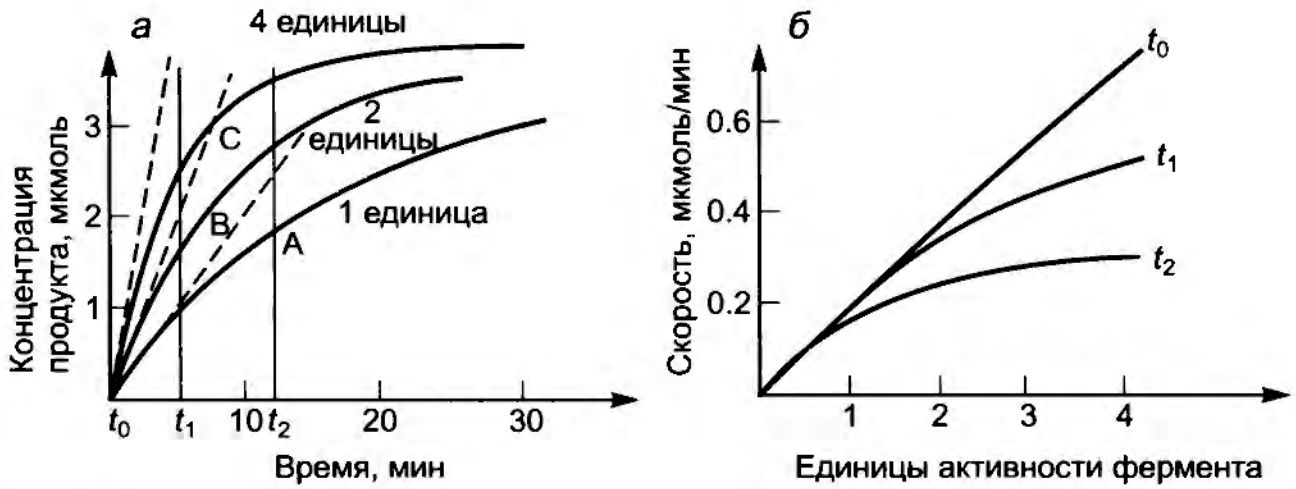


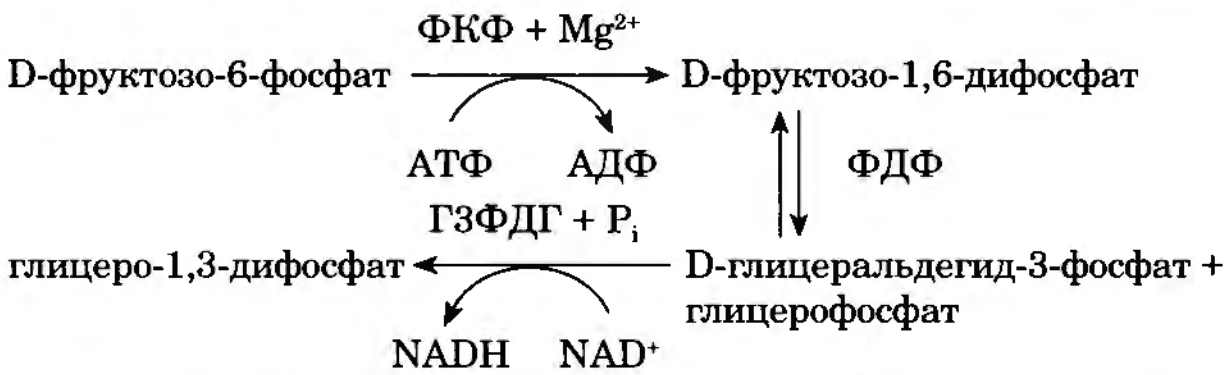
Рис. 15.3. Определение начальной скорости ферментативной реакции: *а* — зависимость концентрации образующегося продукта от количества фермента; *б* — зависимость начальной скорости от концентрации фермента при определении методом тангенсов (t_0) и при проведении измерения в фиксированные моменты времени (t_1 и t_2)

ни изменения скорости, так что ошибка определения тем меньше, чем раньше от момента начала реакции проведено измерение. В этом случае начальная скорость пропорциональна времени и количеству субстрата, прореагировавшего через этот промежуток времени. Возможные проблемы измерения через фиксированный промежуток времени отражены на рис. 15.3. Здесь показана зависимость хода реакции от концентрации фермента при постоянной исходной концентрации субстрата (рис. 15.3, *а*). Определение скорости реакции в момент времени t_0 (по тангенсу угла наклона) или в фиксированные моменты времени t_1 и t_2 позволяет построить зависимость начальной скорости от концентрации фермента (рис. 15.3, *б*). Видно, что только метод тангенсов позволяет получить правильную линейную зависимость. Поскольку корректное измерение начальной скорости возможно лишь при очень малых изменениях концентраций субстрата и продукта, гораздо более точный результат получается именно при анализе количества продукта, поскольку относительное увеличение его концентрации немного выше соответствующего уменьшения концентрации субстрата.

15.2.2 Методы стационарной кинетики

Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях

Многие субстраты и продукты ферментативных реакций поглощают свет в видимой или ультрафиолетовой области, так что для изучения этих реакций можно использовать изменения поглощения при протекании реакции. Важно, чтобы субстрат и продукт поглощали при разных длинах волн и чтобы для анализируемого вещества соблюдался закон Бугера–Ламберта–Бера (разд. 12.4.1). Многие ферментативные реакции связаны со взаимными превращениями NAD(P)$^+$ и NAD(P)H. Оба вещества поглощают при 260 нм, но лишь восстановленная форма поглощает еще и при 340 нм. Ферменты, не связанные с этими коферментами, можно анализировать с помощью **сопряженных реакций** — ферментативных реакций, имеющие общие промежуточные продукты. Данный принцип проиллюстрирован ниже на примере определения 6-фосфофруктокиназы (ФФК; КФ 2.7.1.11) с помощью сопряженных реакций с участием фруктозодифосфатальдолазы (ФДФ; КФ 4.1.2.13) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ; КФ 1.2.1.12).



Анализируемая смесь должна содержать D-фруктозо-6-фосфат, АТФ, ионы магния, ФДФ, ГЗФДГ, NAD$^+$ и P_i, причем все эти компоненты в избытке. В таких условиях реакция идет до конца, так что скорость расходова-

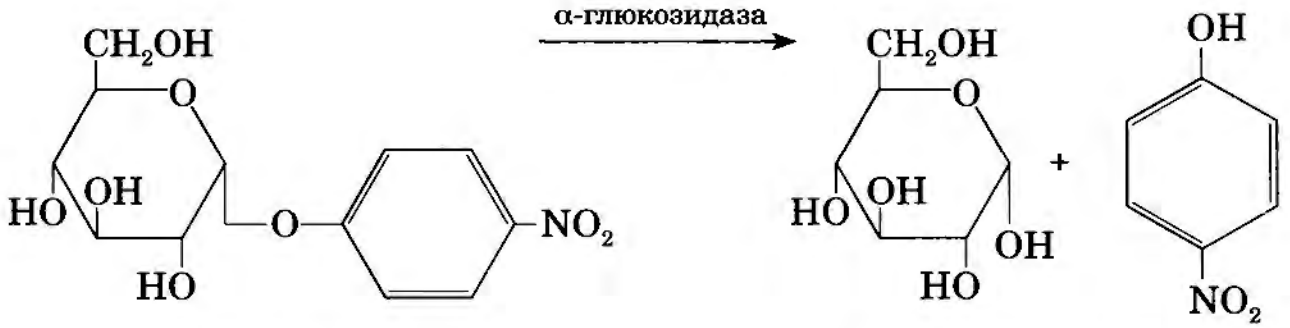
ния NAD^+ и образования NADH (и, следовательно, увеличение поглощения при 340 нм) зависит исключительно от активности известного объема добавленной 6-фосфофруктокиназы. В принципе, нет никаких ограничений по числу ферментов, участвующих в таких сопряженных реакциях; важно только, чтобы скорость суммарной реакции лимитировалась концентрацией анализируемого фермента.

Количество единиц ферментативной активности в анализируемом образце можно рассчитать по закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$\text{Активность фермента (катал/см}^3\text{ анализируемого раствора)} = \frac{\Delta E_{340}}{\varepsilon_\lambda} \cdot \frac{a}{1000} \cdot \frac{1000}{x}$$

где ΔE_{340} — изменение поглощения при 340 нм в секунду (скорректированное на контрольный образец), ε_λ — молярный коэффициент экстинкции NADH при 340 нм ($6{,}3 \cdot 10^3$ дм^3/(моль · см)), a — общий объем реакционной смеси (см^3; обычно ~3 см^3) в кювете с длиной светового пути 1 см, x — объем (мм^3) анализируемого раствора, добавленного в реакционную смесь. Если разделить активность фермента на общую концентрацию белка в анализируемом растворе, можно получить удельную активность (катал/кг).

Возможности метода расширяются при использовании синтетических субстратов, превращающихся в окрашенные продукты. Существует множество фирменных субстратов такого рода, особенно для анализа гидролитических ферментов. У многих исследователей наиболее часто применяемыми окрашенными продуктами являются фенолфталеин и *n*-нитрофенол; оба проявляют окраску в щелочной среде. В качестве примера приведем метод определения α-D-глюкозидазы (мальтазы; КФ 3:2:1:20):



n-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид — D-глюкоза — *n*-нитрофенол (желтого цвета)

С помощью синтетических красителей можно анализировать активность оксидоредуктаз. Окисленные и восстановленные формы таких красителей имеют разную окраску. В качестве примеров можно назвать тетразолиевые красители метиленовый синий и дихлорфенолиндофенолят-2,6, а также метиловый фиолетовый и бензиловый фиолетовый (табл. 1.8). Возможность использования этих красителей определяется отношением окислительно-восстановительных потенциалов красителя (разд. 1.5) и субстрата: для протекания реакции в желаемом направлении изменение свободной энергии должно быть отрицательным.

Спектрофлуориметрические методы

Ферментативный анализ с использованием флуоресцентного детектирования имеет важное практическое преимущество, заключающееся в высокой чувствительности этого детектора, и, следовательно, позволяет определять низкие концентрации ферментов. Однако этот метод очень чувствителен к наличию в образцах примесей, способных вызывать тушение флуоресценции. Кроме того, некоторые флуоресцирующие вещества разлагаются, особенно под действием УФ-излучения. NAD(P)H обладает способностью флуоресцировать, поэтому зависимые от него ферменты можно определять либо по поглощению при 340 нм, либо по флуоресценции (первичная длина волны 340 нм, длина волны сравнения 378 нм). Кроме того, для определения некоторых ферментов существуют синтетические субстраты, высвобождающие флуоресцирующий продукт. В качестве примера приведем определение β-D-глюкуронидазы (КФ 3:2:1:31) с 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронидом в качестве субстрата, в результате разложения которого образуется флуоресцирующий продукт 4-метилумбеллиферон.

Люминесцентные методы

Люминесцентные реакции часто используют в ферментативном анализе в связи с их высокой чувствительностью. В качестве примера приведем реакцию с участием люциферазы:

$$\text{Люциферин} + \text{АТФ} + O_2 \xrightleftharpoons{\text{люцифераза}} \text{оксилюциферин} + \text{АМФ} + PP_i + CO_2 + \text{свет}$$

Данный метод можно использовать для определения АТФ, а с помощью сопряженных реакций также для определения ферментов, использующих АТФ. В качестве примера приведем метод определения малатдегидрогеназы (МДГ; КФ 1:1:1:37). Данная система сопряженных реакций основана на том, что бактериальная люцифераза использует восстановленный FMN для окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов (RCHO).

$$\text{S-малат} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{МДГ}} \text{оксалоацетат} + NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + FMN \xrightleftharpoons{\text{оксидоредуктаза}} FMNH_2 + NAD^+$$

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \xrightleftharpoons{\text{люцифераза}} FMN + RCOOH + H_2O + \text{свет}$$

В условиях избытка реагентов равновесие каждой реакции сдвигается вправо.

Иммунохимические методы

Для определения ферментов методом высокочувствительного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) необходимы моноклональные антитела к конкретному ферменту. Данный метод позволяет различать

изоформы ферментов, что делает его перспективным при медицинской диагностике. Важный клинический пример — определение креатинкиназы (КК). Этот белок представляет собой димер, построенный из двух субъединиц М и В. Определение изоферментов МВ играет важную роль при диагностике инфаркта миокарда, причем анализ осуществляют именно иммунохимическим методом. Более подробно анализ КК-МВ обсуждается в разд. 1.7.3. Принцип данного метода анализа рассмотрен в разд. 7.7.

Ион-селективные и кислородные электроды

Ион-селективные электроды (ИСЭ) и газочувствительные электроды при определениях, например, ионов аммония, кислорода, диоксида углерода и аммиака применяются во многих методах ферментативного анализа, где эти вещества расходуются или образуются. Это чувствительные методы, результаты хорошо воспроизводятся и могут применяться для анализа очень малых объемов образца (см. разд. 1.5.2).

Радиоизотопные методы

Эти методы, хотя и обладают очень высокой чувствительностью, в ферментативном анализе применяются только в тех случаях, когда разделение меченых и немеченых форм субстратов или продуктов нетрудоемко. Чаще всего их используют тогда, когда один из продуктов находится в газовой фазе. В качестве примера приведем реакцию с участием глутаматдекарбоксилазы (ГД):

$$\underset{\text{L-глутаминовая кислота}}{HOOCCH_2CH(NH_2)^{14}COOH} \xrightleftharpoons{\text{ГД}} {}^{14}CO_2 + \underset{\gamma\text{-аминомасляная кислота}}{HOOCCH_2CH_2CH_2NH_2}$$

Образующийся $^{14}CO_2$ поглощается щелочью, что позволяет определить скорость реакции. Если в реакции газ не образуется, для разделения субстрата и продукта применяют экстракцию растворителем, но для рутинного анализа это довольно сложно. Для определения ГД можно использовать электрод, селективный к CO_2.

Некоторые практические замечания

Когда конкретный метод анализа выбран, следует учесть некоторые практические моменты.

- Все реактивы должны иметь достаточную степень чистоты, прибор должен быть чистым и готовым к работе.
- Следует контролировать pH, температуру и ионную силу раствора.
- Все эксперименты должны предусматривать наличие контроля; для этого готовят реакционную смесь, полностью идентичную анализируемому образцу, но не содержащую фермента или субстрата. При изменении параметров контрольного раствора, не содержащего анализируемого фермента, говорят о протекании неферментативной реакции, а при изменении параметров контрольного раствора, не содержащего субстрата, выявляются фоновые реакции в образце фермента. Всегда стоит про-

верить наличие линейной зависимости начальной скорости от концентрации фермента, проведя эксперимент с различными объемами анализируемого образца; это позволяет удостовериться в отсутствие в образце активаторов или ингибиторов реакции.

- Определение активности фермента следует проводить при избытке субстрата (по меньшей мере $10K_м$, см. разд. 15.3).
- Кинетические измерения следует проводить при концентрации субстрата от 0,1 до $10K_м$.
- Большинство реакций проводят при 30 °C, но некоторые лучше проводить при 37 °C — это ближе к физиологическим условиям.
- Необходимо построить градуировочную зависимость и подтвердить применимость метода (см. разд. 1.6.5).

15.2.3 Методы предстационарной кинетики

Обсуждавшиеся выше методы нельзя применять для анализа ферментативной реакции в тот короткий промежуток времени (обычно миллисекунды), пока не установится стационарное состояние в процессе образования фермент–субстратного комплекса. На рис. 15.1 изображены кинетические кривые, соответствующие этому начальному этапу ферментативной реакции. Индукционный период t связан с константами скорости образования — диссоциации фермент–субстратного комплекса (ES). Для проведения анализа в этот начальный момент времени существуют две возможности.

Методы быстрого перемешивания

В **методе непрерывной струи** растворы фермента и субстрата с помощью шприца с объемом 10 см^3 вводят в камеру для перемешивания, объем которой обычно составляет 100 мм^3. Далее смесь с выбранной заранее скоростью прокачивают через тонкую трубочку, освещаемую источником света и связанную с фотоумножителем. Скорость потока жидкости через трубочку высокая, обычно около 10 м/с; при таких условиях создается достаточная турбулентность, обеспечивающая гомогенность раствора. Точное время от момента перемешивания до момента наблюдения можно рассчитать, зная скорость потока. Изменяя скорость потока, можно изменять скорость реакции в момент наблюдения, т. е. изучать зависимость степени протекания реакции от времени. По этим данным можно рассчитать константы скорости реакций. Для проведения такого исследования требуются сравнительно небольшие количества реагирующих веществ и ограничения накладывает только время, необходимое для смешивания двух растворов.

Метод остановленной струи — это вариант струевого метода, в котором вскоре после выхода реакционной смеси из камеры для перемешивания поток останавливают, а детектор определяет изменения таких экспериментальных параметров, как поглощение или флуоресценция (рис. 15.4). Используют специальные проточные ячейки, которые позволя-

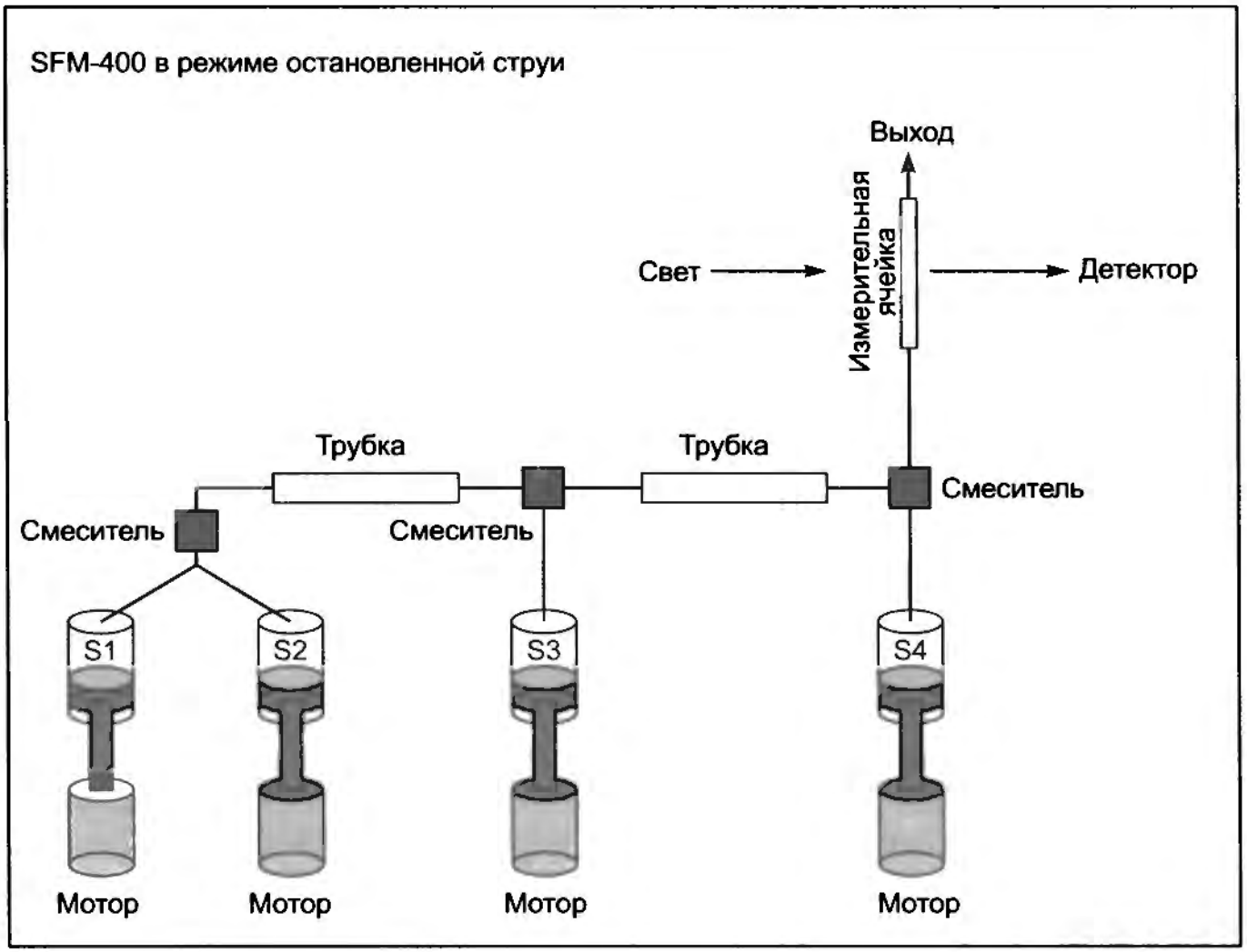
ют снимать показания под углом 180° к источнику света при измерении поглощения, пропускания или кругового дихроизма или 90° — флуоресцентное излучение, анизотропия флуоресценции или рассеяние света. Кроме того, можно получать масс-спектры, определять рентгеновское рассеяние или проводимость. Привлекательность метода состоит в малом расходовании реактивов.

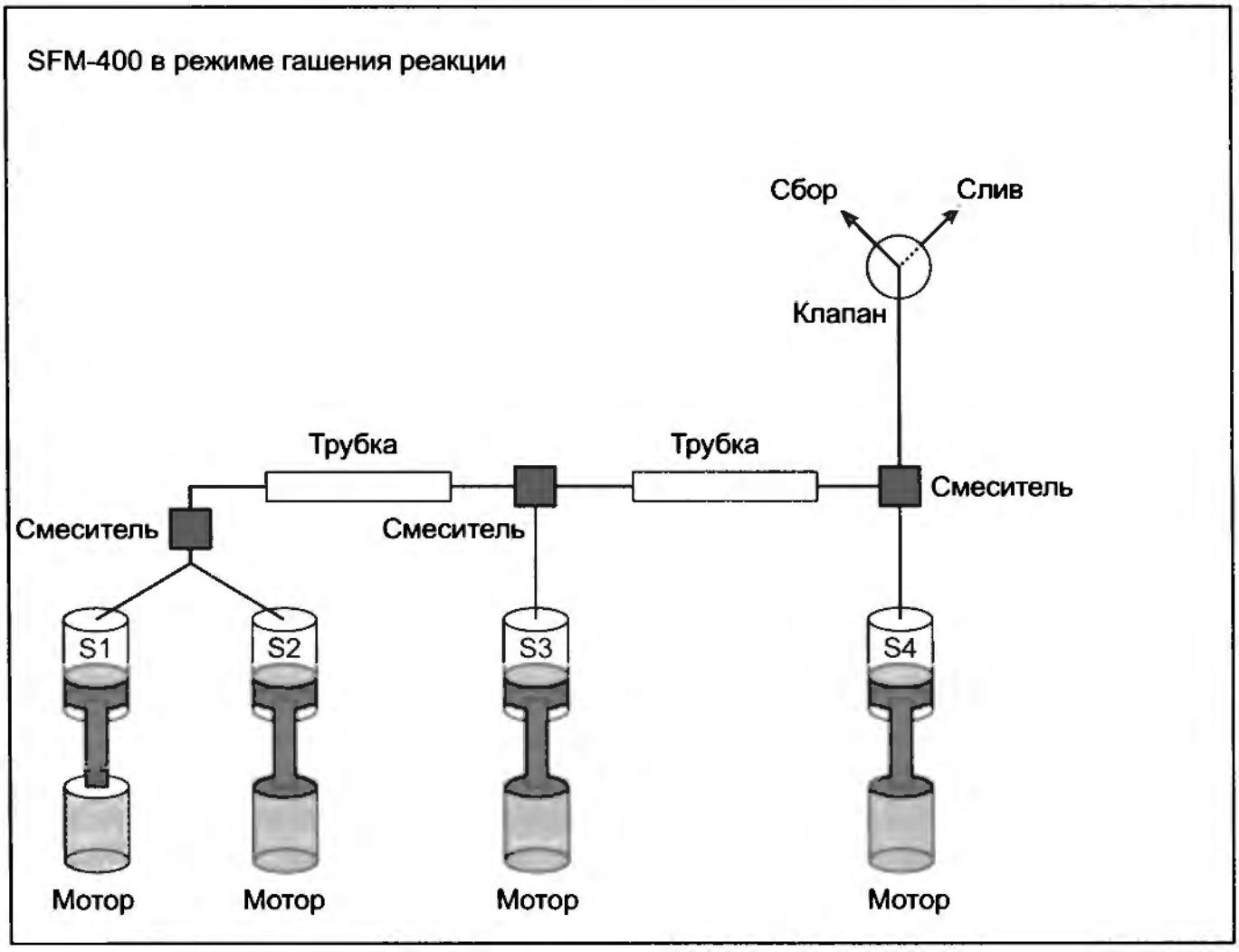
Вариант метода остановленной струи — **метод гашения реакции**. После смешивания реагентов к ним из следующего шприца добавляют реагент, останавливающий реакцию, например трихлоруксусную кислоту. Далее с помощью подходящего метода определяют количество образовавшихся продуктов. Варьируя время от смешивания реагентов до добавления гасителя, можно изучать кинетику реакции. Недостаток такого подхода состоит в расходовании бóльшего количества реагентов, чем в методе остановленной струи, поскольку определенное время следят не за одной реакцией, а проводят серию реакций. Мониторинг протекания реакции в первые миллисекунды в обоих вариантах анализа представляет собой сложную задачу, поскольку реагенты должны как следует перемешаться. Частично эту проблему можно решить путем изменения pH или температуры, чтобы затормозить протекание реакции на этот период. В обоих вариантах метода обычно используют синтетические субстраты, из которых образуются окрашенные продукты или окрашенные промежуточные продукты с ацильными или фосфорильными группами.

Релаксационные методы

Ограничения метода остановленной струи главным образом связаны с мертвым временем, когда происходит смешивание фермента и субстрата. В релаксационных методах равновесную смесь реагирующих веществ готовят заранее, а положение равновесия сдвигают путем изменения условий реакции. Наиболее распространенным вариантом такого метода является **метод температурного скачка**, при котором температуру реакционной смеси резко повышают на 5–10 °C. Нагрев обычно осуществляют разрядом высоковольтного конденсатора или инфракрасного лазера. Скорость установления новой температуры в смеси (время релаксации τ обычно несколько микросекунд) связана обратной зависимостью с константами скорости реакции. За установлением нового равновесия следят с помощью подходящего спектрофотометрического детектора. Полученные данные позволяют определить промежуточные продукты и рассчитать константы скорости реакции.

С помощью описанных выше методов предстационарной кинетики было показано, что взаимодействие фермента с его субстратами происходит очень быстро; константы скорости образования комплекса ES (реакция второго порядка) составляют 10^6–10^8 (моль · дм$^{-3}$)$^{-1}$ · с$^{-1}$, а константы скорости распада ES (реакция первого порядка) — 10–10^4 с$^{-1}$. Комплексообразование происходит медленнее, чем это предсказывает теория соударений, что подтверждает необходимость правильной ориентации молекул субстрата и фермента с последующими конформационными изменениями в белке, а, возможно, и с вовлечением процессов сольватации.


SFM-400 в режиме остановленной струи
Выход
Измерительная ячейка
Свет
Детектор
Трубка
Трубка
Смеситель
Смеситель
Смеситель
S1
S2
S3
S4
Мотор
Мотор
Мотор
Мотор


SFM-400 в режиме гашения реакции
Сбор
Слив
Клапан
Трубка
Трубка
Смеситель
Смеситель
Смеситель
S1
S2
S3
S4
Мотор
Мотор
Мотор
Мотор

Метод остановленной струи использовался также для изучения других быстрых биохимических процессов, в которых возможно образование промежуточных продуктов. Например, его применяли для анализа фолдинга белка, конформационных изменений белка и связывания белков с лигандами, а метод гашения реакции использовали для изучения действия вторичных мессенджеров.

15.2.4 Аналитические методы в экспериментах *in vivo*

Экстраполяция кинетических зависимостей, полученных в экспериментах *in vitro*, на течение процессов *in vivo* возможна при допущении, что внутриклеточные среды, такие как цитозоль и митохондриальный матрикс, могут рассматриваться как гомогенные растворы ферментов, в которых отдельные ферменты, их субстраты и продукты способны свободно диффундировать. Действительно, при фракционировании клеточного содержимого после разрушения клеток выясняется, что многие клеточные белки находятся в свободном состоянии. Однако последние исследования методом **высоковольтной электронной микроскопии** показывают, что в клетках млекопитающих существует протяженная сеть, названная **микротрабекулярной сетью** или решеткой; эта сеть связывает между собой все внутриклеточные структуры. Некоторые ученые утверждают, что существование такой решетки (сети) лишь артефакт, однако все больше данных указывает на то, что такая решетка или аналогичная ей структура является хорошей аппроксимацией внутриклеточной структуры *in vivo*. В таком случае те белки, которые считались свободно диффундирующими, скорее всего были слабо связаны с микротрабекулярной сетью. Подобная концепция подтверждает возможность широкого распространения полиферментных комплексов, которые ранее рассматривались, скорее, как исключение из правила. Тогда имеет право на существование и теория **туннелирования** продуктов реакций от одного фермента к другому (разд. 15.4.7). Туннелирование может осуществляться по нескольким механизмам, в числе которых — последовательное ковалентное связывание промежуточных

Рис. 15.4. Принципиальная схема устройства приборов фирмы Bio-Logic для анализа реакции методами остановленной струи (*вверху*) и гашения реакции (*внизу*). Реагирующие вещества набирают в отдельные шприцы с помощью контролируемых микропроцессором шаговых моторов, способных перемещать жидкость со скоростью 0,01–10,00 см^3/мин, при минимальном объеме вводимого образца 10–30 мм^3. Реагирующие вещества смешиваются (объем смеси может колебаться от 25 до 1000 мм^3) и поступают в трубку, а затем в проточную измерительную ячейку. Остановить реакцию можно в любой момент либо путем остановки мотора, либо закрыв выходное отверстие из измерительной ячейки. Мертвое время составляет ~0,6 мс. Ход реакции контролируют спектральными методами в видимом или ультрафиолетовом диапазоне, методами флуоресценции или кругового дихроизма. Длина светового пути может колебаться от 0,8 до 10 мм. В варианте гашения реакции минимальное время реакции составляет менее 2 мс. Гасящий реакцию реагент добавляют из третьего или четвертого шприца. Воспроизводится с разрешения BioLogic Science Instruments, Франция; <www.bio-logic.info>

продуктов с активными центрами, перенос не связанных ковалентной связью промежуточных продуктов от центра к центру, перенос промежуточных продуктов в неподвижный водный слой и предотвращение их диффузии под действием электростатических сил. Было показано, что туннелирование промежуточных продуктов внутри организованного комплекса ферментов должно приводить к усилению **потока** (скорости утилизации субстратов) в определенных метаболических путях и ограничению потока в конкурирующих путях. Вызывает ли подобное слабое взаимодействие между ферментами изменение в их кинетическом поведении по сравнению с их поведением в растворе или нет, пока еще только предстоит установить.

Наиболее подходящим методом анализа для изучения ферментативных процессов в отдельных клетках и в целых организмах является ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Этот недеструктивный метод позволяет определять стационарные концентрации метаболитов и метаболические потоки с помощью простой техники протонного ЯМР, путем перераспределения метки ^{13}C среди промежуточных продуктов гликолиза или с помощью ЯМР ^{31}P для измерения оборота АТФ. Наличие взаимодействия между отдельными ферментами было установлено при изучении конформационных изменений в молекулах ферментов. Для реализации данного метода требуется ввести в молекулу белка определенную метку. Для проведения ЯМР очень удобно использовать в качестве метки изотоп ^{19}F, поскольку спиновое квантовое число этого изотопа равно 1/2 и, следовательно, ядро может иметь два спиновых состояния, которые удобно анализировать с помощью ЯМР. Диапазон химических сдвигов ядра фтора большой, т. е. ядро очень чувствительно к изменению локального окружения белка. Кроме того, размер ядра фтора близок к размеру протона, и поэтому введение этого изотопа не должно значительно изменять структуру молекулы фермента. Поскольку фтор очень редко встречается в биологических образцах, не возникает неопределенности с интерпретацией сигнала метки. Изучение времени релаксации ядер фтора позволяет детектировать небольшие перемещения молекул ферментов в клетке, происходящие в результате белок-белковых взаимодействий.

Дополнением к анализу методом ЯМР может быть генно-инженерный подход к изучению белков. Существует возможность ликвидировать ферменты в клетке, а также снижать или повышать их внутриклеточную концентрацию, что позволяет изучать их кинетическое поведение и участие в метаболических процессах. Для реализации такого подхода необходимо иметь кДНК конкретного белка или соответствующий клон, использовать методологию разрушения генов (gene disruption) и антисмысловую РНК.

15.2.5 Аналитические методы определения субстратов

Ферментативные методы очень удобны для оценки количества субстратов в биологических образцах. Для этого работают в условиях избытка фермента (т. е. концентрация субстрата $<K_M$; см. разд. 15.3) и используют связь концентрации субстрата в анализируемом растворе с наблюдаемой начальной скоростью реакции. Важно, чтобы реакция завершалась за довольно

короткий промежуток времени. Если реакция обратима, следует изменить экспериментальные условия (например, pH) или связывать образующийся продукт, с тем чтобы реакция все же была завершена. Для определения субстратов часто применяют сопряженные реакции, которые также могут сместить равновесие реакции. Чувствительность метода начальных скоростей для определения концентрации субстрата зависит от значения молярного коэффициента экстинкции анализируемого вещества, а также от K_M субстрата. Обычно эти два фактора и ограничивают возможности определения. Существует несколько подходов к решению данной задачи. Измерение **в конечной точке** позволяет избежать измерения начальных скоростей; метод основан на полном превращении субстрата в продукт с измерением соответствующих параметров (например, поглощения) или флуоресценции. Чувствительность анализа, кроме того, можно существенно повысить путем использования сопряженных реакций, приводящих к регенерации субстрата, если измерять суммарное изменение какого-либо выбранного параметра, например поглощения, через определенный промежуток времени. Для определения концентрации субстрата необходимо заранее построить градуировочную кривую, изменяя концентрацию субстрата при избытке всех остальных реагирующих веществ. Чувствительность этого варианта метода в 10^4–10^5 раз превосходит чувствительность метода определения концентрации по конечной точке.

Ферментативные методы анализа часто применяют в клинической практике для определения содержания субстратов в биологических образцах. Например, три наиболее часто применяемых метода определения глюкозы связаны с использованием гексокиназы, глюкозооксидазы и глюкозодегидрогеназы. Первые два метода основаны на проведении сопряженных реакций:

- *Гексокиназный метод.* Данная реакция идет в сопряжении с реакцией, катализируемой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой; измеряют изменение поглощения при 340 нм, связанное с образованием NADH:

$$\text{D-глюкоза} + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{D-глюкозо-6-фосфат} + \text{АДФ}$$

$$\text{D-глюкозо-6-фосфат} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{D-глюконо-1,5-лактон-6-фосфат} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

- *Глюкозооксидазный метод.* Здесь используют сопряжение с реакцией пероксидазы и измеряют поглощение окисленной формы красителя в видимой области спектра или применяют кислородный электрод для прямого определения поглощения кислорода:

$$\text{D-глюкоза} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftarrows \text{D-глюконовая кислота} + \text{H}_2\text{O}_2$$

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{краситель}_{red} \rightleftarrows \text{H}_2\text{O} + \text{краситель}_{ox}$$

В глюкозооксидазном методе в качестве субстрата используют β-D-глюкозу, но в крови присутствует равновесная смесь β- и α-изомеров. К счастью, в препаратах глюкозооксидазы содержится изомераза, осуществляющая взаимные превращения двух форм, что позволяет определять общее содержание D-глюкозы.

- *Глюкозодегидрогеназный метод.* Метод не требует сопряженной реакции; измеряют увеличение поглощения при 340 нм:

$$\beta\text{-D-глюкоза} + NAD^+ \rightleftarrows \text{D-глюконо-1,5-лактон} + NADH + H^+$$

Приведем примеры других субстратов, содержащихся в моче или крови, которые в клинической биохимии часто определяют ферментативными методами:

- *Креатинин* служит показателем функции почек; для анализа требуются креатининаза, креатинкиназа, пируваткиназа и лактатдегидрогеназа:

$$\text{креатинин} + H_2O \rightleftarrows \text{креатин}$$
$$\text{креатин} + \text{АТФ} \rightleftarrows \text{фосфокреатин} + \text{АДФ}$$
$$\text{АДФ} + \text{фосфоенолпируват} \rightleftarrows \text{АТФ} + \text{пируват}$$
$$\text{пируват} + NADH + H^+ \rightleftarrows \text{L-лактат} + NAD^+$$

- *Холестерин* служит показателем состояния сосудов и вероятности развития сердечно-сосудистых заболеваний. В реакции используют холестеролоксидазу и пероксидазу и измеряют изменение поглощения в видимой области спектра, связанное с окислением красителя:

$$\text{холестерин} + O_2 \leftrightarrow \text{4-холестен-3-он} + H_2O_2$$
$$H_2O_2 + \text{краситель}_{red} \leftrightarrow H_2O + \text{краситель}_{ox}$$

Все эфиры холестерина в образце под действием холестеролоксидазы в реакционной смеси гидролизуются до свободного холестерина.

Действие биосенсоров для определения, например, глюкозы или холестерина (разд. 1.5.2) основано на приведенных выше реакциях; такие биосенсоры представляют собой простой и удобный инструмент для определения данных субстратов.

Пример 1 ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ

Вопрос Концентрацию глюкозы в растворе определяли с помощью гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Эти ферменты в присутствии NAD^+ и Mg^{2+} превращают глюкозу в глюконо-1,5-лактон-6-фосфат. При избытке NAD^+ и ферментов равновесие реакции смещается вправо, так что реакция практически идет до конца. К 1,0 см^3 анализируемого раствора добавили 1,0 см^3 раствора, содержащего NAD^+, оба фермента и $MgCl_2$. Измеряли изменение поглощения при 340 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Максимальное изменение поглощения составило 0,61. Какова исходная концентрация глюкозы в образце? Молярный коэффициент экстинкции NADH при 340 нм $6{,}22 \cdot 10^3$ дм^3/(моль · см).

Ответ В условиях избытка NAD^+ и обоих ферментов вся глюкоза из анализируемого образца превращается в продукт реакции, так что изменение поглощения при 340 нм отражает количество образующегося NADH. Это единственный продукт, поглощающий при 340 нм, и, поскольку его образование стехиометрически связано с потреблением глюкозы, это дает возможность определить исходную концентрацию последней.

Применим уравнение Бугера–Ламберта–Бера (уравнение 12.5 в разд. 12.4.1):

$$A = \varepsilon_\lambda cl$$

$$0{,}61 = 6{,}22 \cdot 10^3 \cdot c \cdot l$$

Откуда

$$c = \frac{0{,}61}{(6{,}22 \cdot 10^3 \cdot l)} = 9{,}807 \cdot 10^{-5}\ \text{М}.$$

Однако исходный раствор глюкозы при добавлении реагентов был разбавлен в 2 раза, так что для определения исходной концентрации глюкозы полученное значение следует удвоить; итак, исходная концентрация глюкозы $1{,}96 \cdot 10^{-4}$ М.

15.3 СТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

15.3.1 Односубстратные реакции

Для многих ферментов зависимость начальной скорости v_0 от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента имеет вид гиперболы (рис. 15.5). Математическое выражение, описывающее эту зависимость, называют **уравнением Михаэлиса–Ментен**:

$$v_0 = \frac{V_{MAX}[S]}{(K_M + [S])} \qquad (15.1)$$

где максимальная скорость V_{MAX} — предельное значение начальной скорости, когда заняты все активные центры фермента, K_M — **константа Михаэлиса**, [S] — концентрация субстрата. При малой концентрации субстрата заняты не все активные центры фермента, так что скорость реакции напрямую связана с количеством занятых центров. Такие условия соответствуют **кинетике реакции первого порядка**, при которой скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата. При высоких концентрациях субстрата все активные центры фермента заняты и скорость реакции перестает зависеть от концентрации субстрата, поскольку комплексы ES больше не образуются; в таких условиях наблюдается **нулевой порядок реакции**. При этом скорость реакции определяется скоростью превращения фермент–субстратного комплекса в продукты и диффузией продуктов от молекулы фермента.

Из уравнения 15.1 следует, что при $v_0 = 0{,}5V_{MAX}$ константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, $K_M = [S]$, при которой достигается половина максимальной скорости; измеряется константа Михаэлиса в единицах концентрации (в молях). Обычно значения K_M лежат в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-5} М; важное значение этой константы связано с тем, что она позволяет определить концентрацию субстрата, необходимую для насыщения всех активных центров фермента. При $[S] >> K_M$ выражение 15.1 приводится к виду $v_0 \approx V_{MAX}$, но простой расчет показывает, что при $[S] = 10K_M$ скорость v_0 составляет лишь $90\%V_{MAX}$, а при $[S] = 100K_M$ $v_0 = 99\%V_{MAX}$.

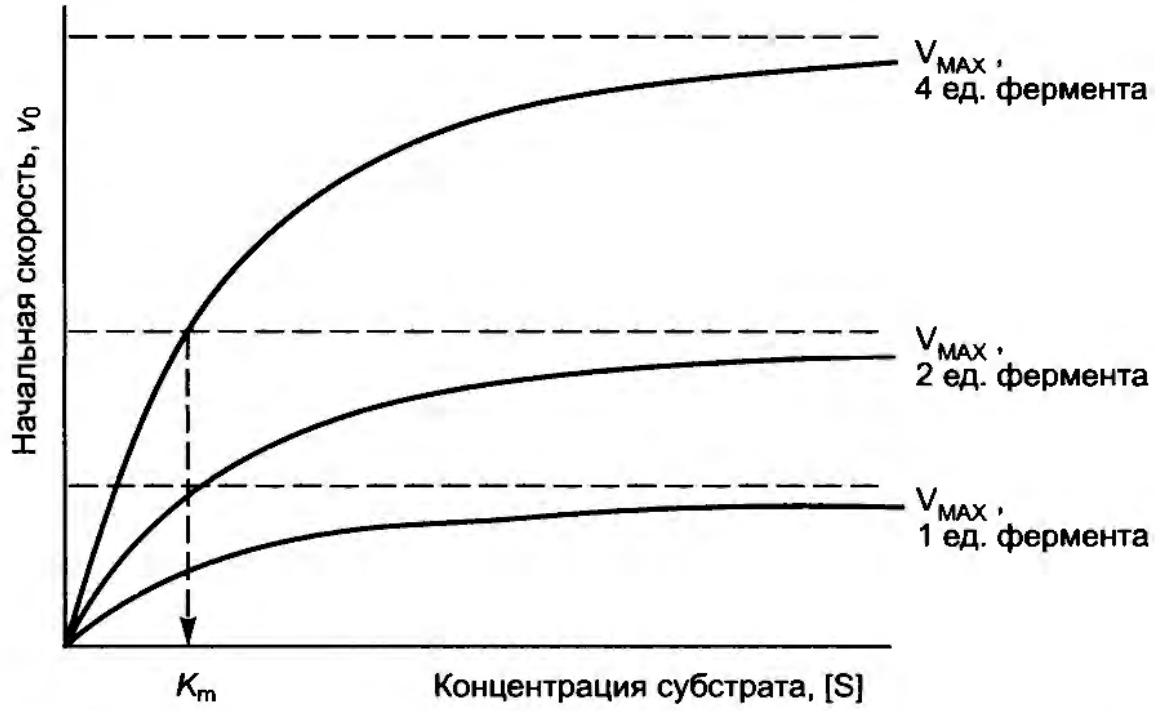


Рис. 15.5. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при трех различных концентрациях фермента. Удвоение концентрации фермента приводит к удвоению максимальной скорости V_{MAX}, но не изменяет K_M

Понимание сути данной зависимости принципиально важно для проведения ферментативного анализа.

Как уже говорилось ранее, ферментативная реакция протекает через стадию образования фермент–субстратного комплекса ES, в котором субстрат S связан нековалентной связью с активным центром фермента E. Образование этого комплекса в большинстве случаев происходит быстро и обратимо и характеризуется константой диссоциации комплекса K_S:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} ES$$

где k_{+1} и k_{-1} — константы скорости прямой и обратной реакций. В состоянии равновесия скорости прямой и обратной реакций равны, так что к этой обратимой системе можно применить закон действующих масс:

$$k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES]$$

Следовательно,

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{1}{K_a} \qquad (15.2)$$

где K_a — **константа ассоциации** (характеризует сродство фермента к субстрату).

Понятно, что при больших численных значениях K_S равновесие сдвинуто в сторону образования свободных субстрата и фермента, а когда эта константа мала, равновесие сдвинуто в сторону образования комплекса. Таким образом, константа диссоциации комплекса K_S связана обратной зависимостью со сродством фермента к субстрату.

Превращение комплекса ES в продукт P можно записать в виде уравнения необратимой реакции:

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

где k_2 — константа скорости реакции первого порядка.

В некоторых случаях превращение ES в E и P может осуществляться в несколько стадий, но этот процесс необязательно необратимый. Обычно константа k_2 меньше k_{+1} и k_{-1}, причем иногда много меньше. Следовательно, в общем случае скорость превращения ES в продукты реакции лимитирует скорость всего процесса в целом, так что концентрация комплекса ES практически остается постоянной, но необязательно равновесной. В таких условиях константу Михаэлиса K_M можно определить следующим образом:

$$K_M = \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_2}{k_{+1}} \qquad (15.3)$$

Понятно, что при таких условиях $K_M > K_S$ и только при очень малом k_2 эти две константы сближаются по величине. Соотношение между этими константами еще более усложняется тем обстоятельством, что в некоторых ферментативных реакциях происходит последовательное образование двух продуктов, причем скорости образования каждого продукта соответствует собственная константа:

$$E + S \rightleftarrows ES \xrightarrow{k_2} EA + P_1 \xrightarrow{k_3} E + P_2$$

где P_1 и P_2 — продукты реакции, а A — метаболит субстрата S, который далее превращается в P_2.

В данном случае константа Михаэлиса описывается следующим выражением:

$$K_M = K_S \frac{k_3}{(k_2 + k_3)} \qquad (15.4)$$

так что $K_M < K_S$. Из сказанного выше понятно, что соотношение между K_M и K_S можно интерпретировать только в том случае, когда механизм реакции известен в деталях.

С помощью уравнения Михаэлиса–Ментен можно определить K_M и V_{MAX}, но при этом возможно возникновение существенной ошибки, поскольку экспериментально довольно сложно измерять начальные скорости реакции при высокой концентрации субстрата и экстраполировать гиперболическую зависимость для точного определения V_{MAX}. В связи с этим для расчетов используют линейные преобразования уравнения Михаэлиса–Ментен. Чаще всего пользуются уравнением Лайнуивера–Берка, которое можно получить, «перевернув» уравнение Михаэлиса–Ментен:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \qquad (15.5)$$

График зависимости $1/v_0$ от 1/[S] — прямая с углом наклона K_M/V_{MAX}, причем на оси $1/v_0$ прямая отсекает отрезок $1/V_{MAX}$, а на оси 1/[S] — отрезок $-1/K_M$. В альтернативных вариантах установления K_M и V_{MAX} используют **уравнение Хейнца**:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} + \frac{[S]}{V_{MAX}} \qquad (15.6)$$

или **уравнение Иди–Хофсти**:

$$\frac{v_0}{[S]} = \frac{V_{MAX}}{K_M} - \frac{v_0}{K_M} \qquad (15.7)$$

В первом случае строят график зависимости $[S]/v_0$ от [S], а во втором $v_0/[S]$ от v_0. Определение K_M и V_{MAX} в координатах Лайнуивера–Берка, Хейнца и Иди–Хофсти по одному набору экспериментальных данных представлено на рис. 15.6 (более детальное объяснение см. пример 2).

Видно, что на графике в координатах Лайнуивера–Берка точки располагаются неравномерно — они сконцентрированы ближе к началу координат, что может вносить ошибки в расчеты. В координатах Иди–Хофсти или Хейнца, напротив, точки распределены равномерно. С учетом статистического распределения точек оптимальным графиком для расчета констант является график в координатах Хейнца.

Конечно, возможно, что два фермента обладают сродством к одному и тому же ферменту и при заданной концентрации фермента развивают одинаковую V_{MAX}. Однако, если K_M различны, то и вид графиков, отражающих уравнение Михаэлиса–Ментен, будет различным. Это показано на рис. 15.7; такие ситуации возникают в случае разветвления метаболических путей. Тот же принцип верен и в ситуации, когда для двух различных субстратов фермент имеет разные K_M, но одинаковые (или различные) V_{MAX}. При низких концентрациях субстрата предпочтительна реакция с меньшей K_M.

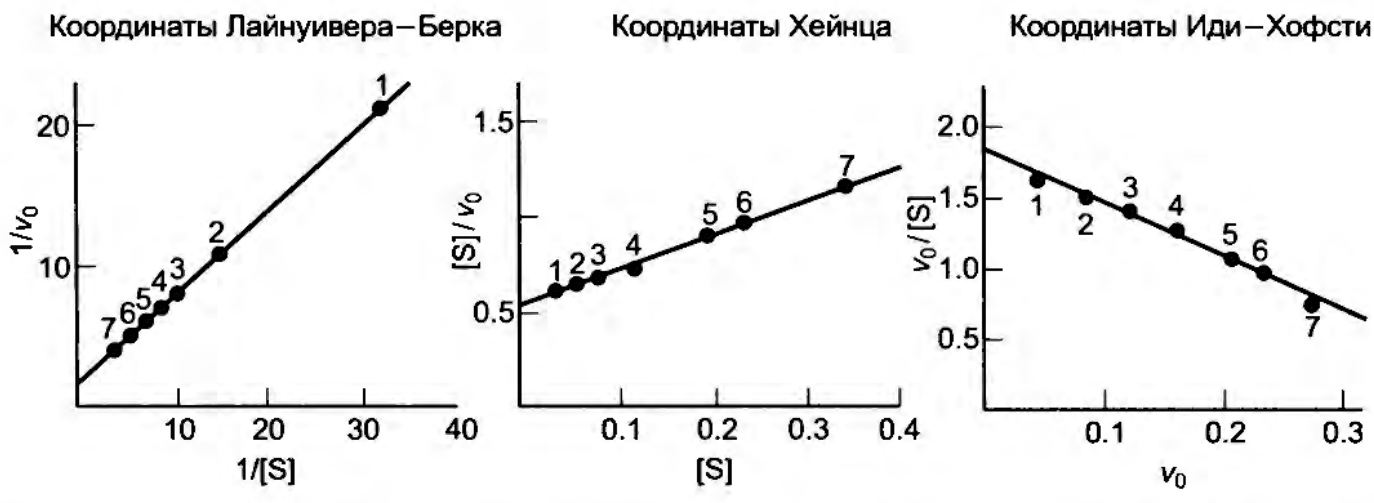


Рис. 15.6. Графики зависимости начальной скорости v_0 от концентрации субстрата [S], построенные по одному набору экспериментальных данных в координатах Лайнуивера–Берка, Хейнца и Иди–Хофсти

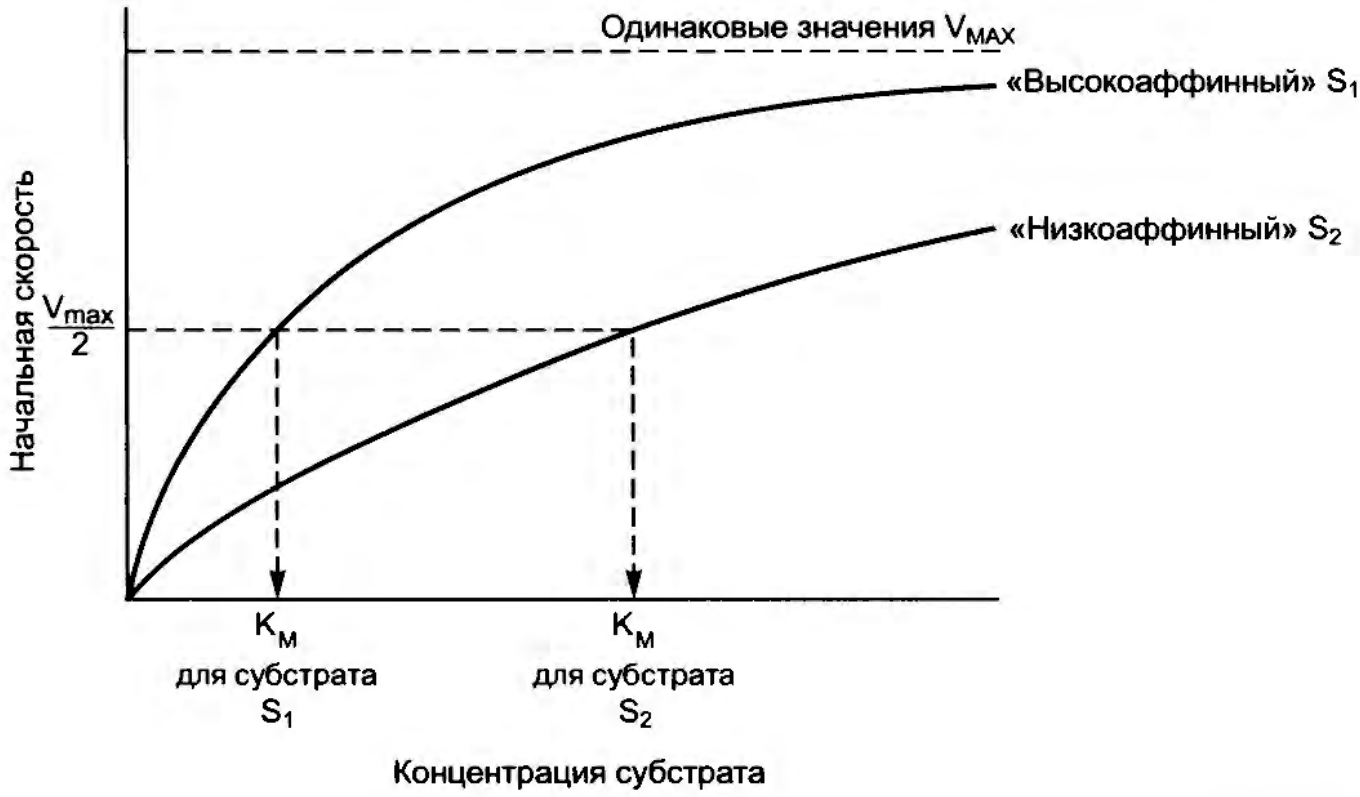


Рис. 15.7. Взаимодействие фермента с субстратами S_1 и S_2 с разными константами Михаэлиса. При низкой концентрации субстрата фермент отдает предпочтение «высокоаффинному субстрату»

Важно подчеркнуть, что константа Михаэлиса характеризует взаимодействие фермента с субстратом и не зависит от количества фермента, участвующего в проведении реакции. Напротив, V_{MAX} не зависит от природы фермента, но зависит от его количества. Это следует из рис. 15.5; подробное обсуждение приведено в примере 2. Кроме константы Михаэлиса K_M и максимальной скорости V_{MAX}, используют также называемое **число оборотов*** фермента k_{cat}:

$$k_{cat} = \frac{V_{MAX}}{[E_0]} \qquad (15.8)$$

где $[E_0]$ — общая концентрация фермента. Число оборотов — это максимальное число молей субстрата, которое может превратиться в продукт за единицу времени в расчете на моль фермента, размерность — обратные секунды; значения варьируют от 1 до 10^7 $с^{-1}$. Число оборотов одного из наиболее эффективных из известных ферментов каталазы $4 \cdot 10^7$ $с^{-1}$. Каталитический потенциал ферментов с высоким числом оборотов можно реализовать лишь при высокой (насыщающей) концентрации субстрата, что редко случается внутри клетки при нормальных условиях. Еще одна константа, **константа специфичности**, определяется как k_{cat}/K_M и является мерой

* Вообще говоря, выражение 15.8 дает определение так называемой каталитической константы, а число оборотов представляет собой отношение каталитической константы к числу активных центров в молекуле фермента; для мономерных ферментов эти две константы совпадают. — *Прим. перев.*

эффективности конверсии субстрата в продукт при низких концентрациях субстрата, размерность дм^3/(моль · с).

Для превращения субстрата в продукт прежде всего должно произойти столкновение молекулы субстрата с ферментом в результате диффузии, а затем они должны принять правильную ориентацию. Теоретически при диффузии скорость столкновений составляет ~ 10^9 дм^3/(моль · с), причем многие ферменты, в том числе ацетилхолинэстераза, карбоангидраза, каталаза, β-лактамаза и триозофосфатизомераза, имеют значения констант специфичности, приближающиеся к этой величине, что означает, что эти ферменты действуют практически с максимальной кинетической эффективностью. Поскольку константа специфичности — это отношение двух констант, ферменты с одинаковой константой специфичности могут иметь сильно различающиеся константы Михаэлиса. Например, каталаза имеет константу специфичности $4 \cdot 10^7$ дм^3/(моль · с) и K_M = 1,1 М (очень высокую), а фумараза — константу специфичности $3{,}6 \cdot 10^7$ М$^{-1}$ · с$^{-1}$ и K_M $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ М (очень низкую). В полиферментных комплексах ограничения скорости диффузии и столкновений частично преодолены. Продукт одной реакции в результате так называемого туннелирования направляется прямо в активный центр следующего фермента, расположенного поблизости (разд. 15.4.7).

Пример 2 УПРАЖНЕНИЯ ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКЕ

Вопрос Активность фермент α-D-глюкозидазы из *Saccharomyces cerevisiae* исследовали с помощью синтетического субстрата *n*-нитрофенил-α-D-глюкопиранозида (ПНФГ), при гидролизе которого образуется *n*-нитрофенол, имеющий в щелочной среде желтую окраску (подробности см. в разд. 15.2.2). Приготовили 3 мМ раствор ПНФГ и отбирали из него аликвоты для анализа зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата при фиксированном объеме образца фермента. Общий объем каждой реакционной смеси составлял 10 см^3. Через 2 мин после начала реакции 1 см^3 реакционной смеси отбирали и добавляли к 4 см^3 боратного буфера, pH 9,0, чтобы остановить реакцию и получить желтую окраску. Измеряли изменение поглощения при 400 нм, которое служило мерой начальной скорости реакции. Были получены следующие результаты:

ПНФГ, см^3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
Начальная скорость	0,055	0,094	0,130	0,157	0,196	0,230	0,270

Какие кинетические константы можно определить на основании этих данных?

Ответ Рассчитав молярную концентрацию ПНФГ в каждой реакционной смеси, можно найти K_M и V_{MAX}, пользуясь координатами Лайнуивера–Берка, Хейнца или Иди–Хофсти. Тот факт, что для определения начальной скорости брали по 1 см^3 реакционной смеси, не имеет значения для расчета концентрации субстрата. На рис. 15.6 представлены графики, построенные на основании приведенных выше данных, причем

значения v_0 выражены просто как изменение поглощения при 400 нм. Из графиков получены $K_M \sim 0{,}2$ мМ и $V_{MAX} \sim 0{,}4$.

Как отмечалось в разд. 15.3.1, V_{MAX} может выражаться в различных единицах, а ее экспериментальное значение зависит от целого ряда переменных, в частности от концентрации фермента. Чтобы проще было проводить сравнительный анализ, V_{MAX} лучше выражать как число молей продукта, образующихся в единицу времени. Чтобы это сделать, следует превратить единицы поглощения в количество продукта с помощью уравнения Бугера–Ламберта–Бера. Соответствующие данные представлены в табл. А.

Таблица А

ПНФ, мкМ	2,0	4,0	6,0	8,0	12,0	16,0	24,0
Поглощение (400 нм)	0,065	0,118	0,17	0,23	0,34	0,45	0,65

График подтверждает выполнение закона Бугера–Ламберта–Бера — найти количество продукта. Отсюда можно рассчитать v_0 (в мкмоль/мин). Данные для трех линейных зависимостей представлены в табл. Б.

Таблица Б

[S], мМ	0,03	0,06	0,09	0,12	0,18	0,24	0,36
v_0, мкмоль/мин	0,054	0,096	0,138	0,168	0,210	0,251	0,294
1/[S], 1/мМ	33,33	16,67	11,11	8,33	5,55	4,17	2,78
$1/v_0$, мин/мкмоль	18,52	10,42	7,25	5,95	4,76	3,98	3,40
$v_0/[S] \cdot 10^3$, дм^3/мин	1,8	1,6	1,53	1,40	1,17	1,05	0,82
$[S]/v_0 \cdot 10^{-3}$, мин/дм^3	0,56	0,63	0,65	0,71	0,85	0,95	1,22

Результаты, полученные на основании трех линейных графиков, сведены в табл. В.

Таблица В

Координаты	Коэффициент	Угол наклона регрессии	Отрезок на оси ординат	K_M, мМ	V_{MAX}, мкмоль/мин
Лайнуивера–Берка	0,9997	0,499	1,91	0,26	0,52
Хейнца	0,9970	1,990	0,489	0,25	0,50
Иди–Хофсти	0,9930	–3,995	2,030	0,25	0,51

Полученные во всех трех координатах значения K_M и V_{MAX} хорошо согласуются между собой, однако качество регрессии в координатах Лайнуивера–Берка значительно выше, чем в других координатах. Тем не менее распределение точек вдоль прямой именно в этих координатах наихудшее (см. рис. 15.6). Значение максимальной скорости указывает на количество продукта, образующегося за минуту, естественно, для конкретного количества фермента и в объеме реакционной смеси 10 см^3. Для получения абсолютного значения максимальной скорости необходимо учесть количество фермента и объем реакционной смеси. Если бы объем составлял 1 дм^3, то $V_{MAX} = 51$ мкмоль/(мин · дм^3), но количество фермента можно учесть лишь в том случае, если его препарат чистый и известна молярная концентрация фермента. Данный фермент имеет молекулярную массу 68 кДа, так что, если в 10 см^3 реакционной смеси

содержалось 3 мкг чистого фермента, его молярная концентрация в каждой реакции составляла $4{,}4 \cdot 10^{-3}$ мкМ. Отсюда можно рассчитать k_{cat} (см. уравнение 15.8):

$$k_{cat} = V_{MAX}/[E_0] = 51(\text{мкмоль}/(\text{мин} \cdot \text{дм}^3))/4{,}4 \cdot 10^{-3}\ \text{мкмоль}/\text{дм}^3$$
$$= 11 \cdot 10^3\ \text{мин}^{-1} \text{ или } 1{,}8 \cdot 10^2\ \text{с}^{-1}$$

Число оборотов k_{cat} — это число молекул субстрата (в данном случае ПНФГ), превращенных в продукт в секунду в конкретных экспериментальных условиях. Полученное значение $1{,}8 \cdot 10^2\ \text{с}^{-1}$ попадает в середину диапазона известных значений этого параметра для разных ферментов. Кроме того, можно рассчитать константу специфичности, т. е. оценить эффективность превращения субстрата в продукт при низких концентрациях субстрата:

$$k_{cat}/K_M = (1{,}8 \cdot 10^2\ \text{с}^{-1})/0{,}25\ \text{мМ} = 7{,}2 \cdot 10^3\ (\text{мМ} \cdot \text{с})^{-1} \text{ или } 7{,}2 \cdot 10^5\ (\text{мМ} \cdot \text{с})^{-1}$$

Обратите внимание, что размерность константы специфичности совпадает с размерностью константы скорости реакции второго порядка для $E + S \rightarrow E + P$. Полученное значение также типично для многих ферментов.

15.3.2 Двухсубстратные ферментативные реакции

Гораздо более сложная ситуация наблюдается при протекании двухсубстратных реакций (рис. 15.8), в которых два субстрата S_1 и S_2 превращаются в два продукта P_1 и P_2, как, например, в реакциях, катализируемых трансферазами, киназами и дегидрогеназами. Эти реакции могут протекать по упорядоченному или неупорядоченному механизмам.

- *Упорядоченный механизм* — для образования продуктов оба субстрата должны связаться в специфических участках активного центра фермента с образованием **тройного комплекса**. При этом субстраты могут связываться с ферментом либо в строго последовательно, либо случайным образом.
- *Неупорядоченный механизм* — первый продукт высвобождается до того, как свяжется второй субстрат.

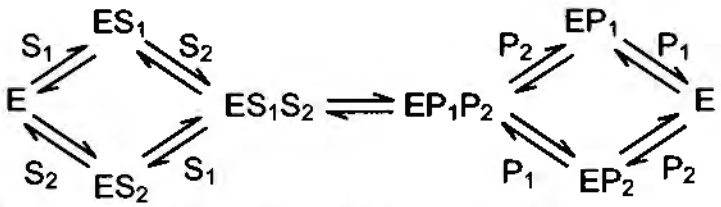
В случае механизма с образованием тройного комплекса с увеличением концентрации второго субстрата в координатах Лайнуивера–Берка получают серию непараллельных прямых, отсекающих на оси ординат отрезок постепенно уменьшающегося размера (рис. 15.8, *б*).

Примером неупорядоченного механизма может служить механизм **пинг-понг**, в котором образуется модифицированный фермент (ε), например его ацетилированная форма. В случае механизма пинг-понг увеличение начальной скорости реакции при увеличении концентрации одного субстрата и при постоянной концентрации второго субстрата в двойных обратных координатах Лайнуивера–Берка приводит к появлению серии параллельных прямых. По мере увеличения концентрации второго субстрата

а) $E + S_1 \rightleftharpoons ES_1 \overset{S_2}{\rightleftharpoons} ES_1S_2 \rightleftharpoons EP_1P_2 \rightleftharpoons P_2 + EP_1 \rightleftharpoons P_1 + E$

Упорядоченный механизм со строго последовательным присоединением субстратов

б)



Упорядоченный механизм со случайным присоединением субстратов

в) $E + S_1 \rightleftharpoons ES_1 \rightleftharpoons \epsilon P_1 \rightleftharpoons \epsilon + P_1$

$\epsilon + S_2 \rightleftharpoons \epsilon S_2 \rightleftharpoons EP_2 \rightleftharpoons E + P_2$

Неупорядоченный механизм (пинг-понг)

Рис. 15.8. Механизмы двухсубстратных реакций

длина отрезка, отсекаемого прямыми на оси абсцисс, постепенно уменьшается (рис. 15.9, *а*).

Максимальная скорость двухсубстратной реакции определяется как максимальная начальная скорость в условиях насыщающих концентраций обоих субстратов, а константа Михаэлиса для каждого субстрата определяется как концентрация этого субстрата, при которой достигается 0,5 V_{MAX} в условиях насыщающей концентрации второго субстрата. Чтобы найти эти константы Михаэлиса, необходимо провести анализ начальных скоростей как функции концентрации одного субстрата при наборе фиксированных концентраций второго субстрата. Для каждой концентрации второго субстрата строят зависимость в двойных обратных координатах и получают серию прямых — так называемые **первичные графики** (рис. 15.9). Далее строят **вторичный график** — зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси $1/v_0$ в координатах Лайнуивера–Берка, от обратной концентрации второго субстрата. Получают прямую, угол наклона которой дает отношение K_M (второго субстрата)/V_{MAX}, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает $1/V_{MAX}$. Далее анализ повторяют в условиях, когда субстраты «меняются ролями». Принцип построения вторичного графика проиллюстрирован на рис. 15.15.

При изучении механизма двухсубстратной реакции обычно определяют изменение начальной скорости при изменении концентрации одного из субстратов и при постоянной концентрации второго субстрата в присутствии и в отсутствие обоих продуктов реакции. Для двухсубстратных реакций применимы правила, сформулированные У. Клеландом. Два из этих правил следующие:

- в двойных обратных координатах пересечение графика с осью $1/v_0$ зависит от присутствия ингибитора только в том случае, если он обратимо

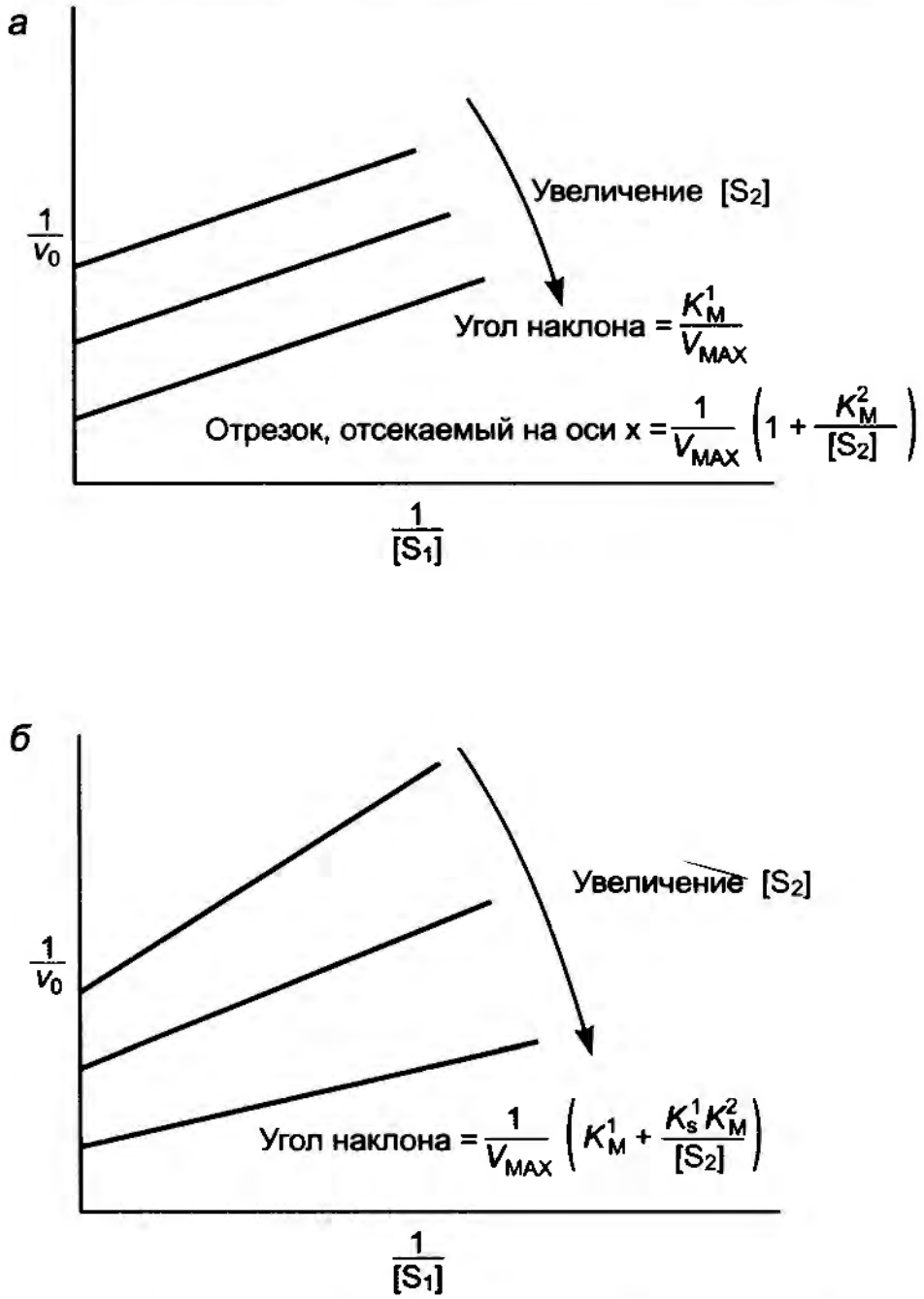


Рис. 15.9. Двухсубстратные реакции в координатах Лайнуивера–Берка: *а* — при реализации механизма пинг-понг получается серия параллельных прямых; *б* — в любом из вариантов упорядоченного механизма получают серию сходящихся прямых. Константы K_M^1 и K_M^2 — константы Михаэлиса для субстратов S_1 и S_2 соответственно; K_S^1 — константа диссоциации комплекса ES_1

связывается не с той формой фермента, с которой связывается субстрат, концентрация которого изменяется;

- в двойных обратных координатах угол наклона графика зависит от присутствия ингибитора, который связывается с той же формой фермента, что и субстрат, концентрация которого изменяется, либо с той формой фермента, которая связана с этой формой через серию обратимых стадий.

Следствием первого правила является то, что конкурентный ингибитор (разд. 15.3.7) и субстрат, концентрация которого изменяется, связываются в одном и том же центре на молекуле фермента. Из второго правила следует,

Таблица 15.1. **Тип ингибирования продуктом в упорядоченных двухсубстратных реакциях при превращении двух субстратов S_1 и S_2 в продукты P_1 и P_2**

Механизм	Продукт	Изменяется $[S_1]$	Изменяется $[S_2]$
Определенный порядок присоединения субстратов	P_1	Смешанный	Смешанный
	P_2	Конкурентный	Смешанный
Случайный порядок присоединения субстратов	P_1	Конкурентный	Конкурентный
	P_2	Конкурентный	Конкурентный

что между необратимым ингибитором (разд. 15.3.7) и субстратом, концентрацию которого изменяется, нет обратимой связи (табл. 15.1).

Применение этих правил к изучению поведения ферментов позволило установить, например, что лактатдегидрогеназа действует по упорядоченному механизму с определенным порядком присоединения субстратов, при котором первым связывается NAD^+, а фосфоглицеромутаза из дрожжей или клеток млекопитающих (но не растений), осуществляющая взаимные превращения 2-фосфо-D-глицерата (2ФГ) и 3-фосфо-D-глицерата (3ФГ), действует по механизму пинг-понг при участии 2,3-дифосфо-D-глицерата (ДФГ) в качестве затравки и промежуточного продукта:

$$E + ДФГ \rightleftarrows E\text{–}P + 2ФГ$$

$$E\text{–}P + 3ФГ \rightleftarrows E + ДФГ$$

Суммарная реакция:

$$3ФГ \rightleftarrows 2ФГ$$

15.3.3 Реакции олигомерных ферментов

Некоторые ферменты состоят из нескольких субъединиц, которые могут быть как идентичными, так и разными, и поэтому имеют несколько активных центров. Такие ферменты называют **олигомерными**. Некоторые из них не подчиняются кинетике Михаэлиса–Ментен, а демонстрируют **S-образную зависимость** начальной скорости от концентрации субстрата (рис. 15.10). Такой тип зависимости характерен для **аллостерических ферментов**, каталитическая активность которых изменяется при конформационных изменениях в молекуле. Если такие конформационные изменения являются результатом последовательного связывания молекул субстрата, то говорят о **гомотропном эффекте**. Такие конформационные изменения сначала происходят в одной субъединице, а затем распространяются на остальные, влияя на связывание следующих молекул субстрата. Последовательное присоединение молекул субстрата к субъединицам называют кооперативным. При этом возможна как активизация связывания следующих молекул субстрата (**положительная кооперативность**), так и ухудшение связывания (**отрицательная кооперативность**). Изменение каталитической активности фермента к его субстрату может быть, кроме того, вызвано связыванием не субстрата, а другой молекулы в так

называемом **аллостерическом центре** на одной или нескольких субъединицах фермента. Вызывающие подобные изменения вещества называют **гетеротропными эффекторами**. Они обычно являются ключевыми интермедиатами метаболизма, такими как АТФ, АДФ, АМФ или P_i, и при связывании с аллостерическим центром изменяют конформацию активного центра. При действии гетеротропного активатора каталитическая активность фермента возрастает, зависимость начальной скорости от концентрации субстрата теряет выраженный сигмоидный характер и сдвигается влево, а при действии гетеротропного ингибитора активность снижается, S-образный вид зависимости еще более усиливается и кривая сдвигается вправо (рис. 15.10). На рис. 15.15, *в* показано, как с помощью графика зависимости в координатах Лайнуивера–Берка можно установить наличие кооперативного связывания. Наличие кооперативного действия можно подтвердить, построив график в координатах Хилла на основании следующего уравнения:

$$\lg\left(\frac{v_0}{V_{MAX} - v_0}\right) = h\lg[S] - \lg K \qquad (15.9)$$

где h — **коэффициент Хилла**, K — **общая константа связывания**, связанная с константами связывания в n отдельных центрах.

Коэффициент Хилла, равный углу наклона прямой, — мера кооперативного взаимодействия между центрами: если $h = 1$, кооперативного взаимодействия нет и реакция подчиняется нормальной кинетике Михаэлиса–Ментен; если $h > 1$, кооперативность положительная, а если $h < 1$, то кооперативность отрицательная. При очень низких концентрациях субстрата, когда не может быть насыщено больше одного центра связывания, и при очень высоких концентрациях, когда большинство центров связывания занято, угол наклона прямой в координатах Хилла приближается к 1. Следовательно, коэффициент Хилла определяют из центральной линейной части графика. Одна из проблем при работе в

Рис. 15.10. Влияние ингибиторов и активаторов на поведение фермента, подверженного аллостерической регуляции

координатах Хилла — трудно точно определить максимальную скорость. Иногда принимается, что h численно равен числу центров связывания субстрата (n). Это слишком большое упрощение, ведь часто коэффициент Хилла не целое число. Например, известно, что число центров связывания кислорода в молекуле гемоглобина равно четырем, а коэффициент Хилла равен 2,6. На практике h можно принять равным минимальному числу взаимодействующих между собой центров связывания и считать его мерой кооперативности.

Для описания поведения аллостерических ферментов не пользуются константой Михаэлиса. Вместо нее введен параметр $S_{0.5}$ — концентрация субстрата, необходимая для достижения 50%-го насыщения фермента. Важно понимать, что S-образная зависимость начальной скорости от концентрации субстрата никак не подтверждает аллостерического механизма действия, поскольку такая же зависимость может возникать в том случае, если в ферментном препарате содержится не один, а несколько ферментов, реагирующих с одним и тем же субстратом. Наличие нескольких ферментов в препарате установить легко, поскольку в этом случае должно наблюдаться несоответствие между количеством потребляемого субстрата и количеством образующегося продукта.

Модели аллостерического действия

Для объяснения механизма аллостерической регуляции было предложено несколько моделей. Все они основаны на предположении, что аллостерический фермент состоит из нескольких субъединиц (**протомеров**), каждая из них способна связывать субстрат и существовать в двух конформациях — **релаксированной** (R, relaxed) и **напряженной** (T, tense). Считается, что субстрат образует более прочную связь с R-формой. Одна из наиболее успешных моделей, предложенная Жаком Моно, Джеффри Уайманом и Жаном-Пьером Шанже, известна как **симметричная модель**. В ней принимается, что конформационные изменения между состояниями R и T происходят одновременно во всех субъединицах. Таким образом, связывание субстрата с протомером в T-состоянии, вызывающее его переход в состояние R, автоматически приводит к переходу всех остальных протомеров в состояние R, что увеличивает реакционную способность фермента (рис. 15.11). Альтернативная модель Даниеля Кошланда, называемая **моделью индуцированного соответствия**, не постулирует наличия такого тесного взаимодействия между субъединицами; по этой модели протомеры могут существовать одновременно в различных конформациях, но связывание субстрата с одним протомером усиливает активность других. Конформационные изменения в белке можно изучать методами спектрофотометрии и седиментации, однако метод рентгеновской кристаллографии дает наиболее четкие результаты. Например, как показал кристаллографический анализ аспартаткарбамоилтрансферазы, катализирующей первую стадию биосинтеза пиримидинов в клетках *Escherichia coli*, механизм действия этого фермента имеет много сходства с симметричной моделью. При этом ЦТФ выступает в роли аллостерического активатора, а АТФ — в роли аллостерического ингибитора.

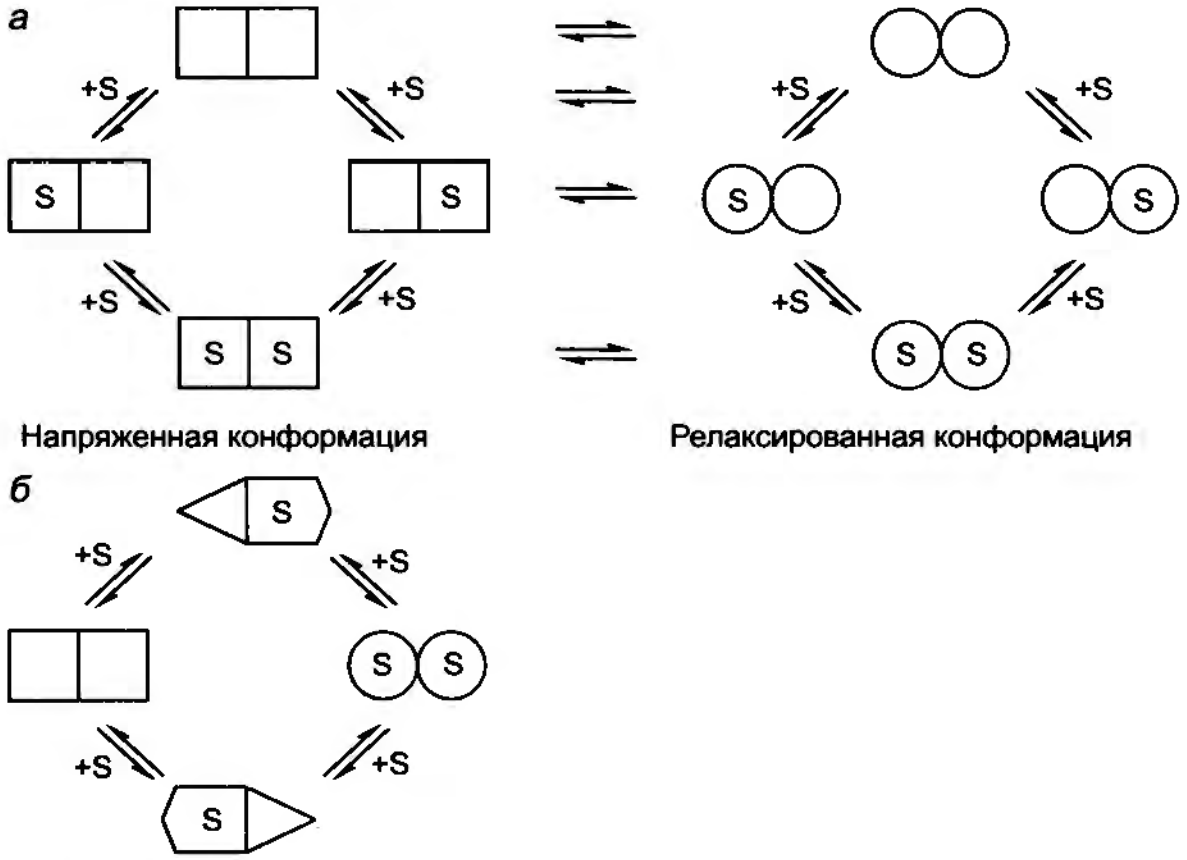


Рис. 15.11. Симметричная модель (*а*) и модель индуцированного соответствия (*б*) для аллостерической регуляции активности димерного фермента. В первом случае предполагается, что фермент может существовать в виде конформаций T или R, различающихся сродством к субстрату. Конформационные изменения во всех субъединицах (протомерах) тесно связаны между собой, так что все протомеры одновременно могут существовать только в одной конформации. Связывание субстрата нарушает равновесие между состояниями T и R в пользу состояния R, что приводит к согласованному изменению структуры, так что симметрия молекулы фермента сохраняется. Заметьте, что данная модель не объясняет, каким образом связывание субстрата с одним протомером снижает сродство к субстрату второго протомера (т. е. не объясняет отрицательной кооперативности). Во второй модели принимается, что связывание субстрата с одним протомером вызывает в нем конформационные изменения и кооперативное взаимодействие с соседним протомером, так что способность последнего связывать субстрат может либо возрастать (положительная кооперативность), либо снижаться (отрицательная кооперативность). Структура отдельных протомеров изменяется не одновременно, а последовательно. В отличие от симметричной модели, последовательная модель не предусматривает сохранения симметрии молекулы фермента в процессе связывания субстрата

Примером фермента, подверженного аллостерической регуляции, является 6-фосфофруктокиназа (ФФК) — ключевой фермент гликолиза:

$$\text{D-фруктозо-6-фосфат} + \text{АТФ} \xrightleftharpoons{\text{ФФК}} \text{D-фруктозо-1,6-дифосфат} + \text{АДФ}$$

В большинстве организмов ФФК представляет собой тетрамер, а в дрожжах существует в виде октамера. Фермент может существовать в двух формах, что согласуется с моделью Кошланда. Каждая субъединица имеет активный центр и центр связывания аллостерического ингибитора АТФ. В активном

центре АТФ может связываться независимо от того, находится ли субъединица в состоянии R или T, а вот в аллостерическом центре связывание АТФ происходит только тогда, когда субъединица находится в состоянии T. При низких концентрациях АТФ выступает в роли субстрата, но в более высоких действует как ингибитор, связываясь с субъединицей в состоянии T, снижая тем самым сродство фермента к другому субстрату — фруктозо-6-фосфату — и, следовательно, скорость всего процесса гликолиза. Активность фермента также снижается в присутствии цитрата и фосфоенолпирувата, а повышается в присутствии АДФ, неорганического фосфата, АМФ и фруктозо-2,6-дифосфата. Активаторы преимущественно связываются с субъединицами в состоянии R, ослабляя ингибирование под действием АТФ. Баланс между ингибированием и активацией устанавливается в зависимости от соотношения этих эффекторов. Описанные процессы вполне понятны, если обратиться к энергетическим затратам клетки, и соответствуют либо активации, либо ингибированию гликолитического пути. Контроль активности ФФК обсуждается далее в разд. 15.5.2.

15.3.4 Влияние концентрации фермента

Можно показать, что для односубстратных ферментативных реакций, которые подчиняются уравнению Михаэлиса–Ментен, верно следующее выражение:

$$v_0 = \frac{k_2[\mathrm{E}][\mathrm{S}]}{(K_\mathrm{M} + [\mathrm{S}])}$$

или в ином виде:

$$v_0 = \frac{k_2[\mathrm{E}]}{(K_\mathrm{M}/([\mathrm{S}] + 1))} \qquad (15.10)$$

Таким образом, при очень высокой концентрации субстрата выражение 15.10 приводится к выражению $v_0 = k_2[\mathrm{E}]$, т. е. начальная скорость прямо пропорциональна концентрации фермента. Это выражение и является основой для экспериментального определения активности фермента в биологических образцах (разд. 15.2). На рис. 15.3 проиллюстрирована важность правильного измерения начальной скорости.

15.3.5 Влияние температуры

Начальная скорость ферментативной реакции изменяется с изменением температуры в соответствии с уравнением Аррениуса:

$$v = Ae^{-E/RT} \qquad (15.11)$$

где A — константа, называемая **предэкспоненциальным множителем**, которая связана с частотой продуктивных столкновений молекул фермента и субстрата, находящихся в правильной ориентации, E — энергия активации (Дж/моль), R — универсальная газовая постоянная (8,2 Дж/(моль · К), а T — абсолютная температура (К). Итак, график зависимости натурально-

го логарифма начальной скорости (или лучше k_{cat}) от обратной абсолютной температуры позволяет найти E. Из уравнения 15.11 становится понятна высокая чувствительность ферментативных реакций к температуре, поскольку связь между скоростью реакции и температурой экспоненциальная. Скорость большинства ферментативных реакций примерно удваивается при повышении температуры на каждые 10 градусов (**коэффициент Q_{10}**). При характерной для каждого фермента температуре (обычно 40–70 °С) происходит денатурация белка и потеря ферментативной активности. Активность фермента при температуре 40–70 °С в определенной степени зависит от времени предварительной инкубации фермента. Так называемая **оптимальная температура**, при которой фермент проявляет наибольшую активность, определяется несколькими факторами: температурная стабильность, температурный коэффициент и время инкубации, и поэтому анализ активности фермента редко проводят в этом температурном интервале, чаще же при 30 или 37 °С (разд. 15.2). Интересно отметить, что ряд экспериментов с ферментами из мезофильных и термофильных источников показал, что при превышении определенного температурного оптимума эти ферменты обратимо теряют свою активность, но не в результате денатурации. Причину структурных изменений, ответственных за подобное поведение ферментов, еще предстоит выяснить.

Действие ферментов основано на том, что они облегчают образование **переходного состояния**, снижая энергию активации реакции по сравнению с неферментативным процессом (рис. 15.12). Снижение энергии активации всего на 5,7 кДж/моль, что эквивалентно энергии одной водородной связи, приводит к увеличению скорости реакции в 10 раз. Понятно, что энергетический барьер снижается одновременно для прямой и обратной реакций, так что положение равновесия не смещается. Примером очень высокой эффективности ферментативного катализа может служить разложение пероксида водорода; в присутствии каталазы разложение происходит в 10^{14} раз быстрее, чем без катализа! На рис. 15.12 представлен профиль превращения субстрата в продукт как функция координаты реакции, которая отражает ход реакции во времени. Число **энергетических барьеров** на таком профиле зависит от числа кинетически значимых стадий. Для большинства ферментативных реакций главный энергетический барьер, определяющий энергию активации реакции и ее скорость, соответствует образованию одного или нескольких переходных состояний от субстрата к продукту; когда образуются и разрываются ковалентные связи, но соединения нельзя выделить в чистом виде. Пример переходного состояния представлен на рис. 15.17. Однако для некоторых ферментов, в частности для АТФ-синтазы, наибольшие затраты энергии требуют начальная стадия связывания субстратов и последующее высвобождение продуктов.

Доказательство того, что действие ферментов состоит в облегчении образования переходного состояния, основано на анализе **моделей** (или **аналогов**) **переходных состояний**, имитирующих строение и природу переходных состояний. Например, переходное состояние реакции гидролиза эфиров карбоновых кислот под действием эстеразы представляет собой

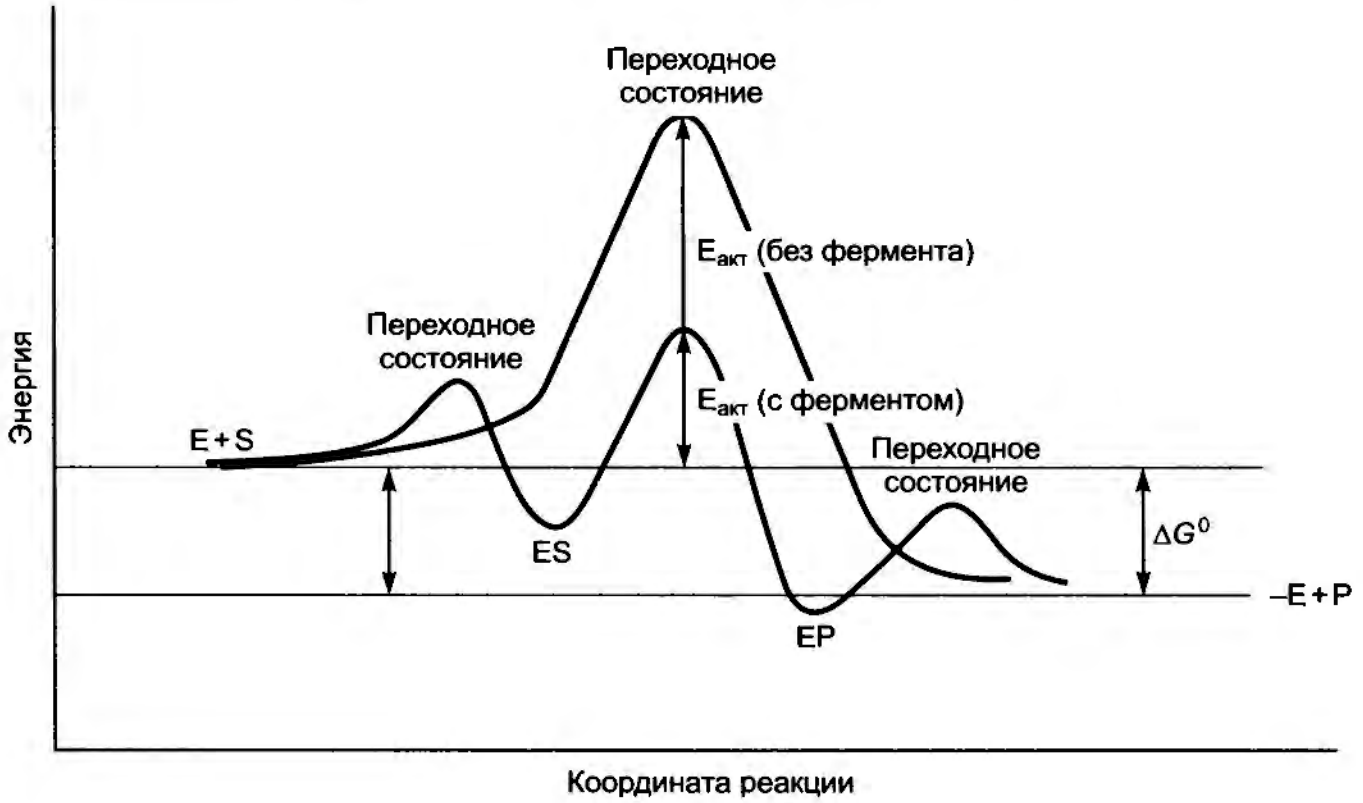


Рис. 15.12. Энергетический профиль простой ферментативной реакции. Образование ES и EP, а также последующее высвобождение E + P протекает через несколько переходных состояний. Энергия активации всей реакции определяется исходной энергией E и S и энергией того переходного состояния, которое отличается наиболее высоким энергетическим уровнем. Неферментативные реакции протекают именно через это переходное состояние, так что энергия активации реакции выше, чем при катализе ферментами

тетраэдрический промежуточный продукт, который удается моделировать с помощью эфиров фосфоновой кислоты с аналогичными заместителями (рис. 15.13). Если получить моноклональные антитела против антигенов, в которых в качестве гаптена использованы эфиры фосфоновой кислоты (разд. 7.2.2), такие антитела будут комплементарны тетраэдрическому промежуточному продукту и смогут выполнять роль активного центра эстеразы. Такой механизм был продемонстрирован с помощью антител, способных гидролизовать эфир в отсутствие эстеразы со скоростью, превышающей скорость некаталитической реакции (приблизительно в 10^5 раз). Успех подобного рода анализа кроется в нахождении оптимальных структур заместителей R и R''. Имеющие каталитическую функцию антитела были названы **каталитическими антителами** или **абзимами** (abzymes, от *a*nti*b*odies as en*zymes*).

Термодинамические параметры ΔG^0, ΔH^0 и ΔS^0 процесса связывания субстрата с ферментом можно рассчитать, зная константу связывания ($K_a = 1/K_s$).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a \qquad (15.12)$$

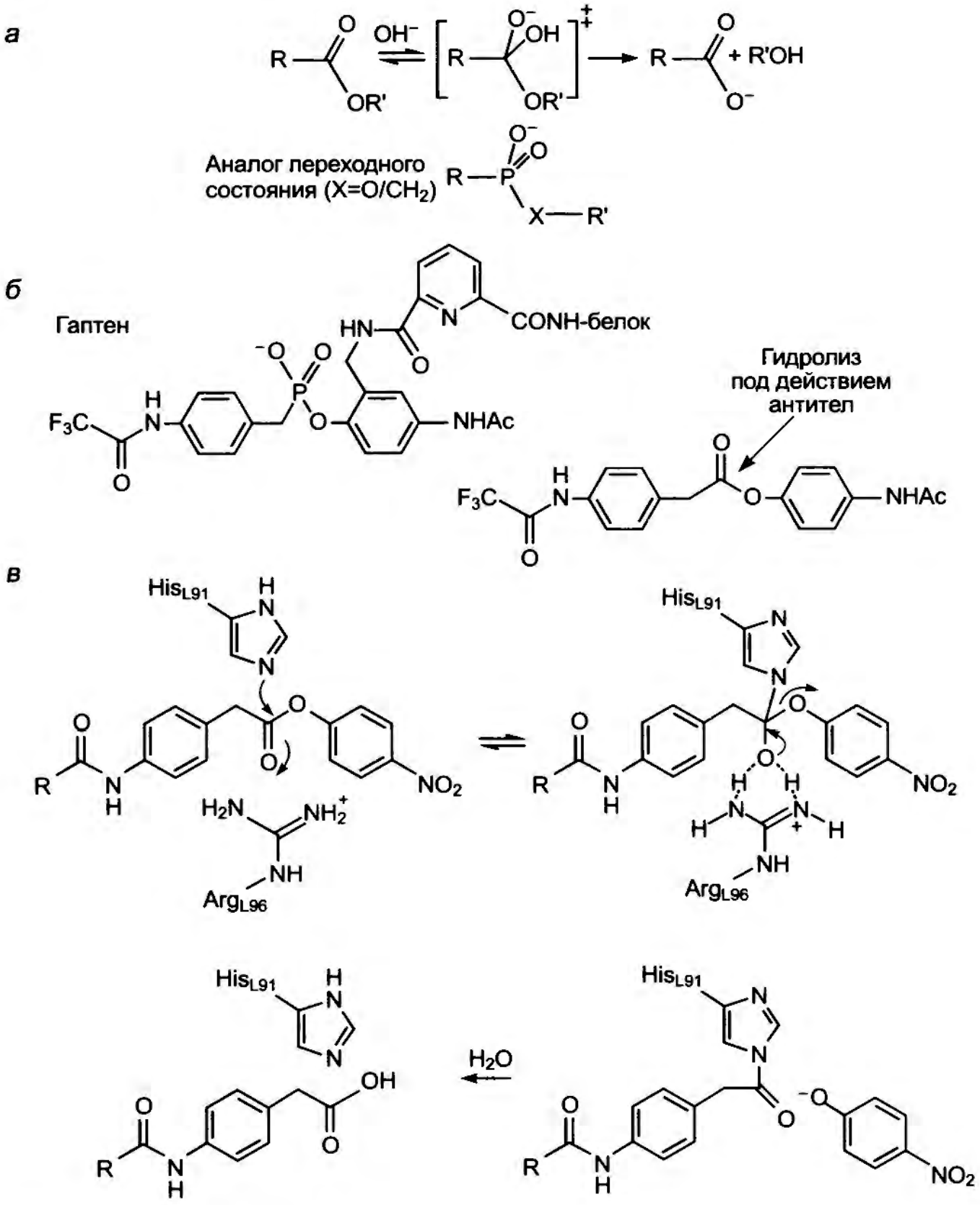


Рис. 15.13. Каталитические антитела, способные осуществлять гидролиз сложных эфиров. *а* — каталитическая реакция гидролиза сложных эфиров протекает через образование тетраэдрического переходного состояния. *б* — каталитические антитела получают, используя в качестве гаптенов фосфорорганические соединения с тетраэдрической структурой, напоминающей структуру переходного состояния. Такие антитела содержат структурный компонент, комплементарный гаптену и способный поэтому связывать соответствующий эфир, облегчая образование переходного состояния. *в* — антитело 43C9 осуществляет гидролиз сложных эфиров по механизму кислотного гидролиза по аналогии с механизмом катализа рибонуклеазой А (см. рис. 15.17). Воспроизводится по книге T. Bugg (2004) An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, 2nd edn, с согласия издательства Blackwell Science Limited

Если K_a зависит от температуры, можно построить **график Вант-Гоффа** в координатах $\ln K_a$ — $1/T$; это прямая с углом наклона $-\Delta H^0/R$ и отрезком $\Delta S^0/R$, отсекаемым на оси ординат:

$$\ln K_a = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \qquad (15.13)$$

Недавние исследования показали, что лишь немногие ферменты способны осуществлять катализ без образования переходного состояния. Однако, например, реакция расщепления связи С–Н под действием метиламиндегидрогеназы не зависит от температуры и, следовательно, ее механизм не укладывается в рамки теории переходного состояния. Данное явление объясняется в рамках теории **квантового туннелирования**. При этом механизме происходит не преодоление энергетического барьера, а как бы его «туннелирование» на энергетическом уровне, близком к основному состоянию реагирующих веществ. Колебания молекул фермента и субстрата сопрягаются таким образом, что высота и ширина энергетического барьера уменьшаются, что упрощает расщепление связи С–Н. Такое явление описано для некоторых химических реакций, но только при низких температурах. Детального понимания роли фермента в этом процессе пока еще не достигнуто.

15.3.6 Влияние pH

Состояние ионизации аминокислотных остатков в активном центре фермента зависит от pH. Поскольку каталитическая активность связана с состоянием ионизации этих остатков, активность фермента также зависит от pH. Графики зависимости $\lg K_M$ и $\lg V_{MAX}$ (а лучше $\lg k_{cat}$) от pH имеют либо колоколообразный вид (что указывает на наличие в активном центре двух важных для катализа ионизируемых аминокислотных остатков) с узким **pH-оптимумом**, либо выходят на плато (один важный для катализа ионизируемый аминокислотный остаток). В любом случае ферменты обычно изучают при том значении pH, при котором его активность максимальна. Изучая зависимость $\lg K_M$ и $\lg V_{MAX}$ от pH, можно определить pK_a ключевых аминокислотных остатков, задействованных в процессах связывания и катализа (рис. 15.14).

15.3.7 Ингибиторы ферментов

Необратимое ингибирование

Ингибиторы ферментов связываются с ними таким образом, что это снижает способность фермента связывать субстрат и/или конвертировать его в продукт. Необратимые ингибиторы типа органических соединений фосфора или ртути, цианидов, монооксида углерода и сероводорода образуют с ферментом ковалентную связь. Степень их ингибирующего действия зависит от константы скорости (следовательно, и времени) образования ковалентной связи и количества ингибитора. Влияние необратимого ингибитора, который нельзя удалить простым физическим методом, например диализом, выражается в снижении количества фермента, доступного для

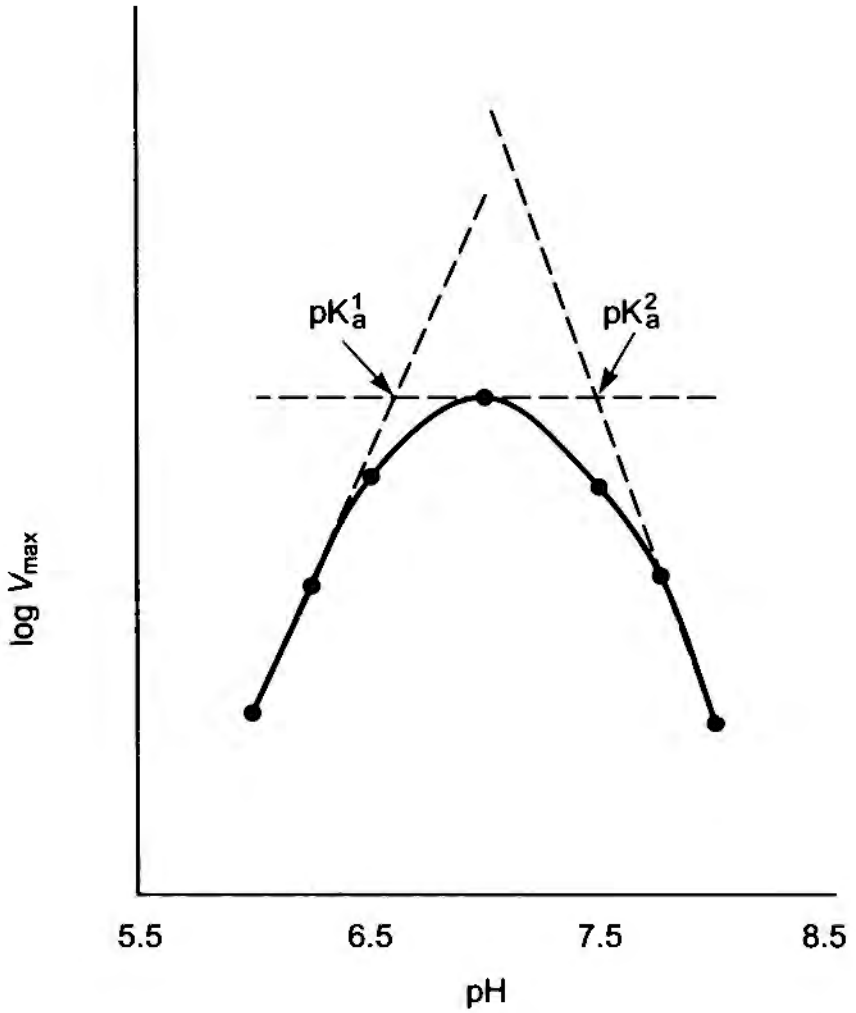


Рис. 15.14. Зависимость максимальной скорости ферментативной реакции от pH. В данном случае в активном центре фермента имеются две ионизируемые группы. По касательным* к экспериментальной кривой удается оценить значения pK_a задействованных в катализе аминокислотных остатков

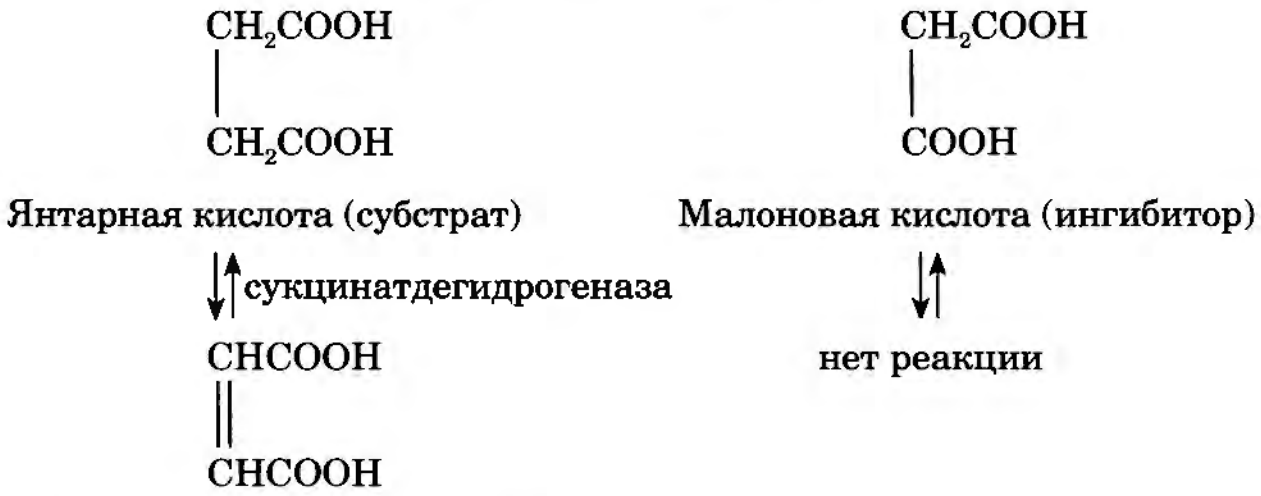
катализа. При этом затрагиваются функциональные группы белка (в частности, гидроксильные и сульфгидрильные) или ионы металла в активном или аллостерическом центре. Так, фосфорорганическое соединение диизопропилфторфосфат реагирует с серином активного центра эстераз, например ацетилхолинэстеразы, а соединение ртути *n*-гидроксимеркурибензоат реагирует с цистеином, что в обоих случаях приводит к образованию ковалентной связи и ингибированию фермента. Ингибиторы такого рода используются для изучения активных центров ферментов (разд. 15.4.2).

Конкурентное обратимое ингибирование

Обратимые ингибиторы не образуют с ферментом ковалентной связи и поэтому могут быть довольно просто удалены при диализе. **Конкурентные обратимые ингибиторы** присоединяются к ферменту в том же центре, что и субстрат и, следовательно, должны иметь с субстратом определенное структурное сходство. Примером может служить ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом:

---

* Правильнее говорить не о касательных, а об асимптомах. — *Прим. ред.*



Фумаровая кислота (продукт)

Любой обратимый ингибитор характеризуется константой диссоциации K_i, называемой **константой ингибирования**, которая описывает диссоциацию комплексов EI (K_{EI}) или ESI (K_{ESI}), где I — ингибитор. Для случая конкурентного ингибирования можно записать такую последовательность реакций:

$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow E + P$$

$$E + I \rightleftarrows EI \rightarrow \text{нет реакции}$$

Поскольку связывание субстрата и ингибитора происходит в одном и том же центре, действие конкурентного ингибитора можно ослабить повышением концентрации субстрата. В присутствии ингибитора максимальная скорость реакции не изменяется, но увеличивается концентрация субстрата, необходимая для ее достижения, т. е. при $v_0 = 0{,}5V_{MAX}$

$$[S] = \frac{K_M(1 + [I])}{K_i} \qquad (15.14)$$

где [I] — концентрация ингибитора.

Из уравнения 15.14 следует, что значение K_i равно концентрации ингибитора, при которой происходит кажущееся удвоение значения K_M. При данном типе ингибирования $K_i = K_{EI}$, а $K_{ESI} \rightarrow \infty$, поскольку комплекс ESI не образуется. В присутствии конкурентного ингибитора уравнение Лайнуивера–Берка (15.5) принимает следующий вид:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot \frac{(1 + [I])}{K_i + 1/V_{MAX}} \qquad (15.15)$$

С помощью данного уравнения можно обнаружить наличие конкурентного ингибирования (рис. 15.15, *а*). Численное значение K_i можно найти из графика в координатах Лайнуивера–Берка для реакции с ингибированием и без ингибирования. На практике, однако, более точное значение получают из вторичного графика (рис. 15.16). Реакции проводят при разных концентрациях субстрата в присутствии нескольких фиксированных концентраций ингибитора и для каждой концентрации ингибитора строят за-

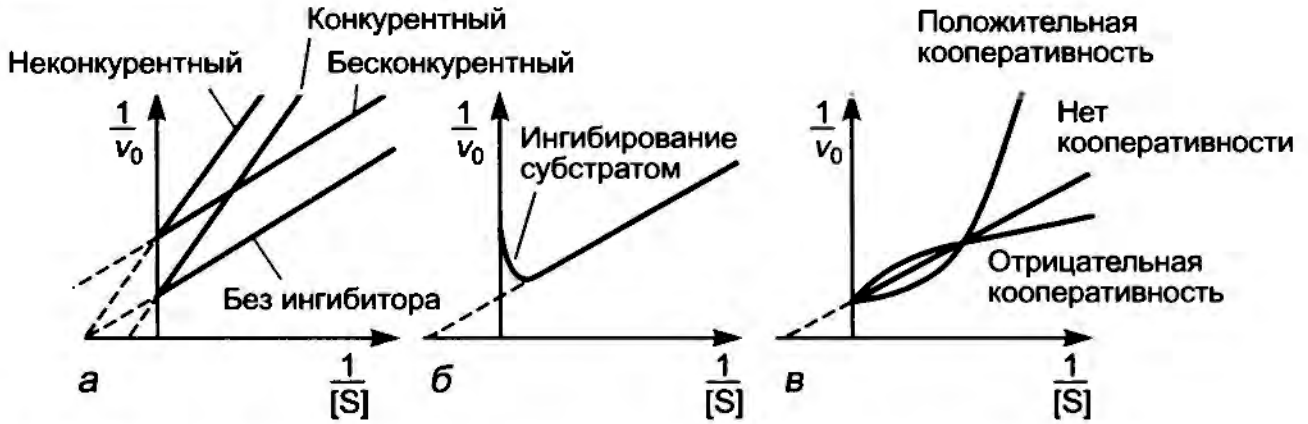


Рис. 15.15. Три типа обратимых ингибиторов (*а*), ингибирование субстратом (*б*) и гомотропная кооперативность (*в*) в координатах Лайнуивера–Берка

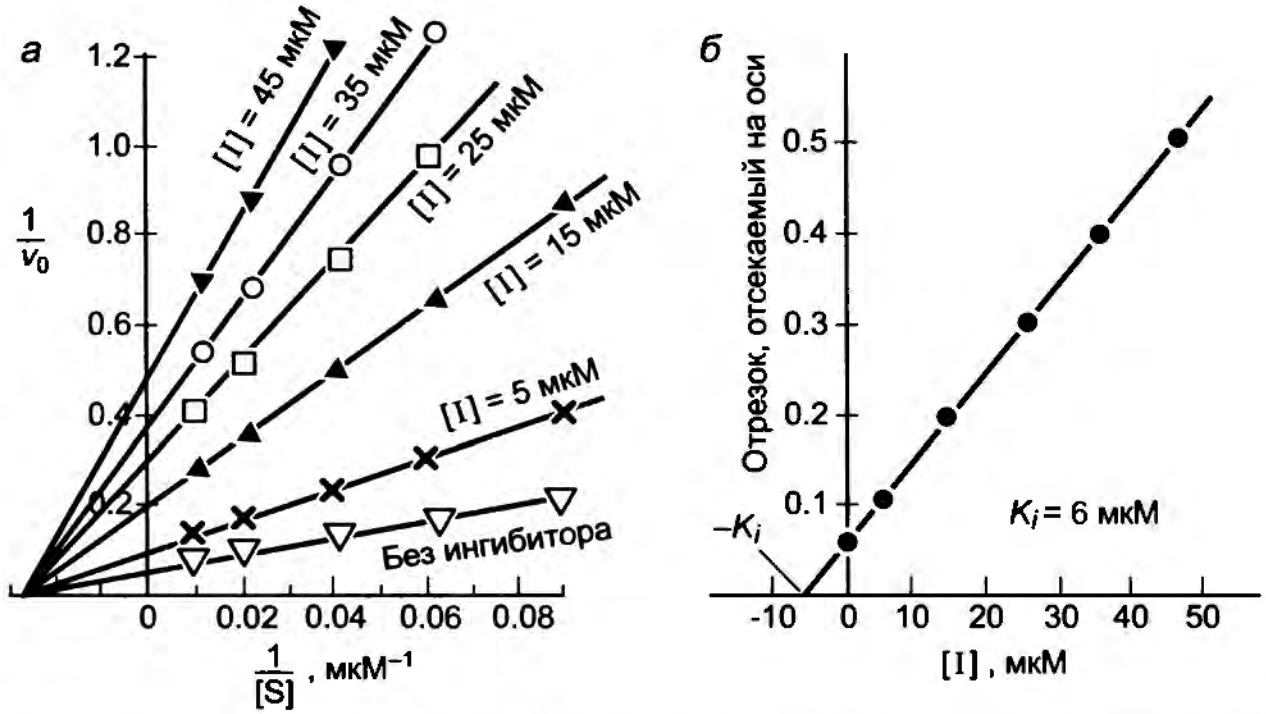


Рис. 15.16. Первичные графики в координатах Лайнуивера–Берка, отражающие влияние обычного конкурентного ингибитора в разной концентрации (*а*) и соответствующий вторичный график, позволяющий определить константу ингибирования (*б*)

висимость в координатах Лайнуивера–Берка. Строят вторичные графики, отражающие зависимость угла наклона первичного графика от концентрации ингибитора или кажущегося значения константы Михаэлиса (K'_M) ($= K_M[(1 + [I])/K_i]$, которое можно рассчитать по величине отрезка, отсекаемого прямой на оси 1/[S]) от концентрации ингибитора; в обоих случаях на оси, по которой отложена концентрация ингибитора, отсекается отрезок $-K_i$. Иногда в активном центре фермента связываются две молекулы ингибитора. В подобных случаях первичный график в двойных обратных координатах по-прежнему линейный, а вот вторичный график — парабола. В таком случае говорят о **параболическом конкурентном ингибировании**, чтобы отличать его от нормального **линейного конкурентного ингибирования**.

Неконкурентное обратимое ингибирование

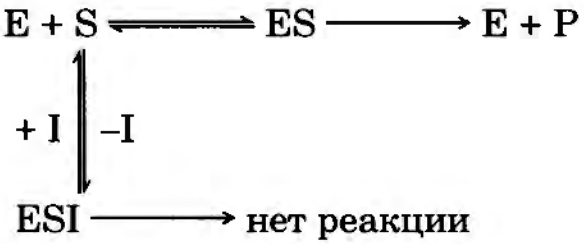
Неконкурентные ингибиторы связываются с ферментом не в активном центре, где связывается субстрат. Поскольку возможность связывания субстрата сохраняется, происходит образование тройного комплекса ESI, не способного осуществлять превращение субстрата в продукт. Так как ингибитор связывается не там, где субстрат, повышение концентрации субстрата не может устранить ингибирование. В результате в присутствии такого ингибитора снижается максимальная скорость, а константа Михаэлиса не изменяется, поскольку ингибитор не мешает связыванию субстрата, но снижает количество комплексов ES, способных приводить к образованию продукта. В данном случае константы K_{EI} и K_{ESI} идентичны и численно равны K_i. Уравнение Лайнуивера–Берка принимает следующий вид:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \cdot \frac{1 + [I]}{K_i} \qquad (15.16)$$

Если установлено наличие неконкурентного ингибирования (рис. 15.15, *а*), K_i лучше всего определить из вторичного графика (рис. 15.16).

Бесконкурентное обратимое ингибирование

Бесконкурентный ингибитор способен связываться только с уже образовавшимся комплексом ES, но не со свободным ферментом; связывание происходит либо на участке, появившемся в результате конформационных изменений, последовавших за присоединением субстрата, либо непосредственно на молекуле субстрата. Образующийся тройной комплекс ESI также непродуктивен.



Как и в случае неконкурентного ингибирования, влияние такого ингибитора не может быть преодолено повышением концентрации субстрата. В данном случае как константа Михаэлиса, так и максимальная скорость уменьшаются в $(1 + [I])/K_i$ раз. Таким образом, при концентрации ингибитора, равной K_i, величины K_M и V_{MAX} уменьшаются вдвое. При данном типе ингибирования $K_{EI} \to \infty$, поскольку ингибитор не может связываться со свободным ферментом, а $K_i = K_{ESI}$. Уравнение Лайнуивера–Берка принимает следующий вид:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \cdot \frac{(1 + [I])}{K_i} \qquad (15.17)$$

K_i лучше всего определить из вторичного графика зависимости $1/V'_{MAX}$ или $[I])/K'_M$ (которое соответствует точке пересечения с осью 1/[S]) от концентрации ингибитора. Оба вторичных графика пересекают ось, по которой отложена концентрация ингибитора, в точке $-K_i$.

Смешанное обратимое ингибирование

В некоторых случаях комплекс ESI сохраняет некоторую каталитическую активность или $K_{EI} \neq K_{ESI} \neq \infty$, т. е. происходит **смешанное ингибирование**. В координатах Лайнуивера–Берка при смешанном ингибировании получается линейная зависимость, отличная от всех тех, что показаны на рис. 15.15, *а*. Прямые, полученные в присутствии ингибитора и без него, могут пересекаться как в положительной, так и в отрицательной областях 1/[S]. Константы ингибирования в этом случае рассчитывают из вторичного графика, либо из угла наклона первичной кривой, либо из значений $1/V_{MAX}$ для первичных графиков от концентрации ингибитора. В обоих случаях вторичные графики пересекают ось концентрации ингибитора в точке $-K_i$. Неконкурентное обратимое ингибирование может рассматриваться в качестве частного случая смешанного ингибирования.

Ингибирование субстратом

Для ряда ферментов при высокой концентрации субстрата наблюдается **ингибирование субстратом**, выражающееся в снижении начальной скорости реакции с повышением концентрации субстрата. Графически подобное явление можно установить, как это показано на рис. 15.15, *б*. Объяснить происходящее можно, если рассматривать субстрат в качестве бесконкурентного ингибитора, приводящего к образованию непродуктивного комплекса.

Ингибирование продуктом реакции

Ферменты, которые действуют в начальных реакциях неразветвленных метаболических путей, часто регулируются с помощью механизма **ингибирования конечным продуктом**. При накоплении определенного количества конечного продукта всего метаболического пути он начинает действовать в роли ингибитора первого фермента, выключая тем самым весь путь. Примером такой регуляции может служить ингибирование аспартаткарбамоилтрансферазы под действием ЦТФ при биосинтезе ЦТФ. В разветвленных метаболических путях ингибирование продуктом обычно затрагивает первый фермент после точки ветвления.

Использование ингибиторов ферментов

Классификация и механизмы ингибирования ферментов имеют важное значение по ряду причин:

- они позволяют лучше понять механизмы катализа (разд. 15.4.2);
- предлагают возможные пути регуляции метаболической активности *in vivo*;
- позволяют синтезировать специфические ингибиторы для терапевтических целей (для блокирования ключевых метаболических путей, связанных с определенными клиническими проявлениями).

Применение ингибиторов в качестве лекарств имеет очень важное значение. Некоторые такие препараты перечислены в табл. 15.2. Ингибиторы

Таблица 15.2. **Примеры использования ингибиторов ферментов в качестве лекарственных препаратов**

Ингибитор	Фермент	Применение
Зидовудин, диданозин	Обратная транскриптаза	Лечение ВИЧ*
Ритонавир, саквинавир	ВИЧ-протеаза	Лечение ВИЧ
Сульфаниламиды	Дигидрофолатсинтаза	Бактериальные инфекции
Триметоприм, метотрексат	Дигидрофолатредуктаза	Бактериальные инфекции
Фосфорорганические соединения	Холинэстераза	Инсектициды
Целастатин	Дегидропептидаза 1	Усиление антибактериального действия
Ипрониазид	Моноаминоксидаза	Регуляция психического состояния
Дисульфирам	Альдегиддегидрогеназа	Лечение алкоголизма
Аллопуринол	Ксантиноксидаза	Лечение подагры
Мевинолин	Гидроксиметилглутарил-CoA-редуктаза	Ингибирование синтеза холестерина
Аспирин	Циклооксигеназы 1 и 2	Ингибирование синтеза простагландинов и тромбоксанов

* ВИЧ — вирус иммунодефицита человека

протеазы ВИЧ-1, такие как ритонавир и саквинавир, были синтезированы на основании данных о структуре активного центра аспартиловых протеаз из разряда пепсинов, к которым относится протеаза ВИЧ-1. Фермент расщепляет специфические пептидные связи, включая -Phe-Pro- и -Tyr-Pro-. Оба лекарства имеют структурное сходство с тетраэдрическим переходным состоянием, возникающем в процессе ферментативной реакции. Оба ингибитора содержат крупные заместители и не подвержены гидролизу, так что они связываются в активном центре фермента, но не расщепляются, а блокируют действие фермента. Успех клинического применения этих препаратов связан с тем, что они достаточно избирательно связываются с протеазой ВИЧ-1, но не с аналогичными человеческими протеазами типа ренина, которые выполняют нормальные физиологические функции.

15.4 АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ ФЕРМЕНТОВ И МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА

Как уже говорилось ранее, ферменты характеризуются очень высокой специфичностью, каталитической активностью и возможностью регуляции. Эти свойства являются отражением пространственного взаимодействия между

ферментом и его субстратом. Таким образом, полное понимание того, как работает фермент невозможно без выяснения механизма связывания субстрата с активным центром фермента и последующего превращения субстрата в продукт. Необходимо изучить структуру участков связывания и активного центра, природу промежуточного фермент–субстратного комплекса, а также сопутствующие электронные и стереохимические явления, приводящие в конечном итоге к образованию продукта. Для решения подобных задач был разработан ряд подходов, которые и будут кратко рассмотрены далее.

15.4.1 Рентгеновская кристаллография

Рентгеновская кристаллография позволяет прямо или косвенно получить информацию о механизме ферментативной реакции. Для проведения анализа фермент должен быть очищен и получен в кристаллической форме (что непростая задача, разд. 8.4.5). Рентгеновская дифракция позволяет установить положение аминокислот в белке и прояснить в деталях картину связывания субстрата и ход реакции. Подобные выводы обычно делаются исходя из результатов кристаллизации в присутствии и в отсутствие субстрата, конкурентного ингибитора или эффектора. Ограничение метода связано с тем, что полученная картина отражает статическую структуру активного центра, в то время как в растворе ферменты ведут себя как очень гибкие и динамичные молекулы, способные существовать во многих микроконформациях. К счастью, экспериментальные данные подтверждают соответствие результатов, полученных методом рентгеновской кристаллографии, той ситуации, которая существует в водной среде *in vivo*. Классические примеры возможностей данного метода — анализ структуры лизоцима, рибонуклеазы, гексокиназы, ряда пептидаз, фосфорилазы и триозофосфатизомеразы; каждый фермент имеет только для него характерный «карман» для связывания субстрата, которое часто сопровождается структурной перестройкой или переориентацией специфических аминокислотных остатков, что и приводит к формированию активного центра. Такие индуцированные изменения скорее говорят в пользу теории **индуцированного соответствия**, чем в пользу ранее господствовавшей теории «ключ–замок», в рамках которой центр связывания рассматривался как некая статичная структура внутри молекулы фермента. Близость специфических аминокислотных остатков в образующемся центре связывания к определенным ковалентным связям в молекуле субстрата обычно благоприятствует возникновению водородных связей или электростатического притяжения между ферментом и субстратом, что способствует образованию энергетически выгодного переходного состояния, необходимого для протекания реакции. Поэтому в активных центрах ферментов чаще всего встречаются такие аминокислотные остатки, которые содержат в боковых цепях функциональные группы: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, серин, цистеин, гистидин, лизин и аргинин.

По мере накопления данных о структуре белков и механизмах ферментативных реакций стали появляться компьютерные программы, позволяю-

щие моделировать химические и стереохимические превращения в молекулах ферментов и предсказывать их трехмерную структуру. Такой подход сегодня широко используется в фармацевтических исследованиях при создании новых лекарственных препаратов.

15.4.2 Необратимые ингибиторы и аффинные метки

Необратимые ингибиторы образуют с ферментом ковалентную связь (разд. 15.3.7). При локализации участка связывания ингибитора иногда удается идентифицировать и специфические аминокислоты центра связывания. Так, цианид связывается с ионами металлов, которые играют важную роль в активности некоторых ферментов, а органические соединения ртути и иодацетат реагируют с сульфгидрильными группами остатков цистеина. Фосфорорганические соединения, такие как диизопропилфторфосфат, являются мощными ингибиторами ацетилхолинэстеразы и серинових протеаз, поскольку образуют ковалентную связь с гидроксильными группами серина, находящегося в активном центре этих ферментов. Такое специфическое «мечение» аминокислот активного центра можно воспроизвести, если использовать аналог природного субстрата, содержащий реакционноспособные группы, которые образуют ковалентную связь с ферментом. Примером может служить ингибирование триозофосфатизомеразы под действием 1-бромглицеро-3-фосфат:

$$O_3^{2-}POCH_2COCH_2Br + \text{Фермент-OH} \rightarrow \text{Фермент-O-}CH_2COCH_2OPO_3^{2-}$$

1-бромглицеро-3-фосфат — триозофосфат-изомераза — алкилированный фермент

Развитие данного метода привело к появлению **фотоаффинных меток**, которые по структуре напоминают субстрат, но содержат функциональные группы (например, азогруппы -N=N-), которые под действием света превращаются в реакционноспособные группы типа карбенов или нитренов, образующих ковалентную связь с расположенными поблизости функциональными группами активного центра фермента. Часто ингибитор или фотоаффинная метка содержат радиоактивный изотоп, что позволяет определять их локализацию внутри молекулы фермента.

15.4.3 Анализ кинетических зависимостей

Анализ кинетических зависимостей с использованием набора субстратов и/или конкурентных ингибиторов и определение K_M, k_{cat} и K_i — эти исследования позволяют выявить корреляцию между структурой молекул и константами и, следовательно, сделать выводы о структуре активного центра. Можно также получить информацию о механизме реакции и порядке присоединения субстратов для двухсубстратной реакции (разд. 15.3.2). Более полную информацию о структуре активного центра можно получить из анализа зависимости констант от pH. В частности, анализируют влияние pH на K_M (что отражает связывание E с S), а также

на максимальную скорость V_{MAX} и k_{cat} (что отражает превращение ES в продукты). Далее строят графики зависимости $\lg K_M$ и $\lg V_{MAX}$ или $\lg k_{cat}$ от pH. По графику можно определить pK_a ионизируемых групп в составе активного центра (рис. 15.14). Эти данные сравнивают с pK_a ионизируемых групп, содержащихся в белке. Например, чувствительность фермента к изменению pH в диапазоне 6–8 говорит о том, что в катализе принимает участие имидазольная группа одного или нескольких остатков гистидина, поскольку pK_a гистидина находится именно в этом диапазоне.

15.4.4 Изотопный обмен

Замена природного изотопа в составе субстрата на другой изотоп того же элемента и изучение влияния этой замены на наблюдаемую скорость ферментативной реакции и стереоселективность часто позволяет делать определенные выводы о механизме реакции. Проиллюстрируем сказанное двумя примерами. Рассмотрим реакцию окисления этанола под действием алкогольдегидрогеназы (АДГ):

$$\underset{\text{этиловый спирт}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \overset{\text{АДГ}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{уксусный альдегид}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Два атома водорода в группе CH_2 этанола химически неразличимы, но если один из них заменить на дейтерий или тритий, то атом углерода в этой группе становится хиральным центром, а конфигурацию всей молекулы можно классифицировать, по правилу Кана–Ингольда–Прелога, как *R* или *S*. Исследования показали, что алкогольдегидрогеназа удаляет атом водорода исключительно в про-*R*-конфигурации, т. е. (*R*)-CH_3CHDOH всегда теряет дейтерий при превращении в уксусный альдегид, а (*S*)-CH_3CHDOH его сохраняет. Подобные особенности можно объяснить только исходя из специфической ориентации молекулы этанола в центре связывания, при которой два атома водорода действительно не эквивалентны. Таким типом стереоспецифичности обладают все дегидрогеназы, которые разделяют соответственно на «A-side» дегидрогеназы (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа и др.) и «B-side» дегидрогеназы (глицерин-3-фосфатдегидрогеназа, глюкозодегидрогеназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и др.). Интересно, что принадлежность фермента к той или иной группе не зависит от того, является ли акцептором электронов NAD^+ или $NADP^+$.

Приведем другой пример. Эфиры под действием эстераз превращаются в смесь кислоты и спирта:

$$\underset{\text{эфир}}{RCOO^*R'} + H_2O \overset{\text{эстераза}}{\longrightarrow} \underset{\text{кислота}}{RCOOH} + \underset{\text{спирт}}{R'O^*H}$$

Атом кислорода, отмеченный звездочкой O*, в результате реакции может оставаться как на молекуле кислоты, так и на молекуле спирта, что зависит от того, с какой стороны от него будет разорвана связь; второй атом кислорода в

составе продуктов берется из воды. Если использовать метку ^{18}O и следить за ней после реакции методом масс-спектрометрии, можно получить информацию о ходе гидролиза под действием эстеразы. В молекуле спирта всегда есть атом кислорода. Реакция начинается с нуклеофильной атаки молекулы воды на карбонильный атом углерода с последующим удалением группы R'O*.

15.4.5 Спектрофотометрический анализ

Для изучения активных центров ферментов используют как ЯМР, так и КР (рамановскую) спектроскопию. С помощью ЯМР обычно изучают небольшие молекулы ферментов, такие как рибонуклеаза А. Этот белок, состоящий из единственной аминокислотной цепи, содержит четыре остатка гистидина. Анализ зависимости активности фермента от pH, что в катализе участвуют два остатка гистидина, причем один в протонированной, а другой — в непротонированной форме. Для ЯМР важно, что протоны гистидина дают сигналы, сильно отличающиеся от сигналов всех остальных протонов в молекуле фермента. Изменения сигнала ЯМР как функция pH связаны с остатками гистидина в положениях 12 и 119. Этот вывод был подтвержден данными по ингибированию иодацетата. Иодацетат обычно не реагирует с гистидином, однако вступает в реакцию с двумя остатками гистидина рибонуклеазы А, что указывает на более высокую реакционную способность этих двух остатков по сравнению с обычным гистидином. Данное наблюдение объясняют тем, что эти два остатка участвуют в образовании водородных связей в активном центре фермента, что ослабляет связь N–H и делает ее более доступной для взаимодействия с иодацетатом (рис. 15.17).

15.4.6 Сайт-направленный мутагенез

Благодаря развитию молекулярно-биологических методов, в частности методов клонирования генов и их экспрессии в подходящих векторах, стало возможным создание модифицированных ферментов, в которых важные для катализа аминокислотные остатки заменены на другие. Изучая влияние на каталитические свойства фермента замены ионизируемого или нуклеофильного остатка на неактивный остаток, можно сделать выводы о роли замещенной аминокислоты. Так, в обсуждавшемся выше примере с рибонуклеазой А замена His12 или His119 на другой остаток приводила к полной потере активности фермента. В принципе возможно создать фермент, который будет обладать более высокой каталитической активностью, чем природный фермент. Такие исследования основаны на знаниях структуры белка и механизма его действия, причем замена одной-единственной аминокислоты в активном центре не должна никак влиять на другие участки белка. Подобные замены надо контролировать с помощью структурных исследований, например, спектральными методами. Данный подход, называемый **рациональным дизайном**, позволил, например, получить супероксиддисмутазу, обладающую более высокой активностью, чем природный фермент, и изоцитратдегидрогеназу, специфичность которой отличается от специфичности природного белка.

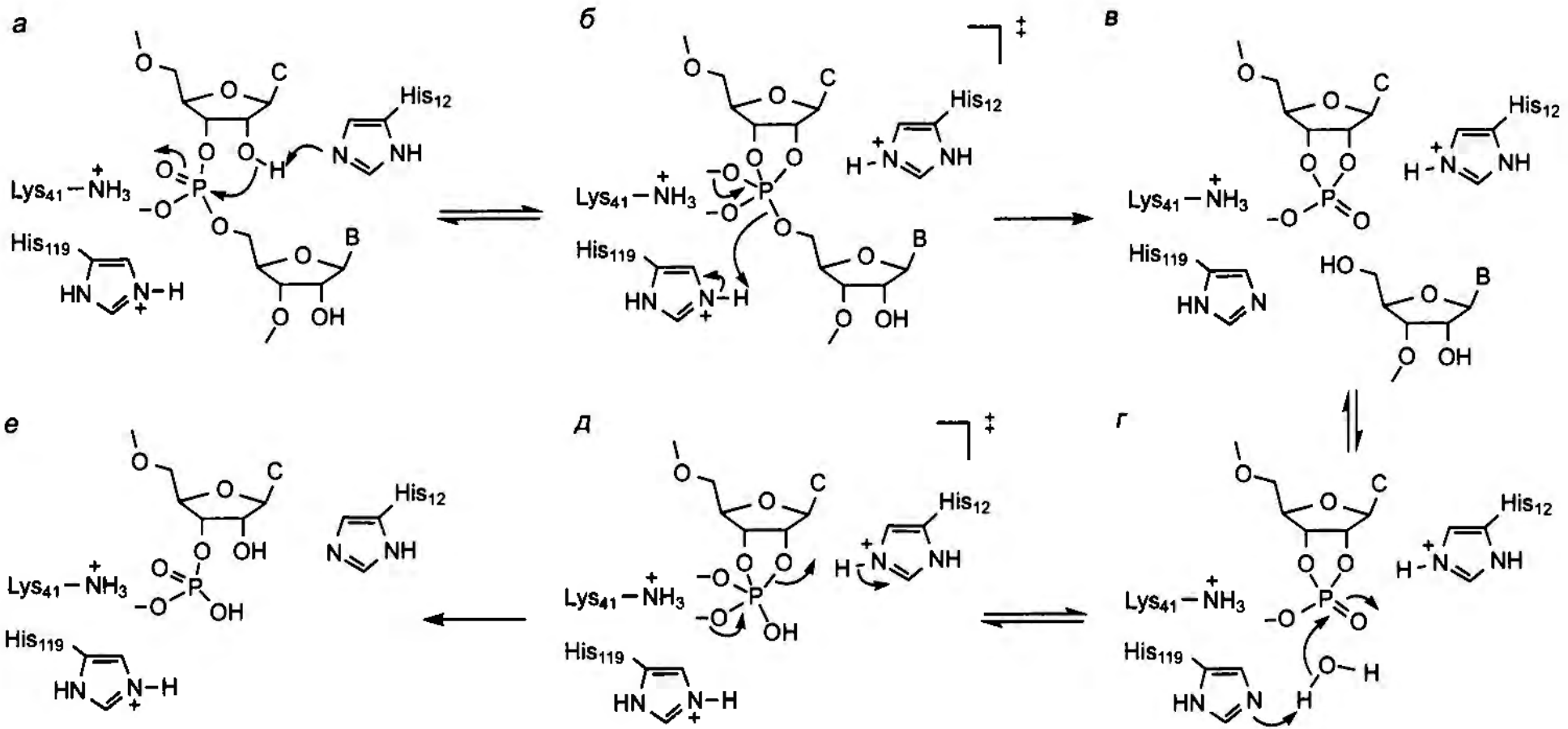


Рис. 15.17. Механизм гидролиза РНК под действием рибонуклеазы. *а* — РНК размещается в субстратсвязывающем кармане рибонуклеазы таким образом, что пиримидиновая группа образует водородную связь с остатком Thr45. Остаток His12, действуя как основание, удаляет протон из гидроксильной группы, а кислород, действуя в качестве нуклеофила, атакует фосфатную группу. *б* — остаток His119 действует как кислота и атакует пятивалентный фосфор, расщепляя при этом связь P–O с соседним остатком рибозы, что приводит к образованию циклического диэфира на первом остатке рибозы. *в* — продукт с 5'-OH группой выходит из активного центра. *г* — молекула воды атакует циклический диэфир, а протон переходит к остатку His119, выступающему в роли основания. *д* — остаток His12, действуя как кислота, отдает протон второму пятивалентному фосфору, что приводит к образованию 3'-фосфата, изображенного на рис. *е*. Воспроизводится по книге T. Bugg (1997) An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, с согласия издательства Blackwell Science Limited

15.4.7 Механизмы катализа. Изучения рибонуклеазы А

Изложенные стратегии изучения ферментов позволили установить механизм действия многих из них. Кристаллографический анализ и направленный мутагенез, в частности, способны предоставить подробную информацию о стереохимических и электронных превращениях, сопровождающих связывание субстрата и его превращение в продукт. Такие исследования подчеркивают важность происходящих в белках конформационных изменений. Важную роль играет также образование водородных связей между субстратом и ключевыми аминокислотными остатками в центре связывания и в активном центре белка, которое облегчает «активацию» субстрата и снижает энергетический барьер реакции. Многие ферментативные реакции имеют и другие общие черты, например подчиняются механизму кислотно-основного катализа, хорошо известного из органической химии. Проиллюстрируем сказанное на примере рибонуклеазы А.

Рибонуклеаза А (РНКаза А)

РНКаза А — небольшой фермент с молекулярной массой 13,68 кДа, состоящий всего из 124 аминокислотных остатков (в том числе четыре остатка гистидина), который катализирует гидролиз РНК, расщепляя эфирную связь Р–О между 5'-углеродом рибозы и пиримидином (цитозином или урацилом), присоединенным к рибозе по положению 1'. Процесс идет через образование циклического 2',3'-фосфодиэфира, который можно выделить и охарактеризовать. Предположения о механизме реакции и природе переходного состояния основаны на данных, полученных разными методами.

- Зависимость активности фермента от pH представлена колоколообразной кривой, что указывает на участие в катализе двух остатков гистидина, одного в протонированной, а другого в непротонированной форме с pK_a 5,4 и 6,4 соответственно.
- Метод ЯМР выявил сигналы двух протонов от остатков гистидина, отличающихся от всех других сигналов протонов в молекуле (разд. 15.4.5).
- Аффинное мечение с помощью иодацетата показало участие в реакции остатков His12 и His119; аналогичный эксперимент с фтординитробензолом указывает на участие в реакции Lys41 и, возможно, Lys7.
- Данные направленного мутагенеза говорят о том, что Lys7 может быть заменен другим остатком без потери ферментативной активности, а Lys41 нет.
- Кристаллографический анализ выявил карман в структуре белка, с которым может связываться расщепляемый участок РНК. Остатки гистидинов 12 и 119 расположены близко, но по разные стороны от этого кармана. Остатки Lys7, Lys41 и Lys66 расположены вблизи Asp121, который соседствует с His119. По-видимому, положительно заряженные остатки Lys взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами РНК, а отрицательно заряженный Asp121 участвует в переносе протона от воды.
- Моделирование структуры активного центра фермента показало, что пиримидиновые основания цитозин или урацил могут располагаться в кармане фермента таким образом, что образуют две водородные связи с

остатком Thr45. При замене пиримидина на пурин (аденин или гуанин) водородных связей не образуется, что объясняет специфичность фермента к пиримидинам.
- Исследование модельных субстратов позволило сделать вывод, что фермент расщепляет эфирную связь P–O, соединенную с 5'-углеродом рибозы, и что процесс идет с образованием циклического 2',3'-фосфодиэфира, который удается выделить.

На основании данных об устройстве активного центра РНКазы А удалось предсказать механизм ее каталитического действия (см. рис. 15.17). Это пример кислотно-основного катализа, характерный для гидролитических ферментов. Каждый из двух ключевых остатков гистидина выступает и в роли основания, и в роли кислоты. Образование пятивалентного фосфора в качестве промежуточного продукта подтверждается тем фактом, что конкурентным ингибитором РНКазы А является ванадат уридина, в котором атом ванадия находится в пятивалентном состоянии. Из-за отсутствия в молекуле ДНК 2'-гидроксильных групп пятивалентное промежуточное состояние образовываться не может, что и объясняет активность фермента к РНК, но не к ДНК.

Полиферментные комплексы

Анализ полиферментных комплексов, в том числе триптофансинтетазы и карбамоилфосфатсинтетазы, показал, что связь активного центра одного фермента с активным центром следующего фермента метаболического пути осуществляется с помощью аллостерической регуляции. Продукты реакции в результате туннельного эффекта передаются из одного активного центра в другой. В случае триптофансинтетазы, представляющей собой $(\alpha\beta)_2$-комплекс, в котором α- и β-субъединицы катализируют отдельные реакции, туннель имеет протяженность порядка 25 Å, а в случае карбамоилфосфатсинтетазы его длина около 100 Å (обратите внимание, что при описании размеров структуры молекул чаще пользуются ангстремами, а не нанометрами). Наличие туннеля предотвращает контакт промежуточных продуктов с окружающей средой и уменьшает время перехода к следующему активному центру. В случае обоих указанных ферментов туннели образуются до связывания исходного субстрата, но в других полиферментных комплексах это может происходить и после связывания субстрата.

15.5 РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

15.5.1 Регуляция активности каждого отдельного фермента

Регуляцию активности любого фермента можно осуществить двумя способами:

- путем изменения условий, в которых действует фермент;
- путем изменения количества фермента в системе за счет форсированного синтеза или деградации фермента.

Второй путь более долгосрочный и будет обсуждаться позднее. Напротив, существует несколько механизмов, с помощью которых активность фермента может быть изменена практически мгновенно.

- *Ингибирование продуктом.* Продукт реакции играет роль ингибитора, поэтому, если он не удаляется в других метаболических процессах, реакция останавливается. Примером может служить ингибирование активности гексокиназы под действием глюкозо-6-фосфата. Гексокиназа существует в виде четырех изоформ — I, II, III и IV. Первые три имеют низкие значения $K_м$ для глюкозы (около 10–100 мкМ) и ингибируются глюкозо-6-фосфатом в отличие от изоформы IV, значение $K_м$ которой выше (10 мМ). Изоформа IV существует исключительно в печени, где высокое значение $K_м$ позволяет ей действовать в условиях высокого содержания глюкозы, которое возникает после употребления богатой углеводами пищи. Остальные три изоформы встречаются в организме повсюду и им не приходиться действовать в условиях такой высокой концентрации глюкозы, как в печени. Более низкие значения константы Михаэлиса позволяют им работать в оптимальном режиме в тех физиологических условиях, в которых они находятся.
- *Аллостерическая регуляция.* В результате связывания в аллостерическом центре небольших молекул, например субстрата, продукта или ключевого метаболита типа АТФ или АМФ, изменяется конформация активного центра (разд. 15.3.3). Хороший пример — регуляция активности 6-фосфофруктокиназы, которая обсуждалась выше.
- *Обратимая ковалентная модификация.* Это может быть аденилирование остатка тирозина под действием АТФ (глутаминсинтаза), АДФ-рибозилирование остатка аргинина под действием NAD^+ (нитрогеназа), но чаще всего происходит фосфорилирование специфического остатка тирозина, серина или треонина под действием протеинкиназы. Фосфорилирование — обратимая реакция, катализируемая в обратном направлении фосфатазой. В результате фосфорилирования белок приобретает полярные γ-фосфатные группы АТФ, что может приводить к конформационным изменениям в молекуле фермента и его активации или инактивации.

Обратимая ковалентная модификация — самый распространенный механизм изменения активности фермента из тех, что перечислены выше. На сегодняшний день идентифицировано много различных протеинкиназ; все они отнесены к трем основным группам.

- *Рецепторные протеинкиназы* располагаются на цитоплазматической стороне клеточного мембранного рецептора и активируются в результате связывания на внеклеточной стороне рецептора определенного гормона, нейромедиатора или другой сигнальной молекулы, высвобождаемой другой клеткой. Связывание лиганда чаще всего ведет к димеризации рецептора и автофосфорилированию протеинкиназы. Такое автофосфорилирование рецепторного белка активирует протеинкиназу и приводит к образованию центра связывания для ряда важных сигналь-

ных внутриклеточных белков, их фосфорилированию и модификации их активности. Более детально этот механизм обсуждается в разд. 16.5.3.

- *Нерецепторные протеинкиназы.* Представители этой большой группы киназ играют важнейшую роль в дифференцировке, пролиферации и гибели клеток. Наиболее изучены киназы семейства Src. Они все имеют сходную структуру и активируются в результате дефосфорилирования и последующего фосфорилирования под действием рецепторной протеинкиназы описанного выше типа.
- *Киназы, регулируемые вторичными мессенджерами.* Представители этой важной группы киназ активируются или дезактивируются в результате действия вторичных мессенджеров, высвобождаемых внутриклеточным мембранно-связанным ферментом, который активируется рецептором, связанным с G-белком. Вторичными мессенджерами могут служить цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} или диацилглицерин (подробности изложены ниже и в гл. 16). В качестве примера можно назвать цАМФ-зависимую протеинкиназу, участвующую в гликогенолизе, протеинкиназу С (активируемую Ca^{2+} и диацилглицерином), задействованную в фосфорилировании рецептора эпидермального фактора роста, а также Ca^{2+}/кальмодулин-зависимую протеинкиназу, вовлеченную в регуляцию других киназ, например киназы фосфорилазы.

Многие киназы участвуют в каскадах ферментативных реакций (таких, как гликогенолиз или гликогенез), которые рассматриваются в следующих разделах. Такие каскады позволяют осуществлять тонкую регуляцию метаболизма и амплифицировать исходный сигнал, получаемый мембранным рецептором.

15.5.2 Регуляция метаболизма

Из тысяч внутриклеточных ферментов многие участвуют в осуществлении хорошо согласованных между собой химических процессов, таких как гликолиз, цикл лимонной кислоты и биосинтез жирных кислот и стероидов. Ферменты, принимающие участие в том или ином метаболическом пути, часто сгруппированы друг с другом одним из трех возможных способов:

- локализованы в одном и том же отделе клетки;
- физически связаны в полиферментные комплексы, например, как синтетаза жирных кислот в клетках *E. coli*;
- связаны с мембраной, например, как ферменты электронотранспортной системы.

Такое сближение ферментов в пространстве облегчает транспорт продукта одного фермента к следующему ферменту данного метаболического пути.

Определение скоростьопределяющей стадии

Ферменты метаболического пути действуют таким образом, чтобы поддерживать определенную скорость расходования субстрата и образования

продукта. Эту скорость называют **скоростью метаболического потока**. Метаболический поток определяется рядом факторов, таких как доступность исходных субстратов и кофакторов, но, в первую очередь, активностью отдельных ферментов. Известно, что не все ферменты конкретного метаболического пути обладают одинаковой активностью. Из-за этого может произойти так, что немногие другие ферменты с совсем небольшой активностью контролируют общий поток в данном метаболическом пути. Для идентификации ферментов, **контролирующих скорость потока**, необходимо провести три вида исследований.

- Изучить кинетические характеристики каждого отдельного фермента *in vitro*, но в условиях, которые максимально приближены к условиям *in vivo*, и при насыщающей концентрации фермента (т. е. при $[S] > 10K_M$).
- Выяснить для каждой ферментативной стадии, является ли она равновесной или близка к равновесию в условиях *in vivo*.
- Определить **коэффициент контроля потока** для каждого фермента.

Далекая от состояния равновесия реакция, но которая сопровождается большим изменением свободной энергии, вполне может быть скоростьопределяющей стадией всего процесса, поскольку наиболее вероятной причиной неравновесности является неадекватная активность фермента. Для выявления неравновесных реакций необходимо найти концентрацию каждого субстрата и продукта *in vivo*. Обычно для этого в модельных системах *in vivo* останавливают все последующие реакции путем денатурации ферментов, а затем анализируют состав реакционной среды методом хроматографии или ЯМР.

Для каждого фермента метаболического пути можно рассчитать коэффициент контроля потока C, который учитывает вклад изменения активности фермента (в физиологических условиях) в общий поток в метаболическом пути. Этот коэффициент варьирует от 0 до 1. Если $C = 1$, это означает, что метаболический поток изменяется пропорционально увеличению активности фермента, а если $C = 0$ — поток не зависит от изменения активности данного фермента. Сумма всех значений C для данного метаболического пути составляет единицу, поэтому, чем выше этот коэффициент для конкретного фермента, тем больше его влияние на общий поток. Следовательно, «скоростьопределяющие» ферменты имеют наиболее высокие значения коэффициента контроля потока.

В табл. 15.3 дана характеристика всех ферментов гликолитического пути в соответствии с тремя названными критериями. Конкретные численные значения трех параметров для каждого фермента могут различаться в разных типах клеток внутри одного организма и в клетках одного и того же типа, но в разных организмах. Из табл. 15.3 видно, что 3 из 10 ферментативных стадий превращения глюкозы в пируват могут играть роль скоростьопределяющих — они неравновесные и связаны с большим отрицательным изменением свободной энергии, т. е. практически необратимы. Катализирующие эти три стадии ферменты обладают наиболее высокими коэффициентами C. Было показано, что все три фермента регулируются с помощью различных механизмов и что все они контролируют поток в гликолитическом пути.

Таблица 15.3. **Выявление скоростьопределяющих стадий гликолиза**

Фермент	Активность	Равновесие	Коэффициент контроля потока, C
Гексокиназа	Низкая	Нет	Высокий
Фосфоглюкомутаза	Высокая	Близко	Низкий
6-Фосфофруктокиназа	Низкая	Нет	Высокий
Фруктозодифосфатальдолаза	Высокая	Близко	Низкий
Триозофосфатизомераза	Высокая	Близко	Низкий
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа	Высокая	Близко	Низкий
Фосфоглицераткиназа	Высокая	Близко	Низкий
Фосфоглицератмутаза	Высокая	Близко	Низкий
Енолаза	Высокая	Близко	Низкий
Пируваткиназа	Низкая	Нет	Высокий

Гексокиназа существует в виде четырех изоформ, три из которых ингибируются глюкозо-6-фосфатом — продуктом реакции. Изоформа IV, известная также как глюкокиназа, не подвержена такому ингибированию и имеет более высокое значение K_M для глюкозы, чем три другие формы фермента. Этот изофермент присутствует в основном в печени, где ему приходится действовать в условиях высокой концентрации глюкозы; образующийся глюкозо-6-фосфат направляется на синтез гликогена через стадию образования глюкозо-1-фосфата.

Активность пируваткиназы подвержена аллостерической регуляции; фермент ингибируется АТФ и активируется АМФ и фруктозо-1,6-дифосфатом. В большом количестве, что снижает ее влияние в качестве скоростьопределяющего фермента, пируваткиназа присутствует в мышцах. Поскольку данный фермент завершает метаболический путь, кажется маловероятным, что он играет определяющую роль в регуляции гликолиза.

Обсуждавшаяся выше 6-фосфофруктокиназа (ФФК; разд. 15.3.3) подвергается аллостерической регуляции со стороны ряда эффекторов, связанных с энергетическим статусом клетки. Наиболее важные активаторы — АМФ и фруктозо-2,6-дифосфат; АТФ выступает в роли активатора, когда находится в низкой концентрации, но становится ингибитором при более высокой концентрации (~ 1 мМ). АМФ активирует фермент, снимая ингибирующее влияние АТФ путем связывания R-конформации, что смещает равновесие, уменьшая количество конформации T, с которой связывается АТФ. Таким образом, влияние АТФ и АМФ определяется их относительным содержанием. Это, в свою очередь, зависит от активности фермента аденилаткиназы, катализирующей реакцию:

$$2\text{АДФ} \rightleftarrows \text{АТФ} + \text{АМФ}$$

АТФ обычно присутствует в клетке в гораздо более высокой концентрации, чем два других нуклеотида, так что незначительное снижение его концентрации (недостаточное для отмены его ингибирующего влияния на ФФК) приводит к более значительным изменениям концентрации АМФ, содержание которого обычно составляет лишь 2% от содержания АТФ. Это относи-

тельно большое увеличение концентрации АМФ приводит к мощному активирующему воздействию на ФФК, что способствует протеканию гликолиза.

Кроме того, контролирующее влияние ФФК на гликолиз связано с вовлечением этого фермента в **субстратный цикл** с ферментом фруктозодифосфатазой (ФДФ), задействованной в глюконеогенезе (превращении пирувата в глюкозу) (рис. 15.18). Обе реакции экзергонические и практически необратимые. Хотя АМФ является мощным активатором ФФК, он также является мощным ингибитором ФДФ и, следовательно, выполняет двунаправленное действие в регуляции этих противоположно направленных процессов. ФФК превращает D-фруктозо-6-фосфат в D-фруктозо-1,6-дифосфат и одновременно конвертирует АТФ в АДФ. ФДФ превращает D-фруктозо-1,6-дифосфат в D-фруктозо-6-фосфат и неорганический фосфат. Может показаться, что суммарным результатом реакции является

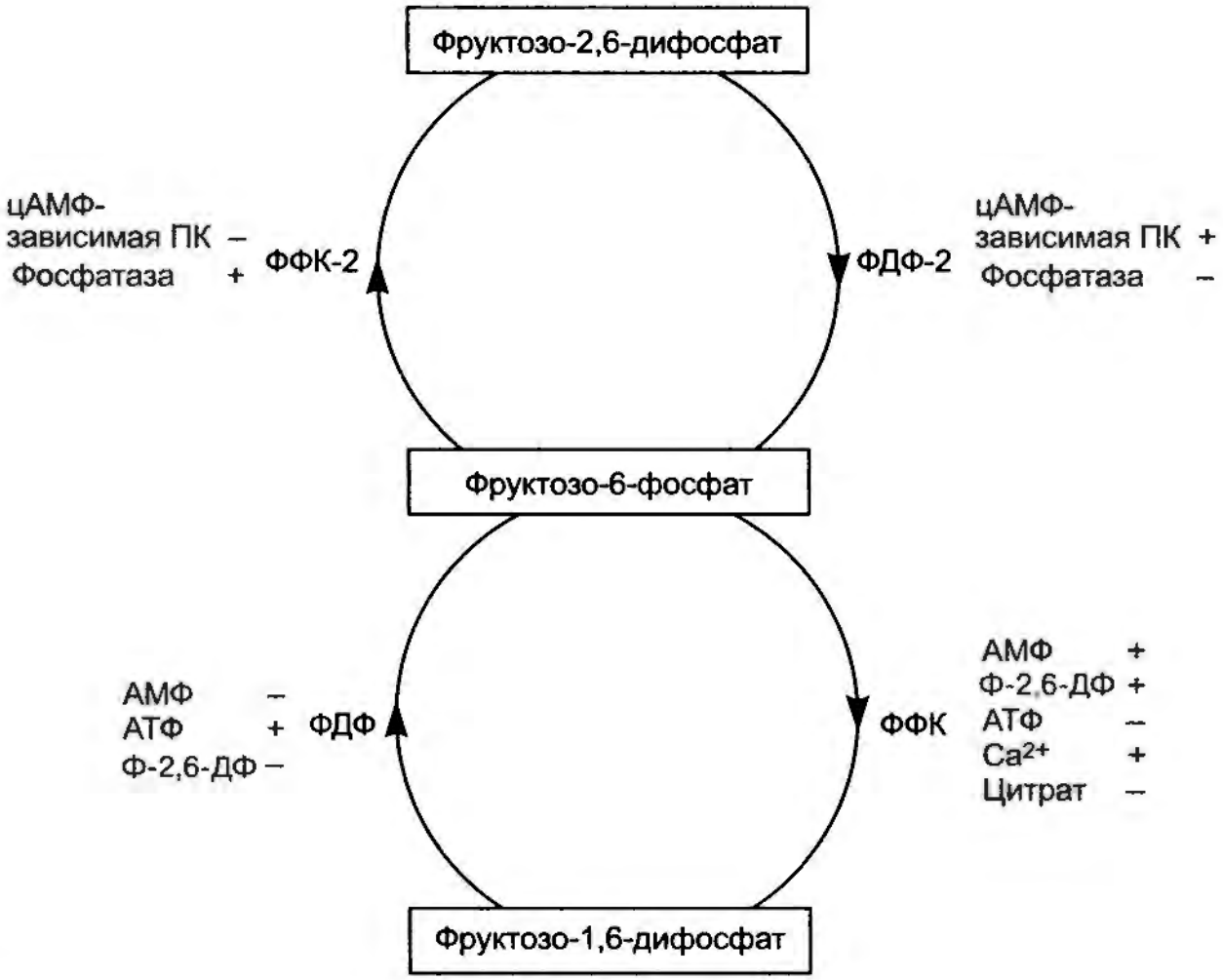


Рис. 15.18. Регуляция активности фосфофруктокиназы (ФФК). Механизм регуляции основан на двух субстратных циклах, центром которых является фруктозо-6-фосфат. Продвижение обоих циклов в противоположных направлениях связано с активностью разных ферментов, так что все реакции экзергонические (сопровождаются отрицательным изменением свободной энергии). Каждый фермент подвергается активации (+) или ингибированию (–) либо под действием аллостерических эффекторов, либо в результате фосфорилирования/дефосфорилирования. Значимость каждого регуляторного механизма различна в разных организмах и даже в отдельных тканях одного организма. ПК — протеинкиназа; Ф-2,6-ДФ — фруктозо-2,6-дифосфат

лишь гидролиз АТФ, но на самом деле данный процесс при участии аденилаткиназы приводит к значительному увеличению концентрации АМФ. Как уже было сказано выше, все это имеет результатом активацию ФФК, ингибирование ФДФ и усиление гликолиза. Двукратное повышение концентрации АМФ может вызвать 200-кратное ускорение гликолиза. Однако регуляторная роль изменений концентрации АМФ не сводится исключительно к стимуляции гликолиза. Не менее важно, что снижение концентрации АМФ приводит к ингибированию ФФК со стороны АТФ, что практически выключает путь гликолиза и ускоряет синтез гликогена.

Хотя АМФ — мощный регулятор активности ФФК, он не самый сильный активатор этого фермента. Данную роль, по крайней мере в печени, выполняет D-фруктозо-2,6-дифосфат (Ф-2,6-ДФ). Это вещество не промежуточный продукт гликолиза, хотя при изомеризации превращается в 1,6-дифосфат — продукт реакции, катализируемой ФФК. Ф-2,6-ДФ активирует ФФК уже в концентрации 1 мкМ. Ф-2,6-ДФ вовлечен в субстратный цикл с фосфофруктокиназой-2 (ФФК-2), превращающей D-фруктозо-6-фосфат в D-фруктозо-2,6-дифосфат, и фруктозодифосфатазой-2 (ФДФ-2), превращающей дифосфат обратно в 6-фосфат. Интересно, что эти две ферментативные активности связаны с разными доменами одного и того же димерного белка. Обе активности регулируются путем фосфорилирования/дефосфорилирования. ФДФ-2 активируется путем фосфорилирования, а ФФК-2 — дефосфорилирования. При высоком содержании глюкозы в клетке происходит активация ФФК-2 путем дефосфорилирования под действием активированной фосфатазы, что повышает концентрацию Ф-2,6-ДФ. Это, в свою очередь, активирует ФФК и усиливает гликолиз. В то же время ФДФ-2 дезактивируется в результате дефосфорилирования под действием той же фосфатазы. При низкой концентрации глюкозы цикл действует в обратном направлении. Данный субстратный цикл — основной механизм, который запрещает одновременное протекание гликолиза и глюконеогенеза в условиях *in vivo*.

Изоформы ферментов ФФК-2 и ФДФ-2 были обнаружены в различных тканях. Они различаются по сродству к субстрату (K_s) и по чувствительности к регуляции путем фосфорилирования/дефосфорилирования. Этим объясняются существующие различия в регуляции активности ФФК и, следовательно, гликолиза в разных тканях организма у млекопитающих.

Субстратные циклы — важный механизм регуляции активности метаболического пути. Они действуют с затратой энергии (АТФ) и могут определять относительное значение точек ветвления в двунаправленных метаболических путях.

15.5.3 Усиление сигнала

Обсуждавшиеся выше субстратные циклы позволяют контролировать противоположно направленные пути метаболизма и превращать небольшие изменения концентрации АТФ в относительно более значительные изменения концентрации АМФ — ключевого аллостерического регулятора скоростьопределяющих ферментов. Такое **усиления сигнала** играет очень важную

роль в тонкой регуляции метаболизма и в формировании клеточного ответа на эффекты от гормонов и нейромедиаторов. Усиление (амплификация) обычно достигается в несколько стадий, ферменты сами играют роль субстратов в реакциях, часто связанных с фосфорилированием или дефосфорилированием, в результате которых происходит активация или дезактивация этих ферментов. Такие последовательности метаболических реакций называют **каскадом**; их суть состоит в значительном усилении исходного биохимического сигнала. Хорошо иллюстрирует данный механизм мобилизация гликогена в форме глюкозо-1-фосфата в результате активности фосфорилазы. В данный каскад входят следующие компоненты: мембранный рецептор, воспринимающий исходный сигнал, поступающий в виде гормона или нейромедиатора, G_s-белок, аденилатциклаза, цАМФ-зависимая протеинкиназа, киназа фосфорилазы, фосфорилаза и гликоген (рис. 15.19). В результате активации аденилатциклазы под действием G_s-белка (см. разд. 16.5.2) происходит высвобождение цАМФ, который активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу. В неактивной форме этот фермент — тетрамер, состоящий из двух регуляторных (R) и двух каталитических (C) субъединиц. Две молекулы цАМФ связываются с каждой из R-субъединиц (положительная кооперативность), в результате чего происходит диссоциация комплекса:

$$\underset{\text{неактивная форма}}{R_2C_2} + 4\text{цАМФ} \rightarrow \underset{\text{активная форма}}{2R\text{-}2\text{цАМФ}} + 2C$$

Внутриклеточная концентрация цАМФ определяет долю активной формы цАМФ-зависимой протеинкиназы. Именно под действием этой формы в присутствии АТФ происходит фосфорилирование (и активация) киназы фосфорилазы:

$$\underset{\text{неактивная}}{\text{киназа фосфорилазы} + \text{АТФ}} \xrightarrow{\text{С-субъединица}} \underset{\text{активная}}{\text{фосфорилированная киназа фосфорилазы}} + \text{АДФ}$$

Фосфорилаза киназы — тетрамерный белок, состоящий из четырех разных субъединиц α, β, γ и δ. На γ-субъединице расположен активный центр киназы, а остальные три субъединицы выполняют регуляторную функцию. Субъединица δ — кальмодулин — представляет собой Ca^{2+}-связывающий белок, содержащий два центра связывания ионов кальция. Активация киназы фосфорилазы происходит в результате фосфорилирования α- и β-субъединиц и связывания двух ионов кальция с δ-субъединицей. Связывание Ca^{2+} с δ-субъединицей вызывает автофосфорилирование фермента на участке, отличном от того, в котором происходит фосфорилирование под действием цАМФ-зависимой киназы. Активированная киназа фосфорилазы активирует фосфорилазу b (димер) путем фосфорилирования остатка Ser14 в каждой субъединице, что приводит к конформационным изменениям в белке и к его димеризации до тетрамера. Образующийся тетрамер фосфорилаза a разлагает гликоген до глюкозо-1-фосфата. Интересно, что фосфорилаза b подвержена также аллостерической регуляции со стороны АМФ, две молекулы которого способны индуцировать конформационные

изменения белка, приводящие к образованию фосфорилазы а, однако механизм этих конформационных изменений отличается от такового в случае фосфорилирования. АТФ и глюкозо-6-фосфат способны вызывать обратные изменения, тем самым инактивируя фермент.

На каждой стадии данного каскада происходит по меньшей мере 100-кратное усиление сигнала, что сдвигает кривую «доза–ответ» к максимуму (рис. 15.19). Таким образом, восприятие сигнала лишь небольшим числом мембранных рецепторов приводит практически к максимально возможному метаболическому ответу. Понятно, что чем больше число компонентов в каскаде, тем больше усиление сигнала.

Мобилизация гликогена обратима в результате действия гликогенсинтазы. Этот фермент инактивируется фосфорилированием под действием киназы фосфорилазы и активируется фосфопротеин-фосфатазой-1, которая одновременно инактивирует киназу фосфорилазы и фосфорилазу а. Регуляция активности самой фосфопротеин-фосфатазы-1 также осуществляется путем фосфорилирования/дефосфорилирования.

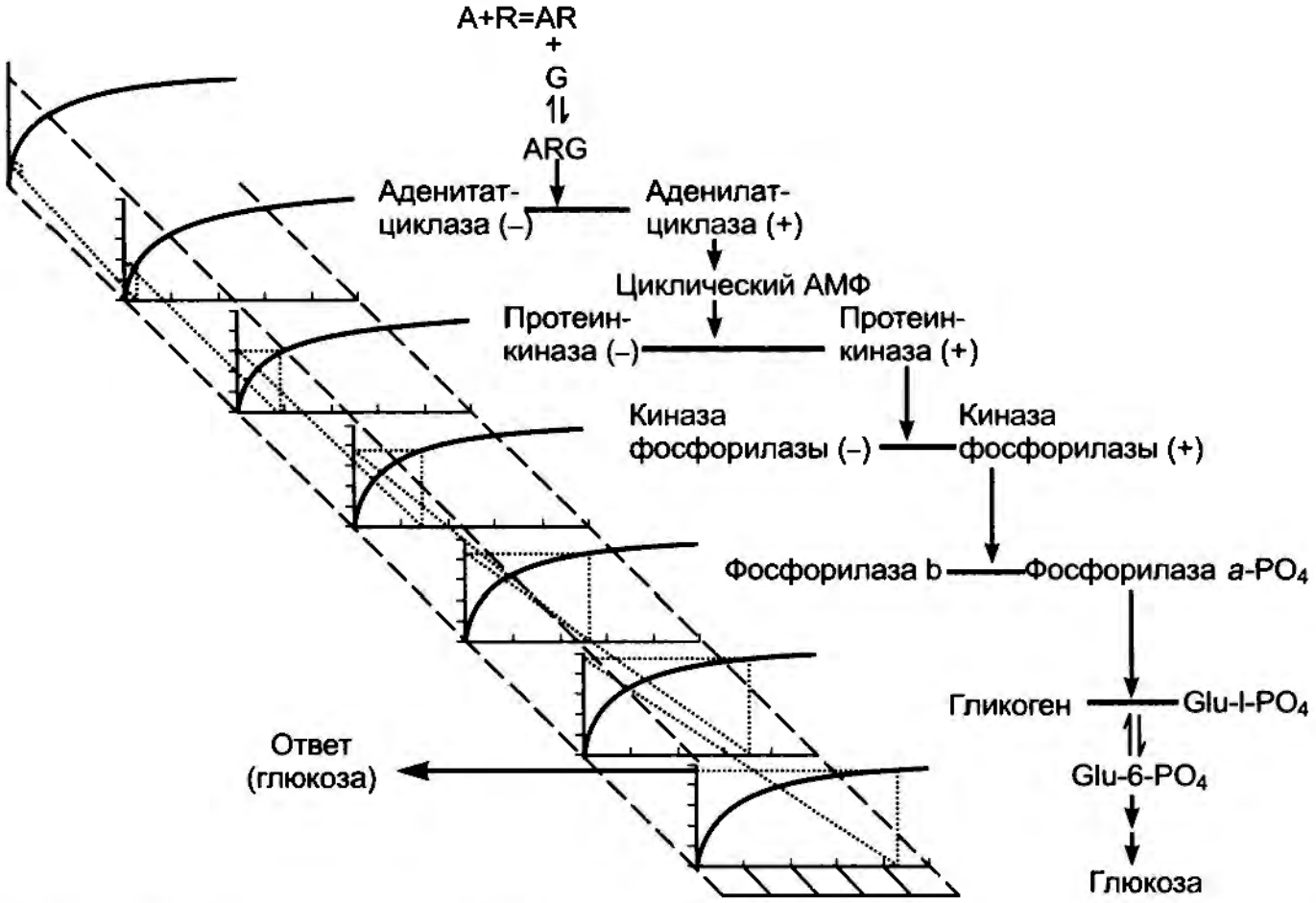


Рис. 15.19. Типичный каскад биохимических реакций: связывание первичного медиатора (А) с рецептором на поверхности клетки, активация G-белка (G) под действием AR-комплекса, активация аденилатциклазы, высвобождение цАМФ и, наконец, высвобождение глюкозы. Каждая стадия каскада представлена гиперболической функцией. Исходный слабый сигнал, регистрируемый рецептором, запускает последовательность постепенно усиливающихся сигналов, так что наблюдаемое в конечном итоге высвобождение глюкозы является практически максимально возможным ответом. Воспроизводится по книге: T. Kenakin (1997) *Molecular Pharmacology : A Short Course*; с разрешения издательства Blackwell Science Limited

15.5.4 Долгосрочный контроль активности ферментов

Обсуждавшиеся до сих пор механизмы регуляции ферментативной активности являются краткосрочными или среднесрочными — они действуют в пределах от нескольких секунд до нескольких минут. Однако существуют механизмы более долгосрочного воздействия. Такая регуляция (на протяжении часов) осуществляется на уровне синтеза и распада ферментов. Синтез многих ферментов происходит практически с постоянной скоростью (их называют **конститутивными ферментами**), но синтез некоторых других подвержен определенному контролю на уровне транскрипции и трансляции. Один из наиболее известных примеров — индукция β-галактозидазы и галактозидпермеазы в клетках *E. coli* под действием лактозы. Экспрессия лактозного оперона контролируется при помощи белка-репрессора, который в норме синтезируется с гена репрессора, и индуктора, в присутствии которого репрессор отсоединяется от оператора, что позволяет происходить транскрипции и последующей трансляции *lac*-генов. Белок-репрессор связывается с *lac*-оператором с $K_i \sim 10^{-13}$ М и константой скорости $\sim 10^7$ $M^{-1}c^{-1}$. Эта величина константы скорости превосходит теоретическое значение для процесса, контролируемого диффузией, что указывает на существование некого механизма, облегчающего данную реакцию, возможно, при участии ДНК.

Пути деградации ферментов такие же, как и всех других клеточных белков, включая мембранные рецепторы. Это реакция первого порядка. Белки характеризуются временем полураспада; для ферментов от нескольких часов до многих дней. Интересно, что ферменты, контролирующие тот или иной метаболический путь, имеют сравнительно небольшое время полураспада. Чувствительность белков к протеолитическому расщеплению определяется их аминокислотной последовательностью. Например, наличие на N-конце белка остатков Leu, Phe, Asp, Lys или Arg, по-видимому, способствует быстрой деградации. Белки, которые должны быть подвержены деградации, сначала метятся небольшим белком **убиквитином** (76 аминокислотных остатков) при участии АТФ. Убиквитин образует связь, напоминающую пептидную, с С-концом направляемого на деградацию белка. При этом возможно как моноубиквитинирование, так и полиубиквитинирование белков, причем последствия этих процессов различны. Белки, связанные с одной молекулой убиквитина, подлежат перемещению («трафику»); этот процесс чрезвычайно важен в циклах рецепторов (разд. 16.6.2). Полиубиквитинированные белки подлежат уничтожению. Во взаимодействии белка с убиквитином принимают участие несколько групп ферментов: убиквитин-активирующие ферменты (E1), убиквитин-конъюгирующие ферменты (E2), убиквитин-лигазы (E3) и убиквитин-деконъюгирующие ферменты (DUB). Основную функцию во всем процессе выполняют убиквитин-лигазы, поскольку именно они узнают подлежащий мечению белок. Анализ генома человека выявил существование нескольких сотен таких ферментов.

Полиубиквитинированные белки уничтожаются с помощью 20S-протеасомы (S — единица Сведберга, см. разд. 3.5.3). Протеасомы пред-

ставляют собой полисубъединичные протеазные комплексы в виде полых цилиндров, внутри которых сосредоточены каталитические центры. 20S-протеасома состоит из 14 α-субъединиц и 14 β-субъединиц, образующих четыре кольца — в каждом по семь субъединиц. Протеолитическая активность сосредоточена в β-субъединицах, находящихся в центральной части цилиндра. Проникновение белка в центральную цилиндрическую часть протеасомы контролируется несколькими факторами. Белковая цепь может проникать в протеасому последовательно, начиная с одного конца, но может образовывать «шпильку» — в результате происходит лишь ограниченный протеолиз. Протеолиз происходит с участием АТФ и дополнительной 19S-протеасомы, на которой сосредоточены участки связывания АТФ. Протеасомы 19S и 20S объединяются, образуя 26S-протеасому, которая и осуществляет расщепление пептидных связей, сопровождающееся гидролизом АТФ. Белки уничтожаются не только в протеасомах, но и в лизосомах, причем для этого не требуется предварительного мечения белка убиквитином.

Существующее равновесие между синтезом белков *de novo* и их протеолитическим расщеплением, а также возможность регуляции активности ферментов позволяют подчинять активность и количество ферментов в клетке изменяющимся внутриклеточным условиям и потребностям всего организма. Все больше данных указывает на то, что процессы убиквитинирования и деубиквитинирования играют в клетке не менее важную роль, чем фосфорилирование и дефосфорилирование.

15.6 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Общая информация

BUGG, T. (2004) *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford. Изложение химических основ энзимологии.

FELL, D. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London. Детальное обсуждение метаболизма в сопровождении необходимых математических основ.

Обзорные статьи

CHEN, R. (2001) Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends in Biotechnolohy*, **19**, 13–14.

CIECHANOVER, A. and BEN-SAADON, R. (2004) N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends in Cell Biology*, **14**, 103–106.

DANIEL, R.M., DANSON, M.J., and EISENTHAL, R. (2001) The temperature optima of enzymes: a new perspective on an old phenomenon. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 223–225.

FÖSTER, A. and HILL, C.P. (2003) Proteasome degradation: enter the substrate. *Trends in Cell Biology*, **13**, 550–553.

HUANG, H., HOLDEN, H.M., and RAUSHEL, F.M. (2001) Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalysed reactions. *Annual Reviews of Biochemistry*, **70**, 149–180.

Глава 16
Мембранные рецепторы

16.1 РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА

Клетки многоклеточного организма должны иметь пути обмена информацией, поскольку без этого невозможно осуществление таких важнейших функций как рост, дифференцировка и реакция на изменение внешних условий. Клетки, находящиеся между собой в физическом контакте, могут взаимодействовать путем обмена малыми молекулами через щелевидные контакты, но клетки, например в животных и растительных организмах, удаленные друг от друга на большие расстояния, нуждаются в эффективной системе коммуникаций. Такая связь осуществляется с помощью **сигнальных молекул** (лигандов), высвобождаемых сигнальными клетками, и узнающими их белковыми **рецепторами**, которые либо пронизывают клеточную мембрану, либо располагаются в цитоплазме клетки-мишени. Чаще всего лиганды — это растворимые молекулы, не способные проникать через клеточную мембрану. Поэтому лиганды связываются со специальными лигандсвязывающими участками рецепторов на внешней поверхности клеток. Связывание лиганда вызывает целую последовательность событий, часто это результат белок-белковых взаимодействий на мембране, приводящих к клеточному ответу. Примеры лигандов — амины, аминокислоты, пептиды и белки. Однако существуют и жирорастворимые лиганды, которые свободно проникают через мембрану и связываются с рецепторами в цитозоле. Далее комплексы лигандов с рецепторами проходят сквозь ядерную мембрану и накапливаются в ядре, где воздействуют на транскрипцию ДНК. По этой причине такие рецепторы называют **ядерными рецепторами**. Примерами лигандов, действующих по такому механизму, могут служить стероидные гормоны (прогестерон, эстроген, тестостерон) и нестероидные гормоны (тироксин и триодтиронин).

Лиганды, действующие на мембранные рецепторы, часто называют **первичными мессенджерами**, поскольку во многих случаях связывание лиганда не приводит сразу к формированию ожидаемого клеточного

ответа. Результатом связывания лиганда является активация внутриклеточного участка рецептора, который далее может

- инициировать серию внутриклеточных активационных процессов, приводящих к клеточному ответу;
- взаимодействовать с другим мембранно-связанным белком, который, в свою очередь, способствует образованию или высвобождению одной или нескольких групп молекул, таких как цАМФ или Ca^{2+}, называемых **вторичными мессенджерами**, которые реагируют с различными белками-мишенями, изменяя их активность и стимулируя формирование клеточного ответа.

В обоих случаях **трансдукция** начального сигнала, полученного рецептором, в клеточный ответ происходит через определенную серию (**каскад**) реакций. Одним из преимуществ каскадных процессов является значительное усиление (**амплификация**) клеточного сигнала по сравнению с тем сигналом, который мог бы сформироваться в результате действия только первичного мессенджера (подробности см. в разд. 15.5.3). Сигнальные молекулы не выполняют никакой другой функции, кроме формирования активной конформации рецептора. В случае двух из трех основных классов рецепторов лиганд-рецепторные комплексы интернализуются путем эндоцитоза, в результате которого в условиях кислой среды, преобладающей в везикулах, происходит диссоциация комплекса. Освобожденный рецептор может либо использоваться вновь, либо подвергаться деградации (разд. 16.6.2).

16.2 КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С РЕЦЕПТОРАМИ

16.2.1 Кривые доза–ответ

Фармакологические исследования

Многие ранние работы по изучению лиганд-рецепторных взаимодействий проводились на выделенных препаратах тканей и имели целью на количественном уровне установить зависимость клеточного ответа от концентрации лиганда. Часто задача исследования состояла в поиске блокаторов, которые имитировали бы связывание физиологического лиганда, но не приводили к клеточному ответу. Такие лиганды-блокаторы находят применение в фармакологии. В 1960-х гг. было обнаружено, что достаточно селективные блокаторы могут различать отдельные подклассы рецепторов, о существовании которых в то время уже подозревали, но идентифицировать которые тогда не представлялось возможным. Существование отдельных подклассов рецепторов сделало возможным применение блокаторов в качестве лекарственных средств, которые селективно воздействовали на определенные ткани и приводили к строго определенному ответу, что минимизировало побочное действие таких лекарств. Именно такой подход

позволил сэру Джеймсу Блеку осуществить свои пионерские исследования β-адренергических и H_2-гистаминовых рецепторов, что в конечном итоге привело к появлению β-блокатора пропранолола, снижающего кровяное давление, и ингибитора секреции соляной кислоты циметидина, используемого при лечении язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. Как будет показано ниже, такой подход к классификации рецепторов, в сочетании с новыми методами клонирования и идентификации генов, привел к выявлению множества подтипов для большинства известных рецепторов.

Кривая доза–ответ

Кривая зависимости ответа мембранного рецептора от повышающейся концентрации (дозы) лиганда имеет три четко различимых участка:

- начальный участок, до которого ответ практически не регистрируется;
- наклонный участок, на котором ответ возрастает быстро с увеличением дозы;
- ослабление ответа при дальнейшем увеличении дозы вплоть до максимального возможного ответа.

Поскольку обычно такие данные получают для концентраций лиганда, различающихся на несколько порядков, лучше строить графики в полулогарифмических координатах (рис. 16.1).

Изучение зависимостей ответа от дозы для конкретного рецептора с использованием лигандов, имеющих различную структуру, показало, что рецепторы могут связывать не только физиологически активные лиганды, причем результаты такого связывания могут быть различными. В результате подобных исследований все лиганды рецепторов можно подразделить на следующие виды:

- *Полные агонисты* вызывают одинаковый максимальный ответ, но различаются дозой, необходимой для его достижения (рис. 16.1 и 16.2).
- *Частичные агонисты* вызывают лишь частичный ответ, даже находясь в большом избытке, так что все рецепторы оказываются занятыми (рис. 16.1 и 16.2).
- *Антагонисты* — это лиганды, которые не вызывают ответа. Можно выделить три подкласса антагонистов.
  1) *Конкурентные обратимые антагонисты*. Такие антагонисты конкурируют с агонистами за те же центры связывания, так что действие антагониста можно преодолеть путем повышения концентрации агониста (рис. 16.2).
  2) *Неконкурентные обратимые антагонисты* связываются в другом центре на молекуле рецептора, чем агонист, так что их действие нельзя предотвратить путем увеличения концентрации агониста.
  3) *Необратимые конкурентные антагонисты* конкурируют с агонистами за те же центры связывания, но образуют при этом ковалентную связь, так что их действие не преодолевается повышением концентрации агониста.

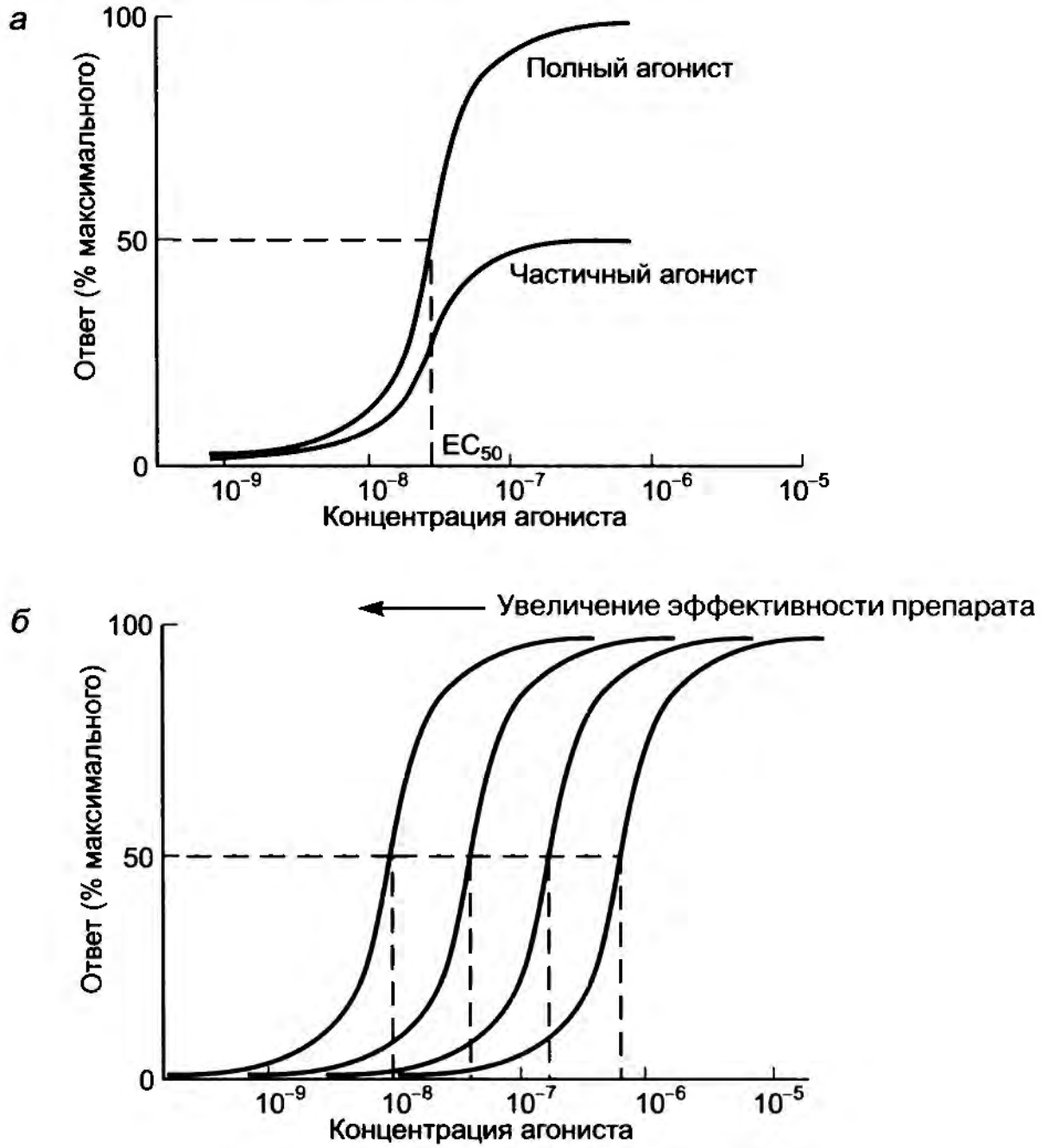


Рис. 16.1. Кривые доза–ответ. *а* — зависимость биологического действия (% максимального ответа) от концентрации полного агониста в полулогарифмических координатах. Равносильный частичный агонист менее эффективен — он не может оказать максимального эффекта, свойственного полному агонисту, даже при связывании со всеми доступными рецепторами. EC_{50} — концентрация агониста, при которой достигается 50%-ный максимальный эффект. *б* — кривые доза–эффект для четырех препаратов полных агонистов с разным потенциалом, но одинаковой эффективностью. Воспроизводится в соответствии с: Maxwell, S.R.J. and Webb, D.J. (1999) Receptor functions. *Medicine*, **27**, 5–9, с согласия издательства The Medicine Publishing Company

Основываясь на такой классификации для характеристики лигандов, можно использовать несколько параметров.

- *Внутренняя активность* — мера способности агониста вызвать ответ в результате связывания с рецептором. Этот параметр определяется как максимальный ответ на анализируемый агонист по сравнению с максимальным ответом на связывание полного агониста, взаимодействующе-

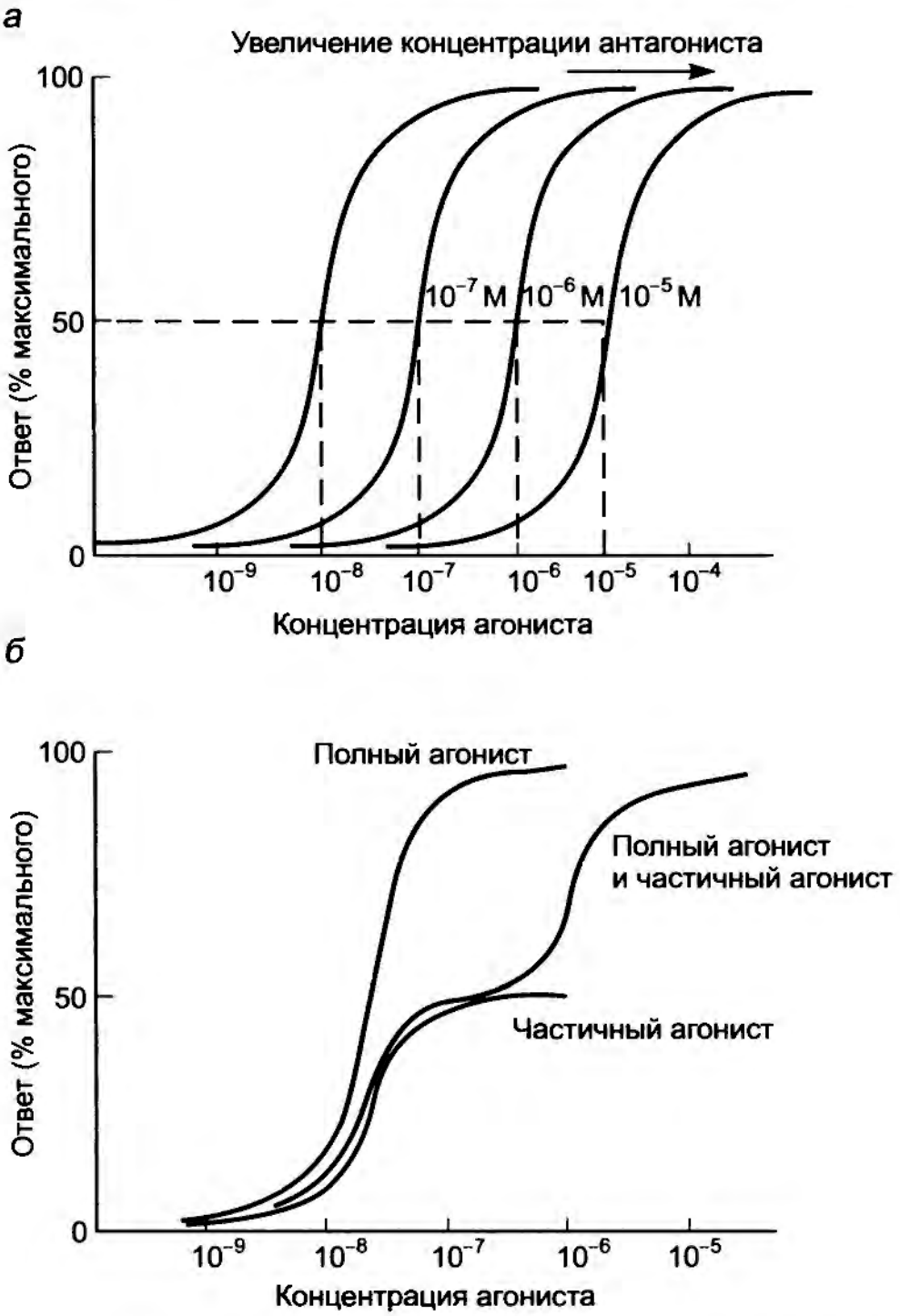


Рис. 16.2. Взаимодействие лиганда с рецептором. *а* — в присутствии антагониста кривая доза–ответ для полного агониста сдвигается вправо, поскольку имеет место конкуренция за центры связывания на молекуле рецептора. Чем выше концентрация антагониста, тем больше этот сдвиг. *б* — в присутствии частичного агониста кривая доза–ответ для полного агониста сдвигается вправо. Воспроизводится в соответствии с: Maxwell, S.R.J. and Webb, D.J. (1999) Receptor functions. *Medicine*, **27**, 5–9, с согласия издательства The Medicine Publishing Company

го с тем же рецептором. Все полные агонисты, по определению, имеют внутреннюю активность, равную 1, тогда как для частичных агонистов внутренняя активность <1.

- *Эффективность* (*e*) — это мера способности агониста инициировать физиологический ответ в результате связывания с рецептором. Эта функция агониста связана с его способностью инициировать переход рецептора в активную конформацию. Все полные агонисты имеют высокую

эффективность, но необязательно одинаковую, поскольку максимального теоретического значения e не существует. Частичные агонисты имеют низкую эффективность, а антагонисты — нулевую.

- *Потенциал* — мера концентрации агониста, необходимой для оказания максимального эффекта: чем выше потенциал агониста, тем меньше эта концентрация. Потенциал агониста связан с положением S-образной кривой зависимости доза–эффект с логарифмической шкалой концентрации агониста. Этот параметр выражают по-разному, например, как **эффективную дозу** или **концентрацию для достижения 50% максимального ответа** (ED_{50} или EC_{50}). В полулогарифмических координатах это соответствует pED_{50} или pEC_{50} (т. е. $-lg_{10}ED_{50}$). Так, агонист с $EC_{50} = 3 \cdot 10^{-5}$ М имеет $pEC_{50} = 4{,}8$.
- *Сродство* — мера концентрации лиганда, необходимой для достижения 50%-го связывания. Это единственный среди перечисленных параметров, который можно использовать для характеристики антагонистов. Как будет обсуждаться далее, сродство отражает как скорость связывания лиганда с рецептором, так и скорость диссоциации образующегося комплекса. Скорость ассоциации связана с пространственным взаимодействием лиганда и рецептора, а скорость диссоциации отражает силу связывания внутри комплекса. Сродство можно выразить с помощью константы связывания K_a, но чаще его выражают с помощью константы диссоциации комплекса лиганда с рецептором K_d, причем K_d — величина, обратная K_a.
- *Селективность* отражает способность агониста различать отдельные типы рецепторов. Этот параметр особенно важен при терапевтических назначениях.

Механизмы рецепторов

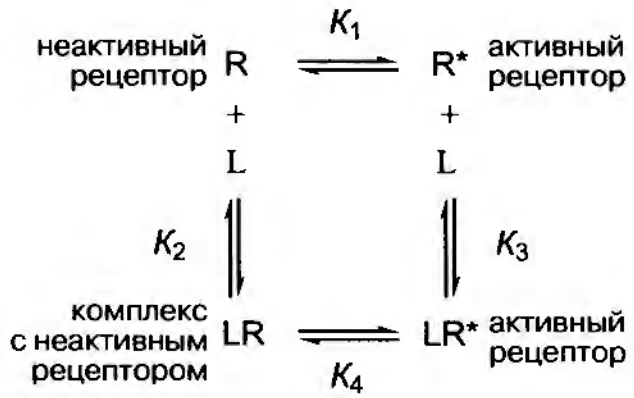
Существование агонистов и антагонистов сначала объясняли с помощью **теории двух состояний рецепторов**, известной также как **модель Кастильо–Катца**. Модель предполагает, что занятые рецепторы могут существовать в двух состояниях — неактивном (AR) и активном (AR*), причем между ними устанавливается равновесие:

A	+	R	⇄	AR	⇄	AR*
агонист		свободный неактивный рецептор		занятый неактивный рецептор		занятый активный рецептор

Возможно, полный агонист легко индуцирует конформационные изменения в молекуле R, переводя ее в активное состояние R* и полностью смещая равновесие в сторону образования AR*, а частичный агонист в меньшей степени способен производить подобные изменения и, следовательно, сдвигает равновесие лишь частично. Антагонисты вовсе не способны индуцировать подобные изменения. Однако обнаружение рецепторов, обладающих активностью даже в отсутствие агонистов, — это так называемая **конститутивная активность** — привело к **модели конформационной селективности**. В рамках этой модели предполагается, что в **покоящем-**

ся состоянии (т. е. в отсутствие любых агонистов) рецепторы существуют в виде равновесной смеси активных (R*) и неактивных форм (R), которые легко превращаются друг в друга. Равновесие может быть сдвинуто как в сторону неактивного рецептора, так и в сторону активного, что и объясняет конститутивную активность. Агонисты предпочитают связываться с рецепторами в состоянии R*, стабилизируя данное состояние и вызывая сдвиг равновесия, в результате чего рецепторы в основном находятся в состоянии R*. Частичный же агонист способен связываться как с формой R, так и с формой R*, оказывая все же предпочтение форме R*, что также приводит к некоторому преобладанию этой формы, но менее значительному, чем в случае полного агониста. В поддержку данной модели говорит тот факт, что некоторые лиганды снижают активность рецепторов с конститутивной активностью. Поскольку считается, что антагонисты не могут взаимодействовать с рецептором в активном состоянии и напрямую не приводят к изменениям активности рецепторов, их назвали **обратными агонистами** — влияние, обратное влиянию агонистов. Обратные агонисты предпочитают связываться с рецепторами в состоянии R, стабилизируя его и смещая равновесие в эту сторону. **Частичные обратные агонисты** способны связываться с рецепторами в обоих состояниях, отдавая все же предпочтение состоянию R, снижая тем самым конститутивную активность рецепторов. Лиганды с одинаковым сродством к рецепторам в обоих состояниях не смещают равновесия и называются **нейтральными агонистами**. Многие лиганды, ранее считавшиеся антагонистами, были классифицированы по их влиянию на конститутивную активность рецепторов как обратные агонисты, однако таких рецепторов относительно немного. Метод плазмонной резонансной спектроскопии (разд. 16.3.2) позволяет достаточно четко различать эти типы лигандов.

Модель конформационной селективности предполагает, что разные формы рецепторов (R, R*, AR и AR*) находятся между собой в равновесии, поэтому их относительное содержание определяется соответствующими константами равновесия:



Важный вывод на основании данной модели состоит в том, что лиганд (L) связывается с определенной конформацией рецептора, стабилизируя ее и смещая равновесие между двумя состояниями рецептора. Понятно, что при очень малых значений K_1 и K_2 модель с двумя состояниями рецептора можно уже не рассматривать. В рамках модели не требуется, чтобы агонист индуцировал переход рецептора в активную конформацию. Рецеп-

торы с таким типом поведения подчиняются симметричной модели аллостерического взаимодействия, предложенной Моно, Уайманом и Шанже, но не модели индуцированного соответствия, предложенной Кошландом (разд. 15.5, рис. 15.11). Рецепторы с конститутивной активностью были обнаружены среди управляемых лигандами ионных каналов и рецепторов, связанных с G-белком.

16.2.2 Параметры взаимодействия лигандов с рецепторами

Процесс связывания лиганда с рецептором начинается с диффузии лиганда к поверхности рецепторного белка. Здесь в результате серии случайных соударений с рецептором на поверхности клеточной мембраны лиганд находит центр связывания. Первоначальное связывание не обязательно происходит с аминокислотным остатком в составе центра связывания, который обычно состоит всего из нескольких специфических аминокислотных остатков. Итак, связывание можно представить следующей схемой:

$$\underset{\text{рецептор}}{R} + \underset{\text{лиганд}}{L} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} \underset{\substack{\text{лиганд-рецепторный}\\ \text{комплекс}}}{RL} \qquad (16.1)$$

где k_{+1} — константа скорости связывания, а k_{-1} — константа скорости диссоциации.

Насыщение

Если связывание изучают в условиях, при которых общая концентрация лиганда много больше концентрации рецептора (условие насыщения), изменение концентрации лиганда в результате связывания можно не учитывать, но изменение концентрации свободного (несвязанного) рецептора учитывать необходимо. Следовательно, если:

$[R_t]$ — общая концентрация рецептора, которая определяет максимальное связывание;
$[L]$ — концентрация свободного лиганда;
$[RL]$ — концентрация лиганд–рецепторного комплекса,

то разность $([R_t] - [RL])$ — концентрация свободного рецептора.

В состоянии равновесия скорости прямой и обратной реакций (реакций образования и диссоциации лиганд–рецепторного комплекса, уравнение 16.1) равны:

$$k_{+1}([R_t] - [RL])[L] = k_{-1}[RL]$$

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{([R_t] - [RL])[L]}{[RL]} \qquad (16.2)$$

где K_d — константа диссоциации комплекса RL, K_a — константа образования комплекса. Выразим отсюда концентрацию RL:

$$[RL] = \frac{[R_t][L]}{(K_d + [L])} \qquad (16.3)$$

Определение K_d

Уравнению 16.3 соответствует гипербола; это означает, что при увеличении концентрации лиганда количество образующихся комплексов постепенно достигнет максимального значения и далее не увеличивается, т. е. происходит насыщение. Уравнение имеет тот же вид, что и уравнения 15.1 и 15.2, которые описывают связывание субстрата с ферментом в терминах K_M и V_{MAX}. Для экспериментального определения K_d уравнение 16.3 лучше преобразовать в уравнение прямой, например в **уравнение Скэтчарда** (16.4):

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R_t]}{K_d} - \frac{[RL]}{K_d} \qquad (16.4а)$$

График в координатах [RL]/[L] от [RL] представляет собой прямую с углом наклона $-1/K_d$, что позволяет найти K_d. Однако во многих случаях относительная молекулярная масса рецепторного белка неизвестна, так что молярную концентрацию [RL] рассчитать не представляется возможным. Тогда степень связывания лиганда в определенных экспериментальных условиях (B) выражают в каких-либо других единицах, например пмоль/10^6 клеток, пмоль/мг белка или просто как изменение флуоресценции (ΔF). Поскольку максимальное связывание (B_{MAX}) достигается тогда, когда все рецепторы заняты, т. е. $[R_t] = B_{MAX}$, уравнение 16.4а можно записать иначе:

$$\frac{B}{[L]} = \frac{B_{MAX}}{K_d} - \frac{B}{K_d} \qquad (16.4б)$$

Следовательно, график в координатах B/[L] от B — прямая с углом наклона $-1/K_d$ и пересечением с осью y в точке B_{MAX}/K_d (рис. 16.3). Если относительная молекулярная масса рецептора известна, уравнение Скэтчарда можно записать в следующем виде:

$$\frac{B}{[L]B_{MAX}} = \frac{n}{K_d} - \frac{B}{B_{MAX}K_d} \qquad (16.5)$$

где n — число независимых центров связывания лиганда на молекуле рецептора.

Отношение B/B_{MAX} дает число молей лиганда, связанных с 1 моль рецептора. Если обозначить через $B/B_{MAX} = r$, уравнение 16.5 примет следующий вид:

$$\frac{r}{[L]} = \frac{n}{K_d} - \frac{r}{K_d} \qquad (16.6)$$

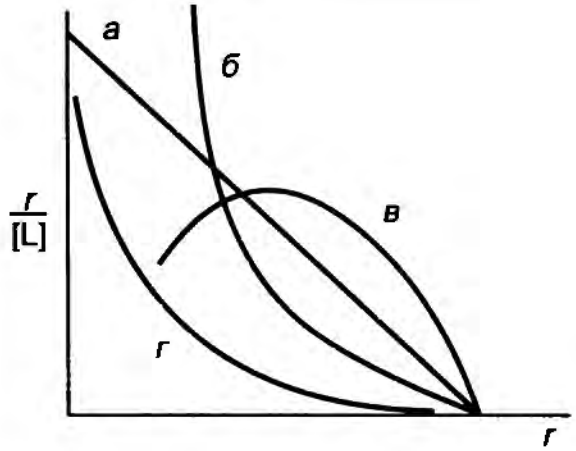


Рис. 16.3. График Скэтчарда в случае (*а*) одного набора центров связывания без кооперативности, (*б*) двух наборов центров без кооперативности, (*в*) одного набора центров с положительной кооперативностью и (*г*) одного набора центров с отрицательной кооперативностью

График $r/[L]$ — r представляет собой прямую с углом наклона $-1/K_d$, однако теперь точка пересечения с осью x соответствует числу центров связывания лиганда на молекуле рецептора (n).

Кроме координат Скэтчарда для определения константы диссоциации можно использовать **координаты Лайнуивера–Берка**:

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{B_{MAX}} + \frac{K_d}{B_{MAX}} \cdot \frac{1}{[L]} \qquad (16.7)$$

или **координаты Хейнса**:

$$\frac{[L]}{B} = \frac{K_d}{B_{MAX}} + \frac{[L]}{B_{MAX}} \qquad (16.8)$$

На практике чаще всего пользуются графиком Скэтчарда, внося тем самым в расчеты ошибку, поскольку экспериментальный параметр B входит в величины, откладываемые по обеим осям, так что при регрессионном анализе линейной зависимости получают завышенные значения и для K_d, и для B_{MAX}. Из уравнения 16.2 видно, что при 50%-м насыщении центров связывания лиганда на молекуле рецептора (т. е. при $B = B_{MAX}/2$) $[L] = K_d$. Это аналогично ситуации при $S = K_M$, которая наблюдается при взаимодействии фермента с субстратом, когда $v_0 = V_{MAX}/2$ (разд. 15.3.1). Следовательно, K_d имеет размерность молярности.

Уравнение 16.2 было выведено для одного набора гомогенных рецепторов, между которыми нет кооперативного взаимодействия при связывании молекул лиганда. На практике, однако, возможны следующие варианты. Во-первых, могут существовать две популяции рецепторов с разными константами связывания. Во-вторых, в одной популяции рецепторов связывание лиганда может быть кооперативным процессом. В обоих случаях графики в координатах Скэтчарда не линейны (рис. 16.3). Если есть подо-

зрение о наличии кооперативного взаимодействия, следует построить график в **координатах Хилла** в соответствии с уравнением:

$$\lg \frac{Y}{(1-Y)} = h\lg[\mathrm{L}] - \lg K_\mathrm{d} \qquad (16.9)$$

или

$$\lg \frac{B}{(B_{max}-B)} = h\lg[\mathrm{L}] - \lg K_\mathrm{d}$$

где Y — доля насыщения центров связывания (от 0 до 1), а h — **константа Хилла**.

Если рецептор имеет несколько независимо действующих центров связывания, $h = 1$; если же такие центры взаимозависимы, $h > 1$ (положительная кооперативность) или $h < 1$(отрицательная кооперативность). Если же в координатах Скэтчарда отклонения от линейности связаны не с кооперативностью, а с наличием нескольких центров связывания, предполагается, что два крайних, почти линейных, участка соответствуют центрам связывания с высоким сродством (при низкой концентрации связанного лиганда большая величина отношения занятый центр связывания/свободный) и низким сродством (при высокой концентрации связанного лиганда малая величина отношения занятый центр связывания/свободный); тогда при экстраполяции этих двух участков можно найти K_d и B_{MAX}. Однако такой подход некорректен, а правильные значения констант можно получить только с помощью тщательного математического анализа, обычно предпринимаемого с помощью специальных компьютерных программ.

Конкурентное связывание

Альтернативой описанному выше методу определения K_d может быть эксперимент, в котором лиганд используется как конкурентный ингибитор второго лиганда, в качестве которого обычно выступает физиологический агонист и для которого известна константа K_d. Из такого эксперимента для изучаемого лиганда получают K_i, численно равное K_d. Чаще всего используют меченный радиоактивной меткой физиологический агонист рецептора с фиксированной концентрацией и серию концентраций изучаемого лиганда. Затем строят график зависимости степени связывания меченого лиганда от логарифма концентрации лиганда. Из графика находят для исследуемого лиганда IC_{50} (концентрация для 50%-го ингибирования связывания физиологического лиганда), а затем K_i находят по **уравнению Ченга–Прусоффа:**

$$K_\mathrm{i} = \frac{IC_{50}}{\{1 + ([\mathrm{L}]/K_\mathrm{d})\}} \qquad (16.10)$$

Определение констант скорости

Для определения константы скорости диссоциации k_{-1} (единица измерения — время$^{-1}$) должно образоваться некоторое количество лиганд-

рецепторного комплекса (B_0); обычно лиганд содержит радиоактивную метку. Доступность для лиганда незанятых рецепторов затем блокируют путем добавления по крайней мере 100-кратного избытка немеченого агониста или конкурентного антагониста и следят за снижением степени связывания (B) во времени. Скорость высвобождения меченого лиганда из центров связывания описывается следующим уравнением:

$$\frac{dB_0}{dt} = -k_{-1}B_0$$

а высвобождение лиганда можно описать как

$$B_t = B_0 e^{-k_{-1}t}$$

Следовательно,

$$\lg B_t = \lg B_0 - 2{,}303k_{-1}t \qquad (16.11)$$

Таким образом, график $\lg B_t$ от времени представляет собой прямую с углом наклона $-2{,}303k_{-1}$, откуда можно определить k_{-1}.

Константу скорости образования комплекса k_{+1} (дм^3/(моль · время)) лучше всего оценить, приближая систему к равновесию, в котором непрерывно следят за степенью связывания лиганда вплоть до достижения равновесия при условии [L] >> [R_t]. В таких условиях реакция имеет не второй, а псевдопервый порядок; [R_t] уменьшается со временем, а [L] остается постоянной. Связывание лиганда возрастает по следующей зависимости:

$$\lg \frac{B_{\text{равн}}}{(B_{\text{равн}} - B_t)} = 2{,}303(k_{+1}[\text{L}] + k_{-1})t \qquad (16.12)$$

График зависимости $\lg(B_{\text{равн}}/(B_{\text{равн}} - B_t)$ от времени представляет собой прямую с углом наклона $2{,}303(k_{+1}[\text{L}] + k_{-1})$, где $B_{\text{равн}}$ и B_t — связывание лиганда в момент равновесия и во время t. Зная величину k_{-1} (из описанного выше эксперимента) и [L], по углу наклона прямой можно найти k_{+1}.

16.3 МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

16.3.1 Постановка эксперимента

Общие замечания

Скорость и степень связывания лиганда с рецептором зависят от таких условий, как температура, pH и ионная сила раствора. Кроме того, необходимо учитывать некоторые физиологические аспекты. Например, если источником рецепторов служат интактные клетки, важно минимизировать влияние транспорта рецепторов (разд. 16.6.2), поскольку в противном слу-

чае число рецепторов при выполнении эксперимента может изменяться. Эту проблему можно решить несколькими способами:

- проводить эксперимент при пониженной температуре (например, 5 °C), что позволит уменьшить транспорт рецепторов;
- добавлять в реакционную смесь ингибитор транспорта, например фениларсиноксид;
- использовать не целые клетки, а отдельно рецепторы или фрагменты мембран.

По историческим причинам при изучении лиганд-рецепторных взаимодействий чаще всего используется лиганд, содержащий радиоактивную метку; при этом измеряют радиоактивность фракции лиганда, связанного с рецепторами. Однако при этом определить константы скорости не просто. Кроме того, такие методы дорогие, особенно при скрининге большого набора лигандов для «сиротских» рецепторов, т. е. таких рецепторов, чьи естественные агонисты неизвестны (например, в случае клонированных генов). В этой связи все большее распространение получает флуориметрический метод анализа, а также изучение лиганд-рецепторного взаимодействия с помощью миниатюризированных инструментов — белковых чипов (см. разд. 8.5 и 16.3.2).

Препараты рецепторов

При приготовлении препарата рецепторов с целью изучения взаимодействия лигандов с рецепторами клеточные мембраны можно оставлять интактными, а можно разрушать их и высвобождать рецепторы с фрагментами мембран или без них, причем некоторые фрагменты мембран с помощью разных регуляторных механизмов могут образовывать везикулы с различной ориентацией рецепторов. Еще одна проблема связана с разрушением мембран; при этой процедуре также могут высвобождаться рецепторы, которые не находятся на клеточной мембране, что приводит к завышенной оценке числа доступных рецепторов. Такие рецепторы должны были бы подвергаться эндоцитозу (разд. 16.6.2), т. е. включаться в мембрану.

В отсутствие фосфолипидов рецепторные белки клеточной мембраны практически не способны связывать лиганды, поэтому при изучении связывания очищенные рецепторные белки следует вводить в фосфолипидные везикулы. На практике препаратами рецепторов могут служить следующие образцы:

- срезы тканей, обычно толщиной 5–50 мкм, полученные криометодом и нанесенные на покрытые глицерином предметные стекла;
- изолированные клетки, выделенные при разрушении тканей механически или ферментативно (с помощью коллагеназы или трипсина);
- культуры клеток (гл. 2), при условии отсутствия примесей;
- препараты клеточных мембран, полученные любым методом разрушения клеток в сочетании с дифференциальным центрифугированием;

- препараты солюбилизированных рецепторов, полученные с помощью детергентов для разрушения мембран и очищенные методом аффинной хроматографии с конкурентным антагонистом в качестве иммобилизованного лиганда;
- рекомбинантные рецепторы, трансфецированные из клеточных линий клонированными генами рецепторов, чаще генами человека.

Срезы тканей лучше всего подходят для изучения распределения и количества рецепторов с помощью авторадиографии или флуоресцентной спектроскопии, однако анализ кинетических закономерностей связывания лигандов в таких образцах усложняется из-за наличия диффузионных барьеров.

Изолированные клетки в качестве источника рецепторов широко используются при многих биохимических исследованиях, в том числе при изучении посттрансляционной модификации рецепторов, их внедрения в мембрану и подавления (уменьшении числа или активности рецепторов), а также при анализе связи «рецептор — клеточный ответ». Однако изучение связывания на интактных клетках сопряжено с рядом проблем:

- В клетках могут содержаться ферменты, разрушающие изучаемый лиганд, что снижает его эффективную концентрацию.
- Транспорт рецепторов (разд. 16.6.2) и другие клеточные процессы могут изменять число доступных рецепторов и, следовательно, влиять на связывание лиганда.
- В препарате может присутствовать несколько типов клеток; эта проблема преодолевается при клонировании генов рецепторов в специфических клеточных линиях.

Препараты клеточных мембран можно использовать как источник рецепторов, но отсутствие в них цитоплазматических компонентов может влиять на регуляцию связывания лиганда.

Рекомбинантные рецепторы все шире применяются для изучения связывания лигандов. Необходимо только быть уверенным, что эти рецепторы имеют такие же функциональные характеристики, что и их нативные аналоги. Особенно важно соблюдение посттрансляционных модификаций, например правильное гликозилирование рецепторного белка.

Кинетические исследования с целью определения констант скорости реакции лучше всего проводить либо на изолированных клетках, либо методом локальной фиксации потенциала (разд. 16.3.2), поскольку при этом удается избежать ошибки, связанной с диффузией лиганда к рецептору. Количество рецепторов в интактных тканях лучше всего определять, используя рецептор с радиоактивной меткой и необратимый конкурентный антагонист с детекцией методом количественной авторадиографии. Альтернативный подход — мечение рецепторов с помощью эмиттера позитронов (например, ^{11}C) и детекция методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ).

Лиганды

Чаще всего взаимодействие лигандов с рецепторами изучают, применяя лиганды, меченные изотопами ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{32}S или ^{135}I. Обычно используют лиганды с высокой удельной активностью (разд. 14.1.6), поскольку это позволяет минимизировать проблему неспецифического связывания (см. ниже). Альтернативный подход — метод флуоресцентной спектроскопии (см. разд. 16.3.2).

Для изучения взаимодействия лигандов с рецепторами, происходящего за какие-то доли миллисекунд, необходим особый подход (методы остановленной струи и гашения реакции обсуждались в разд. 15.2.3). Один из подходов заключается в использовании фотолабильных предшественников лигандов (так называемых «caged ligands»). Эти вещества не обладают свойствами лиганда, но при импульсном лазерном фотолизе с определенной длиной волны происходит отщепление защитной группы, маскирующей функциональную группу, в результате чего высвобождается активный лиганд.

Ход анализа

При изучении кинетики лиганд-рецепторного связывания препарат рецепторов инкубируют с лигандом определенное время, достаточное для установления равновесия при заданных температуре, pH и ионной силе. Дождаться установления равновесия совершенно необходимо, поскольку вне равновесия уравнения 16.1–16.9 не выполняются. Далее с помощью подходящего аналитического метода определяют количество связанного и несвязанного лиганда, для чего может понадобиться разделение этих фракций. Затем анализ повторяют с разными концентрациями лиганда, чтобы покрыть диапазон от 10 до 90% максимального связывания и при постоянной концентрации рецепторов. Полученные результаты анализируют с помощью уравнений 16.4–16.9, часто с помощью компьютерных программ.

Раньше эксперименты по изучению связывания лигандов осуществляли вручную, однако успехи в развитии молекулярно-биологических методов, особенно возможности клонирования генов, привели к необходимости создания быстрых **высокопроизводительных методов скрининга** большого числа «сиротских» рецепторов с неизвестными функциями, но с определенным потенциалом для фармакологических целей. Некоторые из возможных подходов к решению данной проблемы обсуждаются ниже.

Неспецифическое связывание

Независимо от выбранного аналитического метода при разделении связанного и свободного лиганда существует проблема **неспецифического связывания** лиганда на неспецифических центрах. В таком неспецифическом связывании могут принимать участие мембранные липиды и белки, которые либо еще локализованы в мембране, либо оказались высвобожденными в результате процедуры выделения рецепторов. При неспецифическом связывании отсутствует плато?? концентрации насыщения, вместо

этого наблюдается почти линейная зависимость от общей концентрации лиганда. Получаемый результат по связыванию лиганда при этом складывается из насыщаемого специфического связывания с рецептором (описываемого гиперболической зависимостью) и ненасыщаемого (линейного) связывания с различными молекулами. Выделить специфическое связывание обычно удается косвенным путем, проводя эксперимент в присутствии целевого меченого лиганда и избытка немеченого конкурентного лиганда (агониста или антагониста). В присутствии избытка немеченого лиганда центры специфического связывания недоступны для меченого лиганда, и он сможет связываться только неспецифическим образом (рис. 16.4). На практике эксперимент проводят в условиях, при которых концентрация конкурентного лиганда по меньшей мере в 1000 раз превышает K_d этого лиганда; эксперимент повторяют с разными по структуре конкурентными лигандами, что позволяет оценить вклад неспецифического связывания.

Разделение свободного и связанного лиганда

При изучении связывания с помощью меченного радиоактивной меткой лиганда необходимо осуществлять разделение связанного с рецептором и свободного лиганда. Для этого существует несколько возможностей. Простейший способ — центрифугирование. Необходимо самым тщательным образом отмывать связанную с рецептором фракцию лиганда от свободно-

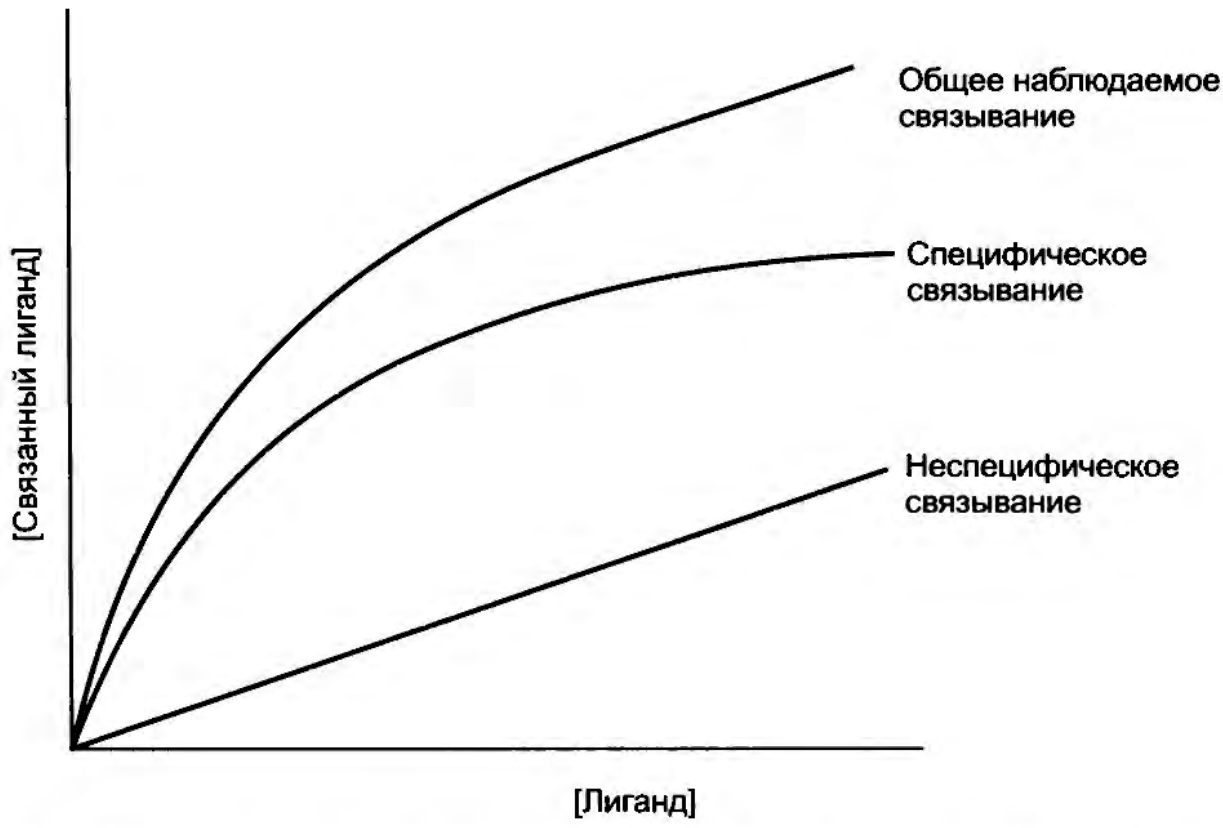


Рис. 16.4. Специфическое и неспецифическое связывание лиганда с мембранными рецепторами. Специфическое связывание обычно описывается гиперболической зависимостью с насыщением, а неспецифическое связывание, как правило, имеет линейный характер и практически не имеет насыщения

го лиганда, стараясь при этом свести к минимуму диссоциацию связанного лиганда из комплекса с рецептором. Другие возможные способы разделения — равновесный диализ и ультрафильтрация.

16.3.2 Аналитические методы для изучения связывания лигандов с рецепторами

Методы, требующие разделения связанного и свободного лиганда

Равновесный диализ. Препараты рецептора и лиганд, каждый в буфере с одинаковым pH и ионной силы, помещают в разные камеры диализной ячейки. Диализные ячейки обычно имеют общий внутренний объем 3 $см^3$, изготавливаются из прозрачного пластика типа Perspex^R и разделены пополам полупроницаемой мембраной на основе ацетатцеллюлозы или нитроцеллюлозы, закрепленной на инертной сетчатой перегородке. В продаже имеется множество вариантов диализных ячеек, некоторые имеют до шести камер. Температуру в ячейке поддерживают постоянной с помощью термостата. Для скорейшего достижения равновесия ячейка медленно вращается. Маленькие и легко диффундирующие молекулы лиганда свободно проникают через мембрану до тех пор, пока их концентрация с обеих сторон мембраны не станет одинаковой (рис. 16.5). Рецепторный белок не может проникнуть через мембрану и постоянно находится в одной половине ячейки. По достижении равновесия из каждой половины ячейки отбирают пробы и анализируют в них содержание лиганда. В образце, отобранном из той половины, где содержится рецептор, концентрация лиганда соответствует сумме концентраций связанного и свободного лиганда, а в образце из другой половины содержится только несвязанный лиганд, причем концентрации несвязанного лиганда в обеих половинах ячейки равны между собой.

Для получения надежных результатов необходимо минимизировать связывание лиганда и рецепторного белка с мембраной и быть уверенным, что общая концентрация ионов с каждой стороны мембраны одинакова, поскольку любое неравенство зарядов в двух камерах ячейки влияет на распределение лиганда (**эффект Доннана**). Ограничения метода связаны с

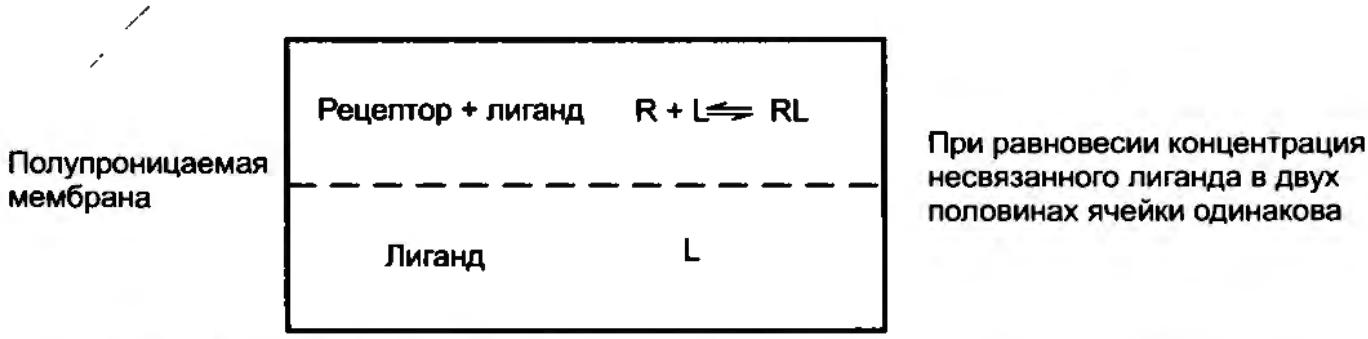


Рис. 16.5. Анализ связывания лиганда (L) с рецептором (R) с помощью равновесного диализа

достаточно длительным периодом установления равновесия; кроме того, метод нельзя использовать, если лигандом является макромолекула типа инсулина, поскольку такие лиганды не могут проходить через мембрану.

Ультрафильтрация. Препарат рецептора и лиганд в буферном растворе помещают в термостатируемую ячейку (обычно объемом 1–3 $см^3$), на дне которой находится полупроницаемая мембрана, закрепленная на инертной сетчатой подложке. Поскольку для установления равновесия не требуется диффузии через мембрану, равновесие устанавливается быстро (обычно за несколько минут, но это необходимо проверить экспериментально). Затем небольшой объем образца (100 $мм^3$) продавливают сквозь мембрану в коллекторную емкость либо под давлением газа со стороны нанесенного образца, либо просто путем центрифугирования ячейки при 3000 ***g*** в течение нескольких минут. Сравнивая концентрацию лиганда в ультрафильтрате (только свободный лиганд) и в реакционной смеси (связанный плюс свободный лиганд), можно определить зависимость степени связывания от концентрации лиганда. Преимущество метода состоит в его быстроте, однако следует удостовериться в отсутствии связывания реагирующих веществ с мембраной, а объем ультрафильтрата должен быть минимальным, чтобы минимизировать возможность смещения равновесия в результате отбора пробы. Как и в случае равновесного диализа, данный метод нельзя применять для анализа связывания макромолекулярных лигандов.

Методы, не требующие разделения связанного и свободного лиганда

Сцинтилляционный анализ — Proximity Assay™. В данном методе рецептор в составе мембранных фрагментов связан ковалентной связью со сцинтиллирующими шариками, а лиганд в качестве метки содержит слабый источник β-частиц (^3H или ^{125}I). Реагирующие вещества смешивают в фотометрической ячейке. При связывании лиганда с рецептором β-частицы заставляют сцинтиллирующее вещество испускать свет, который детектируется фотоумножителем и измеряется, что позволяет определить количество связанного лиганда. Несвязанные лиганды, которые находятся на некотором расстоянии от поверхности сцинтиллирующего вещества, не вызывает свечения, поскольку обладающие низкой энергией β-частицы, исходящие от метки в свободном лиганде, поглощаются реакционной средой (см. разд. 14.2.2). За связыванием можно следить в непрерывном режиме.

Флуоресцентная спектроскопия. Методы изучения лиганд-рецепторного взаимодействия путем детекции флуоресцентного излучения получили широкое распространение благодаря очень высокой чувствительности; в этом методе нет необходимости разделять свободный и связанный лиганд и можно изучать взаимодействие нескольких и даже единичных молекул лиганда с отдельным рецептором. Основы флуоресцентной спектроскопии обсуждались в гл. 12. Эти методы основаны на регистрации флуоресцентного излучения либо самого рецепторного белка, либо флуоресцентного маркера (флуорофора), присоединенного к молекуле лиганда или рецептора. Присоединение лиганда обычно достигается химическим методом

через аминогруппы, тиогруппы, карбоксильные или спиртовые группы. Чаще всего в качестве флуорофора используют флуоресцеин, родамин и краситель Fluo-3. В другом варианте с помощью генно-инженерных манипуляций к рецепторному белку (без изменения его функций) можно присоединить зеленый флуоресцентный белок из медузы *Aequorea victoria* или красный флуоресцентный белок из *Discosoma striata*. Основное преимущество использования этих белков состоит в отсутствие необходимости добавления кофакторов, что упрощает проведение анализа. Собственная флуоресценция белков может быть связана с наличием в их молекулах остатков триптофана. Обладающий гидрофобными свойствами триптофан обычно содержится во внутренней части белковой молекулы. В любом случае интенсивность флуоресценции (из-за изменения какой-либо аминокислоты в активном центре, но не обязательно самого триптофана) зависит от химического окружения флуорофора, так что небольшие конформационные изменения, вызванные связыванием лиганда, могут приводить к следующим последствиям:

- усиление или ослабление флуоресценции (и, следовательно, квантового выхода Q) в результате изменения тушения флуоресценции из-за связывания лиганда;
- изменение спектра флуоресценции, например сдвиг в длинноволновую или коротковолновую область;
- изменение продолжительности флуоресценции T;
- изменение чувствительности флуорофора к плоскополяризованному свету.

При анализе связывания лигандов с рецепторами измерения можно осуществлять как **в стационарном режиме** (проводя единственное измерение), так и **в режиме разрешения во времени** (несколько измерений на протяжении определенного промежутка времени) — чаще всего методом остановленной струи или методом гашения реакции (разд. 15.2.3).

Флуоресцентный анализ в стационарном режиме основан на одном из трех физических явлений.

- Изменение спектральных свойств флуорофора (коэффициента экстинкции, длины волны излучаемого света) при изменениях микроокружения, вызванных связыванием лиганда и/или изменением диффузии рецепторного белка в мембране в результате связывания лиганда. В качестве меры связывания лиганда используют изменение интенсивности флуоресценции (ΔF) как функции концентрации лиганда; для расчета K_d строят графики в координатах Скэтчарда или Лайнуивера–Берка.
- **Анизотропия флуоресценции** — изменение оптических свойств для флуоресцентного излучения в зависимости от направления распространения луча. В данном методе флуоресцентное излучение индуцируют плоскополяризованным (синим) светом. При этом преимущественно возбуждаются молекулы флуорофора, расположенные параллельно плоско-

сти поляризации света. Однако если некоторые из этих молекул после поглощения света, но до начала флуоресценции находятся во вращательном движении, некоторая часть излученного света окажется деполяризованной. Степень деполяризации может дать информацию о размерах, форме и подвижности белка, содержащего флуоресцентную метку. Кроме того, с помощью этого же параметра можно следить за связыванием лиганда. Интенсивность флуоресценции измеряют в той же плоскости, в которой распространяется поглощенный плоскополяризованный свет, а также под прямым углом к этой плоскости. На основании этих двух измерений можно рассчитать степень деполяризации флуоресценции и, следовательно, анизотропию флуоресценции. Обе величины выражают как разность между флуоресценцией в плоскости поглощенного плоскополяризованного света и флуоресценцией в перпендикулярной плоскости, а разность выражают как функцию суммы флуоресценций в этих двух плоскостях.

- **Резонансный перенос энергии флуоресценции** (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Данный метод основан на наличии в разных участках молекулы рецепторного белка двух флуорофоров, причем спектр излучения одного флуорофора должен перекрываться со спектром возбуждения другого флуорофора. При этом возможно, что такое явление, когда излучаемый первым флуорофором свет поглощается вторым и далее является частью излучаемого им света. Такой процесс называют резонансным переносом энергии, а размер области спектра, где наблюдается перекрывание, пропорциональна $1/R^6$, где R — расстояние между двумя флуорофорами. Связывание лиганда с рецептором может индуцировать конформационные изменения, которые приведут к изменению R.

Флуоресцентная спектроскопия с разрешением во времени основана на использовании в качестве флуорофоров соединений европия. Метод позволяет анализировать времена жизни возбужденных состояний флуорофора (от нескольких миллисекунд до нескольких минут). С помощью данного метода удается различить свободный и связанный лиганд и получить ценную информацию о конформационных изменениях в молекуле белка, возникших при связывании лиганда, а также о димеризации рецепторных белков (см. разд. 16.5.2 и 16.5.3) *in vivo* и *in vitro*. Этот метод все более широко применяется для высокопроизводительного скрининга при решении задач геномики и протеомики (разд. 8.5).

Одним из основных ограничений многих методов, используемых для изучения связывания лигандов с рецепторами, является то, что они могут применяться только для анализа конечного равновесного расстояния и, следовательно, не подходят для определения констант образования и диссоциации лиганд–рецепторного комплекса. Кроме того, эти методы довольно медленные и не подлежат автоматизации, что делает их малопривлекательными при рутинных анализах определения кинетических параметров связывания лигандов с рецепторами. Методы клонирования генов позволили также клонировать рецепторы, в том числе и те, функции которых

неизвестны, что может быть весьма перспективным в фармакологических исследованиях, поскольку такие рецепторы могут оказаться мишенью новых терапевтических препаратов. Это и стало причиной быстрого развития автоматизированных методов и появлению соответствующих приборов для изучения взаимодействия биологических молекул без использования флуоресцентных или радиоактивных меток, наиболее важные из которых будут рассмотрены ниже.

Проточная цитометрия. Этот метод позволяет идентифицировать отдельные клетки по мере их прохождения через ряд детекторов. Чаще всего измерения основаны на флуоресценции, как обсуждалось выше. Первоначально этот метод предназначался для разделения смешанных популяций клеток, но был адаптирован для изучения различных аспектов действия рецепторов, в том числе взаимодействия лигандов с рецепторами на поверхности клеток. Главное преимущество метода — возможность проведения измерений на отдельных клетках при скоростях связывания порядка 10 000 $с^{-1}$ с помощью кинетических данных.

Существует два основных вида цитометров. При коаксиальном варианте перемешивания реагирующие вещества поступают к месту детекции в результате процесса, называемого **гидродинамическим фокусированием**. Отдельные потоки реагирующих веществ поступают в коаксиальный поток через специальную насадку на входе в цитометр, представляющий собой проточную ячейку. Потоки реагирующих веществ через цитометр окружены быстро движущейся «оболочкой» буферной среды, что обеспечивает передвижение клеток в виде единой струи без дополнительных возмущений. Перемешивание реагирующих веществ в потоке достигается путем диффузии.

В альтернативном варианте реагирующие вещества вводятся шприцем с помощью управляемых компьютером шаговых моторов, аналогичных тем, что используются при анализе фермент-субстратных взаимодействий методом остановленной струи (разд. 15.2.3). Реагирующие вещества сначала попадают в смесительную камеру, а из нее с помощью еще одного шприца — в цитометр, где поток уже смешанных веществ вновь окружен буферной средой. Цитометр снабжен одним или несколькими источниками света — обычно лазерными, с определенной длиной волны, при которой происходит возбуждение флуоресценции пришитой к молекуле лиганда метки. Свет от источников падает на поток реагирующих веществ под углом 90° и фокусируется на нем. Набор линз, фильтров и фотоумножителей позволяет анализировать флуоресцентное излучение и рассеянный свет под углами 90 и 180° к потоку света от источника света через 100 мс после смешивания реагентов. Изменение точки наблюдения позволяет варьировать время смешивания, а изменение концентрации лиганда позволяет определять кинетические параметры. Данный метод применяется также для изучения числа рецепторов, их десенсибилизации, взаимодействия с G-белками и аррестинами и интернализации. После измерения поток клеток можно поделить на капли и отбирать клетки строго определенного типа (капли несут определенный электрический за-

ряд, отклоняются в электрическом поле и собираются в коллекторе фракций). На таком принципе основан метод **сортировки активированных флуоресценцией клеток** (FACS).

Спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Исследуемый рецептор иммобилизуют на поверхности сенсорного чипа (в качестве которого может служить слой гидрогеля на предметном стекле) либо с помощью системы биотин–авидин, либо посредством ковалентного связывания через аминогруппы или тиогруппы реагентов, аналогичных тем, что используются в аффинной хроматографии (разд. 11.8.2) (рис. 16.6, *а*). Обычно поверхностная концентрация рецепторов составляет 1–5 нг/мм^2. Сенсорный чип служит одной из стенок в проточной микроячейке, через которую непрерывным равномерным потоком пропускают водный раствор лиганда (рис. 16.6, *б*). Таким образом достигается постоянная концентрация лиганда на поверхности; изменять эту концентрацию можно путем изменений концентрации лиганда в поступающем растворе. Температура, pH и ионная сила раствора тщательно контролируются, как и время контакта лиганда с рецептором. Замена раствора лиганда буферным раствором вызывает диссоциацию лиганда, которую и анализируют.

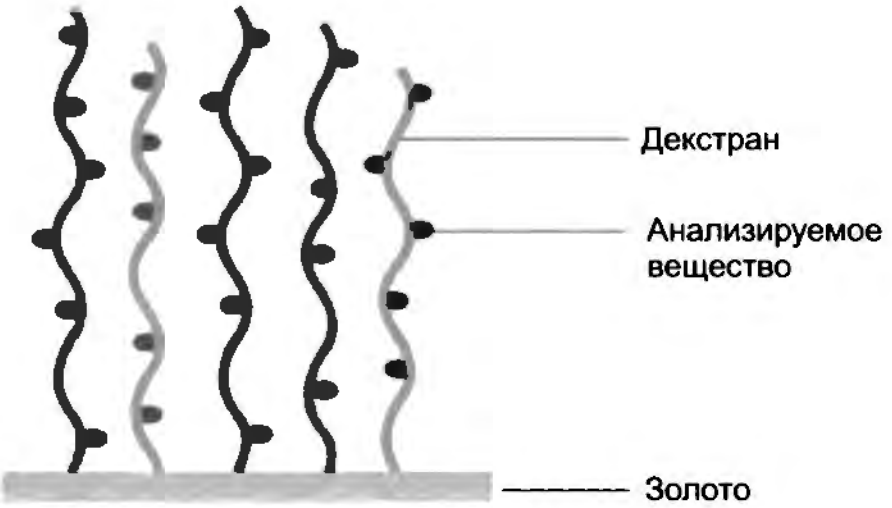
Связывание лиганда с рецептором увеличивает массу вещества на поверхности чипа, а диссоциация лиганд–рецепторного комплекса приводит к снижению этой массы. Эти изменения массы, в свою очередь, изменяют коэффициент преломления среды на поверхности чипа, что и удается измерять, поскольку коэффициент преломления определяет скорость распространения электромагнитного излучения в среде. Измерение основано на эффекте **поверхностного плазмонного резонанса** (ППР) и явлении **полного внутреннего отражения** (ПВО) света. Плазмонами называют коллективные колебания свободных электронов в металлах или полупроводниках.

В результате полного внутреннего отражения поляризованного света на границе раздела двух сред с разными показателями преломления отраженный пучок создает в среде с более низким показателем преломления (в данном случае — в жидкой среде, в которой находится рецептор) электромагнитное поле, так называемое **затухающее поле**. В среде пучок света распадается по экспоненциальному закону, проникая в среду лишь на одну длину волны.

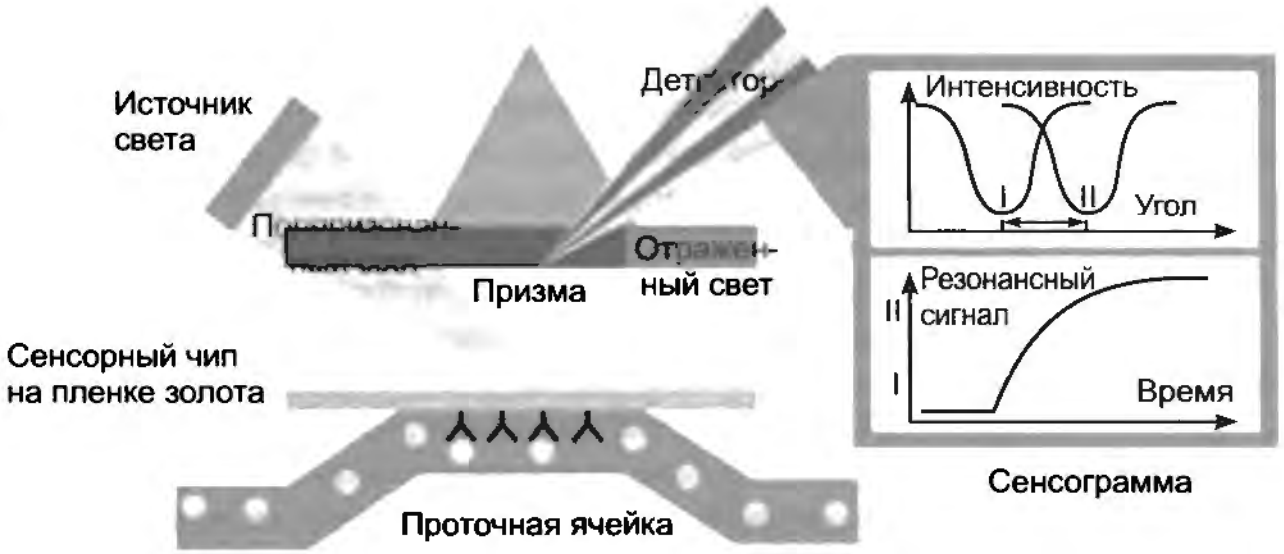
Если на поверхности раздела двух сред поместить тонкую золотую пленку, электроны золота могут входить в резонанс (отсюда название метода) с плоскополяризованной компонентой затухающего электрического поля. Таким образом, ППР усиливает затухающее поле и одновременно снижает интенсивность отраженного плоскополяризованного света (рис. 16.6, *б*).

Рис. 16.6. Принципы метода спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР). *а* — поверхность сенсорного чипа. *б* — проточная ячейка; *справа* — зависимость интенсивности отраженного света от угла падения светового пучка (*вверху*) и изменение резонансного сигнала во времени (*внизу*). *в* — сенсограмма. Воспроизводится с разрешения фирмы Biacore AB, Uppsala, Sweden (www.biacore.com)

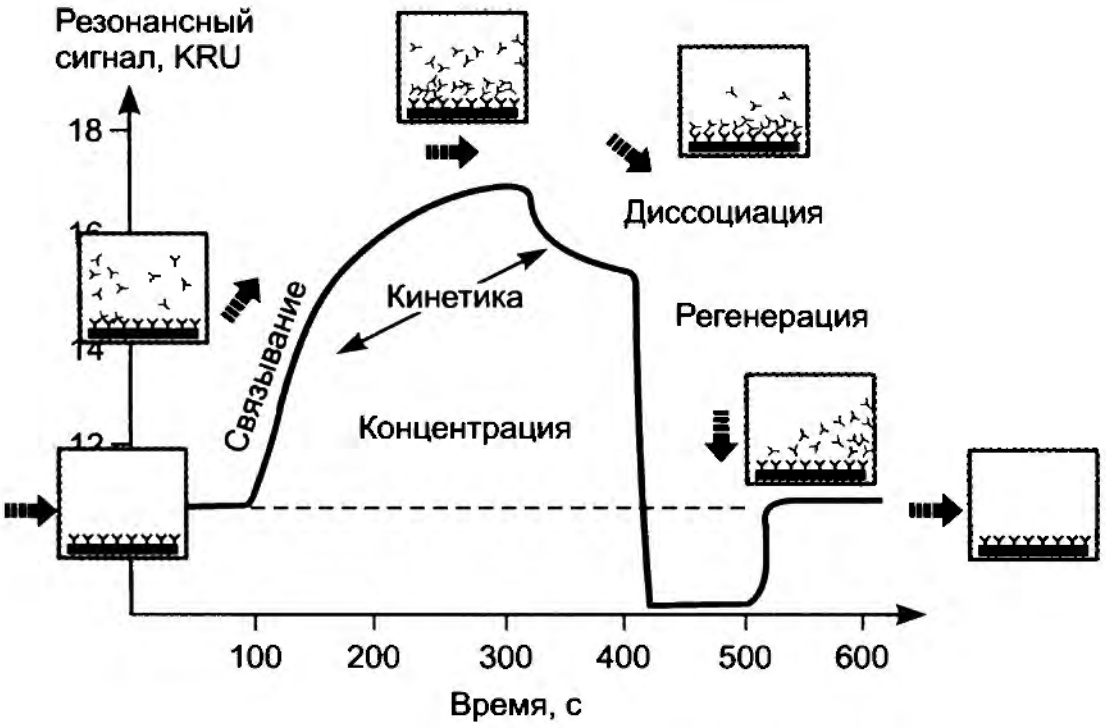
а


Декстран
Анализируемое вещество
Золото

б


Источник света
Призма
Отраженный свет
Сенсорный чип на пленке золота
Проточная ячейка
Интенсивность
I
II
Угол
Резонансный сигнал
Время
Сенсограмма

в


Резонансный сигнал, KRU
18
16
14
12
Связывание
Кинетика
Концентрация
Диссоциация
Регенерация
100
200
300
400
500
600
Время, с

Угол падения света, необходимый для возникновения ППР, зависит от ряда факторов, одним из которых является коэффициент преломления среды, в которой распространяется затухающее поле. Как уже обсуждалось выше, связывание лиганда с рецептором вызывает изменение показателя преломления, поэтому мониторинг угла падения света, при котором происходит ППР, позволяет непрерывно в реальном времени следить за связыванием лиганда с рецептором.

Для проведения анализа используют конусообразный пучок плоскополяризованного света, направленный под углом к поверхности, на которой иммобилизованы рецепторы (рис. 16.6, *б*), а отраженный свет детектируется серией диодов. Непрерывный мониторинг угла ППР как функции времени и измерение резонансного сигнала («сенсограмма» на рис. 16.6, *б* и *в*) при наличии необходимой калибровки позволяют рассчитать константы связывания и константы скорости взаимодействия лигандов с рецепторами. Угол ППР выражают в резонансных единицах (resonance units, RU), причем 1000 RU соответствует изменению массы поверхности чипа примерно на 1 нг/мм^2. Преимущество описанного метода состоит в том, что для его осуществления не требуется введения в молекулы флуоресцентных или радиоактивных меток; с его помощью можно анализировать молекулы с молекулярной массой порядка всего 100 Да, а также проводить измерения в окрашенных или непрозрачных растворах. Метод не только позволяет изучать кинетику лиганд–рецепторного взаимодействия, но и исследовать взаимодействия антигенов с антителами и белок–белковые взаимодействия, а также идентифицировать повреждения в ДНК и изучать процессы передачи сигналов в клетке. Метод широко применяется для решения задач протеомики и для создания новых лекарственных препаратов. На сегодняшний день существует возможность сопряжения данного метода со спектрометрией MALDI-TOF (разд. 8.5).

Резонансная спектроскопия с плазмонным волноводом. Это метод, родственный спектроскопии ППР. Пленка золота или серебра покрыта более плотным слоем оксида кремния, который выступает в роли **волновода** — устройства для распространения электромагнитных волн. Преимущество состоит в том, что резонанс в металле можно индуцировать как *p*-поляризованным светом (в котором электрический вектор направлен перпендикулярно поверхности резонатора), так и *s*-поляризованным светом (в котором электрический вектор ориентирован параллельно плоскости поверхности резонатора). Это позволяет изучать анизотропные свойства молекул, расположенных вблизи поверхности оксида кремния, что, в свою очередь, служит источником информации о конформационных изменениях в данных молекулах, вызванных, например, связыванием лиганда. Данный метод более чувствителен, чем спектроскопия ППР; метод может применяться для изучения конформационных изменений в двойных липидных слоях. Так, на поверхность резонатора можно нанести один двойной липидный слой и включить в него рецепторный белок из раствора (полученного при солюбилизации с детергентом). Затем через эту поверхность пропускают раствор лиганда и изучают процесс связывания. Например, такие исследования с рецепторами, связанными

с G-белком, показали, что агонист, обратный агонист и антагонист производят разные конформационные изменения в мембране, по которым их можно различить. В частности, агонист и обратный агонист увеличивают толщину мембраны (агонист в большей степени, чем обратный агонист) путем удлинения рецептора, а связывание антагониста не вызывает никаких изменений (см. разд. 16.2.1).

Белковые чипы. Данный подход к изучению лиганд-рецепторного взаимодействия основан на том принципе, что системы анализа, использующие небольшие количества связывающихся молекул (лиганд) и небольшие количества молекул-мишеней (рецептор), могут быть более чувствительными, чем системы, использующие в сотни раз большие количества материала. В миниатюризированном варианте молекулы лиганда иммобилизуют на твердой поверхности небольшой площади (обычно на предметных стеклах). Образующееся «микропятно» содержит высокую плотность (концентрацию) лиганда, но очень небольшое его количество. Далее подложку с иммобилизованным лигандом инкубируют с рецептором, чаще всего содержащим флуоресцентную метку, в результате чего некоторая часть молекул–мишеней связывается на подложке. Поскольку пятно имеет лишь очень малую площадь, изменения концентрации молекул-мишеней в растворе в результате связывания практически не наблюдается, даже при низкой концентрации этих молекул и их высоком сродстве к лиганду. Это условие соблюдается, если количество молекул лиганда, связавшихся в комплекс, меньше $0{,}1K_d$, где K_d — константа диссоциации комплекса. Количество образовавшихся комплексов определяют флуориметрическим методом, а затем повторяют всю процедуру для серии микропятен увеличивающегося размера, но при постоянной плотности молекул лиганда. Если после каждой инкубации несвязанный белок тщательно отмывают, то количество комплексов можно определять с помощью масс-спектрометрии и поверхностно-усиленной лазерной десорбцией/ионизацией (SELDI). На практике микропятна формируют на твердой подложке рядами, что позволяет одновременно анализировать сотни и даже тысячи образцов.

Метод локальной фиксации потенциала — метод patch-clamping (*от англ.* patch — заплатка, clamping — захват, фиксация). Данный метод особенно ценен при исследовании кинетики действия рецепторов и их структуры, если она принимает участие в лигандзависимом и потенциалзависимом прохождении ионов через мембрану. Для эксперимента требуется стеклянная микропипетка с внутренним диаметром носика порядка нескольких микрометров, содержащая хлорсеребряный электрод, раствор Рингера и, если нужно, раствор анализируемого лиганда. Носиком пипетки дотрагиваются до мембраны клетки и устанавливают слабый вакуум. Пипетка соединяется с мембраной, образуя очень прочный контакт с сопротивлением в несколько гигаом (1 ГОм = 10^9 Ом), и изолирует кусочек мембраны площадью около 50 мкм^2. Положение носика пипетки контролируют с помощью микроскопа. Солевой раствор в электроде через слой Ag/AgCl соединяется с устройством, позволяющим вести непрерывную регистрацию тока и кон-

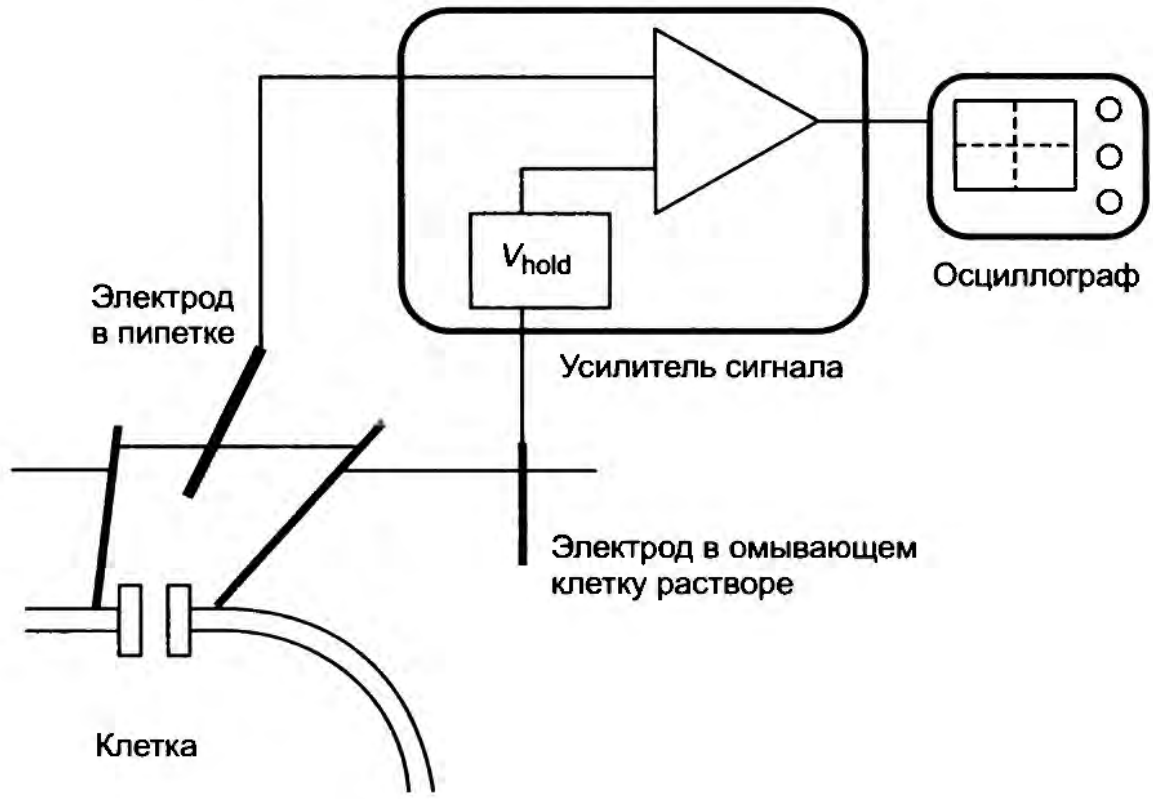


Рис. 16.7. Принципиальная схема устройства patch clamp в режиме фиксированного потенциала. Разность потенциалов между электродом в растворе и электродом в пипетке сравнивают со стандартным потенциалом V_{hold}. Ток подается через систему обратной связи до тех пор, пока два потенциала не уравняются. Таким образом, поток ионов через изолированный участок мембраны соответствует току, который нужно подать, чтобы поддерживать между двумя электродами разность потенциалов V_{hold}. Воспроизводится с разрешения А. Моллемана, Университет Хертфордшира

троль напряжения (режим фиксации потенциала) или наоборот (режим фиксации тока) на изолированном участке мембраны (рис. 16.7). Первый вариант анализа используют чаще второго, поскольку активность многих ионных каналов зависит от потенциала на мембране. Если изолированный участок мембраны содержит один или небольшое число ионных каналов, можно регистрировать ионные токи через каждый отдельный канал. Величина тока имеет порядок нескольких пикоампер (10^{-12} А), а длительность протекания составляет всего несколько микросекунд. Активность каждого канала проявляется как характерные нерегулярные скачки, отражающие переход канала от открытого состояния к закрытому (рис. 16.8). В этом методе можно использовать несколько режимов работы (рис. 16.9), каждый из которых имеет свои преимущества для определенного рода исследований. Так, вариант outside-out (т. е. работа с «вывернутой» мембраной) наиболее удобен для анализа взаимодействия различных лигандов с мембраной. Кроме того, метод позволяет изучать действие отдельных молекул *in situ*.

Изучая величину и направление тока как функцию концентрации ионов, можно сделать вывод о типе ионов, проходящих через канал. Например, ток ~1,0 пА в течение 1 мс соответствует прохождению через канал 7800 ионов натрия. Данный метод анализа позволил установить, что количество ионных каналов в клеточной мембране относительно невелико.

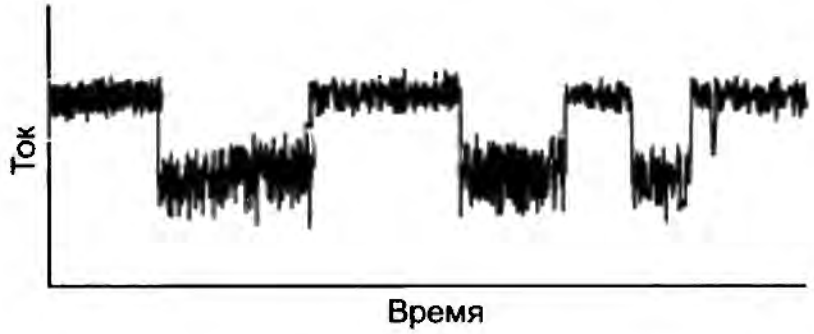


Рис. 16.8. Пример регистрации активности единичного ионного канала с помощью осциллятора. ток изменяется скачками между двумя значениями, соответствующими открытому каналу (более низкий уровень тока) и закрытому (более высокий уровень тока). Шкала тока в пикоамперах, шкала времени — от нескольких миллисекунд до секунд в зависимости от типа канала. Воспроизводится в соответствии с: Molleman, A. (2003) *Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology*, p. 111, с согласия издательства John Wiley and Sons Ltd

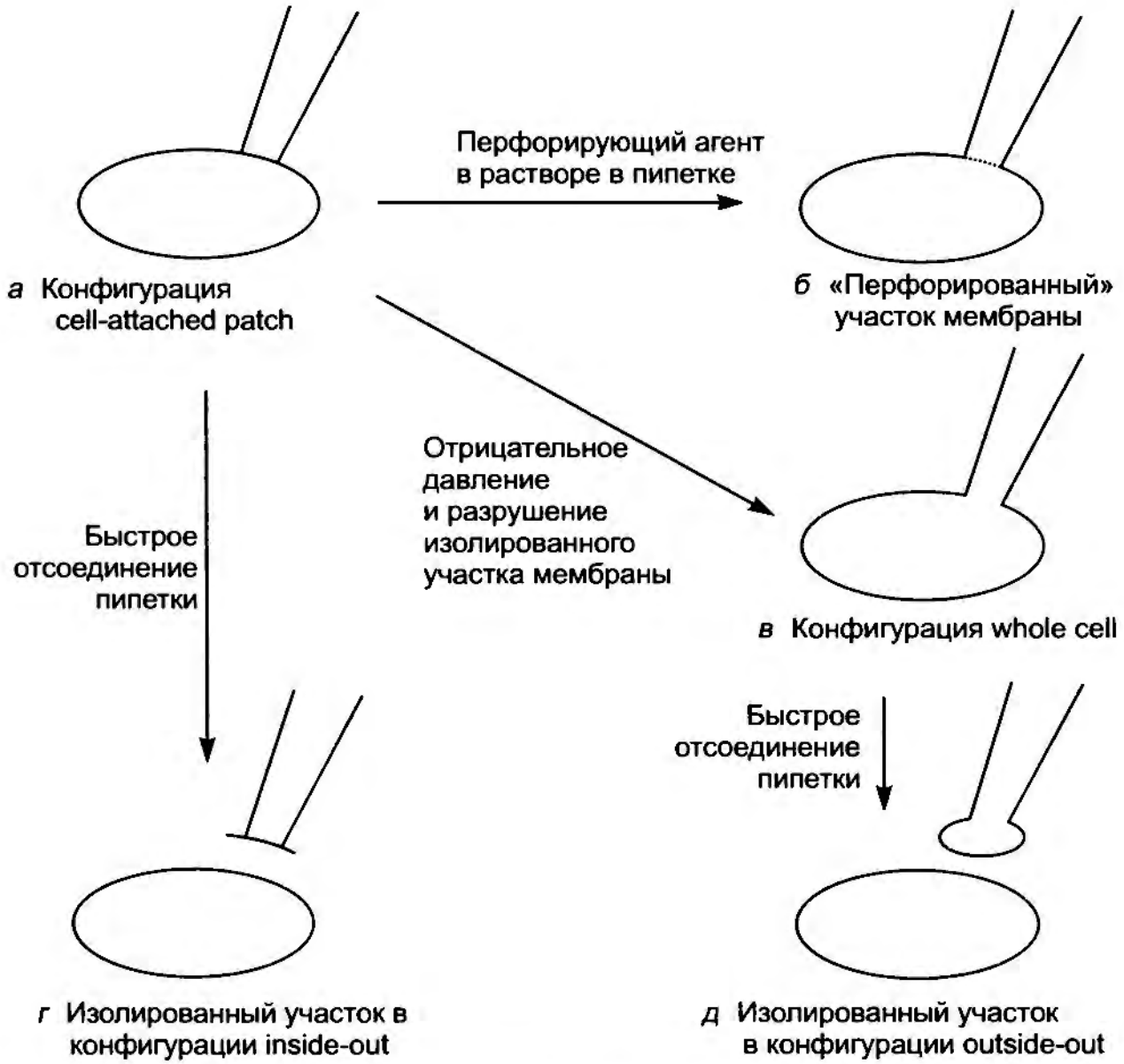


Рис. 16.9. Возможные конфигурации метода patch clamp. В вариантах *б*, *в* и *д* в процессе анализа можно изменять состав среды на внеклеточной стороне мембраны. В варианте *г* можно производить манипуляции на внутренней стороне мембраны. В вариантах *а* и *б* цитоплазма остается практически в неизмененном виде. Воспроизводится с разрешения А. Моллемана, Университет Хертфордшира

16.3.3 Анализ экспериментальных данных по связыванию лигандов с рецепторами

Экспериментальные значения K_d, k_{+1}, k_{-1}, а также число и занятость рецепторов

Экспериментальные значения K_d, найденные для многих рецепторов и их природных агонистов, находятся в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-11} М, что говорит о более высоком сродстве, чем сродство большинства ферментов к их субстратам. Соответствующие константы скорости k_{+1} лежат в диапазоне от 10^5 до 10^8 $М^{-1} \cdot мин^{-1}$, а константы k_{-1} — от 0,001 до 0,5 $мин^{-1}$. Исследования рецепторов, связанных с G-белком, которые образуют тройной комплекс AR*G, показали, что этот тройной комплекс имеет более высокое сродство к лиганду, чем двойной комплекс AR*. Сродство рецептора к агонисту зависит также от взаимодействия рецептора с различными адапторными белковыми молекулами, расположенными во внутриклеточных мембранах. Эти явления обсуждаются ниже.

Из экспериментальных данных по связыванию достаточно легко определить число рецепторов на клеточной мембране, обычно 10^3–10^6 шт. на клетку. Вроде бы очень большое число, но на самом деле это лишь небольшая часть всех мембранных белков. Отсюда трудности, иногда возникающие при очистке рецепторных белков. Зная число рецепторов и K_d для определенного лиганда, можно найти долю занятых рецепторов этого рода при нормальной физиологической концентрации агониста. Кроме того, можно установить, каким образом доля занятых рецепторов и соответствующий клеточный ответ зависят от изменений концентрации агониста в окружающей среде. Относительное изменение клеточного ответа тем заметнее, чем ниже доля занятых рецепторов. Это можно увидеть из формы графика зависимости доза–ответ в физиологическом диапазоне концентраций агониста. Понятно, что если в норме занята значительная доля рецепторов, реакция на изменение концентрации агониста не очень сильная. В таких условиях ответ должен быть сильнее, если при связывании агониста с рецептором имеет место положительная кооперативность.

Исследования показывают, что некоторые агонисты могут вызывать максимальный ответ рецепторов только в том случае, если занято немного рецепторов. Этот факт лежит в основе теории **запасных рецепторов**, которые неразличимы от занятых рецепторов. Считается, что запасные рецепторы повышают чувствительность клеток к присутствующему агонисту. Однако неправильно рассматривать запасные рецепторы как избыточные, и в этом смысле термин «запасные» не очень удачен. Запасные рецепторы выполняют определенную роль в формировании максимального клеточного ответа на низкую концентрацию агониста и в ускорении переключения ответа. Однако изучение связывания агонистов с рецепторами также показало, что число рецепторов на мембране непостоянно, оно меняется. Рецепторы подвергаются **апрегуляции** и **даунрегуляции** (т. е. усилению и подавлению экспрессии) в зависимости от потребностей клетки. Регуляция численности рецепторов осуществляется на нескольких уровнях — от транскрипции и трансляции до интернализации при эндоцитозе с последующим разложением с помощью убиквитинзависимых ферментов

(разд. 16.6.2). При применении меток было показано, что некоторые рецепторы после эндоцитоза вновь возвращаются в мембрану, причем весь этот цикл во времени занимает лишь несколько минут. Время полураспада инсулинового рецептора составляет 9 ч. В некоторых случаях длительный контакт рецепторов с лигандами приводит к **десенсибилизации** рецепторов. Механизм этого явления рассмотрен ниже (разд. 16.6.1).

Пример 1 АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА С РЕЦЕПТОРОМ

Вопрос На препарате целых клеток исследовали связывание агониста с мембранным рецептором как функцию концентрации лиганда в отсутствие немеченого конкурентного антагониста и при его большом избытке. В обоих случаях степень связывания лиганда была такой, что практически не влияла на общую концентрацию лиганда. Какую количественную информацию относительно связывания лиганда с рецептором можно извлечь из этих данных?

	Концентрация лиганда, нМ							
	40	60	80	120	200	500	1000	2000
Общее количество связанного лиганда, пмоль/10^6 клеток	0,284	0,365	0,421	0,547	0,756	1,269	2,147	2,190
Связывание лиганда в присутствии конкурентного антагониста, пмоль/10^6 клеток	0,054	0,068	0,084	0,142	0,243	0,621	1,447	1,460

Ответ Прежде всего следует рассчитать степень специфического связывания лиганда с рецептором (B_s). Использование большого избытка немеченого конкурентного антагониста позволяет определить величину неспецифического связывания. Разность между этой величиной и общим связыванием дает специфическое связывание. Как только эта величина известна, можно применить один из графических методов. Простейший вариант — построение графика зависимости специфического связывания лиганда от общего связывания лиганда. Более точные методы основаны на построении графиков в координатах Скэтчарда (уравнение 16.4) или Лайнуивера–Берка (уравнение 16.7). Кроме того, если использовать координаты Хилла (уравнение 16.9), можно найти константу Хилла (h). Результаты расчетов, полученные с помощью трех названных графиков, представлены в таблице.

	Концентрация лиганда, нМ							
	40	60	80	120	200	500	1000	2000
Общее количество связанного лиганда, пмоль/10^6 клеток	0,284	0,365	0,421	0,547	0,756	1,269	2,147	2,190
Неспецифическое связывание (B_{ns}), пмоль/10^6 клеток	0,054	0,068	0,084	0,142	0,243	0,621	1,447	1,460
Специфическое связывание (B_s), пмоль/10^6 клеток	0,230	0,297	0,337	0,405	0,513	0,648	0,700	0,730
$B_s/[L] \cdot 10^3$, дм^3/10^6 клеток	5,75	4,95	4,21	3,37	2,56	1,30	0,70	0,43
$1/B_s$, (пмоль/10^6 клеток)$^{-1}$	4,35	3,37	2,97	2,47	1,95	1,54	1,43	1,37
1/[L], нМ$^{-1}$	0,0250	0,0170	0,0125	0,0083	0,0050	0,0020	0,0010	0,0005
$(B_{max} - B_s)$, пмоль/10^6 клеток	0,52	0,45	0,413	0,345	0,237	0,102	0,050	0,020
$B_s/(B_{max} - B_s)$	0,44	0,66	0,816	1,174	2,164	6,35	14,00	36,50
$\lg(B_s/(B_{max} - B_s))$	–0,356	–0,180	–0,088	0,070	0,335	0,803	1,146	1,562
lg[L]	1,60	1,78	1,90	2,08	2,30	2,70	3,00	3,30

По гиперболической зависимости можно оценить максимальное связывание (B_{max}). Оно составляет приблизительно 0,75 пмоль/10^6 клеток. Далее по концентрации лиганда, соответствующей $0{,}5B_{max}$ (0,375 пмоль/10^6 клеток), найдем $K_d \sim 100$ нМ.

Из графика в координатах Скэтчарда с помощью регрессионного анализа можно найти коэффициент корреляции r (0,996), B_{max} (0,786 пмоль/10^6 клеток) и K_d (97,3 нМ).

Из графика в координатах Лайнуивера–Берка получаем: коэффициент корреляции $r = 0{,}998$, $B_{max} = 0{,}746$ пмоль/10^6 клеток и $K_d = 90{,}5$ нМ. Обратите внимание, что между приведенными наборами данных имеется некоторое расхождение. Пожалуй, наиболее точными являются результаты, полученные в координатах Лайнуивера–Берка, поскольку, как отмечалось ранее, при применении регрессионного анализа в координатах Скэтчарда всегда получают завышенные значения обеих констант.

Если $B_{max} = 0{,}75$ пмоль/10^6 клеток, по графику в координатах Хилла коэффициент корреляции равен 0,998 и константа Хилла (угол наклона) 1,13.

Подтипы рецепторов

Эксперименты по связыванию рецепторов с агонистами и антагонистами выявили гетерогенность многих мембранных рецепторов. Основанная на

подобных исследованиях классификация рецепторов не лишена неопределенностей и противоречий, так что ее следует сопоставлять с классификацией, основанной на генетических исследованиях. В частности, такой двойной подход подтвердил существование более дюжины подтипов рецепторов 5-гидрокситриптамина (серотонина). Интересная особенность некоторых подтипов рецепторов состоит в том, что они не только отличаются параметрами связывания, но могут запускать противоположные клеточные реакции. Например, β-адренергические рецепторы активируются адреналином и норадреналином, но среди них можно выделить три подтипа β_1, β_2 и β_3, различающиеся аминокислотным составом, сродством к агонистам и физиологическими реакциями. Так, β_1-адренергические рецепторы задействованы в работе сердца, β_2-адренергические рецепторы участвуют в функционировании скелетных и гладких мышц, а β_3-адренергические рецепторы — в метаболических реакциях. Синтетические агонисты, например сальбутамол, легко различают эти три подтипа рецепторов.

Подвижность рецепторов

Взаимодействие рецепторов с другими мембранно-связанными молекулами, необходимое для передачи сигнала в клетке, обеспечивается их способностью свободно диффундировать внутри двумерной структуры двойного липидного слоя. Эту подвижность рецепторов можно изучать с помощью метода **восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания** (FRAP). Для реализации данного подхода рецептор должен нести флуоресцентную метку. Меченые рецепторы, расположенные в небольшом участке мембраны, имеющем круглую форму (площадью 1–10 мкм^2), подвергают воздействию ослабленного лазерного излучения, в месте действия которого происходит необратимое обесцвечивание флуоресцентных меток. Затем происходит постепенное усиление флуоресценции в этой зоне, связанное с диффузией рецепторов с необесцвеченной флуоресцентной меткой. По скорости этого процесса можно определить скорость диффузии рецепторов. Исследования подобного рода показали, что отдельные рецепторы могут перемещаться по всей поверхности клетки за время от 4 мин до 7 ч.

16.4 СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРОВ

16.4.1 Природа рецепторных молекул

Молекулярную природу рецепторных белков и их роль в проведении сигнала в клетке лучше всего изучать на рецепторах, внедренных в клеточную мембрану. Однако низкий уровень экспрессии таких рецепторов и наличие в мембране посторонних белков затрудняет проведение подобных исследований. Тем не менее возможно изучать рецепторы в их естественном окружении либо в нативном состоянии, либо с использованием выделенных рецепторов, внедренных в липосомы (искусственные мем-

браноподобные структуры) или гигантские униламеллярные везикулы с диаметром до 100 мкм. Для проведения анализа в подобных системах могут применяться несколько методов.

- *Электронная микроскопия замораживания–скалывания*. Метод исследования олигомерных мембранных рецепторов, оценка числа и размеров трансмембранных α-спиралей.
- *Оптическая микроскопия*. Метод определения скорости диффузии рецепторов в жидкой мембране.
- *Электронно-спиновая резонансная спектроскопия*. Используется нитроксидная спиновая метка в остатках цистеина. Можно оценивать эффективный радиус белка и изучать его вращательную деформацию в мембране.
- *Антитела против рецепторов*. Метод изучения биохимических свойств рецепторов, в том числе их местонахождения в клетке, а также локализации центров связывания лигандов на молекулах рецепторов. Антитела против рецепторов можно получить с помощью связанных с клеткой или с мембраной рецепторных белков, очищенных рецепторных белков или клонированных рецепторных белков. Одна из проблем заключается в том, что антитела всегда имеют несколько эпитопов (некоторые могут находиться внутри мембраны или на внутриклеточной стороне мембраны, а не только на той стороне мембраны, где связывается лиганд). Поэтому такие антитела могут связываться не только с физиологическими центрами связывания лиганда; более того, из-за своей поливалентности антитела могут вызывать даже агрегацию рецепторов. Чтобы удостовериться в том, что изучается именно центр связывания лиганда, а не какой-либо другой участок, следует использовать одновалентные Fab-фрагменты антител (разд. 7.1.2).

Высвобождение рецептора из мембраны достигается с помощью детергента, а его дальнейшая очистка — с помощью таких методов, как аффинная хроматография с иммобилизованными лектинами, аффинная хроматография с иммобилизованным антагонистом или гидрофобная хроматография. Далее очищенный белок в растворе детергента изучают различными методами.

- *Аналитическое ультрацентрифугирование*. Метод равновесной седиментации (см. разд. 3.5.3) не зависит от формы молекулы белка и позволяет изучать размеры рецепторов, их стехиометрию и взаимодействие субъединиц. В другом методе можно по скорости седиментации оценить чистоту препарата и определить относительную молекулярную массу рецептора, при условии, что известна конфигурация рецептора. Следует, однако, учитывать, что связывание молекул детергента может усложнить интерпретацию результатов.
- *Эксклюзионная хроматография*. Метод позволяет оценить относительную молекулярную массу белка; затруднения связаны с выбором белков для построения градуировочного графика.

- *Электрофорез в геле*. При окрашивании с помощью кумасси бриллиантового синего удается оценить чистоту препарата и его относительную молекулярную массу.

Получив кристаллы очищенного рецепторного белка, можно изучать его структуру с помощью рентгеновской кристаллографии. Однако чаще всего такого рода исследования проводят с рекомбинантными белками. На сегодняшний день изучена структура целого ряда рецепторных белков. В качестве примеров назовем рецепторы родопсина, глутаминовой кислоты, инсулина и никотиновый ацетилхолиновый рецептор. Зная кристаллическую структуру, можно изучать молекулярный механизм физиологической функции рецепторов. Основное ограничение кристаллографического анализа обусловлено трудностями получения кристаллов высокого качества, а также тем, что этим методом получают данные, характеризующие белок только в фиксированном состоянии.

Основной альтернативой кристаллографическому анализу является метод ЯМР, особенно многомерный ЯМР (см. варианты метода COSY, NOESY, ROESY в разд. 13.4.1). Преимущество ЯМР состоит в том, что метод применим для изучения белка в растворе, причем более гибкие участки белковой молекулы могут обеспечивать более сильный сигнал ЯМР, что делает данный метод идеальным инструментом для анализа конформационных изменений, происходящих при связывании лиганда. Изучение скорости дейтериевого обмена в водных растворах рецепторных белков позволило установить, что рецепторные белки могут существовать в виде целого ряда **микроконформаций**, одни из которых энергетически более предпочтительны, чем другие, и что состояния с одинаковой энергией находятся в динамическом равновесии друг с другом. Эти микроконформации возникают в результате укладки и разворачивания специфических небольших гидрофобных участков в молекуле белка. Косвенное свидетельство такой подвижности белков основано на изучении рецепторов, связанных с G-белком. Удалось получить преципитаты иммунных комплексов между рецептором и G-белком в отсутствие агониста рецептора, что подтверждает наличие спонтанных переходов между активным и неактивным состоянием рецептора. Связывание агониста может индуцировать структурные изменения, которые облегчают формирование менее энергетически выгодных состояний. Кроме того, разные агонисты одного рецептора могут индуцировать переход в различные состояния, что объясняет различия в их эффективности.

16.4.2 Связывающие домены рецепторов

Классический подход к изучению связывающих участков рецепторных белков аналогичен тому, который применяют для анализа активных центров ферментов. Для изучения рецептора инсулина, например, было с успехом применено аффинное мечение (разд. 15.4.2). Рецептор инсулина состоит из двух α-субъединиц (84 кДа) и двух β-субъединиц (70 кДа), связанных в тетрамерный комплекс посредством дисульфидных мостиков. Изучение гидро-

фобности (разд. 8.4.3) показало, что только две β-субъединицы пронизывают мембрану и выходят во внеклеточное пространство. Две α-субъединицы полностью располагаются на внутренней стороне мембраны. Для изучения инсулинсвязывающего центра в качестве фотоаффинной метки использовали 4-азидо-2-нитрофенил-^{125}I-инсулин. Образующийся при связывании метки с рецептором комплекс подвергали воздействию ультрафиолетового излучения, в результате чего азидогруппа превращалась в нитрен, прикрепляющийся к центру связывания. Было показано, что реагент связывается с α-субъединицей рецептора. N-Концевые области α-субъединиц содержат много цистеина, и именно в них расположен участок связывания, обладающий определенным сходством с центром связывания лиганда в рецепторе эпидермального фактора роста.

На сегодняшний день для изучения связывающих доменов применяют два метода. Первый состоит в изучении специфичности взаимодействия лигандов с рецепторами с использованием компьютерного моделирования для анализа связи структуры молекул и их специфичности. Второй метод заключается в изучении кристаллической структуры рецепторных белков в присутствии физиологического лиганда и без него. В обоих случаях дополнительную информацию можно получить с помощью направленного мутагенеза, позволяющего идентифицировать аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в процессе связывания. Например, с помощью такой методологии удалось выявить 20 подтипов рецепторов тирозинкиназы, все эти подтипы имеют по несколько внеклеточных доменов с одинаковыми структурными элементами: могут содержать большое количество цистеина, иметь сходство с Ig или с фибронектином III.

Тот факт, что рецепторы обладают достаточной подвижностью и постоянно изменяют свою конформацию, позволяет предполагать, что связывающий домен не имеет строго фиксированной структуры, а обладает определенной гибкостью, причем его форма и размеры до определенной степени определяются лигандом. Этим объясняется, почему в случае некоторых рецепторов разные по структуре лиганды связываются с одинаковой легкостью.

Классификация рецепторов, расположенных на клеточной поверхности

С помощью перечисленных выше методов изучения структуры и размера рецепторных белков в сочетании с анализом соответствующих механизмов передачи сигналов удалось идентифицировать три основных типа мембранных рецепторов.

- *Управляемые лигандами ионные каналы* отвечают за селективное перемещение через мембрану таких ионов, как Na^+, K^+ и Cl^-. Связывание агониста приводит к открытию канала и прохождению ионов через мембрану. Такое перемещение ионов — быстрая и краткосрочная реакция, приводящая к возникновению мембранного потенциала. Это может оказывать возбуждающее действие, приводящее к деполяризации клеточной мембраны (например, никотиновые ацетилхолиновые и ионотроп-

ные глутаматные рецепторы), или прямое или непрямое ингибирующее действие (например, рецепторы γ-аминомасляной кислоты А (ГАМК-А), стимулирующие приток ионов хлора с последующей реполяризацией мембраны). Все рецепторы этого типа состоят из четырех или пяти одинаковых или разных субъединиц. Осуществляемый посредством этих рецепторов ответ происходит за несколько долей секунды.

- *Рецепторы, связанные с G-белком.* Рецепторы этой группы связаны с G-белком, состоящим из трех субъединиц. Активация рецептора приводит к его взаимодействию с G-белком, в результате чего на одной из субъединиц происходит обмен ГТФ на ГДФ. Эта субъединица диссоциирует из тримерного комплекса, вызывая активацию эффекторной молекулы типа аденилатциклазы, вовлеченной во внутриклеточный путь передачи сигнала. Ответ, опосредованный рецепторами данного типа, реализуется за несколько минут.
- *Рецепторы с протеинкиназной активностью.* При стимуляции агонистом внутриклеточная область этих рецепторов подвергается автофосфорилированию. Это активирует киназную активность к внутриклеточным белкам. Большинство активированных рецепторных киназ катализируют перенос γ-фосфатной группы АТФ на гидроксильную группу тирозина в белке-мишени. Этот процесс фосфорилирования контролирует многие важнейшие внутриклеточные процессы. Представители небольшой подгруппы этого типа рецепторов переносят фосфатную группу АТФ не на тирозин, а на серин или треонин. Примерами протеинкиназных рецепторов являются рецептор инсулина и рецептор эпидермального фактора роста. Ответ, опосредованный этими рецепторами, развивается за несколько минут или часов.

Структурные исследования в сочетании с результатами клонирования показали, что все три типа мембранных рецепторов имеют три четко различимых домена.

- *Внеклеточный домен* выходит за пределы внешней поверхности клеточной мембраны и содержит центр связывания лиганда.
- *Трансмембранный домен* включен в двойной фосфолипидной слой мембраны и может состоять из нескольких отделов, уложенных внутри мембраны в виде петель. В некоторых случаях эти петли образуют каналы для прохождения ионов (которые могут открываться и закрываться), а в других рецепторах петли являются частью центра связывания лиганда.
- *Внутриклеточный домен* расположен в цитозоле и отвечает за связывание лигандов внутри клетки, инициирующее процесс передачи сигнала.

Существование у рецепторных белков трех доменов отражает их амфипатическую природу. В каждом рецепторном белке есть участки, состоящие из 19–28 гидрофобных аминокислотных остатков с неполярными боковыми цепями, а также другие участки, в которых в основном сосредоточены гидрофильные остатки с полярными и ионизируемыми боковыми группами. Гидрофобные участки, обычно образующие α-спирали, форми-

руют трансмембранный домен, внедренный в двойной фосфолипидный слой, состоящий из неполярных частей длинноцепочечных жирных кислот. Напротив, гидрофильные участки рецептора располагаются по обе стороны от мембраны, где контактируют с гидрофильным водным окружением. Проникновение гидрофобного участка в клеточную мембрану является настолько характерным признаком рецептора, что такие участки можно обнаружить, просто анализируя аминокислотную последовательность белка. Рецепторные белки делят на суперсемейства по числу имеющихся трансмембранных доменов. Наличие множественных трансмембранных доменов может быть следствием олигомерной структуры рецепторного белка, причем очень часто функционирование рецептора связано с его олигомерной природой (см. разд. 8.4.3).

Суперсемейства рецепторов

Рецепторы с одним трансмембранным доменом (1TM). К этому суперсемейству рецепторов относятся рецепторы инсулина, эпидермального фактора роста, а также тромбоцитарного фактора роста, каждый из этих рецепторов обладает протеинкиназной активностью.

Рецепторы с двумя трансмембранными доменами (2TM). Представители этого суперсемейства обычно используют АТФ, поэтому их называют P2-рецепторами. Существует два типа этих рецепторов: P2X — управляемые лигандами ионные каналы и P2Y — рецепторы, связанные с G-белком. Все подтипы этих рецепторов имеют одну внутриклеточную петлю, а N- и C-концы молекулы расположены за пределами клетки.

Рецепторы с тремя трансмембранными доменами (3TM). К этому суперсемейству относятся только управляемые лигандами ионные каналы, в том числе рецепторы возбуждающего нейромедиатора, например L-глутамата. Лучше всего изучены рецептор НМДА (N-метил-D-аспартат) и рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионата. Эти рецепторы имеют одну внутриклеточную и одну внеклеточную петлю, N-конец белка расположен вне клетки, а C-конец — внутри нее. Все рецепторы этого суперсемейства — полимеры, построенные из одинаковых или различных мономерных единиц; активируются при связывании двух молекул агониста.

Рецепторы с четырьмя трансмембранными доменами (4TM). Эти рецепторы также представляют собой управляемые лигандами ионные каналы, родственные никотиновому рецептору ацетилхолина, рецептору серотонина (5-HT_3), глицина и γ-аминомасляной кислоты ($ГАМК_A$ и $ГАМК_C$). У всех рецепторов этого суперсемейства N- и C-концы молекул расположены за пределами клетки. Только область 2TM имеет α-спиральную структуру.

Рецепторы с шестью трансмембранными доменами (6TM). Это очень маленькое семейство рецепторов. В качестве его представителей можно назвать два управляемых лигандами ионных канала — инозитолтрифосфат-

(IP_3)-активируемый рецептор (расположенный на внутриклеточной мембране) и активируемый капсаицином ваниллоидный рецептор. Каждый из них имеет три внутриклеточные и две внеклеточные петли, а N- и С-концы молекул расположены вне клетки.

Рецепторы с семью трансмембранными доменами (7TM). Это самое большое по численности и разнообразию семейство рецепторов. Многие из них, но не все, связаны с G-белком. Первичными мессенджерами, связанными с активностью рецепторов данного семейства, являются ионы (Ca^{2+}), аминокислоты (глутамат), амины (катехоламины), пурины (АТФ), липиды (простагландины), пептидные гормоны (брадикинин), нейропептиды (тахикинины), кинины (интерлейкин-8) и гликопротеиновые гормоны (тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон). В данном случае N-конец молекулы рецептора является внеклеточным, а С-конец расположен в клетке.

16.5 МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

16.5.1 Передача сигнала через управляемые лигандами ионные каналы

Механизмы регуляции переноса ионов через мембрану по градиенту концентрации, что приводит к изменению мембранного потенциала, осуществляют управляемые лигандами ионные каналы. Этот тип регуляции зависит от типа ионов (катион или анион), их заряда и размера. Связывание лиганда с рецептором, находящимся в состоянии покоя, приводит к конформационным изменениям рецепторного белка, что, в свою очередь, вызывает открытие канала и перемещение ионов. Канал остается открытым до тех пор, пока лиганд остается связанным или пока не происходит десенсибилизации рецептора, тогда канал закрывается. Поскольку данный механизм не зависит от наличия каких-либо других мембранных компонентов или внутриклеточных молекул, клеточный ответ на связывание лиганда происходит практически мгновенно. К данному классу мембранных рецепторов относятся многие рецепторы, участвующие в передаче сигнала между нейронами, между глией и нейронами и между нейронами и мышцами.

По числу трансмембранных доменов выделено четыре суперсемейства рецепторов, которые представляют собой управляемые лигандами ионные каналы (2TM, 3TM, 4TM и 6TM). Семейство 4TM изучено наиболее полно, а один из представителей этого семейства — возбуждающий **никотиновый ацетилхолиновый рецептор** (нАХР) — в больших количествах обнаружен у угрей и электрических скатов. В мышцах млекопитающих нАХР расположен на мембранах постсинаптических клеток и участвует в мышечном сокращении. Токсин змеиного яда α-бунгаротоксин необратимо связывается с этим рецептором, блокируя действие ацетилхолина. Рецептор состоит из пяти субъединиц α, β, γ и δ с соблюдением стехиометрического соотношения $\alpha_2\beta\gamma\delta$ и имеет молекулярную массу 280 кДа. Каждая субъединица пронизывает мембрану 4 раза, главным образом в виде α-спирали, но с участками

β-структуры. Каждый спиральный участок маркирован от TM1 до TM4. Результаты фотоаффинного мечения и проведения точечных мутаций указывают на то, что каждый TM2 участок всех пяти субъединиц ионного канала связан с участками TM1 и TM3, поддерживая структуру канала. Данные по связыванию с лигандами с использованием нативных рецепторов и рецепторов, клонированных в фибробластах, указывают на аллостерическое связывание двух молекул агониста с константой Хилла ~2 (разд. 15.3.3).

Аффинное мечение с конкурентными антагонистами самой разной структуры показало, что центр связывания лиганда расположен в щели между двумя субъединицами. По-видимому, α-субъединица играет в связывании ключевую роль, а субъединицы γ и δ — вспомогательную. Первая молекула лиганда связывается с α_1-субъединицей, находящейся в контакте с δ-субъединицей, а вторая молекула лиганда — с α_2-субъединицей, соседствующей с γ-субъединицей. Таким образом, два центра связывания не идентичны по своей структуре.

Создание генно-инженерных вариантов пяти субъединиц позволило установить, что в отсутствие α-субъединиц не происходит связывания ацетилхолина. Результаты проведения мутагенеза и аффинного мечения с необратимым конкурентным антагонистом показали важную роль связывания лиганда с петлями A, B и C в α-субъединицах, в частности, имеет большое значение число остатков ароматических аминокислот в этих петлях. Интересно отметить, что эти остатки наиболее консервативны среди всех известных вариантов нАХР.

При изучении нАХР в постсинаптических мембранах электрических органов ската *Torpedo torpedo* с помощью электронного микроскопа удалось определить трехмерную структуру ионного канала. Канал имеет форму воронки, причем рецептор проникает в постсинаптическую щель с наружной стороны мембраны своей объемной частью. Канал имеет диаметр 25–30 Å на входе и лишь 6,4 Å в своей узкой части. Узкая часть канала образована тремя рядами отрицательно заряженных аминокислотных остатков, что, по-видимому, и определяет его селективное действие. Важная роль этих аминокислотных остатков была подтверждена при мутагенезе.

Кинетику открытия канала удалось изучить методом patch clamp (см. разд. 16.3.2). Механизм процесса довольно сложный, но его можно описать схемой из нескольких равновесий:

	$A + R$	$\rightleftarrows$	$AR + A$	$\rightleftarrows$	A_2R	$\rightleftarrows$	A_2R^*	$\rightleftarrows$	A_2R^{**}
Канал:	закрыт		закрыт		закрыт		открыт		десенсибилизирован

где A — ацетилхолин, R — рецептор, содержащий два центра связывания ацетилхолина, по одному на каждой α-субъединице.

По экспериментальным данным были рассчитаны константы скорости реакционных стадий в данном процессе, при этом оказалось, что константа скорости открытия канала больше константы скорости обратной реакции (т. е. возвращения в закрытую конформацию), константы скорости диссоциации лиганда из закрытой конформации и константы скорости перехода от открытого состояния к десенсибилизированному состоянию. Поэтому до

наступления десенсибилизации рецептора или диссоциации молекул лиганда из центра связывания происходит множество актов открытия и закрытия канала. Во время этих активных переключений канала среднее время пребывания канала в открытом состоянии для нАХР из *Torpedo* составляет 3,0 мс, а среднее время пребывания в закрытом состоянии 94 мкс. После десенсибилизации рецептор (R**) обычно возвращается в покоящееся закрытое состояние (R).

Десенсибилизация может быть связана с процессом фосфорилирования. Во всех пяти субъединицах между областями ТМ3 и ТМ4 есть аминокислотные остатки, которые являются потенциальными участками фосфорилирования. Кроме того, было показано, что фосфорилирование рецептора происходит по двум остаткам серина на каждой γ- и δ-субъединице. Каждая фосфатная группа несет на себе два отрицательно заряженных атома кислорода, что может приводить к значительным конформационным изменениям в структуре рецептора и к его десенсибилизации. При проведении направленного мутагенеза было показано, что замена этих остатков серина неполярными аминокислотными остатками снижает чувствительность рецептора к десенсибилизации, вызванной связыванием ацетилхолина. Напротив, замена серина на глутаминовую кислоту, содержащую отрицательно заряженные карбоксильные группы, приводит к устойчивой десенсибилизации рецептора. Подобные замены широко используются при изучении протеинкиназ. Такое вызванное фосфорилированием изменение функции рецептора наблюдается во многих типах транспортных белков, что указывает на некоторую универсальность данного механизма, однако до сих пор неясно, является ли фосфорилирование необходимым условием для десенсибилизации рецептора (разд. 16.6.1).

Структурные исследования, аналогичные тем, что описаны для нАХР, проводились и для других управляемых лигандами ионных каналов, в частности, для рецепторов $ГАМК_A$ и глицина. Эти исследования подтвердили предположения об особенностях строения каналов и механизмах селективности по отношению к определенному типу ионов. Кроме того, в специфических участках субъединиц обнаружены консервативные аминокислотные остатки. Однако не все рецепторы, выполняющие функцию ионных каналов, напрямую управляются лигандами. Некоторые рецепторы между связыванием лиганда и открытием канала вступают во взаимодействие с G-белком. В качестве примера можно назвать мускариновый рецептор сердечной мышцы, связанный с K^+ каналом.

16.5.2 Передача сигнала посредством рецепторов, связанных с G-белком

В отличие от рецепторов типа нАХР, участвующих в функционировании ионных каналов, для которых связывание агониста напрямую связано с открытием канала, большинство рецепторов способны передавать сигнал только при взаимодействии с другим белком. Например, для большинства белков, относящихся к суперсемейству рецепторов с семью трансмембранными доменами (7ТМ) (см. выше), эта связь осуществляется с помощью семей-

ства мембранно-связанных белков, называемых **G-белками**, поскольку они связывают ГТФ и ГДФ. По оценкам, в геноме человека закодировано более 1000 рецепторов, связанных с G-белком (GPCR; *от англ.* G-protein-coupled receptors), что указывает на их важную роль в организме. Для этой группы рецепторов клеточный ответ на связывание агониста возникает в результате образования тройного комплекса AR*G, хотя рецепторы с конститутивной активностью могут действовать и через комплекс R*G (см. разд. 16.2.1).

Структура рецептора семейства 7TM

Все GPCR имеют семь трансмембранных спиралей, связанных между собой внеклеточными и внутриклеточными петлями; N-конец таких молекул находится снаружи, а C-конец — внутри клетки (рис. 16.10). Хотя такая структура является общим признаком всех рецепторов данного суперсемейства, их центры связывания лигандов различаются весьма значительно. Участок связывания небольших лигандов (адреналина, гистамина, допамина, серотонина и др.) находится практически внутри трансмембранного спирального участка рецептора, а участок связывания крупных молекул, таких как нейропептиды и хемокины, может распространяться на внеклеточные петли

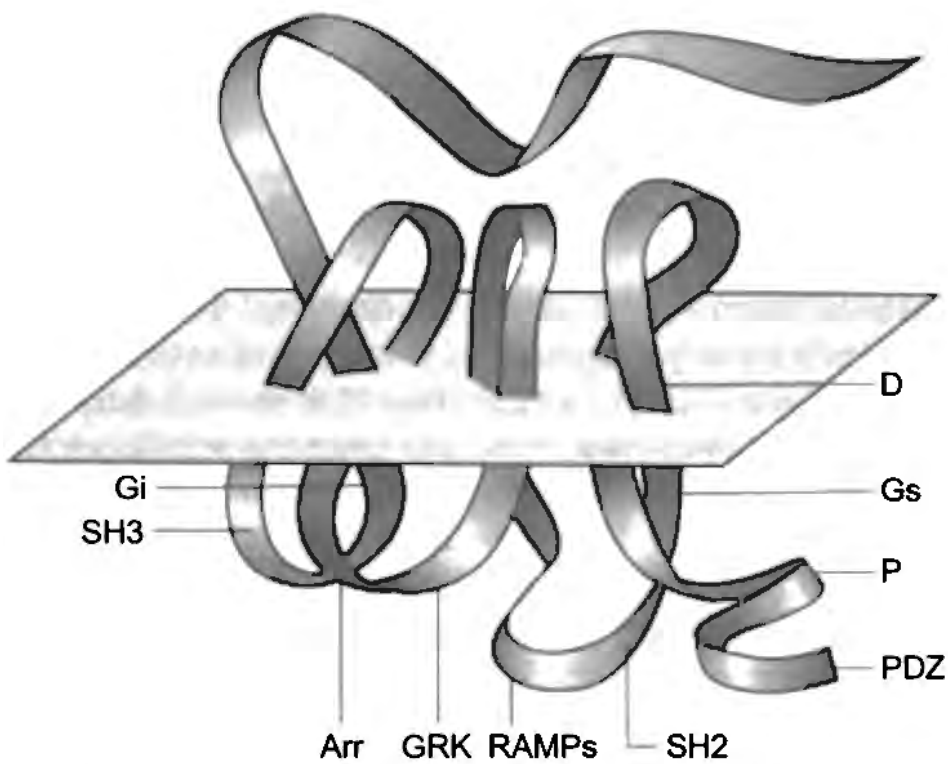


Рис. 16.10. Схема строения гипотетического рецептора, связанного с G-белком (GPCR). Подписаны основные участки взаимодействия рецептора с другими клеточными белками, в том числе с различными G-белками (G_i и G_s), белками с доменами PDZ, SH2 и SH3, белками, модифицирующими активность рецепторов (RAMP), аррестином (Arr), G-белок-сопряженными рецепторными киназами (GRK), а также участки димеризации с другими GPCR (D) и участки фосфорилирования (P), которое приводит к нарушению сопряжения и интернализации. Данная схема лишь указывает на примерное местоположение того или иного участка, поскольку в большинстве случаев точная локализация этих центров неизвестна. Воспроизводится в соответствии с: Kenakin, T. (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 103–110, с разрешения издательства Macmillan Magazines Ltd

или располагаться вблизи N-конца рецептора. Такая вариабельность в расположении центра связывания говорит о том, что могут существовать разные способы стабилизации активной конформации рецептора при связывании агониста. На С-конце белка расположены пролинсодержащие участки, необходимые для связывания активного рецептора с G-белком.

Существует три семейства рецепторов, связанных с G-белком

- *Семейство А* (другое название *класс I*). Семейство характеризуется наличием нескольких консервативных участков в ТМ-петлях и присутствием на С-конце остатка цистеина, связанного с пальмитиновой кислотой. Все члены семейства имеют гомологию на уровне 15–20%. К данной группе относятся родопсиновые, адренергические, гистаминовые, допаминергические, мускариновые и тахикининовые рецепторы. Это самое многочисленное из трех семейств.
- *Семейство В* (*класс II*). Представители этого семейства имеют длинный N-концевой фрагмент, содержащий шесть консервативных остатков цистеина, соединенных дисульфидными мостиками и участвующих в связывании лиганда. Сюда относятся рецепторы глюкагона, кальцитонина, секретина и паратиреоидного гормона. Все эти рецепторы активируют аденилатциклазу и действуют через один и тот же G_s-белок.
- *Семейство С* (*класс III*). Члены семейства связывают глутамат или ГАМК, либо участвуют в метаболизме Ca^{2+} или в формировании вкусовых ощущений. Сюда относятся некоторые метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR), восемь из которых были идентифицированы, причем каждый обнаружен в отдельном участке головного мозга. Связывание глутамата запускает синтез вторичного мессенджера, который модулирует активность ионотропного глутаматного рецептора. В метаботропных глутаматных рецепторах есть аллостерический центр — возможно, мишень действия лекарств, применяемых для лечения болезни Паркинсона (mGluR4), шизофрении (mGluR5) и разного рода зависимостей (mGluR2).

Некоторые экспериментальные данные говорят о том, что рецепторы, связанные с G-белком, взаимодействуют между собой с образованием гомо- и гетеродимеров и олигомеров. Функциональная активность рецепторов, относящихся к семействам В и С, связана именно с такими формами, однако для рецепторов из семейства А выводы неоднозначны. Например, функциональная единица рецепторов mGluR1 из семейства С — гомодимер. Метод рентгеновской кристаллографии показал, что димерная форма глутаматного рецептора существует в динамическом равновесии между двумя конформациями — открытой и закрытой, а роль глутамата состоит в стабилизации активной закрытой формы. Напротив, рецептор $ГАМК_B$ представляет собой гетеродимер, в состав которого входят два рецептора из семейства В.

Активность и специфичность представителей семейства В связана с образованием димеров и олигомеров. Образование олигомеров обусловлено взаимодействиями рецептор–рецептор или мономерного рецептора с членом семейства **белков, модифицирующих активность рецепторов** (receptor activity-modifying proteins, RAMP). Известно три белка из семей-

ства RAMP (RAMP1, 2 и 3); это небольшие белки (RAMP1 состоит из 140 аминокислотных остатков), имеющие один трансмембранный домен, большой внеклеточный домен и малый внутриклеточный домен. Гетеродимер RAMP–рецептор определяет специфичность функционального белка. Так, при связывании RAMP1 с рецептором кальцитонина (CL) происходит образование высокоаффинного рецептора пептида, относящегося к гену кальцитонина (CGRP), а взаимодействие рецептора CL с RAMP2 или 3 приводит к образованию рецептора адреномедуллина. Методом конфокальной микроскопии показано, что эти гетеродимеры образуются в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи и удерживаются на поверхности мембраны при экзоцитозе, связывании лиганда, эндоцитозе и убиквитин-опосредованной деградации (разд. 16.6.2).

Комплексы рецепторов с белками передачи сигнала

Большую часть времени рецепторы, связанные с G-белком, существуют на клеточной мембране не в свободном виде, а в комплексе с **белками передачи сигнала**. Эти комплексы стабилизируются **адапторными белками**, функции которых во многом сходны, но различаются в деталях. В качестве примеров адапторных белков можно назвать мультидоменные PDZ-белки, семейства белков Shank и Homer. Как следует из названия, мультидоменные белки PDZ имеют несколько доменов PDZ (*P*SD-95, *D*ig и *Z*O-1/2), каждый из которых способен связываться с С-концевой областью определенного рецептора или эффекторного белка, вовлеченного в передачу конкретного сигнала. Образующийся комплекс обеспечивает необходимую скорость и эффективность распространения сигнала, что особенно важно при синаптической передаче. Белки Shank содержат несколько мотивов для белок–белкового взаимодействия, в том числе мотив SH2 (*S*rc-*h*omology domain 2), который узнает и связывает фосфорилированные по тирозину последовательности (в том числе в некоторых рецепторах с протеинкиназной активностью (разд. 16.5.3)), и мотив SH3 (*S*rc-*h*omology domain 3), который узнает и связывает богатые пролином последовательности. Таким образом, в GPCR имеются домены, способные узнавать и связывать различные мотивы (рис. 16.10). Кроме того, в этих рецепторах, по-видимому, есть центры аллостерической регуляции. В большинстве случаев модуляторная молекула неизвестна, но аллостерический центр можно рассматривать как потенциальную мишень для действия новых лекарственных препаратов.

Структура G-белков

G-белки — гетеротримеры, построенные из субъединиц α (40–45 кДа), β (36–40 кДа) и γ (8 кДа), которые прочно связаны с внутренней поверхностью клеточной мембраны с помощью липофильных «хвостов» α- и γ-субъединиц. Субъединицы β и γ тесно связаны между собой, а их связь с α-субъединицей более слабая. Кроме участка связывания β-субъединицы, на α-субъединице имеется центр связывания С-концевого участка рецептора, расположенного вблизи его N-конца, а также центр связывания гуаниновых нуклеотидов, обладающий ГТФазной активностью. Хотя центр связывания рецептора расположен на α-субъединице, связывание происходит

только в том случае, когда α-субъединица свяжется с βγ-димером. Исследования показали, что G-белки довольно сильно различаются по строению. Идентифицировано 20 α-субъединиц, 6 β-субъединиц и 12 γ-субъединиц, поэтому возможное число функциональных тримеров αβγ довольно велико.

Типы G-белков

По характеру действия выделяют восемь групп G-белков. Перечислим пять наиболее важных.

- Группа G_s, стимулирующая аденилатциклазу.
- Группа G_i, ингибирующая аденилатциклазу и активирующая K^+-каналы и гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата.
- Группа G_q, осуществляющая связь рецепторов с мобилизацией кальция при участии фосфолипазы C_β с образованием двух вторичных мессенджеров — инозитолтрифосфата и диацилглицерина.
- Группа G_o, снижающая вероятность открытия некоторых потенциалуправляемых Ca^{2+} каналов, вовлеченных в высвобождение нейромедиаторов.
- Группа G_t, активирующая фосфодиэстеразу после стимуляции родопсина светом.

Методы изучения механизма передачи сигнала с участием G-белков

При изучении структуры G-белков и их взаимодействия с рецепторами и внутриклеточными эффекторами используется несколько методов. Приведем примеры.

- Использование аналогов ГТФ, которые связываются с α-субъединицей, но слабо гидролизуются, сохраняя α-субъединицу постоянно активной; например, [^{35}S]ГТФγS.
- Использование бактериальных токсинов (токсины холеры и коклюша), которые являются АДФ-рибозилтрансферазами и стимулируют перенос остатка АДФ-рибозы с NAD^+ на α-субъединицу G-белка. На практике используют NAD^+, меченный ^{32}P.
- Использование N-этилмалеимида в качестве конкурентного ингибитора α-субъединиц, осуществляющего их селективное алкилирование.
- Фотоаффинное мечение с помощью аналогов ГТФ, таких как ГТФ-азидоанилид, который под действием света превращается в нитрен и ковалентно связывается с α-субъединицей.
- Получение и использование для анализа антител против субъединиц каждого типа.
- Клонирование генов и направленный мутагенез; экспрессия в ооцитах шпорцевой лягушки *Xenopus*.
- Создание химерных рецепторов генно-инженерными методами.
- Синтез аналогов лигандов с целью идентификации структурных и кинетических закономерностей связывания рецепторов с лигандами. Ценность данного подхода возросла с развитием возможностей комбинаторной химии, позволяющей одновременно синтезировать очень большое число родственных по структуре соединений.

Цикл G-белков

Связывание агониста с рецептором запускает цикл G-белка (рис. 16.11).

- В норме в состоянии покоя с α-субъединицей тримерного G-белка связана молекула ГДФ. В таком состоянии G-белок не связан с рецептором, но расположен поблизости от него.
- При связывании агониста с рецептором происходит образование активного комплекса, сопровождающееся быстрыми конформационными изменениями в ТМ6-спирали рецептора, приводящими к активации центра связывания G-белка, расположенного во внутриклеточных петлях. Комплекс перемещается и взаимодействует с комплексом G-белка с адапторным белком, связываясь с ним через α-субъединицу. В мембране G-белки превосходят по численности рецепторные белки.
- Связывание комплекса рецептор–агонист с комплексом G-белок–адаптор вызывает конформационные изменения в центре связывания гуаниновых нуклеотидов на α-субъединице, что приводит к диссоциации ГДФ и формированию временного состояния «пустого белка».
- Связывание ГТФ в центре связывания гуаниновых нуклеотидов на α-субъединице запускает быстрые конформационные изменения в этой субъединице с последующим распадом комплекса на ГТФ-α-субъединицу и βγ-димер. При этом и ГТФ-α-субъединица, и βγ-димер остаются связанными с клеточной мембраной.
- ГТФ-α-субъединица и/или βγ-димер связываются с неактивной эффекторной молекулой, вызывая ее активацию или ингибирование.
- Гидролиз ГТФ до ГДФ под действием ГТФазной активности α-субъединицы завершает цикл, обращая конформационные изменения, вызванные связыванием агониста с рецептором в начале цикла. Это облегчает отсоединение α-субъединицы от эффекторной молекулы и ее воссоединение с βγ-димером.

Активацию конкретного G-белка могут вызывать самые разные рецепторы (**«неразборчивость» G-белков**), а конкретный рецептор может взаимодействовать с разными G-белками и/или вызывать несколько клеточных ответов (**«неразборчивость» рецепторов**). Рецепторы, способные активировать более одного типа G-белков и, следовательно, инициировать более одного клеточного ответа, называют **плейотропными рецепторами** (что указывает на множественность их фенотипических проявлений). В качестве примера приведем человеческий рецептор кальцитонина, который способен связываться с G_i, G_s и G_q.

Связывание G-белка с эффектором

Ранее считали, что только комплекс ГТФ с α-субъединицей может взаимодействовать с эффекторной молекулой, но последние исследования показали, что независимой активностью в отношении эффекторов обладает и βγ-димер. Два важных примера роли комплекса ГТФ-α в передаче сигнала состоят в активации аденилатциклазы, которая превращает АТФ во вторичный мессенджер цАМФ, и в активации фосфолипазы С, которая расще-

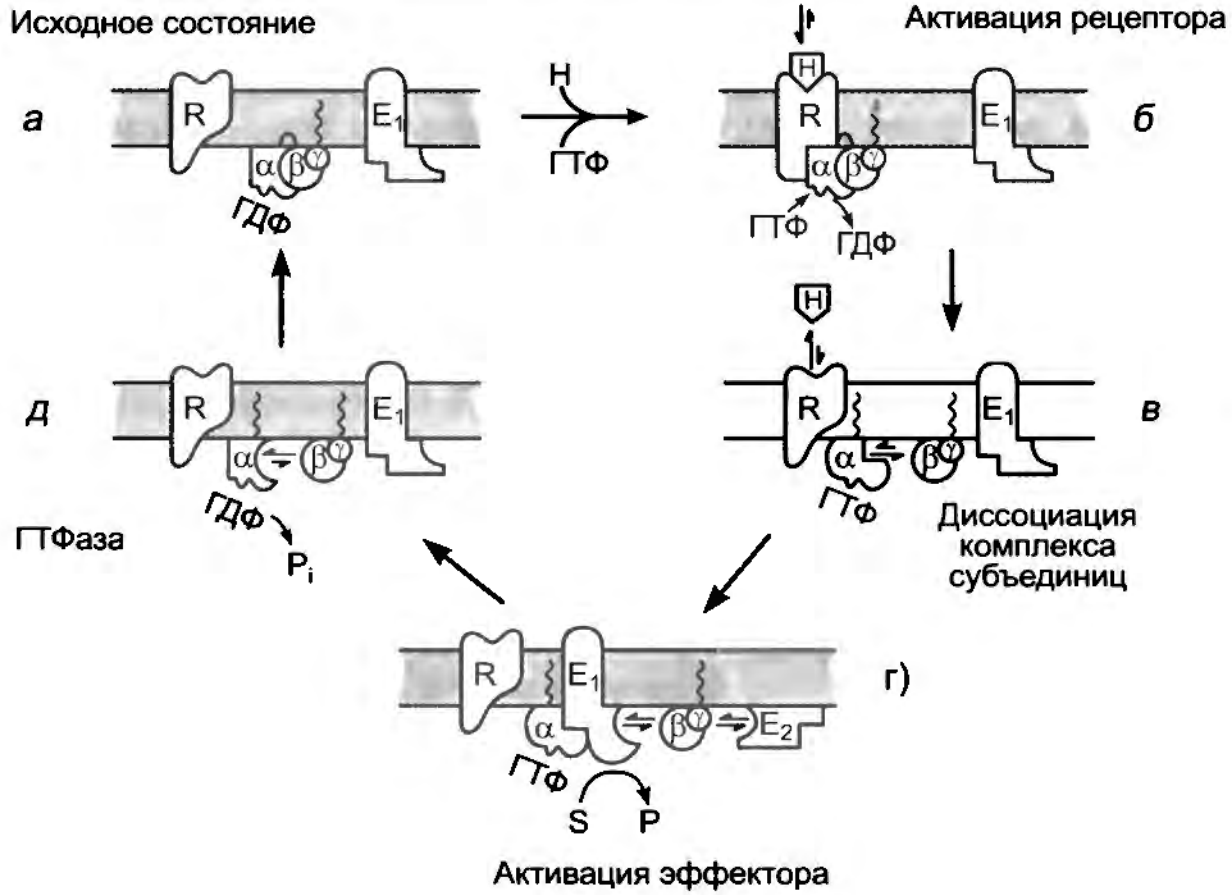


Рис. 16.11. Передача сигнала, опосредованная G-белком. *а* — в исходном состоянии α-субъединица гетеродимера прочно удерживает молекулу ГДФ. Рецептор (R) свободен, а эффектор (E1), например аденилатциклаза, неактивен. *б* — связывание лиганда приводит к конформационным изменениям, в результате которых ГДФ заменяется на ГТФ. *в* — связывание ГТФ заставляет G-белок отщепляться от рецептора, а комплекс ГТФ с α-субъединицей отсоединяется от βγ-димера. *г* — Комплекс ГТФ с α-субъединицей связывается с эффектором и активирует его. Димер βγ-субъединиц может активировать другую эффекторную молекулу (E2). *д* — ГТФазная активность α-субъединицы вызывает гидролиз ГТФ до ГДФ с последующей инактивацией и отсоединением эффектора. Комплекс ГДФ с α-субъединицей объединяется с βγ-димером, в результате чего система возвращается в исходное состояние. Воспроизводится из Hepler, J.R. and Gilman, A.G. (1992) G-Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **17**, 383–389, с разрешения издательства Elsevier Science

пляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на цитоплазматической стороне клеточной мембраны с образованием двух вторичных мессенджеров — инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина. Большинство примеров роли βγ-димера связаны с активацией G_i и G_0, в частности при активации киназы β-адренергического рецептора, фосфолипазы A2 и K^+-канала GIRK (*G*-protein-activated *i*nwardly *r*ectifying potassium channel).

Регуляция передачи сигнала с помощью G-белков

Разнообразие G-белков и опосредуемых ими ответов обеспечивает целый ряд преимуществ, заключающихся в том числе в возможности усиления сигнала, его регуляции и специфичности. Связывание каждого комплекса ГТФ-α, скажем, с аденилатциклазой приводит к синтезу или высвобождению многих молекул вторичных мессенджеров, каждая из

которых может индуцировать ответ с помощью других компонентов системы каскада (усиление сигнала). Регуляция передачи сигнала осуществляется на уровне рецептора и основана на том, что связывание комплекса ГТФ-α с рецептором приводит к уменьшению сродства рецептора к лиганду (K_d увеличивается), способствуя высвобождению лиганда; гидролиз ГТФ до ГДФ вызывает обратные изменения. Кроме того, регуляция осуществляется с помощью группы из более чем 20 белков, называемых **RGS-белками** (*r*egulation of *G*-protein *s*ignalling), которые на основании гомологии последовательностей подразделяют на пять се-

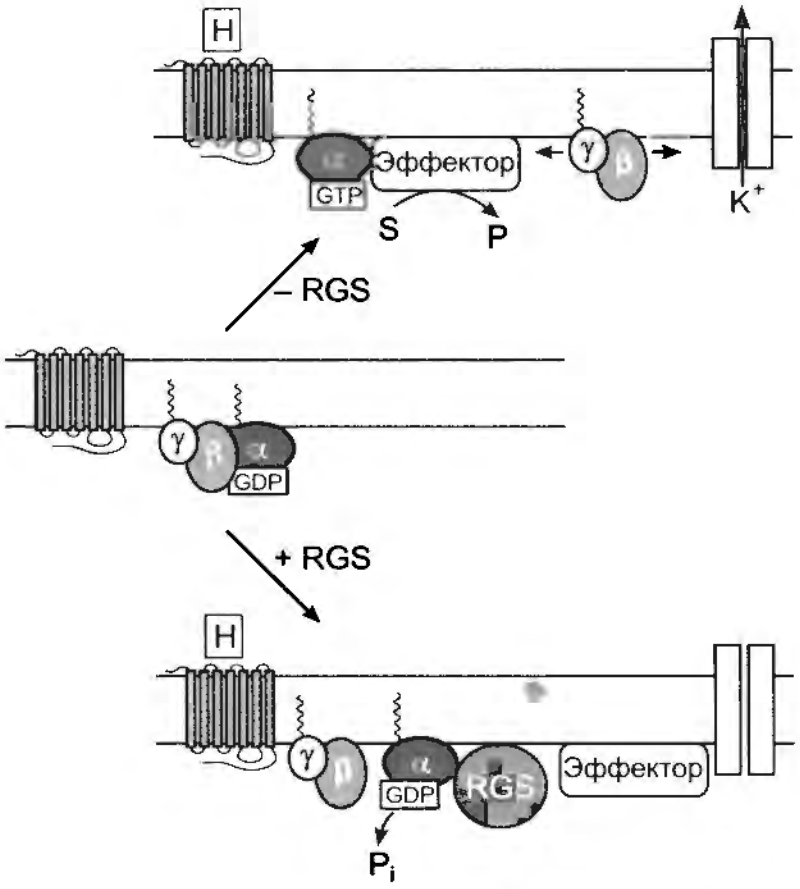


Рис. 16.12. Белки RGS (*r*egulation of *G*-protein *s*ignalling) осуществляют отрицательную регуляцию передачи сигнала с участием G-белков. В состоянии покоя (*в центре*) рецепторы клеточной поверхности, предназначенные для узнавания нейромедиаторов и гормонов, не связаны с агонистом, а G-белок существует в виде гетеротримера αβγ в комплексе с молекулой ГДФ, связанной с α-субъединицей. Связывание агониста (гормона Н) с рецептором (*наверху*) инициирует обмен гуаниновых нуклеотидов, что облегчает связывание ГТФ с α-субъединицей и высвобождение βγ-димера. Активный комплекс ГТФ-α и βγ-димер способны регулировать активность эффекторных белков типа ионных каналов или ферментов, превращающих молекулы субстрата (S) во вторичные мессенджеры (P). Передача сигнала заканчивается в результате действия собственной ГТФазной активности α-субъединицы. Большинство белков RGS связываются с активным комплексом ГТФ-α (*внизу*) и значительно усиливают ГТФазную активность. Гидролиз ГТФ прекращает взаимодействие α-субъединицы с эффектором и способствует восстановлению комплекса ГДФ-α с βγ-димером, что, в свою очередь, приводит к остановке передачи сигнала, опосредованной βγ-димером. Воспроизводится из Hepler, J.R. (1999) Emerging roles for RGS proteins in cell signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, **20**, 376–382, с разрешения издательства Elsevier Science

мейств. Все белки этой группы способны связываться с комплексом ГТФ-α (рис. 16.12), осуществляя при этом два действия:

- ослабляют связывание ГТФ-α с эффектором;
- усиливают ГТФазную активность, ускоряя гидролиз ГТФ до ГДФ более чем в 2000 раз.

Оба действия приводят к инактивации эффектора. Это может либо прекращать передачу сигнала в результате удаления стимула, либо его переадресацию. Некоторые данные указывают на то, что специфические белки RGS регулируют специфические пути передачи сигнала с участием G-белков. Такая специфичность достигается путем сочетания ряда факторов, в том числе специфичной для определенного типа клеток экспрессией белков RGS, их внутриклеточной локализацией, возможностью сопряжения белков RGS со специфическими сигнальными путями и способностью некоторых белков RGS выступать в роли антагонистов эффектора, препятствуя связыванию G-белка с этим эффектором.

Недавние исследования показывают, что важным механизмом активации рецепторов, связанных с G-белком, может быть фосфорилирование. Установлено, что фосфорилирование играет важную роль в десенсибилизации рецепторов (разд. 16.6.1) и эндоцитозе (разд. 16.6.2), но возможно также, что фосфорилирование необходимо для участия рецепторов в определенных путях передачи сигнала. Например, исследования мускариновых рецепторов типа М3 показали, что их фосфорилирование под действием фермента казеинкиназы 1α в определенном участке, отличном того, фосфорилирование по которому приводит к десенсибилизации, играет важную роль в активации пути передачи сигнала с участием внеклеточных регулируемых сигналом киназ 1 и 2 (ERK1 и 2).

16.5.3 Передача сигнала с участием рецепторов с собственной протеинкиназной активностью

Уже более 20 лет назад стало понятно, что процессы фосфорилирования и дефосфорилирования представляют собой важный механизм регуляции активности белков. Было охарактеризовано множество внутриклеточных киназ и фосфорилаз и обнаружено, что их регуляторное действие связано с конформационными изменениями в белках, происходящими при присоединении или удалении фосфатной группы. Процесс фосфорилирования можно изучать с помощью АТФ, меченного ^{32}P. Регуляция активности белков с помощью киназ/фосфорилаз свойственна широкому кругу организмов, что говорит о раннем возникновении данного механизма в эволюции. Суммарный процесс сводится всего лишь к потреблению АТФ, но сопровождается значительным усилением чувствительности и сигнала, поэтому выигрыш с лихвой компенсирует затраты АТФ (подробности см. в разд. 15.4).

Относительно недавно было показано, что многие рецепторы в клеточной мембране обладают скрытой протеинкиназной активностью, которая

активируется при связывании агониста. Передача сигнала с помощью таких рецепторов связана с этой киназной активностью. Связывание агониста приводит к автофосфорилированию одного или нескольких остатков тирозина, серина или треонина во внутриклеточном участке рецепторного белка, что сопровождается стимуляцией протеинкиназной активности внутриклеточного участка рецептора по отношению к внутриклеточным белкам. На основании специфичности действия киназы выделяют два основных типа рецепторов с киназной активностью.

Рецепторы с тирозинкиназной активностью

На основании структуры внеклеточных и внутриклеточных доменов рецепторов выделяют 20 подклассов рецепторов с тирозинкиназной активностью. Среди наиболее хорошо охарактеризованных рецепторов можно назвать рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР), рецептор инсулина и рецептор тромбоцитарного фактора роста (ТФР) (рис. 16.13). Большин-

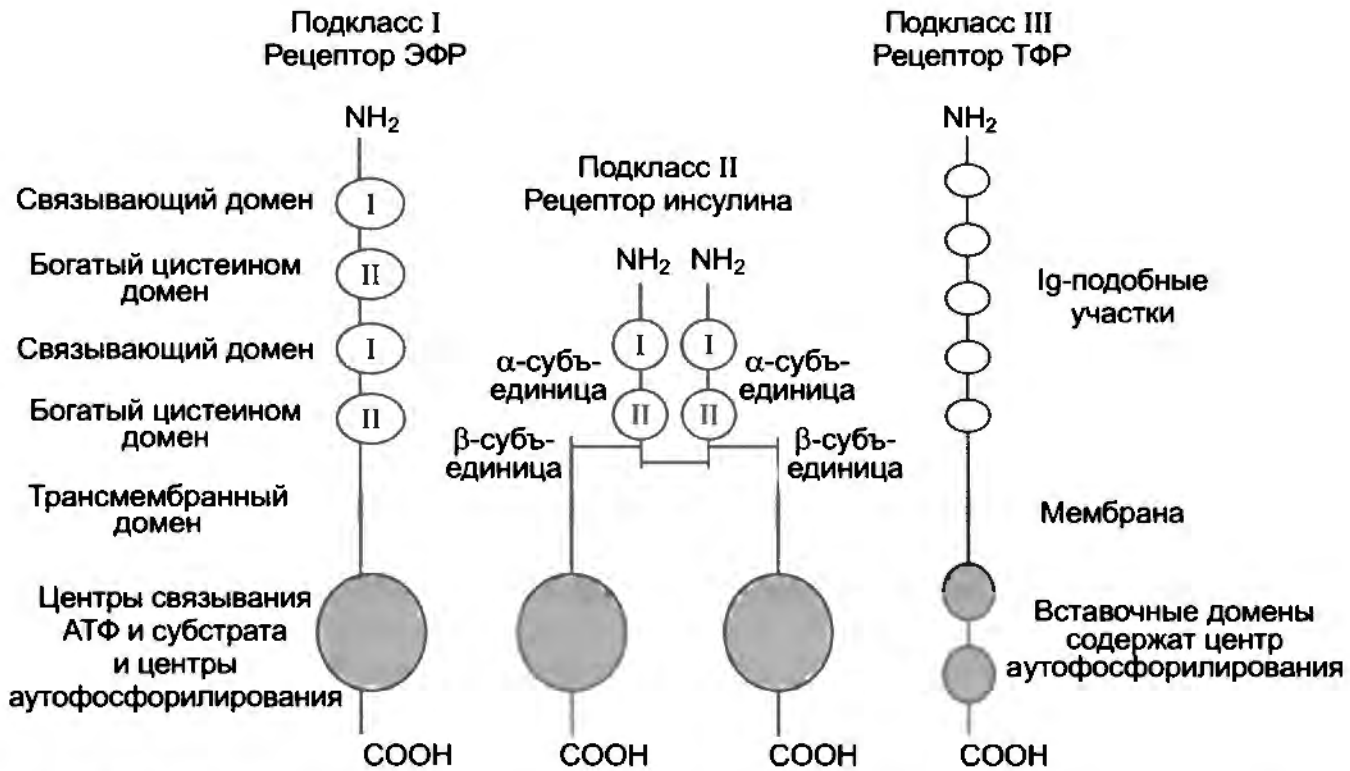


Рис. 16.13. Три подкласса рецепторов с тирозинкиназной активностью. Подкласс рецепторов типа рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) характеризуется наличием двух доменов связывания лиганда, расположенных поблизости, так что связывающийся лиганд попадает в щель между двумя доменами. Два богатых цистеином участка располагаются вблизи поверхности мембраны. В случае подклассов I и III при связывании лиганда происходит димеризация рецепторов, в результате которой усиливается внутриклеточная тирозинкиназная активность и способность к связыванию по сравнению с мономерными формами рецепторов. Рецептор инсулина всегда существует в виде димера, но в данном случае, так же, как и в случае подклассов I и III, при связывании лиганда происходит аллостерическое взаимодействие между двумя αβ-половинами каждого рецептора. Наибольшая доля гомологичных остатков между тремя подклассами рецепторов относится к домену с тирозинкиназной активностью

ство рецепторов данного класса построены из одной аминокислотной цепи и в отсутствие агониста существуют в виде мономера, но димеризуются при связывании агониста. Некоторые рецепторы данного класса, включая рецептор инсулина, всегда существуют в виде димера, однако в любом случае в каждой мономерной единице есть единственный трансмембранный домен. Существуют данные о том, что подобно рецепторам, связанным с G-белком, протеинкиназы взаимодействуют с заякоренными на мембране белками типа белков семейства Shank.

Центр связывания агониста на рецепторах с тирозинкиназной активностью локализован в гликозилированном внеклеточном участке, а непосредственно после трансмембранного домена расположен участок с тирозинкиназной активностью. Связывание агониста вызывает конформационные изменения, позволяющие занятым рецепторам узнать друг друга и образовать димеры. Сразу за этим процессом происходит взаимное перекрестное автофосфорилирование от одного до трех остатков тирозина в тирозинкиназном домене каждого мономера, что приводит к их активации. Активированные центры связывают эффекторные молекулы, вызывают их фосфорилирование и активацию, сопровождающиеся образованием сигнальных комплексов. В этом отношении рецепторы данного класса напоминают рецепторы, связанные с G-белком. Образующиеся комплексы также стабилизируются при помощи адапторных белков, но отличных от тех, что действуют в случае рецепторов, связанных с G-белком. В качестве примеров назовем Gab-1, p85 и Grb2. Эффекторы и адапторы обладают одинаковыми центрами связывания остатков тирозина, фосфорилированными под действием киназы, которые могут располагаться как вблизи, так и в отдалении от активного центра киназы, в том числе домены SH2 и домены связывания фосфотирозина. Кроме того, эффекторы могут обладать дополнительными центрами связывания для других эффекторных молекул. В результате первый эффектор выполняет функцию адаптора для второго эффектора, что позволяет сигнальным путям разветвляться и выполнять конкретные требования клетки.

Рецепторы с серин/треонинкиназной активностью

Вторая группа рецепторов с протеинкиназной активностью характеризуется способностью автофосфорилировать остатки серина и треонина во внутриклеточном домене рецептора. Сюда относятся рецепторы суперсемейства трансформирующего фактора роста β — регулирует рост, дифференцировку, миграцию и адгезию клеток. Рецепторы этого типа делят на несколько групп на основании их структуры, особенно структуры домена с серин/треонинкиназной активностью. Все эти рецепторы имеют один трансмембранный домен, а при связывании лиганда образуют гетероолигомерные комплексы. Это приводит к автофосфорилированию и стимуляции серин/треонинкиназной активности к другим внутриклеточным белкам — участникам сигнального пути. Некоторые рецепторы факторов роста после димеризации и автофосфорилирования теряют киназную активность. В таком случае они связываются с внутриклеточными киназами и действуют как обычные рецепторы с киназной активностью.

Подобно рецепторам, связанным с G-белком, рецепторы с протеинкиназной активностью стимулируют многочисленные пути передачи сигнала. Далее в этих путях задействованы фосфолипазы и фосфоинозитидкиназы, которые также участвуют в проведении сигнала, опосредованного G-белками. Среди ряда эффекторов, специфичных для протеинкиназ, можно назвать мембранно-связанный гуанозинсвязывающий белок Ras, обладающий ГТФазной активностью, который вовлечен в процессы клеточного роста и развития у всех эукариотов.

Принципиальную роль в регуляции проведения сигнала с участием рецепторов с киназной активностью играет группа белков с фосфатазной активностью, которые могут как инактивировать, так и активировать проведение сигнала путем дефосфорилирования. Идентифицированы фосфатазы, реагирующие либо только с тирозином, либо также с серином и треонином. Некоторые белки являются цитоплазматическими, другие напоминают рецепторы и имеют трансмембранный домен. Большинство из них имеют два центра с фосфатазной активностью, назначение которых до конца неясно, однако специфичность фосфатаз может быть обусловлена взаимодействиями с этими двумя центрами. Активность фосфатаз, по-видимому, связана с их собственным фосфорилированием; многие из этих белков имеют SH2-домен для связывания рецепторов с тирозинкиназной активностью.

16.6 ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ И ПЕРЕМЕЩЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ

16.6.1 Десенсибилизация рецепторов

Одна из особенностей всех трех основных групп рецепторов клеточной мембраны состоит в том, что все они **десенсибилизируются**, в результате чего, несмотря на продолжающееся присутствие агониста, клеточный ответ ослабевает или прекращается. Однако между тремя классами существуют определенные различия в скорости наступления десенсибилизации. Так, управляемые лигандами ионные каналы, представителем которых является нАХР, переходят в состояние десенсибилизации через несколько секунд после активации, тогда как в случае рецепторов, связанных с G-белком, и рецепторов с киназной активностью десенсибилизация происходит через несколько минут, а иногда и часов. Такое различие убедительно доказывает существование разных механизмов, ответственных за потерю активности рецепторов. В случае нАХР десенсибилизированный рецептор имеет более высокое сродство к агонисту, чем тот же рецептор в активной конформации при открытом состоянии канала, причем одного этого уже достаточно для осуществления перехода к десенсибилизированному состоянию, но прежде ионный канал должен открыться и закрыться множество раз. Удаление агониста немедленно приводит к выходу из состояния десенсибилизации. Некоторые управляемые лигандами ионные каналы после активации могут подвергаться фосфорилированию, что так-

же может облегчать наступление десенсибилизации, но с более низкими скоростями.

Считается, что относительно более позднее наступление десенсибилизации рецепторов, связанных с G-белком, и рецепторов с протеинкиназной активностью объясняется ковалентной модификацией рецепторов в результате фосфорилирования участков, отличных от тех, по которым происходит автофосфорилирование, необходимое для их активации. Следующее за активацией фосфорилирование остатков тирозина, серина или треонина во внутриклеточном домене рецептора вводит в молекулу полярную фосфатную группу, которая может вызывать конформационные изменения, не совместимые с нормальным функционированием рецептора. Изучение рецепторов, связанных с G-белком, показало, что фосфорилирование под действием киназ, активируемых вторичными мессенджерами, таких как цАМФ-зависимая киназа или протеинкиназа А, приводит к нарушению взаимодействия рецептора с G-белком. Фосфорилирование могут осуществлять также семь рецепторов из семейства серин/треонинспецифических киназ, связанных с G-белком (GRK1–7), которые способны воздействовать на связанные с агонистом или обладающие конститутивной активностью рецепторы. Кроме того, фосфорилирование рецепторов инициирует их **интернализацию** и **транспорт** (рецикл и деградацию). Интернализация может происходить по нескольким механизмам, среди которых лучше всего изучен **эндоцитоз**.

16.6.2 Эндоцитоз и перемещение рецепторов

Интернализация и перемещение рецепторов наиболее детально изучены для рецепторов, связанных с G-белком, в частности для β_2-адренергического рецептора. Процесс включает три стадии.

- Перемещение рецепторов, обычно находящихся в связи с агонистами (**зависимая от лиганда интернализация**), но иногда без агонистов (**независимая от лиганда интернализация**), в определенные участки мембраны. При реализации зависимого от лиганда пути перед интернализацией происходит фосфорилирование рецептора под действием GRK.
- Интернализация рецепторов с образованием **ранней эндосомы** (**рецептосомы**).
- Внутриклеточная сортировка эндосом для последующего рецикла рецепторов или их деградации после слияния эндосомы с лизосомой.

В результате процесса эндоцитоза внеклеточные молекулы и мембранные белки, в том числе и рецепторы, проникают в клетку. Процесс вхождения рецепторов в клетку изучают флуоресцентными методами, используя в качестве метки зеленый флуоресцентный белок или один из его генно-инженерных вариантов (разд. 16.3.1). В случае рецепторов, связанных с G-белком, после связывания лиганда и G-белка рецепторы подвергаются лигандзависимому фосфорилированию под действием GRK, что стимулирует взаимодействие с одним из адапторных белков из семейства β-аррестинов.

Эти находящиеся в цитозоле адапторные молекулы способствуют разрыву связи рецепторов с G-белками и вовлечению рецепторов в так называемые **покрытые** (или **окаймленные**) **ямки** на мембране, где рецепторы связываются с белком **клатрином** при участии еще одного адапторного белка, называемого AP-2. Этот белок взаимодействует с фосфоинозитидами и способствует как образованию покрытых ямок, так и привлечению в них активированных рецепторов. Участок Tyr-X-Arg-Phe, расположенный вблизи С-конца молекулы рецептора, связывается с одним концом AP-2, а другой конец этого белка связывается с клатрином. Покрытые ямки — это такие участки на поверхности мембраны, в которых сосредоточено много клатрина, располагающегося на цитоплазматической стороне мембраны. Ямки имеют тенденцию сосредотачиваться в одной области клетки, а затем сливаться воедино. Белок клатрин состоит из трех тяжелых и трех легких цепей, способных образовывать полимер со структурой в виде сети или решетки, который связывается с С-концевой областью рецептора. Для полимеризации клатрина необходимо предварительное фосфорилирование легких цепей в нескольких участках, возможно, под действием нескольких киназ. В стабилизации сети клатрина принимают участие ионы Ca^{2+}. Полимерная сеть клатрина деформирует мембрану и способствует «отпочковыванию» покрытых ямок с образованием **эндоцитозных везикул**. Как только везикула образуется, она теряет клатриновую оболочку; это происходит при участии одного из членов семейства белков теплового шока (heat shock protein, hsp70). Далее везикулы сливаются, образуя ранние эндосомы, или рецептосомы (рис. 16.14). При образовании эндосом цитоплазматическая часть рецептора остается обращенной наружу. Кроме адапторных белков AP-1 и AP-2 идентифицирован еще ряд других, причем по крайней мере два из них — AP-3 и AP-4 — могут действовать независимо от клатрина. Детали механизма интернализации рецепторов, не зависимой от связывания лиганда, изучены в меньшей степени. По всей видимости, в этом процессе не участвуют аррестины и GRK, но AP-2 и покрытые клатрином ямки также играют важную роль в образовании эндосомы.

Как только внутри клетки образовалась эндосома, происходит деполимеризация клатриновой сети, возможно, при участии hsp70, сопровождающаяся гидролизом АТФ. Далее для попавших в эндосому рецепторов возможно два пути развития событий:

- дефосфорилирование с последующим возвращением в мембрану функционального рецептора;
- протеолиз с утратой функции мембранного рецептора — процесс так называемой **даунрегуляции**.

Пути сортировки в эндосомах определяются под действием **сигналов сортировки**. Основной сигнал сортировки связан с цитоплазматическим участком самого рецептора. Например, PDZ-связывающий домен в С-концевой области β_2-адренергического рецептора взаимодействует с белком, называемым эзрин–моезинсвязывающим фосфопротеином 50 (EBP50). В результате рецептор направляется на рецикл. В этом процессе также прини-

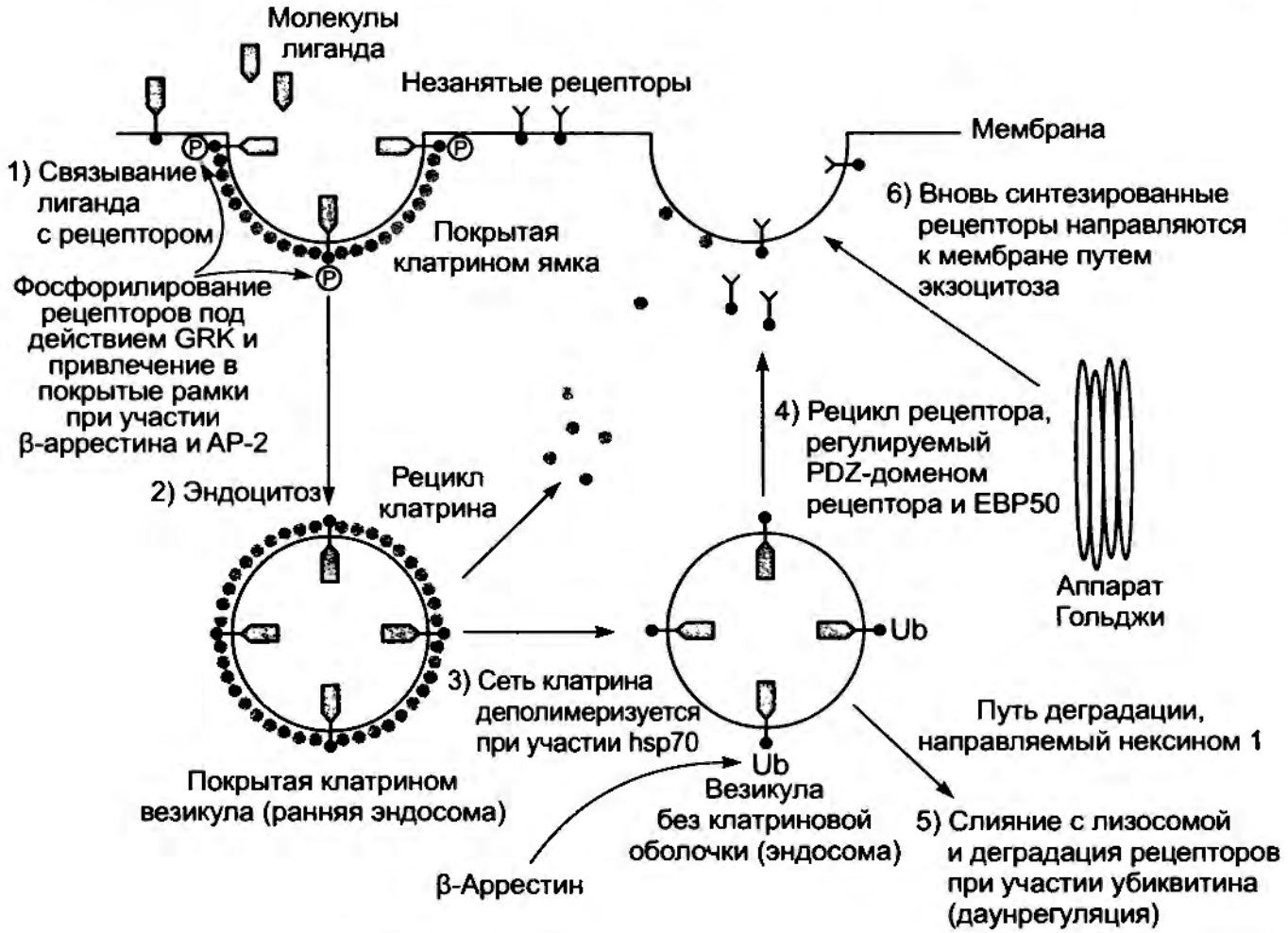


Рис. 16.14. Лигандзависимая интернализация рецептора, связанного с G-белком, и сортировка в эндосомах. 1) Связанные с лигандом рецепторы фосфорилируются (P) под действием связанной с G-белком киназы (GRK), что приводит к привлечению аррестинов. Аррестины выступают в роли адапторных белков, связывая фосфорилированные рецепторы с компонентами транспортной системы — клатрином и адапторным белком AP-2 — и привлекая их в покрытые клатрином ямки. 2) Под действием сети клатрина покрытые ямки образуют углубления внутрь цитоплазмы, что приводит к формированию эндосом. Обратите внимание, что цитоплазматический домен рецептора в процессе эндоцитоза остается экспонированным в цитоплазму. 3) Клатриновая сеть подвергается деполимеризации, а клатрин направляется на рецикл. 4) Рецепторы дефосфорилируются и в результате взаимодействия EBP50 с PDZ-доменом рецептора направляются обратно к поверхности клетки, что приводит к их ресенсибилизации. 5) Альтернативный ход событий: дефосфорилированные рецепторы связываются с убиквитином (Ub) и направляются на деградацию. Они взаимодействуют с нексином 1, который стимулирует слияние эндосомы с лизосомой и деградацию рецептора с помощью ряда протеасом (процесс даунрегуляции). 6) Из аппарата Гольджи вновь синтезированные молекулы рецепторов направляются на внутреннюю поверхность мембраны путем экзоцитоза. Равновесие циклов рецепторов — их деградация, синтез и экзоцитоз — определяет количество функциональных рецепторов на поверхности мембраны в любой момент времени

мают участие аррестин и так называемый N-этилмалеимидчувствительный белок слияния (NSF) (рис. 16.14). Отправляющиеся на рецикл рецепторы сначала дефосфорилируются под действием связанной с эндосомой фосфатазы и направляются в мембрану через аппарат Гольджи. Рецепторы, утратившие PDZ-домен, направляются на деградацию. В случае предна-

значенных для деградации рецепторов сигнал сортировки также исходит из их С-концевой области. В данном случае эта область рецептора взаимодействует с белком нексином 1, участвующим в слиянии эндосомы с лизосомой, в результате чего pH внутри этой частицы снижается до 5,3, что облегчает протеолитическое расщепление рецепторного белка. Кроме того, имеются данные, что этот процесс зависит от связывания рецептора с убиквитином, возможно, при активном участии аррестина. Убиквитин помечает белки, направляющиеся на деградацию. В этом процессе принимают участие несколько протеасом (разд. 15.5.4).

Большая часть исследований механизма эндоцитоза рецепторов проводилась на сравнительно небольшом количестве рецепторов, связанных с G-белком, и нескольких рецепторах с протеинкиназной активностью (например, рецепторе эпидермального фактора роста). Остается выяснить, насколько универсален эндоцитоз с образованием покрытых клатрином ямок для других многочисленных рецепторов и для различных типов клеток. Однако уже сегодня ясно, что экспрессия, регуляция и десенсибилизация рецепторов зависят от разнообразных белок–белковых взаимодействий, многие из которых происходят на поверхности мембраны и вызывают значительные конформационные изменения рецепторов и эффекторов, причем конечная цель всех этих процессов — привести активность рецептора в соответствие с текущими нуждами клетки и всего организма. Очевидно также, что обратимое фосфорилирование играет ключевую роль в регуляции активности рецепторов и их эффекторов.

Временны́е вариации количества рецепторов, доступных для связывания лиганда, являются результатом перемещения рецепторов и их синтеза, который происходит в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. Сигнальная последовательность белка определяет его узнавание и транспортировку в аппарат Гольджи, где белок подвергается гликозилированию, упаковывается в покрытые везикулы и внедряется в мембрану в результате **экзоцитоза**, в котором клатрин играет ключевую роль. Равновесие между синтезом, рециклом и деградацией рецепторов контролируется с помощью различных механизмов, так что количество свободных рецепторов на внешней стороне клеточной мембраны соответствует конкретным физиологическим нуждам. Временны́е вариации числа мембранных рецепторов играют важную роль в клинических реакциях на длительный прием лекарственных препаратов, который приводит к снижению числа рецепторов, а также в нейродегенеративных заболеваниях, при которых наблюдается дефицит физиологических агонистов, приводящий к увеличению числа рецепторов.

16.7 ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Общая информация

FORMAN, J.C. and JOHANSEN, T. (ed) (2002) *Textbook of Receptor Pharmacology*, 2nd edn. CRC Press, New York. Авторитетный источник информации в области молекулярной биологии рецепторов, количественных аспектов связывания лиганда и систем проведения сигнала. Содержит задачи для студентов.

HARDING, S.E. and CHOUDHRY, B.Z. (ed.) (2001) *Protein–Ligand Interactions: Structure and Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford. Применение различных спектральных методов при изучении структуры рецепторов и связывания лиганда.

MOLLEMAN, A. (2003) *Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electophysiology*. Wiley, Chichester. Автономное издание, отражающее некоторые аспекты биофизики мембран, постановку эксперимента, методы обработки результатов и некоторые особенности метода patch clamping.

Обзорные статьи

DEVI, L.A. (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends in Pharmacological Sciences*, **22**, 532–537.

GUREVICH, V.V. and GUREVICH, E.V. (2004) The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**, 105–111.

HOVIUS, R., VALLOTTON, P., WOHLAND, T., and VOGEL, H. (2000) Fluorescence techniques: shedding light on ligand–receptor interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 266–272.

KALLAL, L. and BENOVIC, J.L. (2000) Using green fluorescent protein to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**, 175–180.

KENAKIN, T. (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**, 346–354.

MARCHESE, A., CHEN, C., KIM, Y.-M., and BENOVIC, J.L. (2003) The ins and outs of G-protein-coupled receptor trafficking. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 369–376.

MEYER, T. and TERUEL, M.N. (2003) Fluorescence imaging of signaling networks. *Trends in Cell Biology*, **13**, 101–106.

MORFIS, M., CHRISTOPOULOS, A., and SEXTON, P.M. (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**, 596–601.

NEDLELKOV, D. and NELSON, R.W. (2003) Surface Plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlook. *Trends in Biotechnology*, **21**, 301–305.

ROBERTSON, A.D. (2002) Intramolecular interactions at protein surfaces and their impact on protein function. *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 521–526.

ROBINSON, M.S. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends in Cell Biology*, **14**, 167–174.

SKLAR, L.A., EDWARDS, B.S., GRAVES, S.W., NOLAN, J.P., and PROSSNITZ, E.R. (2002) Flow cytometric analysis of ligand–receptor interactions and molecular assemblies. *Annual Reviews of Biophysics and Molecular Structures*, **31**, 98–119.

STRANGE, P.G. (2002) Mechanisms of inverse agonism at G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**, 89–95.

TOLLIN, G., SALAMON, Z., and HRUBY, V.J. (2003) Techniques: Plasmon-waveguide resonance (PWR) spectroscopy as a tool to study ligand–GPCR interactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**, 655–659.

Полезные Интернет-сайты

G-белки

<www.gpcr.org>

<www.cis.upenn.edu/~krice/receptor.html>

Эндоцитоз рецепторов

<www.cytochemistry.net/cell-biology/recend.htm>

<cellbio.utmb.edu/cellbio/recend.htm>

Методы

<www.biochem.arizona.edu/tollin/cpwr/principl.htm>

<www.biacore.com>

Оглавление

Предисловие редакторов перевода 5
Предисловие редакторов шестого издания 7
Авторы 9
Принятые сокращения 11

Глава 1. Теоретические основы биохимического анализа 13
К. УИЛСОН (разд. 1.7 в соавторстве с Дж. Файффом)
1.1. Общие понятия 13
1.2. Единицы измерения (размерности) 15
1.3. Слабые электролиты 22
1.4. Буферные растворы — их природа и способы приготовления 27
1.5. pH-электрод и кислородный электрод 30
1.6. Количественный биохимический анализ 41
1.7. Основы клинического биохимического анализа 62
1.8. Техника безопасности в лаборатории 84
1.9. Дополнительная литература 86

Глава 2. Методы культивирования клеток 87
Э. БЕЙДОУН
2.1. Введение 87
2.2. Лаборатория и оборудование для культивирования клеток 88
2.3. Техника безопасности при работе с культурой клеток 93
2.4. Методы стерилизации и правила работы с культурой клеток 94
2.5. Типы животных клеток. Характеристики клеток в культуре 98
2.6. Культура клеток бактерий 111
2.7. Культура клеток растений 115
2.8. Применение клеточных культур 120
2.9. Дополнительная литература 121

Глава 3. Центрифугирование 122
К. ОЛЕНДИК
3.1. Введение 122
3.2. Теоретические основы седиментации 123
3.3. Типы центрифуг. Правила работы и техника безопасности 128
3.4. Препаративное центрифугирование 137
3.5. Аналитическое центрифугирование 146
3.6. Дополнительная литература 151

Глава 4. Микроскопия 152
С. ПЭДДОК
4.1. Введение 152
4.2. Световой микроскоп 155
4.3. Оптические срезы 168
4.4 Визуализация живых клеток и тканей 173
4.5. Стереомикроскоп 177
4.6. Электронный микроскоп 177
4.7. Получение изображений в биохимии 182
4.8. Специальные методы получения изображения 185
4.9. Сохранение изображений, их представление и другая информация 186
4.10. Дополнительная литература 187

Глава 5. Теоретические основы молекулярной биологии и биоинформатики. Методы 189
Р. РЕЙПЛЭЙ
5.1. Введение 189
5.2. Структура нуклеиновых кислот 190
5.3. Гены и структура генома 197
5.4. Локализация и упаковка нуклеиновых кислот 201
5.5. Функции нуклеиновых кислот 203
5.6. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами: основные инструменты и методы 215
5.7. Выделение и разделение нуклеиновых кислот 216
5.8. Молекулярная биология и биоинформатика 224
5.9. Молекулярный анализ последовательности нуклеиновых кислот 226
5.10. Полимеразная цепная реакция 234
5.11. Определение первичной нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование) 244
5.12. Дополнительная литература 252

Глава 6. Рекомбинантная ДНКи генетический анализ 253
Р. РЕЙПЛЭЙ
6.1. Введение 253
6.2. Библиотеки генов 254

6.3. Векторы для клонирования ... 264
6.4. Гибридизация и зонды ... 284
6.5. Скрининг геномных библиотек (клонотека) ... 286
6.6. Применение клонирования генов ... 290
6.7. Экспрессия чужеродных генов ... 296
6.8. Анализ генов и их экспрессии ... 302
6.9. Анализ целых геномов ... 317
6.10. Фармакогеномика ... 324
6.11. Молекулярная биотехнология и ее применение ... 324
6.12. Дополнительная литература ... 327

Глава 7. Иммунохимические методы ... 328
Р. ТОРП и С. ТОРП
7.1. Введение ... 328
7.2. Получение антител ... 334
7.3. Очистка иммуноглобулинов и получение их фрагментов ... 346
7.4. Иммунопреципитация ... 353
7.5. Мечение антител ... 360
7.6. Иммуноблоттинг ... 368
7.7. Иммуноанализ ... 370
7.8. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические методы ... 381
7.9. Аффинность и авидность ... 387
7.10. Поверхностный плазмонный резонанс в иммунохимии ... 388
7.11. Дополнительная литература ... 388

Глава 8. Структура белков. Функциональный анализ и методы очистки ... 390
ДЖ. УОЛКЕР
8.1. Ионные свойства аминокислот и белков ... 390
8.2. Структурная организация белков ... 394
8.3. Очистка белков ... 398
8.4. Методы определения строения белка ... 421
8.5. Протеомика. Функции белка ... 437
8.6. Дополнительная литература ... 449

Глава 9. Методы масс-спектрометрии ... 450
Э. ЭЙТКЕН
9.1. Введение ... 450
9.2. Ионизация ... 452
9.3. Масс-анализаторы ... 459
9.4. Детекторы ... 477
9.5. Получение структурной информации методом тандемной масс-спектрометрии ... 477
9.6. Анализ белковых комплексов ... 490
9.7. Обработка результатов. Анализ баз данных ... 494
9.8. Дополнительная литература ... 496

Глава 10. Методы электрофореза 498
ДЖ. УОЛКЕР
10.1. Основы метода 498
10.2. Матрица 502
10.3. Электрофорез белков 507
10.4. Электрофорез нуклеиновых кислот 524
10.5. Капиллярный электрофорез 529
10.6. Электрофорез на микрочипах 535
10.7. Дополнительная литература 536

Глава 11. Хроматографические методы 537
К. УИЛСОН
11.1. Теоретические основы хроматографии 537
11.2. Параметры хроматографического процесса 542
11.3. Жидкостная хроматография (LPLC и ВЭЖХ) 553
11.4. Адсорбционная хроматография 570
11.5. Распределительная хроматография 574
11.6. Ионообменная хроматография 580
11.7. Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация) 585
11.8. Аффинная хроматография 589
11.9. Газожидкостная хроматография 596
11.10. Тонкослойная (планарная) хроматография 603
11.11. Выбор хроматографической системы 606
11.12. Дополнительная литература 607

Глава 12. Спектральные методы.
I. Атомная и молекулярная спектроскопия 608
Д. ГОРДОН
12.1. Введение 608
12.2. Гамма-спектроскопия и гамма-резонансная спектроскопия 612
12.3. Рентгеновская спектроскопия 613
12.4. Спектроскопия в ультрафиолетовом и видимом диапазоне 615
12.5. Спектрофлуориметрия 629
12.6. Круговой дихроизм 639
12.7. Турбидиметрия и нефелометрия 642
12.8. Люминометрия 643
12.9. Атомная спектроскопия 646
12.10. Лазеры 651
12.11. Дополнительная литература 652

Глава 13. Спектральные методы. II. Колебательная спектроскопия. Спектроскопия ЭПР и ЯМР 653
Д. ГОРДОН
13.1. Введение 653
13.2. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния 654
13.3. Электронный спиновый резонанс 657
13.4. Ядерный магнитный резонанс 664
13.5. Дополнительная литература 681

Глава 14. Радиоизотопные методы 682
Р. СЛЕЙТЕР
14.1. Природа радиоактивности 682
14.2. Методы детектирования и измерения радиоактивности 690
14.3. Другие практические аспекты измерения радиоактивности 715
14.4. Преимущества и ограничения экспериментов с радиоактивной меткой 720
14.5. Техника безопасности 721
14.6. Радиоизотопы в биологических исследованиях 724
14.7. Дополнительная литература 729

Глава 15. Ферменты 730
К. УИЛСОН
15.1. Общая характеристика. Номенклатура 730
15.2. Методы изучения ферментативных реакций 734
15.3. Стационарная кинетика ферментативных реакций 747
15.4. Активные центры ферментов и механизмы катализа 771
15.5. Регуляция активности ферментов 779
15.6. Дополнительная литература 788

Глава 16. Мембранные рецепторы 789
К. УИЛСОН
16.1. Роль рецепторов в передаче сигнала 789
16.2. Количественные аспекты связывания лигандов с рецепторами 790
16.3. Методы изучения лиганд-рецепторного взаимодействия 800
16.4. Структура рецепторов 819
16.5. Механизмы передачи сигнала 825
16.6. Десенсибилизация и перемещение рецепторов 838
16.7. Дополнительная литература 842