

И. Л. Юркова

# БИОАНАЛИТИКА



ПОСОБИЕ

И. Л. Юркова

# БИОАНАЛИТИКА

*Рекомендовано*

*Учебно-методическим объединением*

*по естественнонаучному образованию в качестве пособия*

*для студентов учреждений высшего образования,*

*обучающихся по специальностям 1-31 05 01 «Химия (по направлениям)»,  
направления специальности 1-31 05 01-01 «Химия (научно-производственная  
деятельность)» и 1-31 05 01-03 «Химия (фармацевтическая деятельность)»,*

*1-31 05 02 «Химия лекарственных соединений»*

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072я73  
Ю64

**Рецензенты:**

кафедра химии Белорусского государственного педагогического  
университета имени Максима Танка (заведующий кафедрой  
доктор биологических наук, профессор *В. Н. Никандров*);  
доктор химических наук, профессор *Е. И. Квасюк*

**Юркова, И. Л.**

Ю64 Биоаналитика : пособие / И. Л. Юркова. — Минск : БГУ, 2017. — 359 с.  
ISBN 978-985-566-457-5.

Рассматриваются способы и методы, используемые на преаналитических стадиях анализа биологических молекул в комплексных матрицах (гомогенизация, осаждение, разделение компонентов с помощью мембран, экстракция, препаративные центрифугирование и хроматография). На современном научном уровне изложены теоретические основы и методики гель- и капиллярного электрофореза, ферментативного и иммунного анализа.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-31 05 01 «Химия (по направлениям)», направления специальности 1-31 05 01-01 «Химия (научно-производственная деятельность)» и 1-31 05 01-03 «Химия (фармацевтическая деятельность)», 1-31 05 02 «Химия лекарственных соединений».

**УДК 577.1(075.8)**  
**ББК 28.072я73**

**ISBN 978-985-566-457-5**

© Юркова И. Л., 2017  
© БГУ, 2017

Рубеж XX–XXI вв. отмечается мощным развитием биохимии и фармацевтики, молекулярной медицины и иммунологии, микробиологии и генетики, токсикологии и экологии, альтернативной энергетики и химии пищевых продуктов. Достижения и дальнейший прогресс в данных областях науки и техники связаны с развитием и совершенствованием биоаналитики. Биоаналитика и разработка базирующихся на ней диагностических систем наряду с производством медикаментов и регенеративной медициной составляют значительную часть современной биотехнологии.

Биоаналитика является междисциплинарной областью знаний, сформированной на стыке аналитической химии, биохимии, молекулярной биологии и материаловедения. Это, по сути, новая инновационная отрасль науки, которая стремительно развивается.

Биоаналитика охватывает, с одной стороны, мощный и многосторонний арсенал аналитических методов для анализа низкомолекулярных биологически активных соединений и биополимеров в комплексных биологических матрицах и с другой — использование биомолекул в качестве распознающих элементов для анализа иных молекул.

В настоящее время особенно возрастает роль функционального биоанализа (англ. biomolecular interaction analysis (BIA)), цель которого заключается в исследовании взаимодействий макромолекул и биологически активных соединений. Понимание основ молекулярного взаимодействия рецептора (белок, ДНК, антитело и т. д.) с лигандом (полисахарид, лекарственное соединение, антиген и т. д.) открывает перспективы в разработке новых диагностических тестов и фармацевтических препаратов.

При анализе сложных по составу биологических проб, в которых присутствуют тысячи различных компонентов, варьирующихся по концентрации в широком диапазоне, огромное значение имеет преаналитический этап. В данном пособии представлены аналитические методы, необходимые для разделения и концентрирования аналитов в целях их последующего качественного и количественного исследования. Кроме того, приведена информация об основных биомолекулах, так как знание физико-химических свойств анализируемых молекул определяет стратегию и качество их анализа.

В анализе биополимеров важное место занимает гель-электрофорез (гель-ЭФ). В издании рассматриваются как классические, так и новые техники метода, например двумерный гель-ЭФ, актуальный в протеомике, и дифференциальный 2D-гель-ЭФ, уникальность которого состоит в возможности одновременного анализа нескольких биопроб.

Современную биоаналитику трудно представить без такого метода, как капиллярный электрофорез (КЭ), который по своей эффективности превосходит высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). С помощью КЭ возможно выявление не только заряженных, но и нейтральных компонентов. Аффинный КЭ

актуален в анализе молекулярных взаимодействий «биоэффектор – лиганд». Метод КЭ используют для анализа с помощью микрофлюидных чипов. Он находит все большее применение в анализе пищевых продуктов, наркотиков, лекарственных средств, пестицидов и их метаболитов в биопробах.

В пособии также представлены классические биоаналитические виды анализа – ферментативный и иммунный, высокая специфичность и чувствительность которых позволяют проводить исследование комплексных образцов с минимальной пробоподготовкой (или без нее). Ферментные и иммунохимические методы используют для разработки экспрессных тест-систем для скрининга пестицидов, наркотиков и лекарственных средств в биожидкостях.

В каждой главе материал представлен как совокупность теоретических основ и методических указаний, необходимых для понимания и применения каждого метода. Для углубленного изучения отдельных методов целесообразно обращаться к специализированным монографиям.

Для аналитика, занятого в области современного биоанализа, актуально и необходимо знание и владение различными аналитическими методами. Настоящее пособие в компактной форме обобщает в себе как различные физико-химические методы (хроматографические, спектрометрические, электрофоретические и др.) для характеристики биологических молекул, так и специальные – иммунохимические и ферментные, в которых биомолекулы служат «инструментами» для детектирования целевых аналитов.

Возрастающая роль биоаналитики в научной и производственной сферах создает необходимость ее введения в обучающий процесс для студентов химических и биохимических специальностей. Издание также может быть полезно магистрантам и аспирантам естественнонаучных специальностей, сотрудникам специализированных лабораторий для успешного решения биоаналитических задач.



Биоаналитика – совокупность физико-химических методов для непосредственного анализа биологических макромолекул и биологически активных соединений, с одной стороны, и использование биомолекул (ферментов, антител) в качестве распознающих элементов для анализа других биомолекул или небιологических низкомолекулярных веществ – с другой.

Предмет биоаналитики – это выделение, очистка, качественный и количественный анализ белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и других биологических молекул, а также метаболитов или биологически активных веществ.

Сфера применения биоаналитики очень широка. Она охватывает важнейшие области науки и техники, связанные с жизнедеятельностью человека. К ним относятся биотехнологии, в том числе биофармацевтика; система экомониторинга, токсикология; система оценки качества продуктов пищевой, косметической и парфюмерной промышленности; клинико-диагностические лаборатории, сельское хозяйство. Фокус биоанализа в фармацевтической индустрии – это фармако- и токсикокинетика, биоэквивалентность.

Успех в таких разделах молекулярной медицины, как фармакогенетика и фармакогеномика, напрямую связан с развитием биоанализа. Фармакогеномика представляет собой прикладное применение всего генома человека, в котором фармакогенетика изучает взаимодействие отдельного гена с лекарственным средством. Исследования на геномном уровне позволяют выяснить характер реакций организма отдельного человека на конкретное лекарство в зависимости от наследственных факторов и определить, можно ли использовать его для лечения. Благодаря этому минимизируются побочные эффекты фармпрепаратов.

В целом арсенал биоаналитики включает в себя классические физико-химические методы (хроматографические, спектрометрические, спектроскопические, электрофоретические и др.), а также специальные (иммунологические, ферментные, биосенсорные). Последние относят к классическим селективным биоаналитическим методам.

Важный вклад в развитие методологической базы биоаналитики вносят тандемные методы анализа. Они представляют собой сочетание отдельных методов: жидкостной (газовой, планарной) хроматографии и масс-спектрометрии, капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии, экстракции и хроматографии и т. п.

Развитие и совершенствование методов биоаналитики стимулируется и мотивируется в первую очередь задачами изучения генома, протеома и липидома человека. В 2010 г. стартовал проект «Протеом человека» (под эгидой международной организации HUPO (Human Proteome Organization)), который по аналогии с программой «Геном человека», позволившей расшифровать гены в составе генома

(формально завершённой в 2001–2003 гг.), ставит своей задачей идентифицировать все белки человека. Состав протеома, в отличие от генома, крайне изменчив и представляет собой совокупность большого разнообразия молекул в широком диапазоне концентраций. Количество копий тех или иных белков (англ. *copied* используют вместо *abundance*), приходящихся на одну клетку, может колебаться от нескольких десятков (менее 50) до миллионов. Вместе с тем не существует методов для увеличения количества определенного белка в отличие от ДНК, которую можно размножить методом ПЦР. Это стимулирует развитие высокочувствительных методов анализа, позволяющих снизить объемы исследуемой пробы и пределы обнаружения веществ (вплоть до регистрации единичных молекул, частиц и их комплексов). Важно не только установить состав и пространственную структуру отдельных макромолекул, но и выявить молекулярные механизмы действия, т. е. определить их функции. Последнее послужило развитию такой новой области биоаналитики, как функциональная аналитика, когда биохимические методы позволяют изучать наряду с составом и структурой взаимодействие макромолекул друг с другом и с низкомолекулярными соединениями.

В целом тенденции в развитии биоаналитических методов в последние годы связаны с миниатюризацией (создание микроаналитических систем – микрофлюидных чипов, биочипов, наносенсоров), мультиплексностью (параллельность анализов) и автоматизацией в измерении и оценке результатов. Биоаналитический анализ требует статистической обработки огромного количества данных, поэтому в планировании и оценке эксперимента возрастает роль биоинформатики.

Объектами анализа биоаналитика, как правило, являются чрезвычайно комплексные пробы. Для таких проб характерно огромное разнообразие высоко- и низкомолекулярных веществ с различным составом и структурой. К тому же каждый класс веществ содержит много подобных друг другу соединений, отличающихся по структуре незначительно, а диапазон концентраций компонентов очень широк.

В биоаналитике не существует стандартных схем анализа, важна *постановка его задачи*. Целью биоанализа могут быть установление молекулярного состава отдельных органов, клеток или клеточных органелл; поиск в организме конкретного соединения (например, лекарственного метаболита, наркотика или белка – маркера конкретной болезни) или определенной последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, изолирование и характеристика неизвестных ферментов, выявление состава отдельных частиц пула мембранных липидов; идентификация углеводного компонента гликопротеина, изучение биоспецифических взаимодействий белка, анализ пестицидов в пищевых продуктах и т. п. Задача анализа обуславливает степень чистоты, активности, количество конечного продукта и подбор преаналитических и аналитических процедур. Примером этому служит выделение из образцов индивидуальных белков с необходимой степенью чистоты, что определяется их последующим применением. Высокоочищенные белки могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов в медицине (гормон инсулин, пищеварительные ферменты поджелудочной железы), менее очищенные – как химические реактивы в биохимических исследованиях биожидкостей.

Решение биоаналитической задачи включает в себя, как правило, следующие стадии:

1) ознакомление с физико-химическими свойствами биомолекул или биологически активных веществ (гидрофобность, молекулярный вес, пространственная структура, сродство с другими веществами, взаимодействие с электромагнитными волнами и др.), а также со свойствами основных примесей (биомолекулы могут быть целенаправленно химически или ферментативно модифицированы);

2) теоретическое и практическое изучение основ различных методов пробоподготовки и анализа для их эффективного применения;

3) выбор отдельного метода на основе полученных знаний или (в случае сложности исследуемой системы) серии методов и определение их последовательности.



# ГЛАВА 1

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Для успешного решения поставленных задач биоаналитик должен владеть знаниями о физико-химических свойствах анализируемых молекул. В этой главе кратко представлены свойства важнейших биомолекул – белков, нуклеиновых кислот, липидов и углеводов. Для получения более детальной и углубленной информации необходимо обратиться к специальной биохимической литературе. Структура и свойства биомолекул определяют процедуру их анализа. Чем больше сведений, тем лучшую экспериментальную стратегию можно разработать. В целом при изучении физико-химических свойств биологических молекул в целях их последующего анализа нужно учитывать молекулярную массу, суммарный заряд, соотношение полярных и неполярных групп на поверхности молекулы, ее размер и форму, пространственную структуру, взаимодействие с электромагнитными излучениями, гидрофобность и гидрофильность.

### 1.1. Белки

Белки (греч. *proteios* – протеины) представляют собой высокомолекулярные органические вещества и являются главным «строительным элементом» всех живых организмов, способствующим протеканию важнейших процессов их жизнедеятельности. Такие высокоспецифичные белки, как ферменты, выполняющие роль катализаторов биохимических процессов, или антитела, обеспечивающие защитную функцию организма, могут быть не только объектами анализа, но и выступать в качестве биохимических реагентов при его проведении.

Индивидуальные белки состоят из остатков 20 различных 2-аминокарбоновых кислот, образующих пептидную цепь между  $\alpha$ -карбоксильной и  $\alpha$ -аминогруппой. Аминокислотные остатки связаны в цепочку последовательно и формируют полипептидную цепь, которая имеет одно направление и два разных конца, – N-конец, несущий свободную аминогруппу первой аминокислоты, и C-конец, несущий карбоксильную группу последней кислоты. Общее число и состав аминокислот изменяются в индивидуальном порядке от белка к белку, количество остатков тех или иных аминокислот – алифатических, серосодержащих, ароматических, кислых, основных – определяет физико-химические свойства белка. Например, остатки ароматических кислот – триптофана, тирозина и фенилаланина – характеризуют оптические свойства белка. Кроме того, в молекуле белка могут содержаться фрагменты различных биомолекул (например, остатки сахаров у гликопротеинов), влияющие на химическое и физическое поведение белка. Эти особенности белков нужно

учитывать при выборе методов их определения. В принципе, не существует таких методов, которые могли бы в равной степени отразить все свойства одного белка. Как правило, методы, базирующиеся на цветной реакции или способности поглощать/испускать свет, основываются только на некоторых группах белка. Если такие группы в белке или смеси белков встречаются случайным образом, то это приводит к ошибочному завышенному содержанию белка или наоборот. Некоторые цветные реакции базируются на комплексообразующих или восстанавливающих свойствах пептидной связи и являются хорошим средством для количественного определения белков, так как они мало зависят от индивидуального аминокислотного состава. Другие методы, основывающиеся на свойствах остатков аминокислот, в большей степени субъективны. Выбор метода в конечном итоге определяется поставленными практическими задачами.

Аминокислотная последовательность полипептидной цепи представляет собой первичную структуру макромолекулы белка. Вторичная структура формируется участками полипептидной цепи с упорядоченной конформацией, стабилизированной водородными связями ( $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складчатые листы,  $\beta$ -петли). Трехмерные конформации пептидных цепей, стабилизированные дисульфидными, ионными, водородными или гидрофобными связями, образуют третичные структуры белков. Четвертичную структуру белка формируют несколько полипептидных цепей (субъединиц или мономеров), объединенных в комплекс за счет нековалентных взаимодействий, который называется олигомером.

Нативная конформация белков стабильна при физиологических условиях, но при изменении окружающих условий она может быть потеряна при сохранении первичной структуры, т. е. происходит денатурация белка. В клетках существуют специфические протеины (шапероны), которые защищают другие белки от денатурации. Экстремальные значения pH среды, высокая температура, действие органических растворителей или детергентов ведут к денатурации белков из-за разрыва связей, стабилизирующих четвертичную, третичную, вторичную структуры белка. Потеря нативной структуры сопровождается изменением его физико-химических свойств (растворимость, вязкость, химическая активность), снижением или полной потерей биологических функций. Эти свойства белков нужно учитывать при их выделении из анализируемых проб.

*Молекулярная масса* белка зависит от количества аминокислотных остатков в полипептидной цепи, а для олигомерных белков – и от количества входящих в него субъединиц. К примеру, маленький полипептид инсулин состоит из 51 аминокислоты, а компонент липопротеинов низкой плотности аполипопротеин В – более чем из 4600 аминокислот. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 до 1 000 000 Да и выше (дальтон – несистемная единица, равная 1/12 массы  $^{12}\text{C}$  и соответствующая  $1,66 \cdot 10^{-24}$  г). Чем больше молекулярная масса белка, тем труднее его изолировать и очистить. Эффективность физико-химического метода (максимальное число анализов, которые могут быть разделены друг от друга при оптимальных условиях) различна для соединений с разной массой. Что касается аминокислот или пептидов (масса до 1000 Да), то с помощью различных видов хроматографии можно разделить до 50 различных анализов в пробе. В случае же разделения комплексных смесей белков наиболее эффективна только ионообменная хроматография, да и то частично. В настоящее время в протеомике (анализ всех белков клетки) для разделения преимущественно используют электрофоретические методы. Следует отметить, что

для очень больших молекул или частиц с массой более 150 кДа (олигонуклеотиды, ДНК, протеиновые комплексы, органеллы) практически не существует эффективных методов разделения. Продуктивность разделения метода, однако, не всегда является главенствующим критерием, зачастую основным параметром метода выступает его селективность, что, например, характерно для аффинной хроматографии. В последнем случае единичные макромолекулы из комплексной смеси можно изолировать за одну стадию благодаря высокоспецифическим взаимодействиям белков с лигандами.

*Размер* белковых молекул лежит в пределах 1 нм – 1 мкм, следовательно, они являются коллоидными частицами. Коллоидные растворы белков характеризуются высокой вязкостью, способностью рассеивать лучи видимого света, непроходимостью сквозь полупроницаемые мембраны (целлофан, коллоидная пленка). Эти свойства широко используются для очистки белковых препаратов от сторонних примесей.

По *форме* молекул белки делятся на глобулярные и фибриллярные. У глобулярных белков отношение длинной оси молекулы к короткой (степень асимметрии) равно 3–5 нм, у фибриллярных – от 80 до 150 нм. Глобулярные белки отличаются более компактной структурой, их гидрофобные радикалы в большинстве своем спрятаны в гидрофобное ядро, и они значительно лучше растворимы в биологических жидкостях, чем фибриллярные белки, за исключением мембранных. Глобулярные белки в водных растворах имеют более высокий коэффициент диффузии, чем фибриллярные.

При выборе метода очистки и разделения важную роль играет *растворимость белков*, так как в конечном итоге для последующего качественного анализа необходимо получить истинный раствор аналита. Растворимость белков в воде обусловлена молекулярной массой, величиной заряда, соотношением полярных и неполярных функциональных групп на поверхности белка, формой молекулы.

Растворимость любого вещества зависит от относительного сродства молекул растворяемого вещества друг к другу (по типу сродства при образовании кристаллической решетки) и к молекулам растворителя. Любой фактор, снижающий взаимодействие молекул растворяемого вещества, будет способствовать его растворению. Растворимость обусловлена наличием заряда (отталкивание заряженных частиц) и гидратной оболочки (чем больше заряд, тем больше гидратная оболочка). Потенциальная энергия (энергия Колумба) между двумя зарядами  $q_1$  и  $q_2$  на расстоянии  $r$  в вакууме составляет  $V = (q_1 q_2) / (4\pi \epsilon_0 r)$ , где  $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12}$ , а в среде (воздух или жидкость) –  $V = (q_1 q_2) / (4\pi \epsilon r)$ . Относительная диэлектрическая проницаемость (диэлектрическая постоянная)  $\epsilon_1 = \epsilon / \epsilon_0$  может иметь решающее влияние на силу взаимодействия между ионами в растворе. Величина  $\epsilon_1$  вещества большая, если его молекулы полярны или легко поляризуются. В растворе с высокой величиной  $\epsilon_1$  взаимодействие между ионами выражено меньше, чем в растворе с низкой  $\epsilon_1$ . Например, этанол с низким значением  $\epsilon_1$  снижает сольватирующие силы водного раствора. Некоторые растворители в порядке возрастания их полярности можно расположить следующим образом: вода – 78,5; метанол – 33,6; ацетон – 20,7; этанол – 24,3; этилацетат – 6,02; диэтиловый эфир – 4,34; хлороформ – 4,48; толуол – 2,38; бензол – 2,28; циклогексан – 2,02; гептан – 1,92; гексан – 1,89.

Растворение белков в воде связано с гидратацией каждой молекулы, что приводит к образованию вокруг белковой молекулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных в определенной форме в пространстве молекул воды. Способность белков связывать воду является следствием действия электростатических сил притяжения между диполями воды и ионными/полярными группами, находящимися на поверхности белковой глобулы (водородные связи и ион-дипольные взаимодействия). Гидратная оболочка предохраняет молекулы белка от слипания и выпадения в осадок. Растворимость белка зависит от его структуры, т. е. от количества полярных и особенно ионизируемых групп: чем больше ионизируемых групп (суммарный заряд), тем выше растворимость.

На поверхности большинства внутриклеточных белков преобладают полярные радикалы  $\alpha$ -аминокислот – серина, цистеина, аспаргина, глутамина, – определяющие электростатическое и гидрофильные взаимодействия. Неполярные радикалы  $\alpha$ -аминокислот – аланина, валина, лейцина – обычно располагаются внутри макромолекулы и обуславливают гидрофобные взаимодействия. Однако соотношение полярных и неполярных групп отлично для разных индивидуальных белков. Растворимость белка снижается по мере увеличения гидрофобных радикалов на поверхности его пространственной структуры. Глобулярные белки обладают лучшей растворимостью, чем фибриллярные. При достаточно большом содержании поверхностных гидрофобных радикалов белки полностью не растворяются, а набухают. Более гидрофобные белки, например интегральные мембранные протеины, можно перевести в раствор с помощью детергентов. Однако надо помнить, что последние могут оказывать денатурирующее действие.

Растворы белков отличаются крайней неустойчивостью, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок. Именно поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (спирт, ацетон, концентрированные растворы нейтральных солей щелочных металлов), а также под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.) наблюдаются дегидратация молекул белка и выпадение их в осадок. Данный процесс может быть обратимым и необратимым.

При экстракции белков из естественного биоокружения иногда теряется их стабильность. Белки могут быть расщеплены ферментами – протеазами – или ассоциироваться в нерастворимые агрегаты, что ведет к потере их активности. И поэтому часто уже на первых шагах извлечения белков из биопроб нужно использовать ингибиторы протеаз, производить очистку быстро и на холоду.

**Суммарный электрический заряд.** Он зависит от рН среды и соотношения кислых и основных аминокислот. Белки способны проявлять как кислые, так и основные свойства, т. е. выступать в роли амфотерных электролитов. Это обеспечивается за счет различных диссоциирующих групп, входящих в состав радикалов аминокислот.

Белки имеют в своем составе радикалы основных (лизин, аргинин, гистидин) и кислотных (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) аминокислот, содержащие функциональные группы, способные к ионизации (ионогенные группы). Кроме того, на N- и C-концах полипептидных цепей имеются  $\alpha$ -амино- и  $\alpha$ -карбоксильная группы, также способные к ионизации. Суммарный заряд белковой молекулы определяется соотношением ионизированных анионных радикалов *глу* и *асп* и катионных радикалов *лиз*, *арг* и *гис*. В белках, где преобладают остатки аспарагиновой

и глутаминовой аминокислот, заряд будет отрицательным. Избыток основных аминокислот придает белковой молекуле положительный заряд. Степень ионизации функциональных групп аминокислотных радикалов зависит от значения рН среды. При рН раствора, близком к семи, все ионогенные группы белка находятся в ионизированном состоянии. В кислой среде увеличение концентрации протонов ( $\text{H}^+$ ) приводит к подавлению диссоциации карбоксильных групп и уменьшению отрицательного заряда белков:  $-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$ . В щелочной среде диссоциация протонированной аминогруппы ( $\text{NH}_3^+$ ) вызывает уменьшение положительного заряда белков:  $-\text{NH}_3^+ + \text{OH}^- \rightarrow -\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

Значение рН среды, при котором молекула белка имеет суммарный нулевой заряд, называют *изоэлектрической точкой* (ИЭТ) и обозначают как *pI*. В ИЭТ количество положительно и отрицательно заряженных групп белка одинаково. Поскольку большинство белков в клетке имеет в своем составе преобладающее число анионных групп ( $-\text{COO}^-$ ), то изоэлектрическая точка таких белков лежит в слабокислой среде в диапазоне 4,5–6,5 (кислые белки). ИЭТ белков, в составе которых больше катионных групп, находится в щелочной среде (основные белки), у нейтральных белков – в пределах значения рН 7. При рН ниже ИЭТ белок содержится в форме поликатиона. При рН выше ИЭТ – в форме полианиона.

Белки, имеющие суммарный положительный или отрицательный заряд, лучше растворимы, чем белки, находящиеся в изоэлектрическом состоянии. Суммарный заряд увеличивает количество диполей воды, способных связываться с белковой молекулой, и препятствует контакту одноименно заряженных молекул, в результате чего растворимость белков увеличивается. Заряженные белки могут двигаться в электрическом поле: анионные белки, имеющие отрицательный заряд, – к положительно заряженному аноду, а катионные – к отрицательно заряженному катоду. Белки, находящиеся в изоэлектрическом состоянии, не перемещаются в электрическом поле. На этом свойстве базируется, например, изофокусирование белков (техника гель-электрофореза).

Для *обнаружения белков или определения их общего содержания* в образцах можно использовать качественные цветные реакции, обусловленные взаимодействием функциональных групп молекул белка и цветообразующего реагента. Интенсивность окраски коррелирует с концентрацией реагирующих групп белка и точно измеряется спектрофотометрически. Оценка общего количества белка осуществляется с помощью калибровочной кривой, для получения которой используют стандартные протеины, например бычий сывороточный альбумин или химотрипсин.

К колориметрическим методам определения общего количества белка относится биуретовая реакция, которая является качественной на пептидные связи. При взаимодействии с солями меди ( $\text{CuSO}_4$ ) в щелочной среде все белки дают фиолетовое окрашивание, обусловленное образованием комплекса ионов меди с пептидными связями белков (540–560 нм). В сформированном комплексе медь связана с четырьмя атомами азота координационными связями, а с двумя атомами кислорода – электростатическими. Несмотря на название реакции, используемый в анализе реагент в действительности не содержит биурет ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ). Метод так назван потому, что реагент дает позитивную реакцию с молекулой биурета. Чувствительность биуретового метода невелика – 5–160 мг/мл.

Более чувствительным методом для определения количества белка является метод Лоури (0,005–2 мг/мл). Он базируется на сочетании двух реакций – биуретовой и на ароматические аминокислоты, которые обнаруживают с помощью Фолин – Чокальтеу-реагента ( $H_3PW_{12}O_{40}H_3PMo_{12}O_{40}$  – фосфорномолибдено-вольфрамовый реактив). На первом этапе при взаимодействии белка со щелочным раствором медного купороса образуется комплекс  $Cu^{2+}$  – протеин (биуретовая реакция). Данный комплекс преимущественно своими тирозиновыми и триптофановыми радикалами, в меньшей степени цистеиновыми и гистидиновыми восстанавливает молибдат или вольфрамат, находящийся в форме гетерополифосфорных кислот в Фолин – Чокальтеу-реагенте. В результате образуется комплексное соединение (оксиды  $WO_2 \cdot nWO_3$  или  $MoO_2 \cdot nMoO_3$ ) синего цвета, интенсивность окраски которого измеряется при 750 нм (если это значение очень высокое – при 540 нм). Метод высокочувствительный, но малоспецифичный, так как с реактивом Фолина реакцию дают свободные ароматические аминокислоты и многие другие соединения, содержащие фенольную группу.

Способность белков связывать некоторые специфические красители (амидо черный 10Б, кумасси) используют в спектрофотометрических методах определения белка. Эти красители связываются с протонированными аминогруппами остатков аминокислот в полипептидной цепи и сдвигают максимум поглощения комплекса «краситель – белок».

В основе метода Бредфорда лежит изменение окраски трифенилметанового красителя, кумасси бриллиантового голубого G 250 (англ. Coomassie Brilliant Blue), в зависимости от концентрации белка в пробе. Краситель неспецифически связывается с катионными и неполярными боковыми радикалами аминокислотных остатков в белке, в первую очередь с аргинином, в меньшей степени с лизином, гистидином, триптофаном, фенилаланином и тирозином. В присутствии белка в кислой среде максимум поглощения красителя изменяется с длины волны, равной 465 нм, до 595 нм, при этом увеличение абсорбции раствора при такой длине волны пропорционально количеству белка в нем. Причиной сдвига максимума поглощения вероятнее всего является стабилизация красителя в его анионной сульфоновой форме. Предел обнаружения метода – 0,05–0,5 мкг/мл.

Возможно прямое определение белка путем измерения оптической плотности при 280 нм, основанное на присутствии в макромолекуле остатков ароматических аминокислотных (тирозин, триптофан, фенилаланин). Однако этим методом концентрация белка определяется лишь ориентировочно, так как белки между собой могут сильно отличаться содержанием ароматических аминокислот.

В основе флуориметрического метода обнаружения белка лежит собственная флуоресценция остатков ароматических аминокислотных, главным образом триптофана (возбуждение при 285 нм, эмиссия при 360 нм), в меньшей степени тирозина и фенилаланина.

Для установления первичной аминокислотной последовательности белка проводят процедуру *секвенирования*. Для этого предварительно разрушают пространственную структуру белка, разделяют единичные полипептидные цепи и определяют их количество, используя денатурирующие реагенты (например, раствор мочевины или додецилсульфата натрия), разрушающие нековалентные связи между полипептидными цепями, а также меркаптоэтанол, восстанавливающий дисульфидные связи.

Секвенирование полипептидных цепей состоит из следующих шагов: селективное расщепление полипептидной цепи по определенной позиции с помощью химических реагентов или ферментов; разделение и очистка полученных фрагментов; определение аминокислотной последовательности каждого фрагмента; повторение шага один, но расщепление цепи по другой позиции. Установление полной аминокислотной последовательности исходной полипептидной цепи осуществляется комбинированием отдельных последовательностей (метод перекрывающихся фрагментов), кроме того, определяется исходный порядок дисульфидных связей в полипептидной цепи.

## 1.2. Нуклеиновые кислоты

Нуклеиновые кислоты (НК), дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты обеспечивают хранение и передачу наследственной информации, непосредственно участвуют в механизмах реализации этой информации путем программированного синтеза всех клеточных белков. Ген, участок ДНК, является константным параметром организма, он стабилен при различных физиологических и патологических состояниях и его последовательность не зависит от времени.

Нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых колеблется в пределах от 25 до 1000 кДа и более. Полимерные цепи нуклеиновых кислот построены из нуклеотидных звеньев, состоящих из пуринового (аденин, гуанин) или пиримидинового (цитозин, тимин или урацил) основания, углеводного остатка (рибоза или дезоксирибоза) и фосфатной группы. Благодаря наличию остатков ортофосфорной кислоты НК обладают выраженными кислотными свойствами и при физиологических значениях рН несут отрицательный заряд. Они являются высоко отрицательно заряженными полиионами, что определяет выбор метода их анализа.

Молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, правозакрученных вокруг общей оси с образованием двойной спирали, стабилизированной водородными связями, образующимися между обращенными друг к другу азотистыми основаниями входящих в нее цепей. Водно-солевые растворы высокомолекулярной природной ДНК являются типичными полиэлектролитными системами, в которых конформация макромолекул зависит от степени экранировки ионогенных групп и состава растворителя. Молекула ДНК представляет собой уникальный объект, зарядовые свойства, жесткость, гидрофильность которого можно достаточно легко варьировать при изменении ионной силы, кислотности и состава растворителя.

*Общее содержание* НК определяется по методу, который базируется на способности пуриновых оснований взаимодействовать с аммиачным раствором нитрата серебра с образованием осадка серебряных солей пуриновых оснований, окрашенных в светло-коричневый цвет. Один из колориметрических тестов определения дезоксирибозы и ДНК основывается на реакции с дифениламином. При нагревании дезоксирибозы (после ее высвобождения из ДНК) в кислой среде формируются фурфурол, оксилевулиновый альдегид и сходные хромогены, которые, конденсируясь с дифениламином, образуют соединения, окрашенные в синий цвет.

РНК можно определить по качественной реакции с орцином. При нагревании с соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурфурол, конденсирующийся с орцином, и образует соединение, окрашенное в зеленый цвет. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

Содержание НК в экстрактах из биопроб можно определить по поглощению при 260 нм, которое обусловлено присутствием в них азотистых оснований.

Чувствительный метод определения НК базируется на селективном нековалентном взаимодействии с флуоресцентными красителями (например, бромистым этидием, возбуждение при 520 нм, эмиссия при 600 нм) в нейтральных водных растворах. Флуоресцентный краситель акридиновый оранжевый при значении pH 4–5 в форме мономера связывается с двухспиральными ДНК (максимум эмиссии при 530 нм), а в форме димера – с односпиральными РНК (максимум эмиссии при 640 нм).

Анализ последовательности нуклеотидов в ДНК (*секвенирование*) проводится при помощи химических или ферментных методов. Первоначальная технология, предложенная А. М. Максамом и У. Гильбертом (1977), базируется на специфической химической деградации молекулы ДНК. Другой подход, предложенный Ф. Сэнгером (1977), основан на ферментативном построении комплементарной цепи ДНК в условиях специфической терминации. К настоящему времени данный метод претерпел ряд усовершенствований и является основным в рутинных исследованиях.

Увеличение копий участков ДНК *in vitro* осуществляют с помощью *полимеразной цепной реакции* (ПЦР). Это метод амплификации ДНК, т. е. многократное последовательное удвоение исходной молекулы ДНК с помощью фермента ДНК-полимераза. Для проведения ПЦР необходимы следующие компоненты: праймеры, ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов, буферный раствор, обеспечивающий оптимальные условия для реакции.

Праймеры – парные химически синтезированные олигонуклеотиды (от 15 до 30 пар нуклеотидов), идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. По сути, это затравочное количество нуклеиновой кислоты со свободной 3'-ОН группой пентозы, к которой идет присоединение очередного нуклеотида. В клетке существует специальный фермент, катализирующий образование праймера, – праймаза. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы. В качестве ДНК-полимеразы может быть использована Taq-полимераза (названа по имени бактерии *Thermus aquaticus*, из которой она выделена). Это термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. Дезоксинуклеотидтрифосфаты используются ДНК-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

ПЦР представляет собой циклический процесс из трех этапов:

1) денатурация ДНК-мишени, т. е. переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (92–95 °C);

2) «отжиг» (гибридизация) – праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени при температуре на 4–5 °C ниже температуры плавления комплекса «праймер – матрица» (обычно 55 °C);

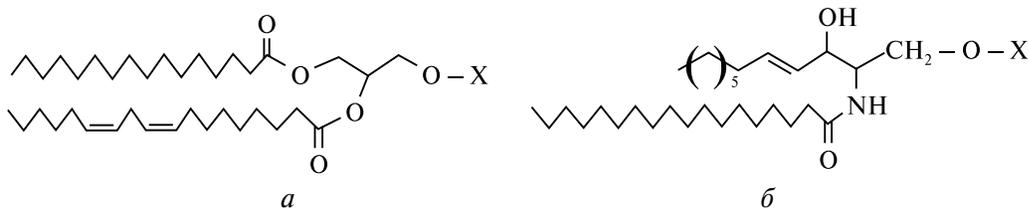
3) элонгация (синтез) – ДНК-полимераза достраивает праймеры, присоединяя к ним нуклеотиды, начиная от 3'-конца праймера, и движется вдоль матрицы в направлении от 3'- к 5' концу.

Все этапы полимеразной реакции – расхождение цепей, присоединение праймера к матрице, синтез дочерних цепей – занимают менее 2 мин. По завершении цикла каждый фрагмент ДНК удваивается. Так, через 40 циклов можно получить до  $10^{11}$  копий участка ДНК.

### 1.3. Липиды

Липиды объединяют большую группу разнообразных веществ, некоторые из них служат структурообразующими элементами клеточных мембран и в большинстве случаев липиды – сложные эфиры жирных кислот и какого-либо спирта. Липиды не являются полимерами. Их главная особенность заключается в том, что они малорастворимы или совсем не растворимы в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях (метанол, ацетон, хлороформ).

Липиды наряду с белками образуют основу мембраны, в зависимости от вида клеток они могут составлять ~ 50 % (плазматические мембраны эритроцитов или гепатоцитов) или более 75 % (плазматическая мембрана нейронов) от общего числа компонентов мембраны. Липиды биомембран представлены, как правило, производными глицерина и сфингозина, а также холестерином (см. рисунок).



Структурные формулы липидов:

- a* – глицеролипид; *b* – сфинголипид; X = H: *a* – 1,2-диацилглицерин;  
*b* – N-ацилсфингозин (церамид); X = остаток углевода: *a* – глицерогликолипид;  
*b* – гликосфинголипид; X = эфир фосфорной кислоты: *a* – глицерофосфолипид;  
*b* – сфингофосфолипид

Среди липидов мембран основными являются фосфолипиды (более 60 % от общего липидного состава), которые главным образом представлены глицерофосфолипидами. Гликолипиды составляют около 10 %, хотя в мембранах нейронов их содержание возрастает до ~ 25 %.

Липиды биомембран – амфифильные соединения из гидрофобного и гидрофильного фрагментов. В зависимости от соотношения размеров полярной и неполярной частей они образуют в воде различные структуры (мицеллы или липосомы). Каждый мембранный липид представляет собой смесь из большого числа молекул (пул), которые имеют одинаковую полярную часть, но различные ацильные остатки. Ацильный состав мембранных липидов очень переменчивый и может меняться от времени года.

Липиды не содержат хромофорных и флуорофорных групп в своей структуре. Однако продукты пероксидного окисления ненасыщенных фосфолипидов анализируют спектрофотометрически (при 230 нм). Липиды биомембран нелетучи и очень трудно переводятся в газовую фазу.

Общее количество фосфолипидов можно определить по содержанию фосфора в молекуле липида колориметрическим методом, а гликолипидов — методом денситометрии после разделения липидов с помощью тонкослойной хроматографии.

## 1.4. Полисахариды

Олиго- и полисахариды (углеводы) — группа природных полигидроксиальдегидов и полигидроксикетонов, мономеры которых (моносахариды) связаны между собой *O*-гликозидной связью. Углеводы включают в состав десятки, сотни или тысячи моносахаридов, их масса колеблется от нескольких тысяч до нескольких миллионов дальтонов. Гетерогенность углеводов по составу объясняется тем, что молекулы сахаров содержат много активных групп и могут комбинироваться между собой различным образом. Если две одинаковые аминокислоты взаимодействуют только с образованием одного дипептида, то из двух молекул глюкозы может сформироваться 11 различных дисахаридов. Из двух разных гексоз (например, *D*-глюкозы и *D*-галактозы) могут образоваться 16 дисахаридов, а из трех различных гексоз — 81 различных трисахарид.

В составе полисахаридов обнаружено свыше 20 видов моносахаридов и их производных. Наиболее часто встречаются из гексоз *D*-глюкоза, *D*-галактоза, *L*-фруктоза, *D*-манноза; из пентоз — *D*-ксилоза, *L*-арабиноза и т. п.; из дезоксисахаров — *L*-рамноза, *D*-фукоза; из продуктов восстановления *D*-маннозы — спирт маннит; из продуктов окисления моносахаридов — *D*-глюкуроновая, *D*-маннуриновая, *D*-галактуроновая, *D*-гулуриновая и другие кислоты. Разнообразие в строении полисахаридов может быть обусловлено не только характером моносахаридов и способом их соединения, но также тем, что гидроксильные и карбоксильные группы моносахаридов и их производных могут быть метилированы, этерифицированы органическими и неорганическими кислотами (например, серной кислотой — агар-агар); водороды карбоксильных групп замещены на ионы металлов (пектиновые вещества, камеди).

Полисахариды формируются из моносахаридных звеньев одного (гомополисахариды) или различных (гетерополисахариды) типов. Это линейные или разветвленные полимеры, которые могут существовать в линейной, спиралевидной или шаровидной форме.

Гетерогенность состава и высокая молекулярная масса полисахаридов обуславливают сложности в проведении их анализа, так как требуется установить не только моносахаридный состав, но и определить для каждого мономера конфигурацию и направление их соединения в полимере.

Полисахариды обнаруживают иные физико-химические свойства от составляющих их моносахаров (или олигосахаридов). С увеличением молекулярной массы они становятся нейтральными по вкусу (уменьшается сладость), снижаются восстанавливающие способности и растворимость в воде.

Полисахариды – аморфные вещества, не растворимые в спирте и неполярных растворителях, а растворимость в воде варьирует. Некоторые углеводы растворяются в воде с образованием коллоидных растворов (амилоза, слизи, пектовые кислоты, арабин), могут образовывать гели (пектины, альгиновые кислоты, агар-агар) или вообще не растворяться (клетчатка, хитин).

Структурные полимеры придают клеткам и органам механическую прочность. Молекулы целлюлозы, составляющей основную массу клеточных стенок растений, содержат не менее  $10^4$  остатков глюкозы, их молекулярная масса находится в пределах  $(1-2) \cdot 10^6$  Да, а в длину они достигают 6–8 мкм. Природная целлюлоза (линейный полигликан) обладает высокой механической прочностью, устойчива к химическому и ферментативному гидролизу, что обусловлено конформацией ее молекулы и особенностью надмолекулярной организации. Конгломераты целлюлозы стабилизированы за счет внутри- и межцепочечных водородных связей между ОН-группами, что объясняет ее нерастворимость в воде.

Водорастворимые полисахариды высоко гидративны. Молекула гиалуроновой кислоты (ее структурной единицей является дисахаридный фрагмент из  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамина) насчитывает несколько тысяч моносахаридных остатков и принимает конформацию спирали, на внешней поверхности которой локализованы карбоксильные группы, благодаря чему углевод может связывать 10 000-кратный объем воды.

Резервные полисахариды менее растворимы, чем моносахариды, следовательно, они не влияют на осмотическое давление и поэтому могут накапливаться в клетках (например, крахмал – в клетках растений, гликоген – в клетках животных).

Важным при анализе полисахаридов является установление общего порядка построения макромолекулы. Часто используется метод метилирования полисахарида с последующим его гидролизом и идентификацией образующихся метилированных продуктов. Сложность анализа состоит в том, что получают комплексные по составу смеси.

Структурные различия между полисахаридами определяются строением моносахаридов, составляющих цепь; типом гликозидных связей, соединяющих мономеры в цепи; последовательностью остатков моносахаридов в цепи.

Для выявления *общего количества* углеводов (моно-, олиго-, полисахариды, гликозиды, гликопротеины, гликолипиды) существует множество методов, основанных на проведении реакций с образованием окрашенных продуктов. Одним из таких методов выступает фенол-серноокислотный. В концентрированной серной кислоте полисахариды подвергаются гидролизу до моносахаридов, которые дегидратируются с формированием активных интермедиатов, например фурфурола, 5-метилфурфурола. В присутствии фенола эти интермедиаты образуют окрашенные продукты (суммарное поглощение можно определить при 492 нм).

### 2.1. Цель и задачи преаналитики

Прежде чем выполнить качественный и количественный анализ искомого компонента (аналита), нужно получить его в чистом виде из какой-то пробы. Именно поэтому в анализе важной стадией является проведение преаналитических процедур. В биоаналитике проба представляет собой сложную смесь, содержащую несколько тысяч различных видов молекул, имеющих молекулярную массу от  $10^2$  до  $10^8$  и присутствующих в диапазоне концентраций от  $10^{-15}$  до  $10^{-2}$  моль/л. Кроме того, в пробе могут содержаться компоненты с очень схожими свойствами или у которых свойства способны меняться в зависимости от условий среды (например, денатурация белков).

В области экологии пробами могут быть сточные воды, осадки сточных вод (сгущенный шлам), почвы, отработанный индустриальный воздух; в биотехнологии – ферментативная среда, пептидные гидролизаты; в пищевой промышленности – мясо, молоко; в клинической химии и биомедицине – биологические жидкости, клетки, ткани; в агрохимии – растения. Например, сыворотка крови содержит белки (70–80 мг/мл), минеральные соли (около 7,5 мг/мл), липиды (4–8 мг/мл), а также большое количество низкомолекулярных органических веществ (гормоны, биогенные амины, витамины, креатин, креатинин, билирубин, мочевая кислота и др.).

Перед биоаналитиком стоит задача отделить целевой компонент от сложной матрицы пробы без потерь, что требует применения разнообразных методов и различных их сочетаний. Ход анализа определяется поставленной задачей. Так, нужно выявить либо содержание биомолекул, либо концентрацию биологически активного соединения (например, находящегося в крови фармпрепарата, связанного, как правило, с белком).

Традиционные методы органической химии (перегонка, перекристаллизация, возгонка) неприменимы для очистки биоконпонентов, и поэтому для них разработаны *специальные* способы. Выделяемые биоконпоненты зачастую неустойчивы, вследствие чего их не рекомендуется подвергать воздействию температуры, давления или показателя pH в экстремальных значениях.

*Преаналитика* охватывает совокупность методов, с помощью которых из анализируемых проб (микроорганизмы, животные, растительные ткани/клетки и т. п.) выделяют необходимые компоненты (субклеточные органеллы, фракции мембран или отдельные вещества). Преаналитические методы включают в себя отчасти техники пробоотбора и прежде всего различные методы пробоподготовки.

Цель преаналитических методов – перевод пробы в форму, пригодную для аналитического определения. В конечном итоге необходимое вещество нужно получить в истинном растворе для его дальнейшей характеристики и идентификации с помощью хроматографических, электрофоретических, масс-спектрометрических

и других методов. Очень важно тщательно проводить все преаналитические стадии. Без преаналитики существуют неизбежность ошибок в анализе, незначительная воспроизводимость результатов, а также нежелательное загрязнение частей прибора и сильное изнашивание материалов (например, ВЭЖХ-колонок). Неаккуратное выполнение преаналитических процедур может привести даже к отсутствию результатов при проведении последующего инструментального анализа.

В целом преаналитическая процедура включает в себя следующие стадии:

- отбор, замораживание проб;
- гомогенизация пробы;
- фракционирование компонентов смеси;
- экстракция нужных компонентов;
- разделение компонентов;
- очистка и концентрирование (обогащение) компонентов.

Для проведения преаналитических процедур в распоряжении аналитика имеются различные способы измельчения, растворения, а также разные варианты экстракционной техники и очистки. Как уже указывалось выше, не существует стандартных и универсальных схем в биоанализе. Выбор методов, в том числе и преаналитических, определяется поставленной задачей, т. е. всегда важно знать, для каких целей изолируется то или иное вещество.

Для успешного выполнения преаналитической процедуры в целом желательно руководствоваться следующими принципами:

- для проведения каждого этапа использовать различные техники, выбор которых основывается на каком-то одном свойстве вещества (гидрофобность/гидрофильность, наличие заряда в молекуле, лигандная специфичность и др.);
- минимизировать обработку пробы на каждом этапе, так как длительная процедура может привести к потере активности биомолекул или снижению выхода вещества;
- минимизировать введение в пробу дополнительных реагентов, которые могут впоследствии взаимодействовать с реагентами при проведении идентификации биомолекул или потребуют дополнительной процедуры для их удаления;
- логически продумывать каждый шаг и стремиться минимизировать число этапов очистки, так как в противном случае удлинится время анализа и увеличатся потери вещества.

В данной главе более детально рассмотрены способы выделения биомолекул из биологических систем или сырья. В биотехнологическом производстве, например, задачей является выделение целевого продукта. Это может быть вещество, накапливаемое в клетках или содержащееся в культуральной жидкости, либо сама клеточная масса.

**Отбор проб, замораживание.** На стадии отбора проб, т. е. сразу после выделения, биоматериал нужно охладить (на льду или при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере), чтобы минимизировать реакции обмена и ферментативные процессы. Для хранения и последующего анализа биоматериал должен быть глубоко заморожен (при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в морозильной камере или при  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  в жидком азоте). Конечно, имеются ферменты, как, например, пируват-карбоксилаза (митохондриальный фермент), которые активны и на холоду. Повторение процедуры заморозки-разморозки может привести к повреждению внутриклеточных компонентов и высвобождению фер-

ментов, которые катализируют процессы разрушения биомолекул, например протеазы, нуклеазы, гликозидазы.

Наибольшую опасность при замораживании представляет механическое повреждение мембран клеток кристаллами льда. Образуюсь как вне, так и внутри клеток, что гораздо опаснее, они разрывают липидный бимолекулярный слой, формирующий эти мембраны. Для защиты клеток от повреждения при замораживании используют специальные вещества – криопротекторы. Они делятся на две группы: проникающие внутрь клетки, или эндоцеллюлярные (диметилсульфоксид, ацетамид, пропиленгликоль, глицерин, этиленгликоль), и не проникающие внутрь клетки, или экзоцеллюлярные (полиэтиленгликоли и полиэтиленоксиды, фиколл, сахароза, трегалоза и др.), которые действуют снаружи, осмотически вытягивая из клеток воду. Чем меньше в клетке останется воды, тем меньше потом в ней образуется льда. Однако нужно учитывать, что удаление воды приводит к повышению концентрации остающихся внутри клетки солей (вплоть до значений, при которых происходит денатурация белков).

Эндоцеллюлярные криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда за счет образования водородных связей с молекулами воды. Они не только снижают температуру замерзания, но и разбавляют образующийся при кристаллизации «рассол», не давая белкам денатурироваться. Наиболее широкое применение нашли глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО). При их добавлении к воде температура ее замерзания понижается, достигая низшего значения при соотношении примерно 2 : 1. Эта наиболее низкая температура называется *эвтектической* или *криогидратной*. При дальнейшем охлаждении таких смесей размеры образующихся кристаллов льда оказываются столь мелкими (сравнимыми с размером кристаллической ячейки), что не способны нанести значительных повреждений структурам клеток. Если бы можно было довести концентрацию криопротектора в живых тканях до эвтектической, это позволило бы полностью решить проблему повреждения тканей ледяными кристаллами. Однако при таких концентрациях любые известные криопротекторы оказываются токсичными. На практике применяют концентрации криопротекторов значительно меньшие, чем эвтектические, и при этом часть воды все же замерзает. Так, при использовании 27 % водного раствора глицерина 40 % присутствующей в клетке воды образует с глицерином эвтектическую смесь, остальная же ее часть замерзает. В целом механизм действия криопротекторов до конца не ясен несмотря на то, что они исследуются более 60 лет.

Большое значение для решения проблемы обратимого замораживания имеет скорость охлаждения. При *медленном охлаждении* (в парах жидкого азота или в специальных программируемых криостатах) кристаллы льда образуются в основном в межклеточном пространстве. По мере охлаждения они растут, оттягивая на себя воду из клеток. Как уже было сказано выше, это позволяет существенно уменьшить повреждения, наносимые кристаллами клеткам, но и концентрация солей внутри клеток значительно возрастает, повышая риск денатурации белков. Оптимальные скорости понижения температуры, при которых достигается компромисс между повреждающими действиями кристаллов льда и высокими концентрациями растворенных веществ, для разных типов клеток сильно разнятся. Отличаются также и оптимальные для них концентрации криопротекторов. Это значительно затрудняет криосохранение органов и тканей, включающих не-

сколько различных типов клеток, а тем более — целых организмов. При *быстром охлаждении* (например, помещение образца в жидкий азот) вода не успевает продиффундировать из клеток наружу; кристаллы формируются как вне, так и внутри клеток, но за счет более быстрого охлаждения они оказываются значительно мельче, чем в первом случае, и успевают образоваться не во всех клетках. Токсичных концентраций солей при этом удается избежать, время их действия снижается, как и продолжительность вредного воздействия криопротекторов. Последнее позволяет использовать более высокие их концентрации.

Существуют вещества, блокирующие образование кристалликов льда. Такими свойствами обладают, например, *специальные белки*, продуцируемые организмами ряда холодоустойчивых животных — арктических и антарктических рыб, некоторых насекомых и др. Молекулы этих веществ имеют участки, обладающие комплементарностью к поверхности кристалла льда: «сажаясь» на эту поверхность, они приостанавливают его дальнейший рост. Как показали эксперименты, проведенные в 1954—1960 гг. английским криобиологом О. Смитом, золотистые хомячки способны выживать в ситуации, когда в лед превращалось до 50—60 % воды, содержащейся в тканях их головного мозга.

## 2.2. Гомогенизация

### 2.2.1. Выбор среды гомогенизации

При выделении целевых компонентов из биопроб (например, из органа, клеток дрожжей, мяса или частей растений) первым шагом является полное разрушение сложных клеточных комплексов. Процесс разрушения образца и получения однородной массы (гомогената) называется гомогенизацией. Отобранные фракции гомогената будут идентичны по составу друг другу и оставшейся части образца. Гомогенизация обеспечивает воспроизводимость результатов и технически облегчает качественный анализ.

На стадии гомогенизации клеточные компоненты переводятся в нефизиологическую среду, поэтому нужно использовать такие составы растворов, которые позволят максимально сохранить свойства биоконпонентов.

Среда гомогенизации должна обеспечивать защиту клеток от осмотического разрыва, потери молекулами биологической активности, деструктивного действия ферментов (протеазы, нуклеазы, фосфатазы), окисления веществ и действия на них ионов переходных металлов (ионы железа, кадмия, меди), агрегации макромолекул (т. е. получение нерастворимого осадка).

**Тоничность буфера.** Для гомогенизации обычно применяют изотоничные буферы. Понятие *тоничность* используется в биологии для характеристики поведения данной клетки в конкретном растворе. Клетка окружена мембраной, проницаемой для одних и непроницаемой для других молекул (т. е. это полупроницаемая мембрана). Тоничность служит мерой градиента осмотического давления — различия водного потенциала двух растворов, разделенных полупроницаемой мембраной.

Осмоз — процесс односторонней диффузии через полупроницаемую мембрану молекул растворителя в сторону большей концентрации растворенного вещества

(меньшей концентрации растворителя). Перенос растворителя через мембрану обусловлен осмотическим давлением (обозначается  $\pi$ ). Оно возникает соответственно принципу Ле Шателье из-за того, что система пытается выравнять концентрацию раствора в обеих средах, разделенных мембраной, и описывается вторым законом термодинамики. Оно равно избыточному внешнему давлению, которое следует приложить со стороны раствора, чтобы прекратить процесс диффузии растворителя через мембрану, т. е. создать условия осмотического равновесия. Превышение избыточного давления над осмотическим может привести к обращению осмоса – обратной диффузии растворителя. Чем больше концентрация вещества в растворе, тем больше создаваемое им осмотическое давление. Это правило, носящее название закона осмотического давления, выражается следующей формулой:

$$\pi = iCRT,$$

где  $i$  – изотонический коэффициент раствора;  $C$  – молярная концентрация раствора, моль/м<sup>3</sup>;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – термодинамическая температура раствора.

Различают три варианта тоничности – один раствор по отношению к другому может быть изотоническим, гипертоническим и гипотоническим. Изотонический раствор имеет осмотическое давление, равное внутриклеточному. Клетка, погруженная в изотонический раствор, находится в равновесном состоянии – молекулы воды диффундируют через клеточную мембрану в равном количестве внутрь и наружу, не накапливаясь и не теряясь клеткой. Гипертонический раствор содержит большую концентрацию вещества по отношению к внутриклеточной. При погружении клетки в такой раствор происходит ее дегидратация – внутриклеточная вода выходит наружу, что приводит к высыханию и сморщиванию клетки. У гипотонического раствора осмотическое давление меньше, чем внутри клетки, т. е. он обладает меньшей концентрацией вещества, не проникающего через мембрану. При погружении клетки в такой раствор происходит осмотическое проникновение воды внутрь клетки и ее набухание.

В качестве изотонических используют водные растворы сахаров (например, 5 % раствор глюкозы), многоатомных спиртов (глицерин, маннит), солей и их смесей (NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>).

**Значение pH, ионная сила и вид ионов, полярность растворителя.** Поведение биомолекул различается в зависимости от показателя pH раствора. Ферменты проявляют активность при определенном значении pH. Белки в области своей изоэлектроточки достаточно плохо растворимы в сравнении со своими заряженными формами, так как они электронейтральны и между ними нет сил взаимного электростатического отталкивания. Вблизи точки pI белки могут «слипаться» за счет водородных и ионных связей, гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и поэтому при изменении pH фракционно осаждаются. Желаемое значение pH гомогената можно получить с помощью разбавленного аммиачного раствора или уксусной кислоты.

Большое значение для растворимости белка имеет *ионная сила* раствора (в биохимии больше используют понятие «ионная сила», а не «концентрация» электролита). Ионная сила раствора ( $I$ ) – это мера интенсивности электрического поля, создаваемого в растворе ионами, она равна полусумме произведений из концентрации всех ионов в растворе на квадрат их заряда ( $I = 1/2 \sum c_i z_i^2$ ). Ионная сила плазмы крови человека равна 0,145 (такой ионной силой обладает физиологический

раствор (0,9 % NaCl)). При низкой ионной силе растворимость белка увеличивается, а при высокой – снижается. Зависимость растворимости большинства белков от рН при данной ионной силе раствора описывается U-образной кривой с минимумом растворимости вблизи изоэлектрической точки и увеличенной растворимостью при значениях рН меньше и больше данной точки. С повышением температуры до определенной величины (например, от 0 до 25–40 °С) растворимость большинства белков повышается (это правило имеет исключение), тогда как специфичность НК сохраняется только при определенной концентрации ионов, т. е. при определенной ионной силе раствора.

*Концентрация* компонентов буфера определяет его буферную емкость. Для гомогенизации зачастую нужно использовать буферы с большой емкостью, так как во время пробоподготовки может освобождаться большое количество кислот.

*Ионы* буфера для гомогенизации влияют на растворимость биомолекул, так как изменяют поверхностный заряд и гидратную оболочку макромолекул, что препятствует обмену с растворителем – водой. Это приводит к агрегации макромолекул и выпадению их в осадок. Влияние различных ионов на растворимость белков отражает эмпирический ряд Гофмейстера (об этом говорится ниже при рассмотрении методов осаждения).

Биомолекулы имеют ярко выраженные гидрофильные и гидрофобные участки, которые различным образом реагируют на изменение в растворе, поэтому нужно учитывать *полярность* раствора.

**Защита от окисления, протеаз, нуклеаз, фосфатаз, ионов переходных металлов.** Для защиты компонентов биопробы от окисления кислородом воздуха вводят вещества (антиоксиданты), способные тормозить процессы окислительной деструкции биомолекул. При разрушении клеток могут высвобождаться различные молекулы-окислители (например, хиноны), которые будут окислять биомолекулы. Поэтому в среду гомогенизации вводят вещества, способные связывать такие окислители в нерастворимые соединения, удаляемые фильтрованием. Большинство протеинов содержат свободные сульфгидрильные группы (–SH), способные образовывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные мостики (S–S). Для избежания этого вводят сульфгидрильные реагенты (R–SH), например 2-меркаптоэтанол, цистеин, восстановленный глутатион.

При разрушении клеток высвобождаются ферменты: протеазы (устойчивы к нагреванию) и нуклеазы (многие из них активны при 0 °С), вызывающие деструкцию белков и НК соответственно; фосфатазы, катализирующие дефосфорилирование белков, липидов, сахаров и др. Существует целый набор ингибиторов активности ферментов, но нужно помнить, что они могут проявлять неизвестные побочные действия.

При загрязнении проб *ионами переходных металлов* ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) нужно добавлять вещества, способные связывать ионы в комплексы. Ионы металлов могут реагировать с группами биомолекул.

**Температура среды гомогенизации.** Общепринято, что белки наиболее стабильны при 0 °С, хотя имеются белки, которые лабильны и на холоду, их хранят при температуре от –20 до –70 °С. Отдельные ферменты консервируют при 2 °С, а некоторые толерантны к низким температурам. В сравнительно узком интервале температуры, приблизительно от 0 до 40 °С, растворимость большинства белков возрастает с ее повышением. При температурах, превышающих диапазон 40–50 °С,

большинство белков утрачивает стабильность, начинается их денатурация, сопровождающаяся обычно резким снижением растворимости.

Таким образом, не существует универсальных сред для гомогенизации, все определяется поставленной задачей. Обычно используют изотонический буфер с нейтральным значением рН (7,5–8). В буфер могут вводиться различные «защитные» вещества, способствующие сохранению функций и свойств биоконпонентов. Наиболее употребимыми средами для гомогенизации являются трис-буферы (на основе трис(гидроксиметил-аминометана,  $pK_a$  8,06) и HEPES-буферы (на основе 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой кислоты,  $pK_{a1} = 3$ ,  $pK_{a2} = 7,5$ ), фосфатный и цитратный буферы, а также растворы солей (0,1 М  $K^+$  или  $NH_4^+$ ), глицерина (5 %) и глицилглицина. Для изолирования клеточных органелл могут использоваться неводные среды, часто смеси из тяжелого и легкого растворителя (тетрахлорметан – бензол, хлороформ – эфир). При этом нужно учитывать, что органические растворители могут инактивировать ферменты.

### 2.2.2. Механические методы гомогенизации

При выборе любого метода гомогенизации надо учитывать следующее:

- количество исходного материала (не все методы рассчитаны на большие количества и являются базой для непрерывной работы);
- вид исходного материала (животные клетки, растения, семена, грибы или микроорганизмы). Клеточные стенки разных организмов очень сильно отличаются по составу и прочности, поэтому различным образом устойчивы к механическим и немеханическим методам;
- метод должен быть как можно более щадящим;
- побочные вещества, используемые в определенных методах, должны быть отделены, поскольку способны вызвать проблемы при анализе.

Растительные клетки разрушаются труднее, чем животные, так как содержат прочную целлюлозную оболочку. Животные ткани различаются по своей прочности. К примеру, клетки крови – эритроциты – разрушаются легко, а в кровеносных сосудах содержится жесткий коллагенсодержащий материал, что требует дополнительных затрат. В большинстве случаев сначала биоматериал разрушается механически. Обычно здесь важен эмпирический опыт, однако, напомним, выбор метода определяется поставленной задачей. При гомогенизации растворимые низко- или высокомолекулярные соединения повреждаются меньше, чем сложные клеточные структуры. Однако нужно учитывать, что свойства биомолекул очень разнообразны. Так, внеклеточные белки (лизоцим, рибонуклеаза, химотрипсин), часто имеющие в своей структуре дисульфидные мостики, более стабильны, чем белки, локализованные внутри клеток.

К механическим методам гомогенизации относятся различные способы измельчения и растирания материала с помощью внешних усилий.

*Измельчение* материала без использования или с применением абразивного материала (песок, стеклянные бусинки с  $d = 0,1–0,2$  мм или  $0,3–0,5$  мм для больших частиц) выполняют с помощью специальных приборов: ротационных/вибрационных мельниц, гомогенизаторов, диспергаторов с высокими оборотами (например,

Ultra-Turrah). В вибрационной мельнице материал пробы вместе с мелющими телами (стальными/керамическими шарами, цилиндрами) встряхивается на большой частоте. Вибромельница за счет способа измельчения (удар с истиранием) обеспечивает возможность очень тонкого помола материала (размер частиц – менее 1 мкм).

Гомогенизаторы типа «блендер» с острыми лопастями используют в основном для суспендирования в буферах мягких животных и растительных тканей. В лабораториях широко применяют гомогенизаторы, основанные на разрушении микрообъектов в зазоре с градиентом скоростей жидкости, например гомогенизатор Поттера – Эльвейема. Он представляет собой толстостенную пробирку с притертым к ней стеклянным поршнем, вращаемым электромотором или вручную. При сочетании возвратно-поступательного и вращательного движений поршня жидкость, содержащая суспензию микрообъектов, проходит через зазор между пестиком и пробиркой. При этом клеточные мембраны разрушаются. Гомогенизаторы, используемые в лабораториях, позволяют получить измельченный материал с диаметром частиц от 10 до 50 мкм (суспензии) или от 1 до 10 мкм (эмульсии).

*Растирание* нативного или замороженного материала производят в ступке или стеклянном гомогенизаторе с абразивным или без абразивного материала (песок, оксид алюминия, стеклянные бусинки  $d = 0,1-0,5$  мм). Биоматериал с абразивом (1 : 1) растирают до получения жидкой кашицы, которую помещают в буфер, и абразив удаляется центрифугированием при низких оборотах.

В лабораторных условиях пробы в виде суспензии гомогенизируют путем частого встряхивания, пипетированием (т. е. с помощью биохимической пипетки) либо продавливанием через сито.

Наиболее полная степень разрушения клеток достигается в случае применения декомпрессионных способов (френч-пресс, пресс Хьюза) или ультразвуком. В френч-прессе жидкая проба под высоким давлением (5–400 атм) с помощью поршня продавливается через узкую стальную форсунку ( $d < 1$  мм). Жидкость, проходя через отверстие, испытывает действие режущих сил и декомпрессию, в результате снятия напряжения клетки лопаются и их содержимое высвобождается. Давление поршня можно корректировать, тем самым регулировать мощность сил и, следовательно, ограничивать повреждение тонких биологических структур. В прессе Хьюза материал, смешанный с абразивными частицами, продавливается через небольшое отверстие под действием высокого давления.

Ультразвуковая гомогенизация осуществляется с помощью ультразвуковых волн (в области частот 10–40 кГц), она основана на явлении кавитации. В результате действия ультразвука в пробе локально генерируются очень высокое давление и высокая скорость струи жидкости, что вызывает удары, вибрацию, турбулентность, которые разрушают пробу. Ультразвуковая гомогенизация очень эффективна для размельчения мягких и твердых частиц.

Важно помнить, что при измельчении может возникать теплота трения, поэтому гомогенизация должна проводиться или на холоду (добавляют водяной или сухой лед – твердый диоксид углерода, который перед суспендированием измельченной пробы исчезнет как газ), или быть очень короткой (до 1 мин), при этом температура не должна превышать 5–10 °С. Кроме того, можно растирать предварительно замороженную пробу или добавить при измельчении жидкий азот. Промышленные гомогенизаторы содержат специальные системы охлаждения.

### 2.2.3. Немеханические методы гомогенизации

К немеханическим методам гомогенизации относятся повторяющаяся процедура «заморозка–разморозка» и лизис клеток. Данные методы более избирательны в сравнении с механическими, но и они имеют свои недостатки, поэтому выбор осуществляется в зависимости от задачи.

Гомогенизация повторяющейся процедурой «заморозка–разморозка» основана на попеременном замораживании и размораживании пробы. В результате образующиеся кристаллы льда повреждают структуру клеток так, что их содержимое легко переходит в буфер. Такой метод приводит к необратимой денатурации ферментов и ДНК, поэтому не пригоден к повсеместному использованию.

Лизис (разрушение) клеток – метод высвобождения клеточного содержимого. Лизис может быть физический, химический или ферментативный.

*Физический лизис* (осмос) – это простой и мягкий метод разрушения клеток, базирующийся на том, что клетки в растворах с незначительным осмосом лопаются. Такой метод подходит для разрушения отдельных клеток только с одной клеточной мембраной, а клеточное сообщество предварительно должно быть разрушено механически или ферментативно (с помощью ферментов лизоцима, хитиназы, пектиназы или целлюлозы). Клетки помещаются в гипотонический раствор, общая концентрация компонентов которого незначительна в сравнении с таковой в клетках. Посредством осмоса молекулы воды диффундируют в высококонцентрированное внутриклеточное пространство. Это приводит к сильному набуханию клеток, из-за высокого давления они лопаются, вследствие чего содержимое высвобождается.

*Ферментативный лизис* проводят с помощью ферментов. Он используется для полного или частичного разрушения углеводсодержащих клеточных стенок бактерий, грибов или растений, а также для изолирования клеточных органелл и ядра, ДНК и РНК. При данном лизисе образуется большое количество продуктов деструкции, что очень сильно затрудняет изолирование белков, поэтому для их выделения нужно выбирать другой метод. В биоанализе широко используется обработка лизоцимом (мурамидаза) – ферментом класса гидролаз. Он разрушает  $\beta$ -1,4-гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в гетерополисахаридной цепи (при этом образуются димеры, другие связи остаются не расщепленными), что в конечном итоге может привести к полному удалению пептидогликана из клеточной стенки. Лизоцим получают главным образом из белка куриных яиц. Аналогичные ферменты содержатся в организмах животных, в первую очередь в местах соприкосновения с окружающей средой (в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слезной жидкости, слюне и т. д.).

Клеточная стенка не является жизненно важной структурой, так как в определенных условиях она может быть удалена, и бактериальные клетки при этом существуют в виде протопластов или сферопластов. В благоприятных условиях сферопласты и протопласты проявляют определенную метаболическую активность, но утрачивают способность к размножению.

*Химический лизис* осуществляют с помощью различных реагентов, преимущественно органических растворителей, которые растворяют липопротеины клеточных стенок, вследствие чего содержимое высвобождается. Обработка толуолом или бутанолом при 30–40 °C разрушает даже толстостенные клетки дрожжей; из лизата, по-

лученного таким образом, можно выделить ферменты. При действии ацетона на клеточный материал при низких температурах (0 °С) образуется сухой порошок, который хранится долгое время при температуре от –20 до –80 °С. При необходимости из порошка можно просто получить клеточное содержимое путем экстракции буфером.

Для выделения интегральных мембранных белков необходимо разрушить гидрофобные взаимодействия между белками и липидами мембран. При удалении липидов мембранные белки посредством гидрофобных взаимодействий образуют нерастворимые агрегаты и выпадают в осадок или чрезвычайно прочно связываются со всеми видами поверхностей, которые по большей части имеют гидрофобный характер. Для разрушения межбелковых, белково-липидных и межлипидных связей, а также для денатурации белковых структур, предотвращения неспецифического связывания в иммунохимических анализах и кристаллизации белков используют детергенты. Выбор детергента имеет решающее значение и зависит от метода анализа.

Детергенты – это амфифильные соединения, которые содержат неполярный гидрофобный фрагмент и полярную гидрофильную часть, ответственную за растворимость в воде. Гидрофобный фрагмент хорошо взаимодействует с липофильным участком мембранного белка и таким образом заменяет естественное липидное окружение белка.

Важным свойством детергентов является их способность при растворении в воде образовывать сложные структуры – мицеллы, в которых гидрофобная часть направлена внутрь мицеллы, а полярная группа – наружу. Таким образом, гидрофобное ядро мицеллы связывается с гидрофобными участками белков (рис. 2.1). Количество молекул детергента в мицелле зависит от его вида и называется числом агрегации (данный параметр используют для оценки растворимости мембранных белков). Длина гидрофобного участка прямо пропорциональна степени гидрофобности и вполне постоянна для различных детергентов, в то время как полярная группа является переменной. Исходя из ее характеристик детергенты подразделяются на три типа: ионные (анионные или катионные), цвиттер-ионные и неионные. Минимальная концентрация детергентов, при которой они образуют мицеллы, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). При концентрации ниже

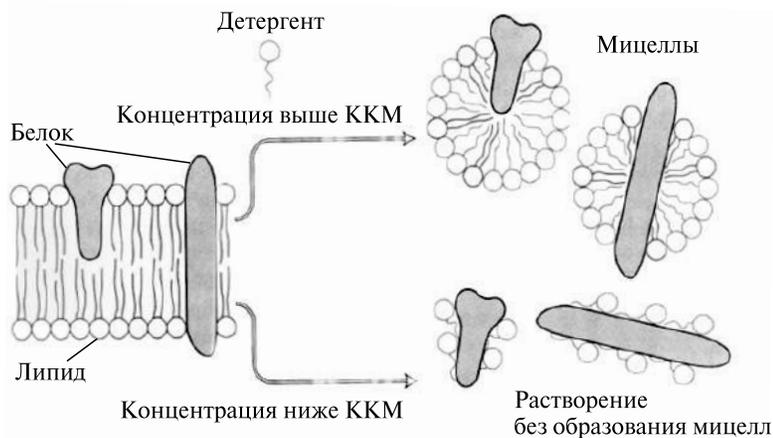


Рис. 2.1. Солюбилизация белков с помощью детергента

ККМ наблюдаются только мономеры, при концентрациях выше ККМ мицеллы и мономеры сосуществуют с другими немиецеллярными фазами, нерастворимыми в воде. Величина ККМ детергента зависит от температуры, ионной силы, значения рН, присутствия ди- и тривалентных катионов или органических растворителей.

Зачастую солюбилизация белков происходит при концентрациях детергента, близких к значению ККМ (см. рис. 2.1).

Из ионных детергентов чаще всего используют анионный додецилсульфат натрия (ДСН). Он (ККМ 7–10 мМ) является очень эффективным поверхностно-активным веществом для коллоидного растворения почти любого белка. Однако ДСН разрушает нековалентные связи белков, вызывая таким образом их денатурацию, что приводит к потере нативной конформации и функций. ДСН связывается с белком в весовом соотношении 1,4 : 1 (или один ДСН-анион на две аминокислоты) и, следовательно, маскирует заряд белка, что добавляет отрицательный заряд для всех белков в образце, несмотря на их изоэлектрический показатель (pI). Это является основной причиной широкого применения ДСН в денатурирующем электрофорезе в полиакриламидном геле. Из-за денатурирующих свойств ДСН не следует использовать в случаях, когда требуются активные белки или при изучении межбелковых взаимодействий. Концентрация солей влияет на мицеллообразующие свойства ДСН, при увеличении количества NaCl в растворе от 0 до 0,5 М его ККМ падает от 8 до 0,5 мМ. Кроме того, ДСН выпадает в осадок при низкой температуре, и этот эффект усиливается в присутствии солей калия. Такое свойство ДСН может быть использовано для очистки белкового образца от детергента.

Неионные детергенты отличаются от ионных тем, что их полярная группа не заряжена и гидрофильна. Они считаются мягкими поверхностно-активными веществами (ПАВ), так как разрушают белково-липидные и межлипидные, но не межбелковые взаимодействия, и большинство из них не вызывает денатурации белков. Белки могут быть растворены и изолированы в своей естественной и активной форме с сохранением белковых взаимодействий. Это основное преимущество неионных детергентов, им отдается предпочтение при выделении мембранных белков. Однако данные ПАВ не всегда способны препятствовать агрегации интегральных белков и вследствие низкой ККМ не могут быть удалены диализом. К неионным детергентам, используемым в биохимии, относятся твин-20 (англ. Tween) (ККМ 0,06 мМ) и твин-80, которые состоят из эфира жирной кислоты и длинной полиоксиэтиленовой цепи. Указанные ПАВ редко являются ингредиентами буферных растворов для лизиса клеток, обычно их используют при проведении иммуноанализа, поскольку они способствуют минимизации неспецифического связывания антител. Для выделения мембранных белков особенно часто используют детергенты группы тритон X-100 (ККМ 0,2–0,9 мМ) – производные полиоксиэтилена, содержащие алкилфенильную гидрофобную группу. Тритон X-114 (ККМ 0,2 мМ) растворим в воде при 4 °С, но образует нерастворимые мицеллы при 23 °С (точка помутнения – температура, при которой детергент разделяется на две фазы), что способствует расслоению фаз между водой и детергентом. Так, гидрофильные белки остаются в водной фазе, а гидрофобные выпадают в осадок совместно с детергентом. Недостатком данных детергентов является то, что они содержат фенильное кольцо и поглощают УФ-свет, что может препятствовать спектрофотометрической идентификации белков.

Цвиттер-ионные детергенты, полярные группы которых содержат положительный и отрицательный заряды в равных количествах, по своим денатурирующим и диссоциирующим свойствам находятся между ионными и неионными ПАВ. Наиболее характерным примером цвиттер-ионных детергентов является 3-[(3-холоамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат, более известный как ЧАПС (англ. CHAPS is an abbreviation for 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate). Высокая ККМ (6–10 мМ) детергента позволяет эффективно удалять его с помощью диализа. ЧАПС в основном используется для коллоидного растворения интегральных мембранных белков.

*Хаотропные агенты* подобны ПАВ тем, что они нарушают нековалентные взаимодействия (водородные, диполь-дипольные, гидрофобные), способствуя денатурации белка, которая в данном случае, как правило, обратима. Мочевина  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  отдельно и в комбинации с тиомочевинной  $\text{CS}(\text{NH}_2)_2$  или детергентами – наиболее широко применяемый в протеомике хаотроп. При использовании мочевины следует соблюдать особую осторожность и не нагревать образцы выше 37 °С, так как это приводит к карбамилрованию белков. Карбамилрование представляет собой процесс изменения белков (или аминокислот), который является результатом неферментативной реакции между изоциановой кислотой (продуктом распада мочевины) и N-концевой аминогруппой или ε-аминогруппой остатка лизина.

После выделения белков концентрация детергента в пробе должна быть снижена или его необходимо удалить полностью. Для данных целей используют эксклюзионную хроматографию или диализ, при этом размер мицелл должен отличаться от размера анализируемого белка. Другой способ удаления детергента – применение циклодекстринсодержащих веществ, неполярных шариков или смол, связывающих детергенты. После удаления детергента конечный буферный раствор должен быть выбран с особой осторожностью, чтобы избежать агрегации белков.

#### **2.2.4. Стратегия и методы обработки гомогената**

После получения гомогената последний обрабатывается в зависимости от поставленной задачи. Гомогенат представляет собой многокомпонентную смесь, из которой нужно выделить целевой анализ. Для этого могут быть выполнены извлечение, разделение, концентрирование и очистка анализа. Перед проведением каждой процедуры необходимо четко разработать нужную последовательность этапов изолирования и фракционирования. Важное требование – избежать потери активности биомолекул. Белки, в частности ферменты, для сохранения активности требуют условий, сравнимых с физиологическими. Нужные вещества могут быть также сразу экстрагированы из гомогената, что определяется видом пробы.

Для выделения из гомогената низкомолекулярных составных частей (например, соли, детергенты) и ненужных биомолекул, разделения смеси на обрабатываемые фракции, концентрирования или разбавления пробы могут быть использованы следующие методы:

- препаративное центрифугирование;

- осаждение (изоэлектрическое, органическим растворителем, солью);
- бэч-адсорбция (адсорбция в потоке);
- фильтрация через мембрану (диализ, ультрафильтрация, диафильтрация);
- препаративная колоночная хроматография (гель-фильтрация, ионообменная, гидрофобная, аффинная);
- препаративный электрофорез.

Таким образом, на преаналитических этапах анализа для достижения цели лучше выбирать высокопроизводительные методы, в то время как высокоразрешающие годятся в меньшей степени. Высокопроизводительными методами являются осаждение, диализ, адсорбция, колоночная хроматография, разделение в противотоках. К высокоразрешающим способам можно отнести препаративный гель-электрофорез, газовую и высокоэффективную жидкостную (прежде всего ионообменную) хроматографию.

Используя специфический метод разделения компонентов, следует учитывать их способность растворяться и адсорбироваться, стабильность в растворе, размер и массу молекул, наличие заряда, взаимодействие с биополимерами — белками, альгинатами, пектинами. При выделении целевого компонента необходимо принимать во внимание то, какое количество и какая степень чистоты конечного продукта необходимы для последующего анализа. Например, для полного химического определения биополимера нужно 50–100 мг вещества, в случае иммунологического анализа достаточно его следовых количеств.

При глубокой очистке важно не потерять вещество и сократить количество стадий очистки. Для этого подходит хроматография (ионообменная, аффинная). Иногда допускается неполная очистка, например для определения активности ферментов в органеллах.

Все методы разделения смесей основаны на том, что исследуемые компоненты в результате каких-либо манипуляций оказываются в разных участках системы и могут быть механически отделены друг от друга. Наиболее производительные процедуры разделения основаны на различном распределении веществ между двумя фазами. Любая такая процедура приводит к разделению исходной смеси на две части (фракции), в одну из которых преимущественно или полностью переходит экстрагируемый компонент. Ввиду исключительной сложности смесей, с которыми имеет дело биоаналитик, на первых этапах разделения в подавляющем большинстве случаев фракция, имеющая искомое вещество, содержит множество других компонентов, т. е. происходит лишь частичная очистка (обогащение смеси искомым компонентом). Вследствие этого выделение отдельных биополимеров или биологически активных веществ является многоступенчатым процессом. На каждой последующей ступени разделения должна получаться фракция, более богатая целевым веществом в сравнении с предыдущей и содержащая меньшее число побочных компонентов. На каждой стадии разделения, включая и начальную, биоконпонент находится либо в виде раствора, либо в виде осадка. Говоря о разделении биополимеров, можно сразу же исключить из рассмотрения все методы, при которых одна из фаз, между которыми происходит распределение, является газовой. Биополимеры в ощутимых количествах в газовой фазе не присутствуют.

## 2.3. Центрифугирование

### 2.3.1. Относительное центробежное ускорение. Скорость седиментации частиц

На преаналитических стадиях обработки пробы широко используется препаративное центрифугирование. Оно является не только старейшей техникой для отделения нерастворенных составных частей смеси, но и служит эффективным методом для фракционирования и изолирования компонентов смеси (в частности, клеток, клеточных органелл, макромолекул). Метод базируется на разделении частиц посредством ускоренной седиментации (осаждение) под действием центробежных сил.

Частицы в растворе осаждаются, если их плотность выше плотности раствора, всплывают (флотация), если плотность ниже, или остаются неподвижными при равенности плотностей (изопикнические условия). В случае незначительной разницы в плотностях раствора и частиц разделение можно осуществить только в центрифуге, которая создает центробежную силу, во много раз превышающую силу земного притяжения.

Первоначально седиментационный анализ был основан на использовании движения частиц в гравитационном поле. В 1923 г. шведский ученый Т. Сведберг (1926, Нобелевская премия) предложил применить для анализа специально сконструированную ультрацентрифугу. Ее использование позволяет значительно ускорить анализ и дает возможность разделить смеси, содержащие частицы, вплоть до коллоидных размеров. Центрифуги могут применяться как в препаративных, так и в аналитических целях.

Центральная составляющая часть центрифуги – ротор. В него помещаются центрифужные пробирки, и посредством мотора ротор вращается с высокой скоростью. Существуют разные типы роторов, а именно: угловой, вертикальный, бакетный (свободно подвешенный), с помощью которых можно разделить несколько микролитров или несколько литров. Центрифуги различают по типам: низкоскоростная (5000–10 000 об/мин, 7000–20 000 g), высокоскоростная (20 000–25 000 об/мин, 35 000–70 000 g), ультрацентрифуга (80 000–150 000 об/мин, до  $10^6$  g). В последних используются охлаждение и вакуум для минимизации теплоты трения, образующейся из-за сопротивления воздуха при высокой скорости вращения. Аналитические ультрацентрифуги снабжены роторами со сквозными цилиндрическими гнездами, в которые помещены специальные прозрачные кюветы для исследуемых растворов или суспензий. Процесс перераспределения частиц в них можно наблюдать непосредственно при вращении ротора с помощью специальных оптических рефрактометрических, абсорбционных систем. В ультрацентрифугах благодаря созданию центробежного ускорения, на много порядков превышающего земное, можно экстрагировать частицы размером менее 100 нм (клеточные органеллы, вирусы, макромолекулы белков и ДНК и др.).

**Принцип центрифугирования.** Разделение частиц с помощью центрифугирования основано на их различном поведении в поле центробежных сил. Физический

принцип центрифугирования базируется на том, что на частицу массой  $m$ , движущуюся по кругу на расстоянии  $r$  (см) от оси вращения с постоянной угловой скоростью  $\omega$  (рад/с), действует направленная наружу центробежная сила, которая ускоряет частицу.

Величина центробежного ускорения ( $G$ ), развиваемого центрифугой, зависит от угловой скорости ( $\omega$ ) и радиуса вращательного движения, т. е. радиуса ротора ( $r$ , см):

$$G = \omega^2 r.$$

Скорость центрифуги обычно выражается через число оборотов в минуту ( $n$ , об/мин<sup>-1</sup> или англ. *rpm*). Связь между угловой скоростью и скоростью вращения в оборотах в минуту (один оборот ротора составляет  $2\pi$  радиан) выражается уравнением

$$\omega = 2\pi \frac{n}{60} = 2\pi \frac{\text{об/мин}^{-1}}{60},$$

а центробежное ускорение тогда будет равно

$$G = 4\pi^2 \frac{(\text{об/мин}^{-1})^2 r}{3600}.$$

Центробежное ускорение принято выражать в единицах ускорения свободного падения ( $g = 9,81 \text{ м/с}^2$ ). Такое его выражение называется относительным центробежным ускорением (ОЦУ). ОЦУ показывает, во сколько раз ускорение центробежного поля больше ускорения силы тяжести Земли  $g$ :

$$\text{ОЦУ} = \frac{\omega^2 r}{g}.$$

Зависимость ОЦУ от скорости вращения ротора в оборотах в минуту и радиуса  $r$  (см) можно представить в следующем виде:

$$\begin{aligned} \text{ОЦУ} &= \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{(\pi \cdot \text{об/мин}^{-1})^2 r}{30^2 \cdot 981} = 1,119 \cdot 10^{-5} (\text{об/мин}^{-1})^2 r = \\ &= 11,8 \cdot r \left( \frac{\text{об/мин}^{-1}}{1000} \right)^2. \end{aligned}$$

Во время центрифугирования расстояние частиц от оси вращения и, следовательно, значение ОЦУ изменяются, поэтому на практике для расчетов берут среднее значение радиуса, т. е. расстояния от оси вращения до середины столбика жидкости в центрифужной пробирке. Каждая центрифуга имеет таблицу или номограмму для перевода оборотов в минуту в центробежное ускорение, кратное  $g$ , с учетом радиуса ротора  $r$ .

В центробежном поле центрифуги скорость осаждения частицы в растворе будет определяться балансом действующих на нее сил: тяжести (направлена вниз), трения (противоположна направлению осаждения), архимедовой (противоположна направлению осаждения) и центробежной (смещает частицы в сторону от оси вращения). При установлении равновесия сил в системе стационарную скорость

седиментации сферической частицы в вязкой жидкости в соответствии с законом Стокса можно представить в виде выражения

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{d^2(\rho - \rho_{\text{cp}})G}{18\eta},$$

где  $v$  – скорость седиментации частицы (см/с);  $G$  – относительное центробежное ускорение;  $d$  – диаметр частицы;  $\rho$  и  $\rho_{\text{cp}}$  – плотность частицы и среды соответственно ( $\text{г/м}^3$ );  $\eta$  – динамическая вязкость среды ( $\text{Па} \cdot \text{с}$ ).

Скорость седиментации частицы зависит от ее массы, размера и формы, вязкости и плотности среды, а также от действующих центробежных сил. Более тяжелые и плотные частицы будут двигаться быстрее в центробежном поле. При одинаковых плотностях частицы большего размера оседают намного быстрее, чем мелкие. Размер частицы будет доминирующим фактором при низкой вязкости среды и малой разнице между плотностями частицы и среды. Скорость осаждения частицы возрастает с увеличением центробежного ускорения и разницы между плотностью частицы и среды. Чем плотнее среда, тем медленнее частица будет двигаться в центробежном поле. Скорость частицы равна нулю, если плотность среды равна плотности частицы. Увеличение вязкости среды приводит к снижению скорости осаждения частицы.

Отклонение формы частицы от сферической сказывается на скорости их оседания. Сферические частицы (или компактные) осаждаются быстрее, чем палочкообразные (эллипсоидные), для последних коэффициент трения больше при одинаковом объеме частиц. Несферические частицы одинаковой массы, но различной формы осаждаются при разных скоростях. Чем компактнее молекула, тем меньше ее коэффициент трения в растворе, и наоборот, чем менее компактна молекула, тем больше коэффициент трения и тем медленнее она будет седиментировать. Такая особенность используется при исследовании конформации макромолекул.

Скорость осаждения пропорциональна расстоянию частицы от оси вращения ротора ( $r$ ). Расстояние увеличивается по мере продвижения частицы, поэтому скорость частицы будет возрастать в результате ее продвижения вдоль пробирки при постоянстве прочих параметров. Может сложиться ситуация, когда наиболее тяжелые частицы достигнут дна пробирки раньше, чем две зоны легких частиц успеют отделиться друг от друга. Для предотвращения этого следует повышать плотность и вязкость среды в радиальном направлении, чтобы они компенсировали увеличение  $r$ , что достигается созданием нарастающего градиента плотности и вязкости среды.

Проявляющая себя при центрифугировании плотность частицы обусловлена не только ее химическим составом и пространственной структурой, но и степенью гидратации частицы, т. е. количеством прочно связанной с ней воды. Вода движется вместе с частицей, значительно уменьшая ее эффективную плотность. Количество связанной с частицами воды заметно уменьшается в присутствии высоких концентраций ионов или гидрофильных молекул, которые тоже связывают воду, тем самым препятствуя гидратации частиц. С другой стороны, некоторые ионы или молекулы способны прочно связываться с частицами, увеличивая таким образом их эффективную плотность. Таким образом, эффективная плотность частиц, определяющая скорость их оседания, сильно зависит от химической приро-

ды и концентрации веществ, растворенных в среде центрифугирования. Следовательно, для этого типа частиц, оседающих в данной среде, вводят понятие *плавучей плотности*. Ее можно определить экспериментально, измерив плотность среды, в которой движение частицы прекращается.

Плавучая плотность — плотность частицы, выражаемая через плотность растворителя и численно равная плотности раствора, при которой частица перестает седиментировать или флотировать в этом растворе в процессе центрифугирования. Плавучая плотность макромолекул (ДНК, белки) определяется их физическим состоянием и химическим составом. В частности, нативная ДНК характеризуется меньшей плавучей плотностью, чем денатурированная. Плавучая плотность ДНК в воде составляет примерно  $1,1 \text{ г/см}^3$ , а в концентрированном водном растворе хлористого цезия —  $1,7$ , в то время как собственная плотность ДНК, рассчитанная исходя из ее химического состава, близка к  $2 \text{ г/см}^3$ . Отсюда видно, что значительное количество воды может прочно связаться с ДНК в водном растворе. Отметим также, что как плотность и вязкость среды, так и степень гидратации частиц зависят от температуры.

Скорость осаждения частиц в жидкости прямо пропорциональна центробежному ускорению:

$$v = \frac{dr}{dt} = S\omega^2 r.$$

Коэффициент пропорциональности  $S$  в этой формуле называют константой седиментации. *Константа седиментации частицы* ( $S$ ) — это скорость седиментации при заданных геометрических параметрах центробежного поля. Она, по сути, является скоростью оседания частицы  $v$  на единицу центробежного ускорения  $\omega^2 r$ :

$$S = \frac{dr}{dt} \frac{1}{\omega^2 r}.$$

Константа седиментации выражается в единицах сведберга (по имени шведского ученого Т. Сведберга), один сведберг ( $S$ ) равен  $10^{-13}$  с. Вязкость жидкостей зависит от температуры и давления, поэтому для сравнения констант седиментации в различных средах их обычно корректируют по плотности и вязкости воды при  $20^\circ \text{C}$  и атмосферном давлении. Константа седиментации частицы  $S_{20w}$  при этих условиях — величина постоянная.

С учетом уравнения Стокса для сферической частицы константа седиментации в воде при  $20^\circ \text{C}$  может быть представлена следующим уравнением:

$$S_{20w} = \frac{d^2(\rho - \rho_{20w})}{18 \cdot \eta_{20w}}.$$

Из данного выражения следует, что константа седиментации частицы является мерой ее массы, формы и размера. Значения  $S$  для биочастиц находятся в пределах от  $10$  до  $10^8$  ед. Константа седиментации для растворимых протеинов с диаметром молекул  $0,001$ – $0,01$  мкм и плотностью  $1,2$ – $1,7 \text{ г/см}^3$  составляет  $1$ – $25 S$ , для митохондрий с диаметром  $0,5$ – $4$  мкм и плотностью  $1,17$ – $1,21 \text{ г/см}^3$  —  $1 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4 S$ , для клеток с диаметром  $5$ – $15$  мкм и плотностью  $1,05$ – $1,2 \text{ г/см}^3$  —  $10^7$ – $10^8 S$ .

Время, необходимое для полного осаждения частицы, можно рассчитать, зная константу  $S$ . Интегрирование уравнения константы седиментации приводит к выражению

$$\ln\left(\frac{r_{\max}}{r_{\min}}\right) = S\omega^2 t.$$

Отсюда время с учетом того, что  $\omega = 2\pi \cdot \text{об/мин}^{-1}/60$ , выражается следующей формулой (при условии, что среда центрифугирования – вода):

$$t = \frac{2,5 \cdot 10^{11} \ln\left(\frac{r_{\max}}{r_{\min}}\right)}{S(\text{об/мин}^{-1})^2},$$

где  $r_{\min}$  и  $r_{\max}$  – расстояние между осью вращения центрифуги до горла (мениска жидкости) и дна центрифужной пробирки соответственно (в сантиметрах).

С другой стороны, зная время осаждения частицы, можно рассчитать константу седиментации. Строя график в координатах  $\ln(r_{\max}/r_{\min})$  (время в секундах), получим прямую с наклоном  $S\omega^2$ , отсюда можно рассчитать  $S$  в секундах.

В аналитических целях коэффициент седиментации можно использовать для расчета молярной массы частицы:

$$S = \frac{M(1 - \hat{v} \cdot \rho)}{Nf},$$

где  $\hat{v}$  – парциальный удельный объем частицы (величина, обратная плотности частицы,  $\text{см}^3/\text{г}$ );  $\rho$  – плотность раствора;  $M$  – молекулярная масса;  $N$  – число Авогадро;  $f$  – коэффициент поступательного трения частицы с радиусом  $r_p$  (для сферической частицы  $f = 6\pi\eta r_p$ ).

### 2.3.2. Методы препаративного центрифугирования

Рассмотрим методы препаративного центрифугирования, которые широко используются в биоаналитике.

*Дифференциальное* центрифугирование (пеллетирование) базируется на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Оно проводится в центрифугах с угловым ротором и требует достаточного различия в скоростях оседания частиц. Бакетные и вертикальные роторы не используют для получения осадка (пеллета). Данный метод центрифугирования заключается в ступенчатом увеличении центробежного ускорения, что приводит к последовательному осаждению различных частиц.

Центрифугирование смеси представляет собой выполнение последовательных стадий (рис. 2.2). Первым этапом является получение пеллета из гомогената при низкой скорости. Оставшуюся надосадочную жидкость (супернатант) осторожно сливают (декантируют) и центрифугируют при более высокой скорости, и снова получается пеллет, далее следует повторение процедуры при больших скоростях. Осадок, образованный после каждой стадии, растворяют в подходящем буфере

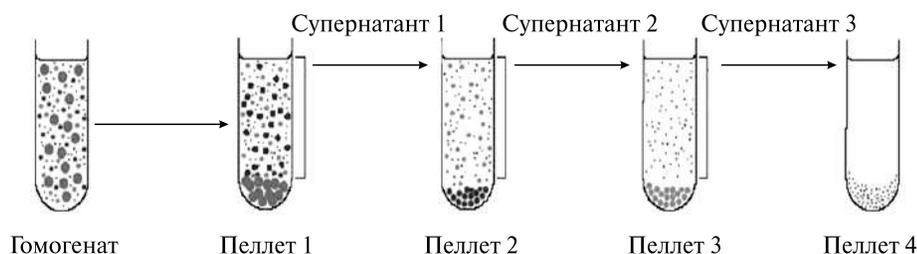


Рис. 2.2. Дифференциальное центрифугирование

и получают раствор биоконпонентов, который в случае необходимости подвергают дальнейшей очистке и/или концентрированию.

Дифференциальное центрифугирование – распространенный метод выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей. Наиболее успешно этот метод применяется для разделения таких клеточных органелл, которые значительно отличаются друг от друга по размерам и плотности. Большие и тяжелые клеточные ядра седиментируют относительно быстро (1000 g, 5–10 мин) и уже при низкоскоростном центрифугировании находятся в осадке. Дальнейшее центрифугирование супернатанта при последующем увеличении центробежного ускорения приводит к седиментации частиц средних размеров и плотности, а затем и к осаждению самых мелких частиц, имеющих наименьшую плотность. При повышении ОЦУ оседают митохондрии (10 000 g, 10 мин) и микросомы (100 000 g, 60 мин). Для контроля состава каждой фракции используют маркеры, т. е. определяют те или иные вещества, которые специфичны только для данных биоструктур. Если биоконпонент обладает оптической активностью, можно использовать коллектор фракций с УФ-детектором. К примеру, ядра клеток определяют по содержанию хроматина, митохондрии – по наличию в них фермента сукцинатдегидрогеназы, а микросомы – по глюкозо-6-фосфатазе.

Получаемые фракции никогда не бывают абсолютно гомогенными по составу. Чистоту фракций можно повысить, если пеллет ресуспендировать и снова отцентрифугировать. Обычно дифференциальное центрифугирование является первой стадией в процессе очистки анализируемых компонентов. Для их дальнейшего разделения применяют другие техники центрифугирования, изложенные ниже.

**Техники центрифугирования в градиенте плотности.** В случае незначительного различия в скоростях седиментации частиц пробы используют селективное влияние вязкости и плотности среды на скорость осаждения частиц в центробежном поле. Для этого центрифугирование пробы проводят в градиенте плотности растворителя. Он представляет собой увеличение плотности жидкости вдоль радиуса вращения в направлении от центра к периферии (от мениска ко дну центрифужной пробирки). Если в растворитель (например, воду) добавить компонент (например, соль CsCl), дающий растворы высокой плотности, то под влиянием центробежного поля в центрифужной пробирке установится градиент концентрации этого компонента. В сущности, это и есть градиент плотности. К техникам центрифугирования в градиенте плотности относятся *зональное* и *изопикническое* центрифугирование (*равновесная седиментация*).

Градиент плотности расширяет возможности центрифугирования. При центрифугировании в гомогенной среде равномерному осаждению частиц мешают механическая вибрация, градиент теплоты и конвекция жидких потоков, что приводит к расширению зон центрифугирования. Влияние данных факторов минимизируется с помощью градиента.

Градиент вследствие возрастающих плотности и вязкости среды вдоль радиуса вращения позволяет минимизировать эффект ускорения частиц за счет увеличения радиуса вращения. Градиент дает возможность «сфокусировать» искомую частицу в зоне градиента, соответствующей значению ее плотности. Недостатком методов с использованием градиента плотности является то, что приходится тратить время на его получение.

Осаждение молекул очень сильно зависит от выбора *параметров* для градиента. Такими параметрами являются свойства вещества для градиента (ионная сила, вязкость, осмотические свойства), форма градиента, значение pH раствора, добавление стабилизирующих компонентов (меркаптан, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), ферменты, соли Mg и др.).

Градиент плотности, как правило, готовят в водной среде, растворяя подходящее вещество. Органические растворители (хлороформ, бензол) используются крайне редко. Идеальное вещество для градиента должно хорошо растворяться в воде, быть физиологически и химически инертным, иметь низкую вязкость и высокую плотность, не поглощать в УФ-области, легко удаляться.

Для образования градиента используются следующие вещества:

- неорганические соли, например хлорид цезия. Высококонцентрированные растворы CsCl имеют большую плотностью (до 1,9 г/мл) и низкую вязкость (до  $1,238 \cdot 10^{-3}$  Па · с), благодаря чему можно получить высокую крутизну профиля равновесного градиента от мениска до дна пробирки. Недостатком растворов CsCl являются осмотическая активность, что может вызвать лизис клеток, и высокая ионная сила, способная привести к диссоциации биомолекул. Растворы CsCl особенно хорошо подходят для разделения нуклеиновых кислот;

- сахара, которая относительно инертна по отношению к биоматериалам, но осмотически активна. Высококонцентрированные растворы имеют высокую вязкость, максимальная плотность 65 % раствора – 1,32 г/мл. Растворы сахарозы часто используются для зонального центрифугирования субклеточных органелл;

- натуральные (гликоген, декстран) и синтетические (фиколл) полисахариды. Они обладают лучшими осмотическими свойствами, чем сахароза, но их высокая вязкость приводит к продолжительному времени центрифугирования и плохому разделению. Растворы полисахаридов используются для зонального и изопикнического центрифугирования;

- коллоидные силикагельные частицы, покрытые полимерами, например суспензии силикагельных частиц ( $d = 15-30$  нм), покрытых перколлем (поливинилпирролидоном) и имеющих плотность 1,13 г/мл. Такие частицы обладают низкими осмотическим давлением и вязкостью, нетоксичны, при добавлении сахарозы или солей могут образовывать изотонические градиенты плотности.

Градиент плотности формируется с помощью градиент-форматора или непосредственно в центрифуге. Наиболее плотный участок градиента находится на дне

пробирки. Вещества более плотные, чем растворитель (вода), во время центрифугирования седиментируют и сами образуют градиент плотности, так называемый самообразующийся градиент, крутизна которого зависит от величины приложенного ускорения. К примеру, центрифугирование гомогенного раствора хлорида цезия в течение ночи приводит к формированию такого градиента.

Существуют различные *формы градиента*. Ступенчатый градиент создается путем наслоения друг на друга растворов разной плотности в центрифужной пробирке (4–6 слоев), начиная с самого плотного, такой градиент надо использовать сразу (рис. 2.3). Линейный градиент получают либо с помощью градиент-форматора, либо он создается в результате диффузии молекул. Для этого растворы с различной плотностью наслаивают в пробирке друг на друга, и через 24 ч образуется почти линейный градиент, что подходит только для быстро диффундирующих веществ. В некоторых случаях желательнее, чтобы крупные частицы, приближаясь ко дну пробирки, не только не увеличивали бы скорость своего движения, а, наоборот, уменьшали ее. Для этого нужен нелинейный, круто нарастающий ко дну пробирки градиент плотности, так называемый экспоненциальный градиент.

Градиент-форматор представляет собой два сосуда (резервуар и смеситель), соединенных с центрифужной пробиркой (см. рис. 2.3). Существует два способа для создания линейного градиента с помощью градиент-форматора. В первом случае в резервуар помещают раствор с меньшей, а в смеситель — с большей плотностью. Жидкость из смесителя через капилляр подается в пробирку сверху, в результате чего втекает жидкость с линейно уменьшающейся плотностью. В другом случае в резервуар заливают раствор максимальной концентрации, а в смеситель — минимальной. Раствор из смесителя подается через длинную иглу на дно пробирки, при этом более плотный раствор будет плавно оттеснять вверх менее плотные слои. Экспоненциальный градиент можно получить, если диаметр смесителя сделать больше диаметра резервуара. В этом случае при заполнении пробирки жидкости из обоих сосудов (суммарный объем) должны быть использованы полностью.

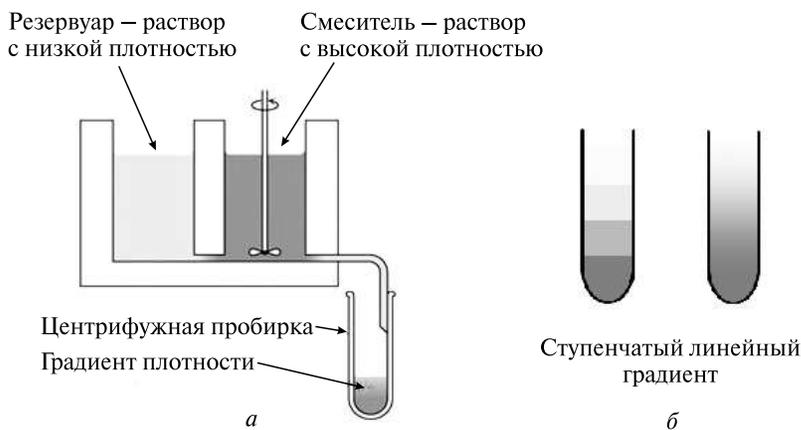


Рис. 2.3. Схема градиент-форматора (а); формы градиента (б)

Плотность градиента для истинных растворов можно определить с помощью рефрактометра по показателю преломления (при этом концентрация и плотность пропорциональны показателю преломления). В случае комбинированного градиента устанавливается зависимость между показателем преломления и плотностью по калибровке. Для коллоидных силикагельных градиентов имеются специальные маркированные по плотности шарики, которые для удобства пользования окрашены.

**Зональное центрифугирование.** В градиенте плотности оно больше подходит для разделения субстанций, различающихся по размеру и форме, а не по плотности. Поэтому митохондрии, лизосомы и пероксисомы, у которых разные плотности, но близкий размер, очень плохо разделяются данным методом. Для зонального центрифугирования подходят бакетные и вертикальные роторы.

Проба наслаивается на раствор с линейным градиентом плотности (рис. 2.4). Частицы осаждаются из-за разности в их константах седиментации ( $S$ ), которые для биоструктур определяются в основном размером. Частицы осаждаются посредством слабого градиента, в котором максимальная плотность среды не должна превышать плотность наименее плотной осаждаемой частицы. В процессе центрифугирования частицы проходят через раствор, так как их плотность выше плотности раствора. Частицы осаждаются, образуя зоны, которые благодаря градиенту плотности не смешиваются, но, конечно, с течением времени все частицы осядут. Центрифугирование прекращают раньше, чем частицы достигнут дна пробирки. Затем дно пробирки прокалывают и собирают фракции.

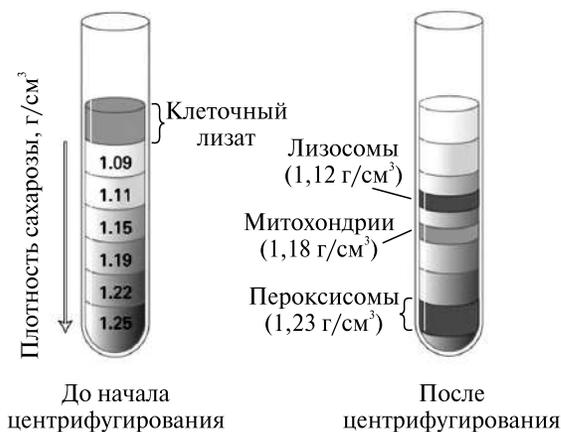


Рис. 2.4. Зональное центрифугирование

Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов (сахарозы) или коллоидного силикагеля, концентрация которых возрастает от поверхности ко дну пробирки. На практике в зависимости от задачи чаще всего используют 5–20 % и 15–30 % растворы сахарозы. Зональное центрифугирование быстрее, чем изопикническое; оно хорошо подходит для разделения белков, слабо различимых по плотности.

В зональном центрифугировании в отличие от дифференциального частицы различных размеров разделяются одновременно при одном центрифугировании, а не поэтапно.

**Изопикническое центрифугирование (равновесная седиментация).** Используется для разделения частиц, которые различаются по их плотности, но не по размеру. Для данного вида центрифугирования могут применяться вертикальный и угловой роторы.

Пробу смешивают с раствором вещества для градиента (обычно используют концентрированный раствор хлорида цезия). Сначала растворенное вещество и растворитель распределены по всему объему равномерно (рис. 2.5). Градиент плотности создается во время центрифугирования за счет седиментации и диффузии, так как ионы цезия обладают большой массой. Частицы пробы двигаются (снизу или сверху пробирки), пока не достигнут точки, в которой их плотность равна плотности градиента; они практически дрейфуют на поверхности с большей плотностью. В области равновесия частицы располагаются в виде полосы, ширина которой определяется соотношением тепловой диффузии частиц и процесса концентрирования за счет седиментации – флотации. Ширина полос будет тем меньше, чем круче градиент плотности среды и чем больше масса частиц, так как увеличение массы снижает диффузию. Разделение продолжается значительно дольше, чем при зональном центрифугировании, и скорость центрифугирования должна быть выше. Для данного метода используют достаточно крутой градиент, который должен охватывать диапазон плотностей всех компонентов смеси. Вязкость среды в связи с этим является нежелательным фактором. Центрифугирование прекращают, когда устанавливается равновесие.

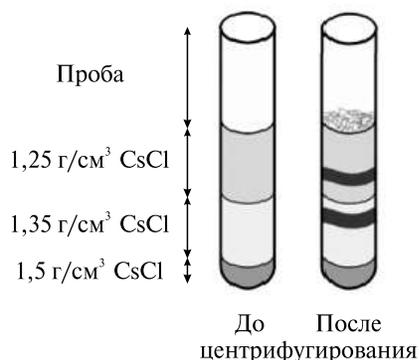


Рис. 2.5. Изопикническое центрифугирование

Данный метод хорошо подходит для разделения нуклеиновых кислот, липопротеидов плазмы крови человека, митохондрий и пероксисом.

Для оценки разделения в центрифуге необходимую зону можно отобрать пастер-пипеткой или проколоть дно, также для этих целей существуют автоматизированные системы.

Состав компонентов разделенных зон можно определить методом микроскопии (для клеток и органелл), спектрофотометрически по поглощению в УФ-свете, биохимически по общему содержанию компонента (например, белки определить по методу Бредфорда) или по наличию характеристических ферментов (маркеров).

Центрифугирование дает более или менее прозрачные истинные растворы биоконпонентов. Посредством различных методов осаждения одновременно с фракционированием они могут быть сконцентрированы и подготовлены для следующей очистки.

## 2.4. Методы осаждения

Осаждение (преципитация) – первая техника, которая использовалась для очистки белков и известна более 130 лет. Метод базируется на взаимодействии преципитирующего реагента с макромолекулами, находящимися в растворе (например, клеточном лизате). Эти реагенты могут быть относительно неспецифичными и осаждать практически все имеющиеся в растворе биомолекулы, в частности белки. Однако осаждение можно выполнить и таким образом, чтобы произошло фракционирование составных частей раствора. Примером служит фракционирование белков плазмы этанолом по методу Кона. Метод открыт в 1946 г. и широко используется в настоящее время. Осаждение макромолекулы представляет собой процесс удаления ее гидратной оболочки и заряда.

Условия осаждения выбирают в соответствии с поставленной задачей, учитывая при этом не только эффективный способ осаждения, но и то, повлияют ли они на активность биомолекулы и при каких условиях может быть удален преципитирующий агент.

**Осаждение неорганическими солями (высаливание).** Данный метод очистки основан на различиях в растворимости биомолекул при разной концентрации соли в растворе. Соли щелочных и щелочно-земельных металлов вызывают обратимое осаждение белков, т. е. после их удаления белки вновь приобретают способность растворяться, сохраняя при этом свои нативные свойства. Чем выше растворимость белка, тем большая концентрация соли необходима для его высаливания. Поскольку разные белки осаждаются при различной концентрации соли, этот метод используется для фракционирования белков. Он также широко применяется при выделении и очистке различных белков (ферменты, гормоны и др.) для получения белковых препаратов (лечебные сыворотки и др.).

Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных (несущих заряд или незаряженных) групп в аминокислотах, входящих в состав полипептидных цепей. Форма (отношение длинной и короткой осей) макромолекул и наличие одноименного суммарного заряда также имеют значение. Факторы, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют растворимость белков. К числу таких воздействий относится, в частности, добавление в раствор солей. Малые ионы солей взаимодействуют с ионными группами белковых молекул, снижая тем самым белок-белковое взаимодействие и, следовательно, увеличивая растворимость белков. Этот процесс в биохимии называют «засол». При дальнейшем повышении концентрации соли идет конкуренция между ионами соли и белка за молекулы растворителя, и если таковых недостаточно, чтобы удержать белки в растворенном виде, они выпадут в осадок. Происходит высаливание белков из раствора.

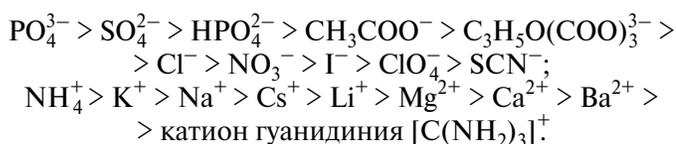
В биохимии действие солей принято сравнивать не по величине молярной концентрации, а по величине ионной силы раствора. При низкой ионной силе ( $< 0,15 \text{ M}$ ) растворимость белка увеличивается при повышении концентрации соли,

так как экранирование притяжения противоположно заряженных групп приводит к разрыхлению структуры белка. При высокой ионной силе ( $> 0,15$  М) растворимость белка падает экспоненциально с повышением концентрации из-за высаливания и обезвоживания. Существуют белки, которые растворяются только в растворах солей и не растворяются в чистой воде, например глобулины. В отличие от них альбумины хорошо растворимы в чистой воде.

При равной молярной концентрации поливалентные анионы более эффективны для высаливания, чем моновалентные (отчасти из-за того, что имеет значение не концентрация соли, а ионная сила раствора), а поливалентные катионы даже препятствуют действию поливалентных анионов. Поливалентный анион с моновалентными катионами представляет оптимальное сочетание. Способность солей высаливать белки описывается лиотропными рядами (рядами Гофмейстера, 1888), которые представляют собой классификацию ионов по их способности высаливать или растворять белки.

В ионных рядах слева направо возрастает способность соли растворять биомолекулы (хаотропы), а справа налево – осаждать (антихаотропы или космохропы – создающий порядок). Антихаотропы являются особенно хорошими и щадящими средствами осаждения, они способствуют агрегации белков посредством гидрофобных взаимодействий.

Так, для анионов и катионов их эффективность высаливать убывает в указанных рядах слева направо:



Для данного метода осаждения решающее значение имеет медленное добавление соли. Осаждение солями может длиться часами. Полученный осадок стабилен в течение нескольких дней. При необходимости растворения осадка его осторожно покрывают буферным раствором, и через несколько часов раствор будет готов.

Наиболее часто для осаждения применяют сульфат натрия, фосфат калия и сульфат аммония. Особенно широко используют  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , так как соль имеет высокую растворимость в воде, которая практически не зависит от температуры. Кроме того, растворы сульфата аммония обладают высокой ионной силой (ионная сила 1 М раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  равна трем, а 1 М раствора NaCl – единице). Сульфат аммония осаждает белки по двум механизмам. С одной стороны, сульфат-анионы делают молекулу белка более компактной (менее растворимой) за счет взаимодействия с положительно заряженными аминокислотами, что более эффективно при pH среды  $< \text{pI}$  белка. С другой стороны, за счет обезвоживания, так как сульфат-анион хорошо связывает воду. Один ион  $\text{SO}_4^{2-}$  может содержать 13–14 молекул воды только в первом гидратном слое. Если одна молекула сульфата координирует 15 молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , то 3 М раствор сульфата аммония связывает 45 из имеющихся в воде 55 М молекул воды. При этом возрастают гидрофобные взаимодействия между молекулами белков. Различные белки высаливаются из растворов разным количеством  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . При описании методик количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения, и этот параметр отличается от классического химического понятия. За 100 % насыщенный раствор принимают 4,1 М рас-

твор соли при 25 °С (или 3,9 М при 0 °С), разбавляемый до необходимой концентрации, выражаемой в процентах от насыщенного раствора. Соль обычно добавляют в виде порошка. Важно правильно рассчитать количество, необходимое для добавления к данному объему раствора белка, чтобы получился указанный процент насыщения. Это связано с тем, что при растворении сульфата аммония меняется объем жидкости. Обычно пользуются специальной номограммой, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной степени насыщения к другой, или онлайн-калькулятором. Метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок в 2 М растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  или при 50 % насыщении) и альбуминов (выпадают в 4,1 М растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  или при 100 % насыщении).

Белок, осажденный высаливанием, можно отделить от белков, оставшихся в растворе, центрифугированием или фильтрованием и вновь растворить (ресуспендировать), добавив воду или буферный раствор. Далее соли из раствора отделяют диализом или ультрацентрифугированием. Высаливание позволяет сконцентрировать растворы, если после осаждения растворить белок в меньшем объеме растворителя.

**Осаждение органическими растворителями.** Осаждение биомолекул (белков, ДНК) возможно с помощью холодных водорастворимых *органических растворителей* (чаще – этанол, ацетон, реже – метанол, изопропанол, диоксан). Длинноцепочечные спирты (более чем  $\text{C}_5$ ) плохо растворимы в воде и поэтому не используются. Уменьшение растворимости происходит, как и при высаливании, за счет дегидратации биомолекул. С другой стороны, осаждающее действие органических растворителей обусловлено тем, что они имеют более низкое значение величины диэлектрической постоянной, чем вода. Органические растворители снижают диэлектрическую постоянную буфера, что ведет к образованию агрегатов макромолекул с противоположными зарядами. Такое осаждение зависит от температуры и ионной силы среды. В противоположность органическим растворителям растворимость макромолекул сильно понижается с температурой, поэтому, несмотря на понижение точки заморозки раствора, осаждение можно проводить и при  $T < 0$  °С. Осаждение при низкой температуре снижает денатурирующее действие органических растворителей.

Для выбора органического средства или оптимальной температуры не существует каких-то общепринятых правил. Процедура осаждения состоит в следующем. К сильно охлажденному раствору пробы порциями медленно вливают растворитель, осторожно перемешивая. Первую порцию добавляют до момента помутнения раствора, оставляют до созревания осадка при пониженной температуре (на несколько часов), полученный осадок отделяют центрифугированием и ресуспендируют. Далее операцию повторяют, пока не будет достигнута концентрация раствора, при которой осаждаются все содержащиеся в смеси белки. Для предотвращения денатурации белков перед добавлением новой порции растворителя смесь охлаждают до более низкой (вплоть до отрицательных значений) температуры. Это возможно из-за понижения температуры заморозки раствора за счет добавок органического растворителя.

Для выделения НК из биопробы нужно удалить белки. Для этого гомогенат перемешивают со свежеперегнанным и насыщенным водой фенолом (1 : 1), который денатурирует белки. К фенолу добавляется *m*-крезол, чтобы избежать кристаллизации фенола при низких температурах. Затем водная фаза (в ней растворены НК) от фенольной отделяется центрифугированием (3000 g). Остатки фенола

в воде удаляются эфиром, а эфир выдувается азотом. Для концентрирования НК могут осаждаться из водных растворов двукратным объемом этанола при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Кроме фенола/крезола белки можно отделить от НК смесью хлороформа с алифатическими спиртами (этанол, *n*-бутанол, изоамиловый спирт), но этот способ применим только для малых по объему проб.

Для выделения белков используют этанол и другие органические растворители (ацетон), которые дегидратируют молекулы белка, что ведет к понижению их устойчивости в растворе. Если осаждение проводить при охлаждении (от  $4$  до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и осадок быстро отделить от спирта, то белок может раствориться в воде, т. е. не успеет произойти денатурация. При длительном стоянии со спиртом белок денатурирует необратимо и становится нерастворимым в первоначальном растворителе. Для разделения белков плазмы крови человека на фракции широко применим метод, разработанный Е. Коном. Метод заключается в том, что к плазме крови последовательно добавляют все большее количество холодного этанола (от  $-3$  до  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и на каждой стадии фракции выпавших в осадок белков отделяют центрифугированием.

**Осаждение полиэлектrolитами и полимерами.** Полимеры (полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, метицеллюлоза, декстран) широко используются для осаждения белков. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – водорастворимый неионный полимер. В сравнении с солями и органическими растворителями он почти не изменяет структуру белков и денатурирует белки крайне незначительно даже при большой концентрации и высокой температуре. Осаждение с ПЭГ протекает очень быстро и почти не зависит от значения рН и ионной силы раствора. ПЭГ оказывает стабилизирующее действие на активность белков, а их растворимость понижается экспоненциально с концентрацией ПЭГ.

Полиэлектrolиты (полимеры, макромолекулы которых содержат функциональные группы, способные к электrolитической диссоциации) как синтетические (полиакрилат, полиэтиленимин, карбоксиметицеллюлоза и др.), так и натуральные (гепарин, хондроитин сульфат) могут осаждают белки из гомогената. Выбор полиэлектrolита определяется основными или кислотными свойствами белков.

Нуклеиновые кислоты, являющиеся отрицательно заряженными полианионами, осаждают основными полиэлектrolитами (поликатионами) – полиаминами, содержащими в повторяющемся звене макромолекулы первичные, вторичные, третичные или четвертичные аминокгруппы. Кроме того, НК могут быть удалены из растворов с помощью анионообменных смол. К примеру, большие количества НК осаждаются синтетическим полиэтиленимином. При этом надо учитывать, что многие белки могут агрегировать совместно с НК.

Сульфат стрептомицина (сильно основной низкомолекулярный антибиотик) осаждаёт почти полностью НК из растворов, содержащих низкие концентрации белков ( $2\text{--}10$  ммоль/л). Контроль осаждения осуществляется спектрофотометрически по поглощению надосадочной жидкости в УФ-области при  $280$  и  $260$  нм. Постоянные значения оптической плотности раствора свидетельствуют о завершении осаждения.

**Осаждение посредством изменения рН или температуры.** Осаждение при изменении температуры базируется на различной растворимости веществ. Большинство белков денатурирует и выпадает в осадок уже при кратковременном нагревании раствора до  $50\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$  или подкислении его до рН  $5$ . Если выделяемый белок выдерживает эти условия, то с помощью избирательной денатурации можно удалить большую часть посторонних белков.

Из органических кислот в качестве осадителей белков широко применяют трихлоруксусную (ТХУ) и сульфосалициловую кислоты. Механизм осаждения белков этими кислотами объясняют денатурацией и дегидратацией молекулы белка. ТХУ осаждает только белки и не осаждает продукты их гидролиза. Это имеет важное значение для определения белкового и небелкового азота. Сульфосалициловая кислота осаждает белки и высокомолекулярные пептиды.

Концентрированные минеральные кислоты (кроме ортофосфорной) вызывают необратимое осаждение белков. Это объясняют как явлениями дегидратации молекул белка, так и рядом других причин (денатурация, образование нерастворимых солей и др.).

**Адсорбция в потоке.** Это альтернатива методам осаждения. Содержащиеся в гомогенате вещества можно связать хроматографическими носителями по Бэч-способу (англ. Batch-adsorption). Данный метод особенно эффективен, когда имеется большая по объему проба с низким содержанием нужного компонента либо количество пробы очень мало (нано- и микрограммы). Адсорбцию проводят без использования колонки, адсорбат сразу добавляют в емкость с раствором пробы и смесь суспендируют, в процессе чего аналит адсорбируется на частицах носителя. После этого носитель осаждают, как правило, центрифугированием, супернатант отбрасывают, а комплекс «аналит – сорбат» разрушают добавлением соответствующих растворов.

## 2.5. Способы разделения компонентов с помощью мембран

В процессе выделения биоконпонентов получают, как правило, растворы, которые по ионной силе, значению рН и составу солей не подходят для других процедур очистки и последующего анализа. Существует ряд способов для снижения или удаления солей из пробы.

**Разбавление пробы дистиллированной водой.** Это простой способ изменить концентрацию солей и достигнуть желаемой ионной силы раствора. Впоследствии такую пробу нужно сконцентрировать, используя, например, ионообменную или аффинную хроматографию. Если разбавление пробы не является эффективным, необходимо применить различные техники удаления солей.

**Диализ.** Относится к наиболее известным и простым методам удаления солей. Это способ фильтрации через мембрану, при котором разделение компонентов происходит в результате диффузии (рис. 2.6).

Движущей силой процесса является разность концентраций подлежащего удалению вещества в исследуемом растворе и чистом растворителе, находящихся по разные стороны мембраны. Посредством диализа разделяются высоко- и низкомолекулярные соединения. В качестве средства разделения служит полупроницаемая мембрана, через которую проходят маленькие молекулы, а большие задерживаются. Мембраны (из мелкопористого ацетата целлюлозы или нитроцеллюлозы) различаются размером пор ( $d = 5\text{--}100$  нм). На них производителем указывается молекулярный вес (значение «cut-off»), с которым молекула уже не проходит через поры

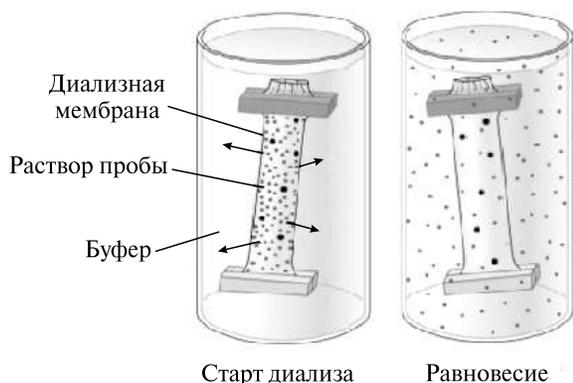


Рис. 2.6. Диализ

мембраны (до 90 %). Прохождение молекул через диализную мембрану зависит от их массы, заряда, формы и степени гидратации. Скорость диффузии частиц через мембрану определяется константой диффузии и градиентом их концентрации, площадью поверхности мембраны и температурой.

Процедура диализа заключается в следующих операциях. Диализный мешочек (полупроницаемая мембрана с определенным размером пор) заполняется пробой (например, 50 мл) на 2/3 и помещается в сосуд с буфером или водой, постоянно перемешиваемой с помощью магнитной мешалки. Маленькие молекулы диффундируют через мембрану, большие остаются внутри, причем сохраняется их активность. Необходимый градиент концентрации поддерживается путем смены буфера или воды в сосуде. Объем пробы остается постоянным. Диализ можно ускорить более частой или непрерывной сменой воды, нагреванием (для растворов белков не выше 40 °С), увеличением поверхности, через которую идет диализ, уменьшением слоя диализуемой жидкости (т. е. объема пробы). С помощью диализа также возможна замена буфера пробы другим. Степень диализа контролируют по проводимости буфера.

В ходе диализа можно сконцентрировать пробу. Если наполненный диализный мешочек поместить не в буфер, а в сильно гигроскопичную среду, например полиэтиленгликоль или сефадекс, то последние будут оттягивать воду и маленькие молекулы из пробы. Таким образом происходит повышение концентрации нужных биоконпонентов. Гигроскопичные материалы заменяют по мере их увлажнения на новые порции.

Недостатками диализа являются его длительность (5–10 ч), низкая эффективность в сравнении с ультрафильтрацией.

**Ультрафильтрация.** Этот способ хорошо подходит для быстрого разделения коллоидных систем и концентрирования растворов биомолекул. В отличие от диализа ультрафильтрация происходит не за счет градиента концентрации, а в результате перепада давления. Разность давлений по обе стороны мембраны создается путем повышения давления со стороны фильтруемого раствора или понижения его в ультрафильтрате. Фирменные приборы для ультрафильтрации состоят из камеры особой конструкции, в которой создается положительное давление, как правило, они снабжены магнитными мешалками. При ультрафильтрации

небольших объемов материала разность давлений может создаваться в результате использования вакуум-насоса или центрифугирования образца. По сути, разность гидростатических давлений по обе стороны мембраны обеспечивает диффузию молекул через мембрану. Процесс заключается в том, что на пути потока пробы (дисперсии) устанавливается полупроницаемая перегородка – мембрана. Через нее свободно проникает дисперсионная среда, жидкость и не проникает дисперсная фаза – частицы определенного размера (вирусы, бактерии и т. п.) или макромолекулы. С помощью ультрафильтрации возможно не только разделение суспензии, но и фракционирование смесей биоконпонентов по размерам молекул, концентрирование определенных фракций и т. п. В случае обычной фильтрации (размер пор  $>1,0$  мкм) можно отделить только механические примеси.

Размер частиц или молекул в разделяемой смеси, а также химические свойства растворенного вещества определяют выбор структуры мембраны, т. е. размер ее пор и их распределение по объему. Различные мембранные процессы можно классифицировать по размерам разделяемых частиц растворенного вещества и, следовательно, по структуре используемых мембран. Помимо ультрафильтрации (размер пор  $5 \cdot 10^{-3}$ – $5 \cdot 10^{-2}$  мкм), применяют также микрофильтрацию ( $10^{-1}$ – $10$  мкм), нанофильтрацию (до 1 нм) и гиперфильтрацию или обратный осмос ( $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-2}$  мкм), что определяется размером пор используемых мембран. В качестве мембран используют различные гидрофобные полимерные (политетрафторэтилен, полипропилен), гидрофильные полимерные (эфир целлюлозы, поликарбонаты, полиимид, полиамид) и керамические (оксид алюминия, оксид циркония) материалы. Очень часто применяют асимметричные мембраны с различным размером пор на верхней и нижней стороне. Сторона к пробе у мембраны может иметь тонкий слой (0,1–1,5 мкм) с очень малым размером пор, что повышает селективность и уменьшает засорение мембраны. Мембраны имеют номиналы, которые указывают, для фильтрации каких молекулярных масс они подходят. Как и всякий баромембранный процесс разделения жидкостей, фильтрация характеризуется отсутствием фазовых переходов и может проводиться при пониженных температурах.

**Диафильтрация.** Данный способ заключается в ультрафильтрационном концентрировании предварительно разбавленного водой исходного объекта (ультрафильтрационного концентрата) для максимального удаления низкомолекулярных веществ путем неоднократного проведения циклов «разбавление – концентрирование». При диафильтрации используют мембраны с различной селективностью по отношению к разделяемым компонентам раствора. Тот из компонентов, который плохо задерживается мембраной, переходит с растворителем в фильтрат, а компонент, по отношению к которому мембрана высокоселективна, остается в аппарате. В диафильтрации во время фильтрации объем пробы поддерживается постоянным. Это может достигаться двумя способами. К пробе добавляют постоянно новую порцию диализного буфера в количестве, равном количеству отобранного фильтрата. В другом варианте проба после уменьшения ее объема в результате фильтрации разбавляется буфером и снова фильтруется. Длительность диафильтрации определяется объемом фильтрата. Для уменьшения концентрации соли в 10 раз объем фильтрата должен превышать исходный объем пробы в 2–3 раза, а для уменьшения соли в 100 раз – в 4–6 раз.

**Гиперфильтрация (обратный осмос).** Это процесс мембранной фильтрации для отделения растворителя от растворенных веществ и ионов при наложении разности давлений без изменения фазового состояния разделяемых компонентов. Обратный осмос во многом аналогичен ультрафильтрации. Но при обратном осмосе используются мембраны с более мелкими порами, обеспечивающими перенос только растворителя. При этом перенос растворителя от более к менее концентрированному раствору реализуется за счет приложения к более концентрированному раствору давления, превышающего осмотическое. Растворенное вещество остается там, где его концентрация выше. На практике для достижения высокой скорости разделения применяют давление, в несколько раз превосходящее осмотическое. Осмос широко используется для обессоливания морских и солоноватых вод. Способом обратного осмоса получают ультрачистую воду для электронной промышленности, продуктов детского и лечебного питания, обрабатывают сточные воды и одновременно извлекают из них ценные вещества. Наблюдается тенденция широкого использования обратного осмоса в пищевой промышленности как эффективного способа концентрирования разбавленных растворов.

**Электродиализ.** Это метод очистки жидких дисперсных систем (растворов высокомолекулярных веществ) от примесей низкомолекулярных веществ, растворенных в дисперсионной среде. Он основан на ускорении диффузии ионов через полупроницаемую мембрану под действием постоянного электрического поля. Известно, что при наложении постоянного электрического поля на раствор в последнем возникает движение катионов (включая ион водорода) к отрицательно заряженному катоду, а анионов — к положительному аноду. Мембраны свободно пропускают раствор и задерживают ионы электролита. Используемые мембраны являются ион-селективными: одни задерживают катионы, другие — анионы. Метод электродиализа широко применяют в биохимических исследованиях при очистке (и выделении) белков, гормонов, антибиотиков и других биологически активных веществ.

Последние модели электродиализаторов многокамерные, в них мембраны расположены поочередно и разделяют общий объем на множество полостей (рис. 2.7).

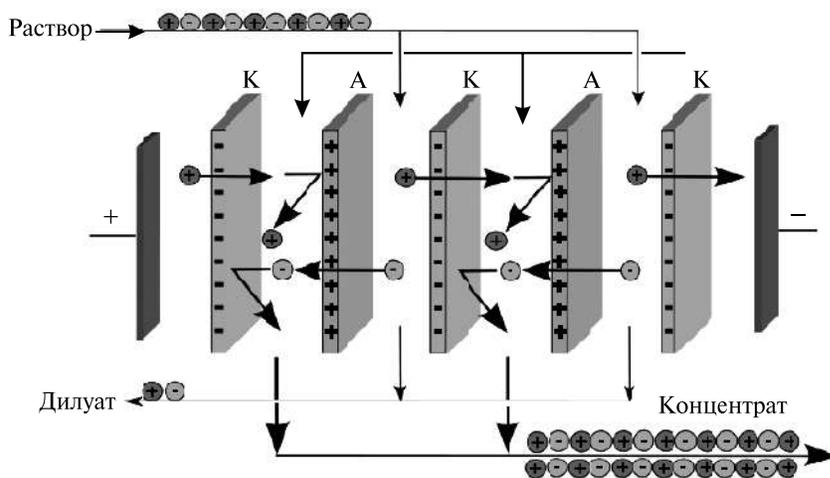


Рис. 2.7. Схема электродиализатора

Через ванну с раствором пропускают постоянный электрический ток, который приводит ионы растворенных солей в движение. Противоположно заряженные ионы движутся в противоположные стороны, но из-за того, что ванна заполнена препятствующими движению ионов мембранами, ионы задерживаются на ближайшей мембране, соответствующей их заряду, и остаются в полости между двумя мембранами. Результатом такого «просеивания» ионов является изменение концентрации раствора между соседними парами мембран – между одной парой происходит ее повышение (концентрат), между соседними к этой паре – понижение (дилуат). Скорость переноса ионов может изменяться подбором соответствующей силы тока. Такой перенос осуществляется против градиента концентрации. За ходом электродиализа следят, измеряя либо электропроводность получаемого раствора (электродиализата), либо концентрацию электролитов в нем.

## **2.6. Экстракционные методы разделения и концентрирования**

### **2.6.1. Принцип экстракции**

Для разделения, очистки от нежелательных примесей, концентрирования компонентов пробы, перевода пробы на другую матрицу (т. е. смена состава среды) на преаналитических этапах в биоанализе широко используются различные экстракционные техники.

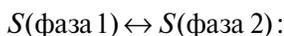
Экстракция (лат. *extrahere* – извлечение) – это перевод одного или нескольких аналитов из одной фазы в другую. Принцип базируется на различном распределении вещества между двумя несмешивающимися (нерастворимыми друг в друге) фазами. В процессе экстракции масса вещества из одной среды (отдающая) переходит в другую (принимающая). Разделение компонентов между фазами происходит в соответствии с их физико-химическими свойствами.

Экстракция подчиняется законам диффузии и равновесного распределения. Массообмен при всех способах распределения вещества между двумя любыми фазами возможен только на поверхности раздела этих фаз. Для ускорения приближения системы к состоянию равновесия площадь контактирующей поверхности стремятся увеличить. При проведении экстракции из жидких проб это достигается с помощью встряхивания жидкостей или смешивания при продавливании через пористые фильтры, а из твердых тел – путем их измельчения перед экстрагированием.

В биоанализе пробы представляют собой либо твердые вещества, либо водные системы. Наиболее часто используют экстракцию из водных растворов с помощью органических растворителей (толуол, диэтиловый эфир, гексан, хлороформ, дихлорметан и др.).

Переход экстрагируемого вещества из одного растворителя в другой происходит в результате разности концентраций и неодинаковой растворимости этого вещества в обоих растворителях. Этот процесс длится до тех пор, пока не наступит равновесие концентраций извлекаемого вещества в одном и в другом растворите-

лях. Допустим, что аналит ( $S$ ) распределен между фазами 1 и 2. Константа распределения ( $K$ ) представляет собой константу равновесия для реакции



$$K = \frac{A_{S2}}{A_{S1}} \approx \frac{[S]_2}{[S]_1},$$

где  $A_S$  – активность компонента;  $[S]$  – концентрация компонента.

Если коэффициент активности неизвестен, константу распределения выражают через отношение концентраций (справедливо для разбавленных растворов).

Допустим, что аналит  $S$  экстрагируют из объема  $V_1$  (мл) растворителя 1 (фаза 1, например, вода) с помощью объема  $V_2$  (мл) растворителя 2 (фаза 2, например, толуол);  $m$  – общее количество аналита  $S$  в системе (в молях);  $q$  – часть аналита  $S$ , которая остается в равновесии в фазе 1. Тогда концентрация аналита в фазе 1 равна  $qm/V_1$ . Часть аналита, которая перейдет в фазу 2, составляет  $(1 - q)$ , а концентрация в данной фазе –  $(1 - q)m/V_2$ . В результате константу распределения можно представить выражением

$$K = \frac{[S]_2}{[S]_1} = \frac{(1 - q)m/V_2}{qm/V_1}.$$

Тогда долю аналита, которая остается в фазе 1 после экстракции, можно выразить следующим образом:

$$q = \frac{V_1}{V_1 + KV_2}.$$

Таким образом, доля аналита, которая остается в фазе 1, зависит от константы распределения и обоих используемых объемов.

В результате однократной экстракции возможна сравнительно небольшая степень извлечения вещества из исходного раствора, поэтому прибегают к многократному повторению актов смешения и последующего расслаивания взаимодействующих фаз. Если проводить экстракцию из фазы 1 повторно  $n$  раз (т. е. добавлять свежие порции растворителя 2 в объеме  $V_2$ , мл), тогда доля аналита  $S$ , оставшаяся в фазе 1 после  $n$  экстракций, составит

$$q^n = \left( \frac{V_1}{V_1 + KV_2} \right)^n.$$

Степень извлечения вещества при дробной экстракции выше, чем при однократной. Эффективней проводить экстракцию несколько раз небольшими количествами растворителя, чем извлекать вещество одним большим объемом экстрагента.

При экстрагировании различных веществ нужно учитывать форму их нахождения в растворе, например растворенное вещество является кислотой или основанием, заряд которых будет варьироваться в зависимости от значения pH. Обычно нейтральные частицы лучше растворимы в каком-то органическом растворителе, а заряженные больше водорастворимы. Чтобы экстрагировать основание ( $B$ , на-

пример, основной амин) из растворителя в воду, нужно использовать низкие значения рН экстрагента, чтобы основание превратилось в кислоту ( $\text{BH}^+$ ). Для экстракции кислоты НА в воду нужно применить высокие значения рН для перехода кислоты в основание  $\text{A}^-$ .

При экстракции важно установить окончание процесса извлечения. Для окрашенных веществ его определяют по отсутствию окрашивания экстрагирующего растворителя; для бесцветных – по специфическим реакциям на извлекаемое вещество в последней порции экстракта или по отсутствию пленки, матового пятна на стекле после упаривания этой порции. Полученные экстракты сушат, упаривают, подвергают дальнейшим методам очистки.

В зависимости от агрегатного состояния обеих фаз экстракция может быть проведена в различных системах: «жидкость – жидкость»; «жидкость – твердая фаза»; «твердая фаза – жидкость»; «жидкость – газ»; «газ – жидкость». В таблице приведены различные экстракционные техники. Для разделения биологических макромолекул не используют экстракцию в газовую фазу, так как они не являются летучими и при переводе их в газообразное состояние будут разлагаться.

**Экстракционные методы, используемые для различных систем**

Фаза 1	Фаза 2	Экстракционные техники
Твердая	Жидкая	Соклет-экстракция Ускоренная экстракция растворителями Экстракция ультразвуком Экстракция микроволнами
Твердая	Сверхкритическая	Сверхкритическая флюидная экстракция
Твердая	Газообразная	Парофазная экстракция (англ. headspace) Перегонка с водяным паром
Жидкая	Твердая	Твердофазная экстракция Твердофазная микроэкстракция Метод дисперсии матрицы с твердым сорбентом
Жидкая	Жидкая	Жидко-жидкостная экстракция
Жидкая	Газообразная	Парофазная экстракция (англ. purge-and-trap-technik)

К факторам экстрагирования, влияющим на этот процесс и с помощью которых можно увеличивать выход экстрактивных веществ, относятся измельченность сырья, разность концентраций экстрактивных веществ в двух фазах и температура. При измельчении увеличивается суммарная поверхность сырья, контактирующая с экстрагентом: чем больше поверхность, тем больше вещества извлекается. Однако при сильной измельченности сырья (растения, животные ткани, микроорганизмы и др.) экстракт может быть загрязнен балластными веществами. Разность концентраций экстрактивных веществ в сырье и экстрагенте является движущей силой любого вида диффузии, поддержать которую можно путем перемешивания, циркулирующей экстрагента и заменой вытяжки новыми порциями экстрагента. С повышением тем-

пературы интенсивность диффузии увеличивается, поэтому этот фактор довольно часто используют для повышения эффективности экстракции (например, при получении масляных экстрактов).

## 2.6.2. Экстракция в системе «жидкость – жидкость»

Жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) является традиционным методом подготовки проб. Она представляет собой процесс извлечения веществ, растворенных в одной жидкости, в другую (экстрагент), не растворяющуюся или почти не растворяющуюся в первой, но избирательно растворяющей экстрагируемые компоненты. ЖЖЭ обычно используют для экстракции компонентов из водных растворов посредством органических растворителей (рис. 2.8). ЖЖЭ применяют, например, в фармацевтике при извлечении БАВ из биожидкостей и культуральных сред при производстве антибиотиков, настоев и т. п.

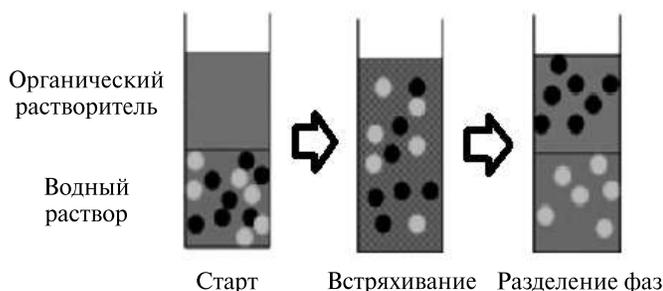


Рис. 2.8. Жидко-жидкостная экстракция

Раствор экстрагированных веществ в экстрагенте называют экстрактом, а остаточный раствор, из которого экстрагированы извлекаемые компоненты, – рафинатом. Разделение смеси на экстракт и рафинат происходит в результате статической (отстаивание) или центробежной (центрибежные экстракторы) декантации. В плотности экстрагирующего растворителя и исследуемого раствора должна быть достаточно большая разница, чтобы они хорошо разделялись. Неполлярные углеводороды и эфиры (полярные) менее плотные, чем вода, и в смеси будут находиться в верхней фазе. Хлорсодержащие растворители (например, хлороформ) более тяжелые в сравнении с водой, поэтому будут вытеснять ее вверх. Полярность экстрагента должна быть отличной от полярности раствора пробы, чтобы они не растворялись друг в друге. Физико-химические свойства аналитов определяют выбор экстрагента. Экстрагируемое вещество должно лучше растворяться в экстрагенте, чем в растворителе, из которого его извлекают. Действует принцип: подобное растворяется в подобном. Для извлечения полярных веществ с высоким значением диэлектрической постоянной используют полярные экстрагенты (например, метанол), для неполярных – неполярные (например, хлороформ). Повышение селективности экстракции достигают с помощью бинарных смесей растворителей (хлороформ/изопропиловый спирт, хлороформ/метанол, гептан/этилацетат и др.).

Массообмен в процессе экстракции осуществляется на поверхности раздела двух фаз. Массоперенос анализируемого вещества от одной фазы к другой продолжается до достижения термодинамического равновесия. Для увеличения площади поверхности фазового контакта одну из фаз диспергируют в виде капель в другой сплошной фазе. Распределяемое вещество диффундирует из сплошной фазы к поверхности капель, а затем внутрь капли либо, наоборот, из капли через поверхность раздела фаз в сплошную фазу. Массопередача внутри капель осуществляется молекулярной и конвективной диффузиями. Конвекция внутри капель возникает за счет циркуляции жидкости. Перемешивание ускоряет процессы, протекающие в диффузионной области вследствие замены медленной молекулярной диффузии быстрым конвективным переносом реагентов.

*Конвективная диффузия* обусловлена движением жидкости в результате встряхивания, перемешивания, изменения температуры и других внешних воздействий. Данный вид диффузии реализуется за счет перемещающихся внутри жидкости конвективных потоков, несущих диффундирующее вещество. Перенос вещества осуществляется вследствие перемещения отдельных весьма малых (элементарных) объемов жидкой фазы, причем вещества внутри этих элементарных объемов переносятся посредством молекулярной диффузии, характерной для неподвижной фазы, которой и является элементарный объем жидкости. Увеличение скорости перемещения жидкости приводит к увеличению конвективной диффузии. Скорость переноса вещества в результате конвективной диффузии тоже пропорциональна разности концентраций. Скорость конвективной диффузии в 10–12 раз выше, чем молекулярной, протекающей самопроизвольно (без воздействия внешних сил) вследствие беспорядочного теплового движения молекул (броуновское движение). Отличительная особенность *молекулярной диффузии* заключается в том, что перенос массы вещества осуществляется молекулами, а среды неподвижны относительно друг друга. Скорость молекулярной диффузии прямо пропорциональна поверхности контакта сред, разности концентраций, температуре. Обратная зависимость зависит от толщины диффузионного слоя, вязкости экстрагента и радиуса частиц. Движущей силой диффузии является разность концентраций. При выравнивании концентраций диффузия приостанавливается.

Степень извлечения аналитов методом ЖЖЭ составляет 70–90 %, при этом их концентрация в экстракте может повыситься в 5–10 раз по сравнению с исходной пробой.

Простой вариант ЖЖЭ – встряхивание в делительной воронке. Обычно проводят многократную экстракцию, которая базируется на повторяющейся делительной операции со свежей порцией растворителя. Это может быть прерывное встряхивание с новой порцией или непрерывное в перфораторе (аппарат для экстрагирования). Для оценки количественного выхода экстракции часто на всех стадиях добавляется внутренний стандарт – вещество, сходное по свойствам с целевым аналитом.

Недостатком ЖЖЭ является необходимость использования больших объемов высокочистых, дорогих и токсичных органических растворителей, а сама процедура экстракции трудоемка, длительна, кроме того, в ходе экстракции происходит разбавление компонента и требуется упаривание экстрагента.

### 2.6.3. Экстракция в системе «твердая фаза – жидкость»

Механизм экстрагирования целевых компонентов из твердого сырья в общем случае включает следующие основные стадии: смачивание твердого материала и проникновение экстрагента в поры твердого материала; растворение и десорбция целевых компонентов внутри твердых частиц; перенос растворенных целевых компонентов из глубины твердой частицы к поверхности раздела фаз, который осуществляется с помощью молекулярной диффузии; перенос вещества от поверхности раздела фаз в объем экстрагента и распределение его по всей массе экстрагента с помощью конвективной диффузии.

Скорость экстракции в системе «твердая фаза – жидкость» значительно зависит от скорости переноса вещества в порах твердых частиц: чем больше разность концентраций экстрагируемого вещества в твердых частицах и растворителе, тем интенсивнее происходит диффузия. Кроме того, чем больше поверхность соприкосновения экстрагируемого вещества с растворителем и длительность соприкосновения, тем большее количество вещества будет диффундировать в единицу времени в данной системе. Поэтому для интенсификации процесса перед экстрагированием твердый материал измельчают.

Степень изолирования исследуемых веществ из исходного биологического материала зависит от растворимости извлекаемых веществ в экстрагенте, структуры (пористости) исходного материала и степени его измельчения, проникающей способности экстрагента в материал, интенсивности перемешивания смеси измельченного исходного материала и экстрагента, кратности настаивания биоматериала с экстрагентом, температуры, рН среды и ряда других факторов. Длительность экстракции и полноту экстрагирования, а также способ и условия ее проведения определяют в каждом конкретном случае.

Данный вид экстракции широко используют для выделения индивидуальных липидов из исходного материала (например, растительного). Экстракцию мембранных фосфолипидов можно осуществить с помощью смеси органических растворителей хлороформ/метанол. Они разрушают взаимодействие липидов с белками, дезактивируют большинство липолитических ферментов, которые в активной форме вызывают деградацию липидов.

При экстракции белков из гомогенизированных биопроб нужно учитывать особенности этих биополимеров. Для извлечения растворимых белков широко применяют различные буферные смеси со значением рН среды от кислых до слабощелочных (боратные, фосфатные, цитратные, трис), а также 8–10 % растворы солей. Экстракцию мембранных белков проводят, используя буферы с добавками детергентов (дезоксихолат, додецилсульфат натрия, тритон X-100 и др.), которые способствуют разрушению гидрофобных взаимодействий между белками и липидами или другими белковыми молекулами. Буферы могут также содержать глицерин (5–10 %), мочевины (< 8 М), тиомочевину (< 5 М) или сахарозу (25 мМ) для стабилизации молекул белка.

Экстракция из твердого растительного или животного сырья широко распространена в пищевой промышленности, например извлечение водой сахара из свеклы или трихлорэтиленом масла из соевых семян. В фармацевтическом производстве данным способом получают, например, различные настои, экстрагируя БАВ из лекарственного растительного сырья.

Экстракция *по методу Сокслета* – один из самых распространенных методов экстракции веществ из твердого сырья в лабораторных условиях. Ф. Сокслет (1848–1926, немецкий агрохимик) изобрел аппарат для определения содержания жира в сухих продуктах. В качестве проб могут использоваться почвы, биоматериалы, продукты питания. В аппарате Сокслета растворитель нагревается в круглодонной колбе до кипения, и его пары поднимаются в обратный холодильник, где конденсируются. Сконденсированный растворитель капает в экстрактор, содержащий твердый материал. После того как объем растворителя в экстракторе достигнет определенного уровня, он сливается в колбу и, продолжая кипение, вновь начинает поступать в экстрактор. Прибор позволяет производить многократную экстракцию за счет повторного использования растворителя, при этом экстрагируемое вещество накапливается в основной колбе. После окончания экстракции растворитель сливают из колбы в подходящую емкость и упаривают до остаточного объема, пригодного для дальнейшей работы. Существенными недостатками метода являются длительное время экстракции (от нескольких часов до суток), небольшое количество возможностей для варьирования условий экстракции и большое потребление растворителя (в диапазоне литров). Это послужило стимулом для развития и усовершенствования метода путем автоматизации и использования высоких температур и давления.

*Ускоренная экстракция растворителями* (англ. accelerated solvent extraction (ASE)) служит для экстракции органических соединений из твердых и полутвердых образцов с помощью жидких растворителей. Метод ускоряет процесс экстракции благодаря использованию растворителя при высокой температуре (до 200 °С) и давлении (0,3–20 МПа). Повышенное давление позволяет сохранять растворитель в жидком состоянии при температуре выше температуры его кипения. Кроме того, в таких условиях более узкие поры в твердой матрице становятся доступными для проникновения растворителя. Температура способствует повышению растворяющей способности экстрагента, скорости его диффузии в матрицу, снижению вязкости и поверхностному натяжению растворителя, нарушению сорбционных межмолекулярных взаимодействий между активными центрами матрицы и молекулами аналита.

Для экстракции применяют установки (ASE® компания Dionex), использующие запатентованную технологию (первая модель запатентована в 1995 г.). Растворитель заполняет ячейку, в которой находится образец; проба должна быть предварительно измельчена. Ячейка с образцом нагревается в печи. Объем пробы в экстракционных ячейках составляет 1–100 мл. Экстракция осуществляется путем непосредственного контакта горячего растворителя с образцом в статическом и динамическом режимах. По окончании экстракции азот под давлением вытесняет весь растворитель из ячейки через фильтр в сборник. Отфильтрованный экстракт подлежит последующей обработке или физико-химическому анализу. Экстракция таким способом в несколько раз быстрее, чем экстракция Сокслета, ультразвуковая и сверхкритическая экстракция, и требует значительно меньшего количества растворителя и трудозатрат. В качестве растворителей используют пентан, этилацетат или ацетон, водные системы (например, буферы). Кроме того, можно одновременно применять различные растворители.

Метод ASE успешно используется в экологическом мониторинге (анализ пестицидов, гербицидов, взрывчатых веществ, диоксинов, фуранов), исследовании продуктов питания (жиры, остатки пестицидов, витамины, антибиотики), недр,

фармацевтике (анализ действующих веществ в лекарственных средствах, БАДов), криминалистике и других отраслях промышленности.

Применяя традиционные растворители при повышенных температуре и давлении, метод ASE существенно увеличивает эффективность процесса экстракции (время экстракции составляет всего 15–18 мин, а объем растворителя – 15–100 мл).

*Экстракция ультразвуком* (механическими волнами) нашла широкое применение в биоаналитической практике для различных целей – очистки сложных микроструктурированных материалов, лучшего растворения труднорастворимых субстанций, гомогенизации биопроб, а также для экстракции. Источником ультразвука (УЗ) чаще всего являются пьезоэлектрические элементы (пьезоэлектрический кварц, или керамический осциллятор), которые преобразуют электрическую энергию в механические колебания. На практике применяют УЗ с частотой в области 20 кГц – 1 ГГц.

Экстракция с помощью ультразвука – современный, высокоэффективный, экономически выгодный, высокопроизводительный, экологически чистый технологический процесс. УЗ-экстракция позволяет получать химически чистые экстракты биологически активных веществ из природного сырья растительного или животного происхождения.

Применение ультразвука высокой интенсивности позволяет увеличить скорость протекания экстракции (в 10–100 раз) и выход экстрагируемых веществ, обеспечить экстракцию веществ, недоступных другими способами. При проведении УЗ-экстракции в качестве растворителя используют воду, органические растворители (например, этанол, этилацетат, метанол, гексан, ацетон, ацетонитрил) или их смеси с водой, хотя можно отказаться от применения экстрагирующих органических реагентов. Эффективность экстракции повышается, если процедуру проводить при увеличении температуры, однако в данном случае и при  $T_{\text{комн}}$  можно достичь высокой эффективности.

Ультразвуковые технологии экстрагирования реализуются при помощи универсальных ультразвуковых ванн для обработки в жидкой среде, диспергаторов и специализированных установок для экстрагирования в жидкости. При проведении УЗ-экстракции с помощью ультразвуковой ванны, наполненной водой, в нее помещают сосуд с исследуемой пробой в растворителе. Частоту ультразвука и длительность экстракции выбирают так, чтобы передача энергии молекулам пробы осуществлялась щадящим образом для минимизации их распада. На выход экстрагируемых веществ влияют интенсивность и продолжительность действия УЗ, температура экстрагента, соотношение сырья и экстрагента. Оптимальная частота – 21–22 КГц, рекомендуемая плотность облучения – не более 2–2,2 Вт/см<sup>2</sup>, а концентрация твердой фазы – не более 10 % (соотношение 1 : 10). В промежутках между ультразвуковой обработкой рекомендуется проводить перемешивание. Не следует слишком долго проводить УЗ-экстракцию, поскольку большая продолжительность почти не повышает степени извлечения веществ, но заметно влияет на их устойчивость. Экстракция может занимать 5–30 мин, после нее необходима стадия фильтрации экстракта.

Звуковые (акустические) колебания воздействуют на химико-технологические процессы через так называемые эффекты первого (частота, интенсивность, скорость акустических колебаний) и второго порядка, развивающиеся в жидкости при распространении мощных акустических волн. К последним относятся кавитация (разрыв сплошности жидкости), акустические течения (звуковой ветер), радиационное давление, пульсация газовых пузырьков.

Ультразвуковые волны движутся в среде как продольные компрессионные (сжатые) волны, при этом фазы сжатия и разрежения, равные по величине амплитуде волны, чередуются в каждом элементе объема жидкости в соответствии с частотой. Возникающие при прохождении УЗ-волн участки сгущения и разрежения среды создают добавочные изменения давления в среде по отношению к окружающему ее внешнему давлению. Такое добавочное давление носит название давления излучения (*радиационное давление*). Оно служит причиной того, что при переходе УЗ-волн через границу жидкости с воздухом происходит отрыв отдельных капелек от поверхности и образуются фонтанчики жидкости.

В фазе разрежения акустической волны в жидкости возникает относительно низкое давление и образуются пустоты или пульсирующие пузырьки, заполненные паром, газом или их смесью. Появление и движение такого рода пузырьков принято называть *кавитацией* – разрыв (нарушение) сплошности жидкости. Разрыв происходит преимущественно в механически слабых местах, например на границе фаз «жидкость – твердая поверхность». При этом каждый пузырек принимает очень большое количество энергии из звукового поля. Перемещаясь с потоком в область с более высоким давлением или во время полупериода сжатия, кавитационный пузырек схлопывается (наносекунды). При схлопывании пузырька в момент достижения минимального размера в центральной области образуется пик давления и в направлении от центра формируется и распространяется в жидкости сферическая ударная волна, быстро затухающая в пространстве. Пузырек кавитации, взрываясь, отдает при этом всю сконцентрированную при росте энергию. В микрообласти взрыва происходит повышение давления (до 500 ат) и температуры (до 5000 °С), в результате чего образуется поток жидкости со скоростью вплоть до 400 км/ч. Эффект кавитации зависит от энергии (амплитуды) и в меньшей степени от частоты ультразвука. Поскольку кавитационных пузырьков много и их схлопывание происходит много тысяч раз в секунду, то в итоге образуются режущие силы, способные механически разрушить твердый материал, например стенки клеток, и высвободить содержимое.

УЗ-волна, проходящая через среду, несет в себе импульс, постепенно передающийся частицам среды, вызывая их упорядоченное движение. В колебательное движение вовлекаются не только молекулы и объемы жидкости, через которую проходит волна, но и частицы вещества, находящиеся в ней в различном физико-химическом состоянии. Все они испытывают постоянное давление в сторону от излучателя. Компоненты систем типа «жидкость – твердое тело», «жидкость – жидкость» не только колеблются около положения равновесия, но и смещаются в одну сторону, образуя акустическое течение («звуковой ветер»). Скорость акустических течений зависит от интенсивности звука и вязкости среды. При этом появляются сильные турбулентные течения, гидродинамические микропотоки, способствующие переносу масс, растворению веществ. Такое явление отмечается как снаружи твердых частиц, так и внутри них (например, набухшей клетки). Вследствие различной инертности частиц фазы их собственные колебания не совпадают с таковыми основной массы жидкости. В результате этого в местах трения происходят локальное повышение температуры, уменьшение вязкости жидкости, увеличение турбулентности, нарушение структуры прилегающих слоев, и, как основное следствие этого, пограничный слой, имеющийся около частиц, ис-

тончается или получает предельную толщину, значительно меньшую, чем в спокойном состоянии фаз.

Таким образом, физический механизм действия ультразвука приводит к следующему:

- увеличивается скорость обтекания частиц пробы;
- молекулярная диффузия внутри частиц материала и в пограничном диффузионном слое практически заменяется конвективной, что вызывает интенсификацию массообмена;
- происходит диспергирование частиц, т. е. увеличение межфазной поверхности (например, разрушаются клеточные структуры, что ускоряет процесс перехода полезных веществ в экстрагент за счет их вымывания);
- усиливается перенос масс, растворение веществ, происходит интенсивное перемешивание содержимого даже там, где этого достичь другими способами невозможно (например, внутри клетки);
- улучшается проникновение экстрагента в материал.

При использовании УЗ экстракт можно получить в течение нескольких минут. Однако нужно помнить, что интенсивное УЗ-облучение пробы приводит к образованию чрезвычайно активных гидроксильных радикалов, способных вызывать деструкцию биомолекул и, следовательно, изменять свойства выделяемых компонентов.

*Экстракция микроволнами (МВ)*, как и ультразвуком, способствует значительному ускорению и эффективности процесса. Это электромагнитные волны в области длин 0,05–1 м с частотой 300 МГц – 1 ГГц. Источник микроволн в приборах – магнетрон (коммерческие приборы работают на частоте 2,45 ГГц). Микроволны вследствие низкой энергии не изменяют структуру молекул, не вызывают переходов электронов, но ввиду ротации диполей и движения молекул способствуют образованию ионов. Экстракция может проводиться под давлением (0,5–20 МПа) и при температуре 250 °С. Для МВ-экстракции используют приборы из тефлона, который, как кварцевое стекло и полипропилен, прозрачен для микроволн.

Американский инженер П. Спенсер (1894–1970) обнаружил (1945) тепловое действие микроволнового излучения. Ему принадлежит патент на создание МВ-печи, предназначенной для приготовления пищи.

МВ-экстракция (МВЭ) базируется на том, что энергия микроволн конвертируется в тепловую энергию. Нагревание под действием МВ относится к области диэлектрического нагревания, под которым понимают образование тепла в непроводящих или слабо проводящих веществах под действием высокочастотного переменного электрического поля. При выборе растворителей для МВЭ особенно важны теплоемкость вещества, его диэлектрическая постоянная и коэффициент диэлектрических потерь. Диэлектрическая постоянная характеризует поляризуемость диэлектрика в электрическом поле, коэффициент диэлектрических потерь отражает эффективность превращения электромагнитного излучения в теплоту. Предпосылкой для нагревания вещества в переменном электрическом поле является несимметричная структура молекул (например, как у молекулы воды). Под действием переменного электрического поля молекулы таких веществ образуют электрические диполи (поляризуются), которые совершают вращательно-колебательные движения в такт высокочастотного поля. При этом молекулы тормозятся вследствие возникающего межмолекулярного трения, и их кинетическая энергия превращается в тепловую. Затем молекулы снова ускоряются высокочастотным полем, и процесс повторяется.

При воздействии микроволн на объект его разогревание происходит более гомогенно, чем при нагревании электроплиткой (где сначала возникают локальный разогрев и образование температурного градиента). Поскольку энергия переносится на всю поверхность объекта, разогрев осуществляется более равномерно и можно минимизировать локальный перегрев.

При МВЭ растворитель должен хорошо поглощать энергию, разогреваться (быстрый разогрев реакционной смеси сокращает время экстракции) и, конечно, хорошо растворять необходимые анализы. Соответствующими диэлектрическими характеристиками обладают полярные растворители, в первую очередь низшие спирты, максимум поглощения которых наиболее близок к частоте, используемой в лабораторных микроволновых системах. Широко используются также смеси спиртов с водой. В случае водных проб могут применяться и неполярные растворители, в данном случае энергия поглощается водой и происходит разогревание, что способствует подогреву неполярного растворителя и повышению его эффективности.

Метод МВЭ позволяет количественно извлекать органические соединения из матрицы за короткое время (5–15 мин) с использованием минимальных количеств органических растворителей (2–10 мл/1 г образца), проводить подготовку десятка образцов, прост в исполнении, дешев. МВЭ довольно универсальна и дает возможность экстрагировать несколько групп веществ одновременно, сохраняет летучие компоненты.

МВЭ органическими растворителями стала рутинным методом пробоподготовки при определении в почвах и других твердых образцах фенолов, хлорсодержащих пестицидов, полициклических ароматических соединений, полихлорированных бифенилов.

*Сверхкритическая флюидная экстракция* представляет собой новый технологический процесс для извлечения и концентрирования различных веществ. Методом пробоподготовки, основанным на жидкостной экстракции, присущ ряд ограничений и недостатков: низкая производительность и многостадийность, низкая селективность и ограниченные возможности управления ею в процессе экстракции, искажение состава за счет потери компонентов и привнесения новых за счет примесей растворителя, загрязнение окружающей среды. Использование в качестве экстрагента сверхкритического флюида во многом позволяет улучшить процесс экстракции веществ из твердого сырья. В настоящее время разработаны способы *сверхкритической флюидной экстракции* (СКФЭ) различных органических веществ (полиароматических углеводов, полихлорированных бифенилов и дибензодиоксинов, пестицидов, гербицидов и др.) из почв, донных отложений, растительных и животных тканей, пищевых продуктов. СКФЭ нашла широкое применение в фармацевтической промышленности при извлечении фармакологически активных компонентов из растительного сырья, в пищевой отрасли – при получении растительных масел из природного сырья, в биотехнологических производствах – при выделении продуктов микробной ферментации.

Сверхкритическим флюидом (СКФ) называют состояние вещества, когда исчезает различие между жидкой и газовой фазой. Вещество переходит в сверхкритическое состояние в критической точке, которая характеризуется посредством термодинамических величин критической температуры, критического давления

и критической плотности. Понижение либо температуры, либо давления ниже критического выводит вещество из сверхкритического состояния. Впервые сверхкритическое состояние вещества обнаружил К. де ла Тур в 1822 г., нагревая различные жидкости в наглухо закрытом металлическом шаре. В сверхкритическом состоянии способно находиться большое количество веществ, фактически переход в сверхкритическое состояние ограничен температурой разложения вещества.

Свойства вещества в сверхкритическом состоянии являются промежуточными между его свойствами в газовой и жидкой фазах. СКФ имеет газоподобные свойства: низкую вязкость, малое вязкое трение, пренебрежимо малое поверхностное натяжение, высокий коэффициент диффузии. Последний в сверхкритических флюидах на два десятичных порядка выше, чем в обычных жидкостях. Как и жидкости, СКФ обладает высокой растворяющей способностью. Плотность СКФ близка к плотности жидкости и очень чувствительна к изменениям температуры и давления. На этой основе плотность СКФ можно установить между  $0,1 \text{ г/см}^3$  (газообразная) и  $1,2 \text{ г/см}^3$  (жидкообразная). Растворимость веществ экспоненциально зависит от плотности сверхкритического растворителя. Небольшие изменения в давлении, особенно вблизи критической точки, могут сильно влиять на растворимость.

Уникальные свойства СКФ как растворителя находят широкое применение для экстракции и разделения. В сверхкритических средах возможно растворение веществ, нерастворимых в жидкой фазе. В сравнении с жидкой фазой СКФ более сжимаемы, имеют больший мольный объем, что может способствовать образованию кластеров и нестойких комплексов и положительно влиять на повышение растворимости.

Основными преимуществами СКФ как растворителей являются:

- высокая растворяющая и проникающая (низкая плотность, низкая вязкость, высокий коэффициент диффузии) способность;
- возможность селективной экстракции за счет изменения температуры и давления флюида и тем самым его плотности, т. е. возможность менять спектр экстрагируемых веществ;
- сокращение времени экстракции вследствие быстрого массопереноса (низкая вязкость, высокий коэффициент диффузии);
- простота разделения СКФ и растворенных в нем веществ при сбросе давления;
- минимизация искажения состава пробы за счет примесей, привнесенных с экстрагентом (чистота СКФ значительно выше, чем любого органического растворителя);
- упрощение стадии экстракции и извлечения определяемых соединений из экстракта.

Благодаря уникальным свойствам СКФ возможно проведение очень эффективной экстракции в короткое время (10–100 мин) при потреблении маленьких количеств растворителей.

В настоящее время в качестве СКФ используется широкий спектр органических и неорганических соединений, таких как  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SF}_6$ , различные фреоны ( $\text{CH}_3\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{F}_2$ ,  $\text{CHF}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$ ). Однако наиболее популярным и широко применяемым растворителем в сверхкритическом состоянии, на основе которого осуществлено более 80 % всех исследований в области сверхкритических флюидных технологий и процессов, является диоксид углерода. Это обусловлено его удобными критическими параметрами (давление – 72,8 атм, температура – 31,2 °С, плот-

ность – 0,45 г/см<sup>3</sup>). Кроме того, диоксид углерода – это нетоксичное, негорючее, химически инертное и относительно недорогое вещество, которое при нормальных условиях является газом, что облегчает его разделение с целевыми продуктами после завершения процесса. Использование CO<sub>2</sub> вместо органических растворителей повышает экологическую безопасность производств, а также степень чистоты получаемых продуктов, так как CO<sub>2</sub> не оставляет в системе вредных веществ.

Для увеличения степени извлечения полярных соединений и повышения скорости экстракции к диоксиду углерода добавляют полярные органические растворители, чаще всего метанол (1–20 %). Многие потенциально важные вещества растворяются только с использованием поверхностно-активных веществ, что в целом удорожает процедуру.

При использовании CO<sub>2</sub> можно осуществить очень бережную экстракцию содержимого из биоматериалов или продуктов питания. Диоксид углерода широко используется для производства лекарств, удаления алкалоида кофеина из кофе. Растет его применение как заместителя хлорсодержащих углеводородов. К примеру, при получении экстрактов хмеля CO<sub>2</sub> в значительной мере вытеснил традиционно использовавшийся для этого дихлорметан. При этом CO<sub>2</sub>-экстракты не содержат остаточных количеств токсичного растворителя, пестицидов, применяемых при возделывании хмеля, а также продуктов изомеризации – кислот. Более того, варьируя условия экстракции (температура, давление), можно селективно извлекать из сырья эфирные масла, твердые и мягкие смолы, тем самым влияя на вкусовые качества целевого продукта. Сверхкритическим CO<sub>2</sub> эффективно экстрагируются различные масла из растительного сырья, моно-, ди- и триглицериды и эфиры жирных кислот, пальмовое масло, масло из куркумы, рыбий жир.

#### **2.6.4. Экстракция в системах «твердая фаза – газ» и «жидкость – газ»**

Для извлечения летучих целевых соединений нередко применяют парофазную экстракцию. Название метода «парофазный анализ» было предложено и введено в русскоязычную научную литературу в начале 1980-х гг., хотя метод уже достаточно широко использовался в аналитической практике с 1970-х гг. Сущность метода состоит в выделении из образца паров содержащихся в нем летучих соединений при помощи нагревания, пропускания тока инертного газа или комбинации обоих воздействий. Агрегатное состояние образца может быть как жидким, так и твердым.

В том случае, когда паровую фазу выделяют в замкнутом пространстве (обычно при нагревании до 40–80 °С в течение 1–10 мин), подход называют статической парофазной экстракцией (англ. headspace). Анализу подвергают воздушно-паровую фазу из газового пространства емкости над поверхностью пробы. При выборе условий стремятся к тому, чтобы состав паровой фазы был как можно ближе к равновесному, что крайне важно с точки зрения воспроизводимости анализа. Данную технику экстракции используют для перевода легколетучих компонентов из комплексных матриц, которые, как правило, нелетучи, например при анализе алкоголя в крови.

Динамическую парофазную экстракцию (англ. purge-and-trap) реализуют при пропускании через образец инертного газа (например, гелия), захватывающего с собой летучие органические соединения из жидкой фазы (стадия продувки,

англ. purge). Далее газ, несущий аналиты, поступает через подогретый трубопровод (исключается конденсация) в адсорбционную трубку, в которой находится стационарная фаза, абсорбирующая легколетучие аналиты (стадия захвата, англ. trap). Затем посредством нагревания аналиты десорбируются и поступают, например, в хроматограф для анализа. При выборе условий стремятся к тому, чтобы по возможности количественно извлечь из образца целевые летучие соединения. Данная техника относится к селективной и прямой сорбции аналитов из комплексных смесей.

Оба подхода автоматизированы и устойчиво вошли в практику определения летучих соединений методом газовой хроматографии. Автоматический статический парофазный экстрактор состоит из термостата, автосэмплера с пробниками, выполняющими также функцию экстракционных емкостей, и соединенной с аналитическим шприцем газовой линии, по которой проба паровой фазы попадает в газовый хроматограф. Все операции выполняются в непрерывном режиме согласно программе, введенной оператором. Оба метода, как правило, используются в режиме онлайн, соединенными с газо-жидкостным хроматографом.

Наиболее широко парофазный анализ применяют в области экологии для исследования грунтовых и сточных вод, питьевой воды, например, хлоруглеводороды могут быть определены в очень низких пределах. Метод используют для выявления органических примесей в пищевых продуктах, фармацевтических и косметических препаратах. Идентификацию по данным парофазного анализа используют в криминалистике, микробиологии, медицинской диагностике.

### **2.6.5. Экстракция в системе «жидкость – твердая фаза»**

*Твердофазная экстракция (ТФЭ)* (англ. solid phase extraction (SPE)) – метод пробоподготовки, состоящий в концентрировании и отделении от матрицы целевого вещества с использованием твердых сорбентов и их последующем элюировании подходящими растворителями. Принципиальное отличие ТФЭ от других методов в том, что аналиты извлекаются из пробы посредством адсорбции на стационарной фазе, а не с помощью экстрагирующего растворителя.

Твердые сорбенты упакованы в специальные картриджи. Это продуктивный, относительно несложный, удобный и хорошо автоматизированный метод пробоподготовки, который можно применять для очень многих классов веществ при незначительном потреблении растворителей. ТФЭ используют для извлечения аналитов из различных сложных по составу проб (биожидкости, вода, напитки, почва, растительные и животные ткани и др.).

ТФЭ позволяет сократить время пробоподготовки, уменьшить расход растворителей, повысить точность и правильность анализа. Селективность метода дает возможность хорошо удалить мешающие компоненты. Методом ТФЭ можно выделять компоненты из очень разбавленных растворов с одновременным концентрированием аналита, кроме того, производить замену растворителя пробы.

Процедура ТФЭ состоит из двух основных стадий (рис. 2.9). На первом этапе через картридж пропускают раствор пробы, аналиты пробы взаимодействуют с сорбентом, а растворитель беспрепятственно выходит. Жидкий образец может нагнетаться в картридж с помощью воздушного компрессора, вакуумного или перистальтического насоса, а также вручную. Главное, чтобы при нанесении пробы целевые соединения не проскочили, а количественно поглотились сорбентом.

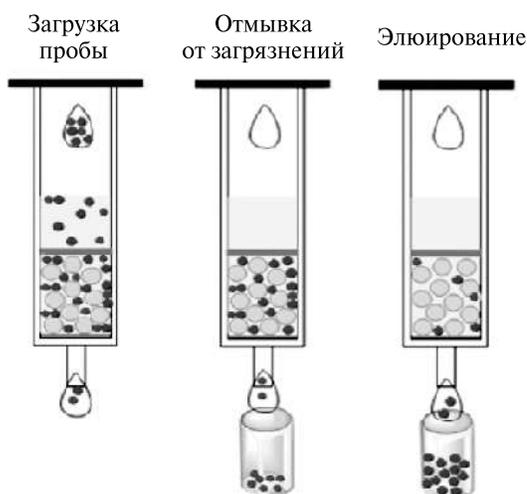


Рис. 2.9. Твердофазная экстракция

Уже на стадии нанесения пробы происходит ее начальная очистка, поскольку только часть загрязняющих компонентов остается на сорбенте вместе с целевыми соединениями — другая часть плохо удерживаемых компонентов матрицы проходит через картридж.

На втором этапе адсорбированные аналиты элюируют с помощью подходящего растворителя. На данной стадии происходит фактическая замена растворителя пробы и дополнительная очистка пробы, поскольку часть компонентов матрицы остается на адсорбенте даже после элюирования целевых соединений. Картриджи помещают в стеклянную камеру, в которой создается вакуум, вследствие этого экстракционные трубочки быстро элюируются. Для улучшения процедуры элюирования вакуумная камера оборудована запорными кранами между отдельными картриджами и уплотняющими пластинками. Внутри камеры элюат собирается в отдельные стеклянные стаканчики или специальные трубочки с маркировкой. При массовом анализе часто используют 96-камерную рабочую станцию, которая позволяет одновременно обрабатывать до 96 образцов. Полученный элюат можно дополнительно обработать или сразу направить на анализ.

Экстракционные картриджи (обычно объемом в пределах от 0,03 до 0,8 мл) состоят из полипропилена или стекла и содержат стационарную фазу, сверху и снизу покрытую фильтрами из керамики (величина пор — 20 мкм). Оптимизация экстракции возможна подбором подходящей стационарной фазы и растворителя почти для каждого класса веществ. Объем пробы составляет от 0,05 до 3 мл, хотя могут обрабатываться и большие объемы (до 2 л). Концентрирование аналита происходит на стадии удаления загрязнений (в 10 раз). Кроме того, элюат можно дополнительно сконцентрировать отгонкой растворителя в токе азота, если целевые вещества нелетучи и элюат не слишком насыщен компонентами матрицы, что приводит к 100-кратному концентрированию. Если аналит очень сильно разбавлен (пико или фемто М), в результате можно достигнуть его концентрирования до микро- или наногаммов, что определяется уже с большей надежностью.

В ТФЭ возможно и обратное направление очистки, когда на стационарной фазе удерживается матрица, а аналит остается в растворе и таким образом очищается уже на первом этапе.

Выбор сорбента является важнейшим в ТФЭ, так как в основе метода лежит взаимодействие сорбента и аналита (электростатическое, гидрофобное/гидрофильное, аффинное). В качестве сорбентов в ТФЭ используют силикагель и его химически модифицированные формы, которые производят для хроматографии. Это могут быть сорбенты для ионообменной, аффинной, нормально- или обращенно-фазовой хроматографии. Силикагель применяют в качестве полярного сорбента. Силанольные ОН-группы силикагеля имеют слабокислый характер и могут эффективно взаимодействовать с полярными компонентами элюента и элюируемыми соединениями посредством как водородных связей, так и диполь-дипольных и индукционных взаимодействий. В данной экстракционной технике удерживается 8 % количества аналита относительно общего количества сорбционного материала (например, 40 мг аналита на 500 мг сорбента). Для нормально-фазового сорбента элюирующая сила растворителей возрастает с их полярностью. Самой низкой элюирующей силой обладают предельные углеводороды, например гексан, наиболее высокой – спирты и вода. Чем более полярно анализируемое соединение, тем больше оно удерживается в нормально-фазовом режиме и тем более полярный растворитель необходимо использовать для его смыва. Другие неорганические адсорбенты, такие как оксид алюминия или гидроксилалатит, применяют в меньшей степени.

Обращенно-фазовый режим используют для ТФЭ различных органических соединений из водных образцов. Удерживание соединений в обращенно-фазовом режиме определяется гидрофобностью. Данный режим реализуется на неполярных адсорбентах, например нейтральных полимерных материалах, С18-привитых силикагелях. Элюирующая сила растворителей уменьшается с ростом полярности. Самой низкой элюирующей силой обладают вода и водно-солевые системы, наиболее высокой – среднеполярные органические растворители (ацетонитрил, изопропанол, ТГФ, ацетон и т. д.).

Для очистки сложных биопроб используют картриджи с бифильными сорбентами – сорбенты с «ограниченным доступом» (англ. «restricted-access media»), которые имеют внешнюю гидрофильную и внутреннюю гидрофобную поверхность. Такие сорбенты получают путем модификации силикагеля (например, алкилдиол-силикагели) и применяют для экстракции из биологических жидкостей. При этом высокомолекулярные компоненты пробы, например белки, элюируются в свободном объеме колонки, а низкомолекулярные компоненты, диффундируя во внутреннее пространство частицы сорбента, удерживаются на ее внутренней поверхности и разделяются.

Альтернативой силикагелю в ТФЭ служат полимерные материалы на основе стирола и дивинилбензола. Преимуществом таких сорбентов являются устойчивость в широком диапазоне рН (1–13), высокая устойчивость к загрязнениям, т. е. способность регенерироваться. Кроме того, в сравнении с силикагелями они могут связывать до 15 % количества аналита. Использование полимеров с различным размером пор позволяет экстрагировать низкомолекулярные соединения от высокомолекулярных. Полимерные сорбенты пригодны для извлечения различных веществ (полярных и неполярных, нейтральных и ионогенных).

*Метод твердофазной микроэкстракции* (ТФМЭ; англ. solid phase micro extraction (SPME)) был описан Я. Павлицыным (J. Pawliszyn) в 1989 г. В настоящее время компания Supelco, Inc. обладает лицензией и производит данные технологии.

Данный метод значительно быстрее твердофазной, не требует больших объемов пробы, реализуется без использования органических растворителей и обеспечивает меньшее загрязнение пробы. ТФМЭ относится к селективной и прямой сорбции аналитов из комплексных смесей и основана на адсорбции соединений из жидких или газообразных образцов на капилляре, покрытом полимерной пленкой.

Устройство для ТФМЭ представляет собой специальный аналитический шприц (на 100–250 мкл), в основании сменной иглы которого расположен микрокартридж с объемом адсорбента порядка нескольких микролитров. Пробу пропускают через картридж вручную при помощи автосамплера или специального автоматизированного устройства. К плунжеру шприца прикрепляется кварцевый стержень, покрытый тонким слоем сорбента (обычно пленка полимера). Для некоторых анализов используют пленку полимера с угольным сорбентом. Стержень в исходном состоянии располагается внутри иглы шприца. Она выполняет две функции – защитной оболочки и интерфейса для прямого ввода адсорбированных соединений непосредственно в газовый хроматограф методом термодесорбции. При отборе пробы, находящейся в закрытой виале, иглой шприца с втянутым в нее стержнем прокалывается мембрана виалы, при нажатии плунжера стержень выходит из иглы и погружается в анализируемую жидкость. В случае парофазного анализа стержень располагается над поверхностью жидкости. Время экстракции составляет 5–20 мин, в течение которых при встряхивании виалы аналит сорбируется на стержне. Затем плунжером стержень втягивается в иглу, и шприц вынимается из виалы. Иглой шприца прокалывается мембрана испарителя хроматографа, при нажатии на плунжер стержень выходит из иглы и попадает в горячую зону испарителя, после чего производится десорбция веществ с полимерной пленки. Затем стержень втягивается в иглу, и шприц вынимается из испарителя.

Очень важным параметром является толщина адсорбирующей пленки, например, высокомолекулярные соединения адсорбируются лучше на тонких слоях. Для ТФМЭ сильнолетучих соединений и/или экстракции из паровой фазы выбирают большую толщину пленки (от 50 до 100 мкм), для среднелетучих соединений применяют пленки меньшей толщины вплоть до 7 мкм, которые обеспечивают более полную термодесорбцию. На пленке происходит как сорбция аналитов при погружении стержня в пробу, так и их десорбция в испарителе газового хроматографа. Химическая структура и свойства полимера определяют селективность и избирательность экстракции. В качестве адсорбентов используют такие полимеры, как полиакрилат, карбовакс, полидивинилбензол, карбоксен и полидиметилсилоксан. В данном ряду полярность уменьшается, и это позволяет подобрать необходимую степень полярности, что увеличивает селективность. Возможно также использование комбинации полимеров.

ТФМЭ позволяет извлекать высоколетучие и среднелетучие соединения, которые способны к десорбции с поверхности рабочего капилляра при его кратковременном нагревании в инжекторе газового хроматографа. Сменные рабочие капилляры можно использовать повторно, однако количество экстракций на один

капилляр закономерно уменьшается при переходе к более грязным матрицам. При ТФМЭ из паровой фазы на одном капилляре можно провести несколько сотен экстракций, тогда как при экстракции из насыщенных нелетучими соединениями жидких матриц, как правило, не удастся использовать капилляр более нескольких раз. При ТФМЭ из паровой фазы время экстракции составляет 5 мин, а из жидких образцов – порядка 30 мин.

ТФМЭ применяют для извлечения веществ из воды, почв, воздуха, биологических проб. Данная экстракционная техника широко используется для анализа гербицидов в воде, продуктов деструкции молока, образующихся на свету, пахучих веществ в цветках, а также наркотиков (например, амфетамина) в биожидкостях.

*Метод дисперсии матрицы с твердым сорбентом* (англ. matrix solid phase dispersion (MSPD)), предложенный в 1989 г., позволяет производить экстракцию соединений из твердых и высоковязких материалов (например, продуктов питания) с помощью сорбентов, используемых в хроматографии. Она успешно применяется для обработки сложных биопроб (например, мясо, молоко, яйца) и требует небольшого количества времени. Проба (0,5 г) в ступке смешивается с сорбентом (например, 1,5 г обращенно-фазового сорбента) и тщательно размельчается долбяком (не пестиком) до гомогенной массы. Далее проба количественно переносится в так называемое зарядное устройство с керамическими шариками и там уплотняется. Целевые аналиты экстрагируются подходящими растворителями. Если надо выделить неполярное вещество (например, ликопин из томатов), то камера элюируется сначала полярным растворителем для удаления полярных загрязнений, далее следует неполярный растворитель. В сравнении с ТФЭ в этом методе осуществляется интенсивное перемешивание пробы и сорбента, и растворитель может селективно экстрагировать как примеси, так и сам аналит.

## **2.7. Препаративная колоночная хроматография**

### **2.7.1. Принцип хроматографирования, основные понятия**

Эффективным средством выделения, очистки и концентрирования биомолекул из сложной многокомпонентной системы для последующего анализа является препаративная колоночная хроматография. В препаративной хроматографии разделенные компоненты собирают в отдельные емкости. В аналитической хроматографии, основная цель которой – идентификация вещества, искомый компонент либо необратимо модифицируется для анализа, либо после выхода из колонки и идентификации идет в отходы.

На современном этапе классическое различие между препаративной и аналитической хроматографией, основанное на разнице в объемах используемых колонок и скорости элюирования, не совсем правильное. Объемы и скорости препаративного разделения определяются масштабами и задачами анализа. Если в наличии имеется ограниченное количество сырья, то скорость элюирования лежит в диапазоне микро- и нанолитров в минуту (научно-исследовательские лаборатории), в случае большого количества исходного материала скорость элюирования может составлять от нескольких миллилитров до литров в минуту (производственные процессы).

Хроматографические методы основаны на разделении растворенных веществ между неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазами. Процесс хроматографирования начинается со внесения пробы в колонку, в которой находится неподвижная фаза и через которую проба перемещается с помощью подвижной фазы. Данный процесс называют элюированием колонки, а подвижную фазу – элюентом. Компоненты пробы (сорбаты) продвигаются по колонке с элюентом, но значительно медленнее, чем его основной поток, так как при этом они взаимодействуют с неподвижной фазой (сорбентом) и в результате также выходят из колонки и детектируются (например, с помощью УФ-детектора). В колонке происходит многократное повторение актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль колонки. Неподвижная фаза может представлять собой вязкую жидкость, которая химически связана с поверхностью твердых частиц (матрицей) или внутренней стенкой капилляра. Твердые частицы, имеющие развитую поверхность, также могут служить стационарной фазой. В качестве подвижной фазы может выступать поток газа, сверхкритического флюида или жидкости, фильтрующейся через слой сорбента. Процесс хроматографирования документируется графически с помощью хроматограммы, на которой сигнал детектора представлен как функция времени или объема элюата. Хроматограмма отражает порядок расположения зон компонентов разделяемой смеси на слое сорбента или в потоке подвижной фазы во времени. Участок хроматограммы, соответствующий площади, ограниченной функцией хроматограммы в момент выхода определяемого вещества из колонки и базовой линией, называют хроматографическим пиком. Площадь пика компонента соответствует его концентрации.

Для препаративного выделения биообъектов применяют жидкостную хроматографию, т. е. элюентом служит жидкость, как правило, буферные растворы, которые могут содержать различные добавки (органические растворители, детергенты, ионы металлов и т. д.).

Препаративная хроматография в зависимости от способа ввода пробы и способа относительного перемещения хроматографических зон по слою сорбента может быть фронтальной, элюентной или вытеснительной, чаще используются два последних варианта. В элюентном способе пробу вводят в поток подвижной фазы. В колонке анализируемая смесь разделяется на отдельные компоненты, между которыми находятся зоны подвижной фазы. В вытеснительном варианте в колонку после подачи разделяемой смеси вводят специальное вещество (вытеснитель), которое сорбируется лучше любого из компонентов анализируемой смеси. Существенным недостатком вытеснительного метода является возможное наложение зоны одного вещества на зону другого, поскольку зоны компонентов в этом методе не разделены зоной растворителя.

Простейшая система для препаративной хроматографии состоит из насосов для подачи растворителей, дозатора для ввода пробы, хроматографической колонки, детектора для регистрации компонентов смеси на выходе из колонки и коллектора фракций. Последний служит для сбора по времени или объему поступающих с колонки фракций подвижной фазы, содержащих разделенные компоненты. В простейшем варианте для проведения препаративной хроматографии нужны только стеклянная колонка и хроматографическая фаза (сорбент) для ее заполнения. Элю-

ирование колонки может происходить при атмосферном (открытая система) или повышенном (среднем, высоком, ультравысоком) давлении. В большинстве случаев препаративного разделения элюирование проводят при атмосферном давлении, так как увеличение скорости элюирования приводит к ухудшению разделения. При использовании мелкозернистых сорбентов из-за крайне низкой скорости процесса подачу элюента осуществляют под давлением с помощью насоса.

Для эффективного разделения смеси нескольких веществ вместо изократического элюирования (постоянный состав элюата) используют градиентное. В этом случае состав элюирующей смеси меняется в процессе десорбции аналитов из колонки непрерывно (линейный градиент) или ступенчато (ступенчатый градиент). При создании последнего пользуются серией растворов, пропуская последовательно их один за другим. Получить линейный градиент можно с помощью прибора, состоящего из двух одинаковых сосудов, установленных на одном уровне. В одном сосуде (крайнем правом от колонки) находится раствор с составом (или нужными параметрами), который должен быть достигнут в конце опыта. В другом сосуде, смесителе, из которого раствор поступает непосредственно в колонку, вначале находится равный объем исходного буферного раствора.

К примеру, нужно создать градиент концентрации сильного компонента (В) во время хроматографического разделения. В начале разделения используется слабый элюент (А), но либо изначально, либо как только из колонки вышли наиболее слабо сорбирующиеся компоненты, концентрацию компонента с большой элюирующей силой (В) в элюенте начинают плавно повышать; и к концу разделения она достигает некоторого максимального значения, достаточного для быстрого вымывания из колонки наиболее прочно удерживаемых веществ. Разделение можно начать, например, при содержании в элюенте 10 % компонента В, а закончить — при 60 %. Таким образом, каждый из компонентов смеси выходит из колонки при оптимальном составе элюента. Этим достигается их полное и качественное разделение за гораздо меньшее время, чем при изократическом режиме. При использовании градиента существенно увеличивается максимальное количество пиков, способных разместиться на хроматограмме, — *пиковая емкость*, что весьма важно при разделении сложных многокомпонентных смесей. Начальную и конечную концентрации компонента В в элюенте, а также скорость повышения концентрации (крутизну градиента) определяют экспериментально, исходя из состава пробы и свойств используемой хроматографической системы. Градиентное элюирование требует повышенной чистоты растворителей, применяемых в качестве элюента. В противном случае примеси в слабом компоненте (А) могут накопиться на начальной стадии хроматографического разделения в колонке и выйти в градиентном режиме в виде ложных пиков (не соответствующих ни одному из компонентов пробы), значительно затрудняя при этом интерпретацию хроматограммы.

Хроматографическое разделение сложных смесей базируется на различиях в гидрофобных/гидрофильных и ионных взаимодействиях, биологическом средстве и размере биомолекул. Сила взаимодействия молекул с неподвижной фазой для каждого из соединений будет различной, а значит, и скорость продвижения молекул разного вида вдоль колонки также будет отличаться. Одни компоненты, которые наиболее сильно взаимодействуют с сорбентом, останутся в верхней части колонки,

другие, связывающиеся с сорбентом в меньшей степени, переместятся в нижние отделы, а некоторые покинут колонку вместе с элюентом. Последние компоненты называют неудерживаемыми. Они находятся в колонке минимальное время, и время их выхода из нее после ввода пробы обозначается как мертвое ( $t_0$ ), т. е. это, по сути, время выхода мобильной фазы (часто мобильную фазу называют просто растворителем). Соответствующий этому времени мертвый объем ( $V_0$ ) — это объем элюента, необходимый для заполнения пор сорбента и пространства между его частицами в колонке. Учитывая, что мертвый объем равен удерживаемому объему несорбирующегося вещества, на практике его определяют, добавляя в разделяемую смесь подобное вещество (маркер), а удерживаемый объем принимают за  $V_0$  (соответствует времени удерживания  $t_0$ ).

Для компонента, взаимодействующего с неподвижной фазой, время его выхода с колонки с момента ввода пробы называется временем удерживания ( $t_R$ ), а объем, необходимый для его элюирования к этому времени, — объемом элюирования ( $V_R$ ).

Вещество 1, слабо взаимодействующее с сорбентом (располагается в нижних отделах колонки), выйдет с колонки раньше, чем вещество 2, взаимодействующее с сорбентом сильнее (располагается в верхних отделах колонки), т. е.  $t_{R1}$  меньше  $t_{R2}$ . В этом случае говорят, что удерживание одного вещества в данной хроматографической системе меньше, чем другого.

Химик-аналитик, выполняющий препаративную хроматографию, должен в зависимости от поставленной задачи находить компромисс между пропускной способностью системы (количество анализируемых образцов), выходом и чистотой разделяемых компонентов. Обычно исходный образец составляет 0,1–2 % от веса сорбента. Длину и диаметр колонки подбирают в зависимости от количества исходной пробы. К примеру, колонку с внутренним диаметром 21 мм для анализа 50 мг образца выбирают длиной 50 мм и 250 мм — для 250 мг. Если при разделении возникают трудности, то либо уменьшают количество пробы, либо увеличивают объем стационарной фазы, последнее достигается увеличением длины и/или диаметра колонки. Зная объем колонки ( $V_{\text{кол}}$ ) и плотность сорбента, можно рассчитать массу сорбента для заполнения колонки. Объем колонки с внутренним диаметром  $d_i$  и длиной  $L$  определяют по формуле

$$V_{\text{кол}} = \left(\frac{d_i}{2}\right)^2 \pi L.$$

Качество (эффективность) приготовленной колонки (длина  $L$ , см), заполненной частицами с определенным диаметром ( $d_p$ , мкм), определяют по числу теоретических тарелок ( $N$ ), рассчитываемых по следующим формулам:

$$N = 3000 \left(\frac{L}{d_p}\right),$$

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2,$$

где  $t_R$  — время удерживания компонента в колонке;  $w_h$  — ширина пика на половине его высоты (в единицах времени).

Основной характеристикой удерживания компонента, наиболее объективно отражающей степень взаимодействия данного вещества с сорбентом, является коэффициент емкости или фактор удерживания  $k$ , который вычисляют по формуле

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \text{ или } k = \frac{V_R - t_0}{V_0}.$$

Этот параметр дает информацию о том, насколько дольше вещество находится в сорбенте, чем в подвижной фазе. В физическом смысле фактор удерживания  $k$  представляет собой отношение концентрации вещества на поверхности сорбента к его концентрации в элюенте при установившемся динамическом сорбционном равновесии. Фактор удерживания может принимать значения между  $k = 0$  (нет удерживания) и  $k = \infty$  (необратимая адсорбция). Из практических и экономических соображений предпочтительны значения  $k$  в диапазоне от 1 до 20.

Для разделения двух компонентов они должны иметь различные факторы удерживания. Способность хроматографической системы разделить два компонента (1 и 2) на основе их различных факторов удерживания ( $k_1$  и  $k_2$ ) описывает селективность ( $\alpha$ ), которая выражается формулой

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}.$$

При значении  $\alpha = 1$  разделение компонентов невозможно. Качество разделения соединений в хроматографии отражают два параметра. К первому относится разница во временах удерживания двух компонентов: чем она больше, тем лучше разделены компоненты. Второй определяется шириной пика компонента на хроматограмме (т. е. хроматографической зоны): чем он шире, тем хуже разделение.

Степень разделения двух пиков определяется разрешением ( $R_S$ ), которое на практике вычисляют по формуле

$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)},$$

где  $t_{R_1}$  и  $t_{R_2}$  – времена удерживания соседних компонентов 1 и 2;  $w_1$  и  $w_2$  – ширина пиков 1 и 2 при основании в единицах времени.

Два пика могут или совсем не разделиться ( $R_S = 0$ ), или едва ( $R_S < 1$ ), частично ( $R_S = 1$ ) или полностью разделиться ( $R_S > 1,5$ ). Для большинства практических приложений достаточно  $R_S = 1,2$  и даже несколько меньше.

При выделении и очистке биомолекул, в частности белков, широко используют разные виды хроматографии, различающиеся по механизму разделения (адсорбционная, распределительная, эксклюзионная, ионообменная). На практике часто реализуется одновременно несколько механизмов разделения (например, адсорбционно-распределительный, адсорбционно-эксклюзионный и т. д.). Выбор хроматографической фазы определяется свойствами биомолекул (гидрофобность/гидрофильность, растворимость, число свободных активных групп, гидродинамический объем, склонность к комплексообразованию, биоспецифичность, наличие заряженных групп и т. д.).

В препаративном разделении компонентов смеси условно можно обозначить как два этапа: «закрепление» (сорбция) компонентов пробы на неподвижной фазе и «снятие» (десорбция) разделенных компонентов. Для каждого этапа подбирается соответствующая мобильная фаза. Условия сорбции (связывания) аналитов — ключевой фактор в разделении компонентов пробы, влияющий на селективность и разрешение метода. После внесения пробы на колонку через нее пропускают *связывающий* раствор, состав которого должен способствовать взаимодействию аналитов с неподвижной фазой. Для последующей десорбции разделенных компонентов нужно использовать раствор другого состава, который называют *элюирующим*.

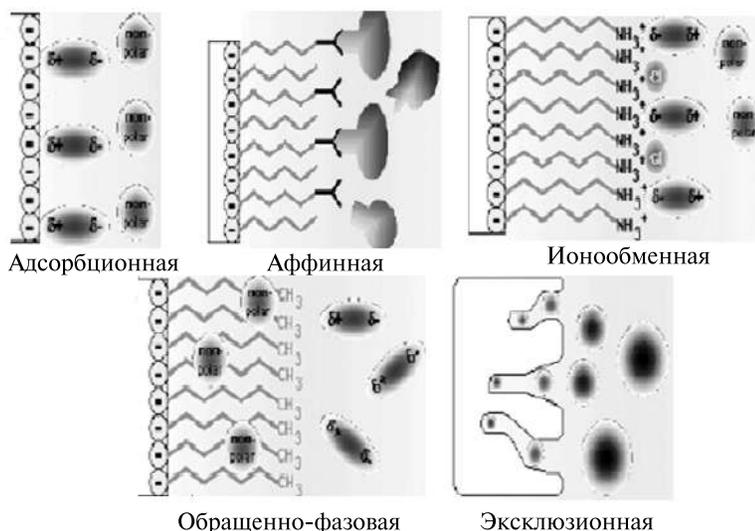


Рис. 2.10. Виды хроматографии, используемые в преаналитике

Вытекающий из колонки раствор собирают в пробирки по 1–3 мл (фракции). Регистрация объема элюата начинается с момента нанесения пробы на колонку. Содержание биомолекул во фракциях определяют обычно фотоколориметрически или спектрофотометрически. В результате проведения цветной реакции или путем измерения поглощения раствора устанавливают содержание биокомпонента в каждой фракции. По этим данным строят кривую, по которой определяют, сколько фракций целевого компонента содержится в элюате и в какой серии пробирок находится каждая фракция. Фракции, содержащие один продукт, объединяют и из полученного раствора выделяют чистый компонент.

В препаративных целях в биоаналитике используются различные виды хроматографии (рис. 2.10).

## 2.7.2. Методы адсорбционной и распределительной жидкостной хроматографии

Адсорбционная и распределительная хроматографии широко применяются в биоаналитике для фракционирования биомолекул (олигонуклеотиды, НК, аминокислоты, пептиды, белки и др.), выделения различных ферментов и лекарственных

препаратов (пенициллин, тетрациклин, алкалоиды и др.). В анализе могут быть использованы как нормально-фазовая (неподвижная фаза более полярная, чем подвижная, в качестве последней служат смеси неполярных алифатических углеводов и более полярных органических растворителей – спиртов, простых или сложных эфиров, галогеналканов), так и обращенно-фазовая хроматография (неподвижная фаза – неполярная, подвижная – полярная).

В *распределительной* жидкостной хроматографии в качестве подвижной и неподвижной фаз используют две несмешивающиеся жидкости, находящиеся в равновесии друг с другом. Жидкая неподвижная фаза может быть нанесена тонким слоем на твердый пористый носитель (матрицу), которым заполняют колонку. В качестве матриц служат оксид алюминия, силикагель, органические полимеры (полистирол, полиметилметакрилат). Недостатком такого типа фазы является относительно быстрое ее вымывание с носителя. В настоящее время наиболее распространено использование химически привитых к сорбенту фаз. При пропуске элюента через колонку происходит распределение компонентов между неподвижной и подвижной фазой, разделение осуществляется за счет различной растворимости в двух фазах. В подвижной фазе компоненты должны растворяться лучше, чем в неподвижной, иначе время удерживания будет очень большим.

Разделение компонентов смеси в *адсорбционной* жидкостной хроматографии (АЖХ) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте. В качестве адсорбентов в АЖХ используют активированный древесный уголь (неполярная фаза), гель фосфата кальция, пористые оксид алюминия (основной адсорбент) и силикагель (кислый адсорбент), пористое стекло, пористые полимеры. Физико-химические параметры адсорбентов могут существенно влиять на свойства неподвижной фазы. К таким параметрам относятся следующие: размер, форма и пористость гранул, диапазон разброса этих размеров; механическая прочность материала матрицы, характер его смачивания и набухания в элюенте; химическая стойкость и инертность в условиях хроматографической элюции; реакционная способность, обеспечивающая возможность химической модификации.

В стеклянной колонке равномерно упаковывают адсорбент в виде суспензии с растворителем и образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку. Компоненты разделяемой смеси адсорбируются на сорбенте, и их удерживание определяется характером функциональных групп аналитов и степенью пространственной затрудненности при их сближении с активными центрами адсорбента. Для каждого компонента пробы устанавливается определенное равновесие между его адсорбцией на поверхности твердой фазы и растворимостью в элюенте. Процессы взаимодействия молекул аналита с поверхностью твердого адсорбента и в объеме подвижной фазы могут быть специфическими – диполь-дипольные, ион-дипольные, водородные связи; и/или неспецифическими – ориентационные, индукционные (взаимодействие между неполярными и полярными молекулами), дисперсионные (взаимодействие между неполярными молекулами). В ходе хроматографирования происходит конкуренция между компонентами пробы и молекулами мобильной фазы за адсорбционную поверхность неподвижной фазы. В случае нормально-фазовой АЖХ более полярные компоненты пробы сильнее, чем неполярные, адсорбируются на полярной фазе и выходят из колонки позже, т. е. аналиты выходят в порядке возрастания полярности. Слабопо-

лярная смесь должна быть разделена на высокоактивном сорбенте, в противном случае компоненты слабо разделяются или вообще не разделяются.

Для десорбции компонентов из колонки подбирают подходящие элюенты. Меняя природу подвижной фазы, можно в широких пределах изменять объемы удерживания и селективность разделения на одних и тех же адсорбентах. Растворитель в качестве мобильной фазы должен быть достаточно сильным, чтобы растворить аналит и конкурировать с удерживающими силами неподвижной фазы. Вследствие динамического процесса адсорбции-десорбции молекулы элюента занимают «вакантные» центры адсорбции и «вытесняют» адсорбированные молекулы аналита с поверхности адсорбента. Если для снятия компонентов с колонки будет использован очень сильный растворитель, то он может сразу смыть все компоненты без разделения.

При подборе систем растворителей для мобильной фазы принимают во внимание как растворимость компонентов смеси, так и элюотропные ряды растворителей, составленные разными авторами. Элюотропный ряд представляет собой последовательность растворителей, расположенных по возрастанию их элюирующей силы.

В хроматографии в качестве неподвижной фазы широко используется пористый гранулированный *силикагель* ( $n\text{SiO}_2 \cdot m\text{H}_2\text{O}$ ), наиболее распространенный полярный адсорбент. Силикагель представляет собой неорганический полимер. Он состоит из атомов кремния, соединенных трехмерно с атомами кислорода; на его поверхности находятся свободные силанольные группы ( $\text{Si}-\text{OH}$ , протонированные при  $\text{pH}$  2–3), которые значительно влияют на разделительные свойства этой неподвижной фазы. В хроматографии обычно применяют пористые частицы с микрометровым диаметром. Снижение размера частиц приводит к увеличению площади поверхности и, следовательно, его разделительной способности. Плотность силикагеля –  $2,2 \text{ г/см}^3$ , он устойчив к гидролизу в области  $\text{pH}$  2–8, поверхность данного адсорбента составляет  $200 \text{ м}^2/\text{г}$ , иногда используются материалы с поверхностью  $400\text{--}700 \text{ м}^2/\text{г}$ . Силикагельные частицы могут иметь различный размер пор (от нескольких сотен до единиц нм). В случае высокомолекулярных субстанций применяются крупнопористые (100–400 нм) силикагели. Силикагельные частицы с диаметром 4,4 мкм содержат до 0,8 мкМ силанольных групп на квадратный метр.

Силанольные группы, находящиеся на поверхности силикагеля, могут быть химически модифицированы, в результате получают привито-фазные сорбенты с заданной селективностью. В настоящее время известно более ста сортов (разных модификаций) силикагеля, а также ряд силикагелей с химически модифицированной поверхностью. Распространенная химическая модификация силикагеля – это замещение силанольных групп с помощью хлорсиланов  $\text{Cl}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{R}$ , содержащих различные функциональные группы R. Образующиеся при этом ковалентные соединения ( $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{R}$ ) очень стабильны. Присоединенные функциональные группы R определяют селективность стационарной фазы. Твердые частицы адсорбента принято называть матрицей, а присоединенные к нему группы (иммобилизованные) – лигандами. Модифицированные силикагели называются по виду привитого фрагмента. Наибольшее распространение получили модифицированные таким образом силикагели, у которых  $\text{R} = -(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ , где  $n = 7$  или 17. Существуют также модифицированные полярные неподвижные фазы – циан или нитрил (цианопропилированный силикагель), amino (аминопропилированный силикагель), диол, нитро и др.

*Нормально-фазовую* хроматографию широко используют для разделения гетероароматических соединений, нуклеотидов, малых пептидов. В данном случае разделение компонентов смеси происходит по полярности. Неподвижная фаза является полярной, и изначально в ее качестве использовали немодифицированный силикагель. Однако в настоящее время распространение получил силикагель с привитыми полярными группами ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CN}$ ). Для разделения компонентов на нормальной фазе в качестве мобильной фазы используют менее полярные органические растворители, а для снятия компонентов с колонки – более сильные полярные органические растворители. Удерживание аналитов на неподвижной фазе происходит преимущественно за счет диполь-дипольных взаимодействий или водородных связей. Элюирование разделенных компонентов может происходить в изократическом или градиентном режиме.

Для разделения пептидов в очень сложных биологических пробах в последние годы стали применять *водную нормально-фазовую* хроматографию, в которой неподвижная фаза базируется на силанах (гидриды кремния  $\text{Si}_n\text{H}_{2n+2}$ ). Данный новый материал позволяет использовать в качестве мобильной фазы как 100 % водные, так и органические растворители. Преимущество этого варианта хроматографии заключается в том, что одновременно можно разделить вещества с различной гидрофильностью в одной и той же пробе, для чего в основном используют водосодержащие элюенты.

Наибольшее распространение в анализе пептидов, белков и других биомолекул нашла применение *обращенно-фазовая* хроматография (ОФХ), которая позволяет разделить вещества по их гидрофобности. В качестве неподвижной фазы используют силикагели с привитыми неполярными алкильными или алкилсилильными группами (с числом атомов углерода от 1 до 18, иногда до 32), а также фенильными, аминопропильными и др. В качестве мобильной фазы применяют смеси воды (или водных растворов солей) с водосовместимыми органическими растворителями (например, водно-метанольные, водно-ацетонитрильные). Сила элюента увеличивается от самого полярного растворителя (вода) к самому неполярному. Элюирование разделенных компонентов может происходить в изократическом или градиентном режиме.

В ОФХ удерживание компонентов на неподвижной фазе объясняют преимущественно с позиций сольвофобной теории Хорвата, которая описывает взаимодействия между гидрофобными фрагментами биомолекул и неполярными лигандами стационарной фазы. В соответствии с сольвофобной теорией связывание компонента с материалом неподвижной фазы происходит в результате вытеснения менее полярных молекул пробы из полярной водной мобильной фазы (сольвофобный эффект) и их «прижимания» (присоединения) к неполярной поверхности стационарной фазы. Удерживание аналитов зависит как от площади контакта между гидрофобными фрагментами молекулы и лиганда, так и от сил поверхностного натяжения элюента (растворителя). Увеличение органической части в водно-органической смеси приводит к снижению сил поверхностного натяжения.

Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образова-

ние такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные лиганды стационарной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности достигается при сорбции молекул на гидрофобной матрице.

### 2.7.3. Хроматография гидрофобного взаимодействия

Хроматография гидрофобного взаимодействия (ХГВ; англ. hydrophobic interaction chromatography) – вариант адсорбционной хроматографии, основанной на различии в гидрофобных свойствах биомолекул. ХГВ широко применяют для очистки и разделения полипептидов, гомологичных и рекомбинантных белков, антител, белковых комплексов, нуклеиновых кислот. В качестве стационарной фазы используют гидрофобные сорбенты, представляющие собой твердые частицы, на поверхности которых иммобилизованы гидрофобные группы, в качестве мобильной фазы – водные растворы с высоким содержанием солей. Разделение биомолекул основывается на обратимом взаимодействии их гидрофобных фрагментов с гидрофобными лигандами сорбента. Отличие ХГВ от обращенно-фазовой хроматографии заключается в том, что в качестве неподвижной фазы используют менее сильные гидрофобные лиганды, а в элюенте не содержатся органические растворители. Последнее позволяет избежать денатурации белков, в частности ферментов.

Для получения гидрофобных фаз в качестве матрицы наиболее часто применяют пористые гранулы сефарозы (поперечно сшитая агароза) и синтетических полимеров (полистирол, полиметакрилат), которые удовлетворяют таким требованиям, как химическая и физическая стабильность, высокая связывающая способность и большая вариабельность в размерах частиц. Гидрофобность матриц достигается путем их функционализации, т. е. к ним ковалентно присоединяются («пришиваются») различные гидрофобные лиганды, содержащие 4–10 атомов углерода (более 10 может привести к самоскручиванию) – алкильные или арильные группы. Алкильные группы (бутильная, октильная, изопропильная) имеют «чистые» гидрофобные свойства. Арильные лиганды (наличие фенильных групп) обнаруживают смешанный характер, поэтому их хроматографические свойства будут определяться ароматическими ( $\pi$ - $\pi$ ) и гидрофобными взаимодействиями, пропорциональными длине алкильной цепи. Присоединение лигандов может происходить путем прямого взаимодействия групп лиганда и групп матрицы (например, гидроксильных групп сефарозы) либо посредством связывающих бифункциональных соединений (линкеров или спейсеров), что способствует минимизации стерических трудностей при взаимодействии макромолекул и сорбента. Важной характеристикой сорбента является распределение лигандов на поверхности матрицы, т. е. плотность иммобилизованных лигандов. Как правило, используют лиганды с небольшой гидрофобностью и низкой плотностью на поверхности (примерно в 10 раз меньше, чем в ОФХ). Эти свойства фазы оказывают значительное влияние на конформацию и, следовательно, активность белков. Сорбция белков в зависимости от плотности лигандов носит сигмоидальный характер.

Проведение ХГВ белков состоит из двух основных этапов: адсорбции (связывание) искомым белком на неподвижной фазе и их десорбции («снятие»). Для связывающего буфера используют высокую концентрацию соли в растворе (1–2 М сульфат аммония или 3 М хлорид натрия). Тип соли и ее концентрацию выбирают так, чтобы нужный белок связался с сорбентом оптимально, а другие менее гидрофобные белки и примеси вышли из колонки, не адсорбируясь. При контроле процесса, например спектрофотометрическом, сигнал детектора вернется на базовую линию после выхода всех неадсорбирующихся компонентов. До оптимизации связывающих условий необходимо предварительно установить «окно стабильности» искомого белка при различной концентрации соли для того, чтобы предотвратить его осаждение в элюенте с высокой концентрацией соли.

Элюирование белков происходит при снижении концентрации соли в растворе, при этом в первую очередь из колонки выходит белок с самой низкой гидрофобностью, соответственно, наиболее гидрофобные белки выйдут последними. В завершение колонку элюируют бессолевым раствором, который удалит наиболее прочносвязанные компоненты. В отдельных случаях для удаления наиболее прочно связанных соединений в буфер можно ввести добавки, ослабляющие гидрофобные взаимодействия, – хаотропные соли (тиоцианаты), неионные детергенты (третон X-100), многоатомные спирты (этиленгликоль) – или повысить значение рН раствора до 9–10, что увеличивает гидрофильность белков путем изменения их заряда. После «снятия» с колонки всех компонентов ее кондиционируют стартовым буфером.

ХГВ хорошо подходит для дальнейшей очистки белков из фракций, выделенных методом высаливания или ионнообменной хроматографии, так как они содержат высокие концентрации соли.

Селективность разделения белков в ХГВ определяется параметрами фаз – стационарной (вид и плотность лигандов на матрице) и мобильной (вид и концентрация соли, значение рН, добавка поверхностно-активных веществ или органических растворителей), а также температурой колонки.

ХГВ базируется на том, что гидрофобные молекулы (или их гидрофобные фрагменты) в водной среде стремятся минимизировать контакт с полярным растворителем (водным раствором), что сопровождается их межмолекулярной агрегацией (гидрофобный эффект). Механизм удерживания компонентов пробы на гидрофобной фазе в ХГВ интенсивно изучается, но ни одна из теорий не объясняет полностью наблюдаемые явления. В ХГВ вид и концентрация соли в элюенте имеют большое влияние на гидрофобные взаимодействия между биомолекулами и стационарной фазой. Увеличение концентрации соли, т. е. ионной силы раствора, способствует гидрофобным взаимодействиям. В соответствии с сольвофобной теорией Хорвата (1977) соли повышают поверхностное натяжение воды. Поверхностное натяжение чистой воды составляет 72 дин/см, а водных ( $2 \cdot 10^3$  моль/г) растворов сульфата аммония, хлорида натрия и перхлората натрия – 77,31, 76,29 и 74,11 дин/см соответственно. Способность соли увеличивать поверхностное натяжение снижается в ряду:  $MgCl_2 > Na_2SO_4 > K_2SO_4 > (NH_4)_2SO_4 > MgSO_4 > Na_2HPO_4 > NaCl > NH_4Cl > NaClO_4 > KSCN$ . Однако влияние состава соли на процесс удерживания белков в ХГВ очень сложное, другие факторы также могут иметь значение. Соль способна непосредственно специфически взаимодействовать с белками, которые имеют заряд и обладают сильным дипольным моментом, что изменит структуру и степень гидратации белка и, сле-

довательно, его способность к гидрофобным взаимодействиям. Так,  $MgCl_2$  сильно повышает поверхностное натяжение воды, но тем не менее помогает растворению белков и препятствует гидрофобным взаимодействиям.

На практике для мобильной фазы в ХГВ наиболее часто применяют следующие соли:  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $NaCl$ ,  $KCl$  и  $CH_3COONH_4$ . При выборе соли используют эмпирически полученные лиотропные ряды Гофмейстера, которые изначально были подобраны для высаживания белков из водных растворов.

*Гидрофобная хроматография с индуцированным зарядом* отличается от ХГВ составом неподвижной фазы. Сорбентом служит матрица с иммобилизованными на ней слабокислыми или слабоосновными лигандами, которые при значении рН буфера, используемого на стадии адсорбции белков на неподвижной фазе, являются нейтральными. При низкой плотности лигандов на поверхности матрицы для адсорбции белков применяют лиотропные соли, а при высокой — адсорбция многих белков может происходить независимо от ионной силы раствора. На стадии элюирования белков значение рН элюента изменяют таким образом, чтобы лиганд стал заряжен, что приводит к ослаблению гидрофобных взаимодействий (рис. 2.11).

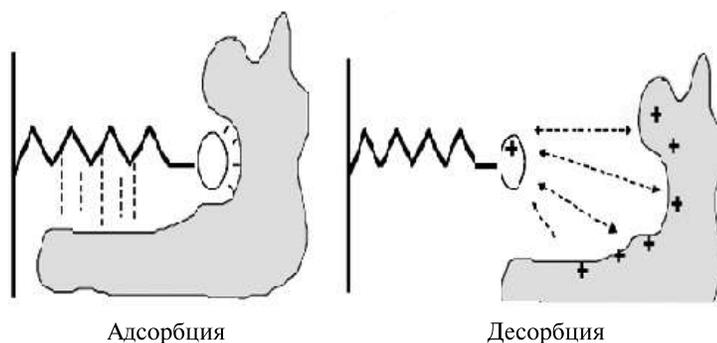


Рис. 2.11. Гидрофобная хроматография с индуцированным зарядом

Обычно хроматографию проводят при рН 5–9. К примеру, в качестве лиганда может быть использован 4-меркаптоэтилпиридин, значение  $pK_a$  которого составляет 4,8. Гидрофобное взаимодействие белка с таким лигандом происходит при значении рН 7,0; десорбция — при рН 4,0–5,8.

#### 2.7.4. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография (ЭХ) (гель-фильтрация, или метод молекулярных сит) в биоаналитике используется для удаления солей из проб, разделения и очистки биомолекул.

В отечественной и зарубежной литературе гель-колоночную хроматографию подразделяют нередко на гель-проникающую хроматографию (ГПХ) и гель-фильтрацию. Принципиальной разницы между этими двумя понятиями нет. Просто термин «гель-фильтрация» используют чаще при работе с водными растворами и гидрофильными гелями. Как правило, фильтрование через гель используется в биохимических исследованиях биологических полимеров. В ГПХ применяются преимущественно органические растворители и гидрофобные

гели. Этот вариант анализа широко используется при исследованиях синтетических высокомолекулярных соединений.

В основе ЭХ лежит принцип разделения веществ по их молекулярной массе и размеру или, точнее, гидродинамическому объему (радиус Стокса). Принципиальной особенностью метода является возможность разделения молекул по их размеру в растворе в диапазоне практически любых молекулярных масс – от  $10^2$  до  $10^8$  Да, что делает его незаменимым для исследования биополимеров. В ЭХ для получения стационарной фазы в качестве матрицы используют пористые шарообразные частицы. Жидкость, заполняющая поры частиц, служит неподвижной фазой. Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит главным образом от соотношения размеров молекул и пор частиц матрицы. Разделение происходит за счет распределения молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами.

Мобильной фазой служат буферные растворы, состав которых определяется свойствами бимолекул, может использоваться и чистая вода в случае удаления солей из пробы. Для сохранения биоактивности и нативной конформации макромолекул используют буферы с величиной рН 5–9 и ионной силой, не превышающей 0,3. Кроме того, буфер может содержать стабилизирующие вещества (глицерин, меркаптоэтанол), которые не влияют на разделяющие свойства матрицы.

В процессе ЭХ поведение макромолекул определяется в первую очередь их гидродинамическими размерами, а характерной особенностью белков является зависимость размеров макромолекул от значения рН и ионной силы раствора. Чем меньше значение рН и ионной силы, тем выгоднее становятся развернутые конформации макромолекул (так называемое полиэлектролитное набухание). В этом случае среднестатистические размеры растут, что приводит к уменьшению объемов удерживания в режиме ЭХ. Общими приемами модификации являются добавки различных солей и применение буферных растворов с определенным значением рН, оптимальные значения которых подбирают экспериментально. Для предотвращения ионообменной сорбции катионных соединений наиболее часто используют такой активный модификатор, как тетраметиламмоний фосфат при рН 3. Однако при разделении некоторых белков могут проявляться гидрофобные взаимодействия, осложняющие эксклюзионный механизм разделения. Те же эффекты иногда проявляются и при работе с дезактивированными гидрофильными сорбентами. Для их устранения к растворителю добавляют метанол. Иногда в водную подвижную фазу вводят полярные органические растворители, гликоли, кислоты, основания и поверхностно-активные вещества.

В качестве матриц для ЭХ наибольшее распространение получили производные синтетического полисахарида декстрана (сефадекс, его рабочий диапазон рН – 2–10; сефакрилы), полиакриламида (биогели, акрилексы), агарозы (сефароза, биогели) и др. Они нерастворимы в воде, но легко набухают, образуя гели. В структуре полисахаридов создают поперечные связи и формируют гранулы с порами, через которые легко проходят вода и низкомолекулярные вещества. В зависимости от условий можно формировать гранулы с разной величиной пор. Выбор размеров пор в гранулах зависит от целей хроматографии. Номера в маркировке сорбента характеризуют пористость материала (например, 100 нм), его выбор определяет

ся молекулярной массой исследуемой макромолекулы. Уменьшение частицы геля (зернистость) улучшает разделение соединений, но увеличивает время хроматографирования. Если анализируемая смесь содержит вещества, отличающиеся по молекулярной массе не более чем на 2–2,5 порядка, то обычно удается разделить их на колонках с одним размером пор. При более широком диапазоне масс следует использовать наборы из нескольких колонок с сорбентами различной пористости. Материал геля должен быть инертным, явления адсорбции – минимизированы. При разделении белков, ферментов, нуклеиновых кислот при контакте с матрицей не должна происходить их денатурация. Для проведения препаративной гель-фильтрации белков чаще других носителей используют сефадексы. Причина в том, что число шшивок в гелях на основе сефадексов легко регулируется в процессе получения количеством введенного эпихлоргидрина (сшивающего агента).

Перед работой гель набухает в избытке растворителя, например в воде. Для сефадекса используют разбавленные растворы NaCl. При переносе геля в колонку важно избежать попадания пузырьков воздуха. Для проверки качества заполнения колонки можно пропустить раствор окрашенного белка или полисахарида, который должен двигаться через нее равномерно.

В колонку вносят раствор образца, объем которого является лимитирующим для качества хроматографии. Объем пробы не должен превышать 5 % объема колонки (иначе разделение между белками и солями неэффективно). Исходную смесь, нанесенную на хроматографическую колонку, элюируют, пропуская через колонку растворитель. Элюирование разделяемых компонентов в ЭХ проводят только в изократическом режиме.

Общий объем растворителя в колонке ( $V_t$ ) состоит из объема, который занимает неподвижная фаза ( $V_g$ ) (объем растворителя внутри пор частиц матрицы), и объема мобильной фазы в колонке ( $V_0$ ) (объем растворителя между частицами), который обозначается как свободный объем. Тогда объем внутри пор частиц ( $V_g$ ) равен разнице между общим и свободным объемами:  $V_g = V_t - V_0$ . Объем  $V_g$  принято называть рабочим объемом колонки или диапазоном селективного разделения колонки.

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит главным образом от соотношения размеров молекул и пор. Все молекулы, размер которых больше размера пор сорбента, не могут попасть в них (полная эксклюзия) и проходят по каналам между частицами. Они элюируются из колонки с одним и тем же удерживаемым объемом, равным объему подвижной фазы  $V_0$ , и выходят из колонки первыми. Молекулы с самыми малыми размерами (в том числе и молекулы растворителя) проникают во все поры и поэтому движутся через колонку медленней, их удерживаемый объем равен полному объему растворителя  $V_t$ , и они элюируются последними.

Молекулы промежуточного размера, способные проникать только в какую-то часть пор, удерживаются в колонке в соответствии с их размером. Удерживаемый объем ( $V_e$ ) определенной молекулы равен количеству мобильной фазы, которая вытекает из колонки между нанесением пробы и выходом молекулы из колонки (измеряется на половине высоты соответствующего пика на хроматограмме). По сути, данный объем определяется суммой  $V_0$  и доступной части объема пор:

$$V_e = V_0 + K_d V_g,$$

где  $K_d$  – коэффициент распределения вещества.

Коэффициент распределения  $K_d$  показывает, какая часть внутреннего объема пор частиц (стационарной фазы) доступна для диффузии конкретных молекул.

Очевидно, что значения  $K_d$  могут изменяться в пределах от нуля до единицы. Для больших молекул, которые не проникают в поры, коэффициент распределения равен нулю и  $V_e = V_0$ . Для очень малых молекул, беспрепятственно проникающих в поры,  $K_d = 1$  и  $V_e = V_t$ . Если же на практике оказывается, что  $K_d \geq 1$  (т. е.  $V_e \geq V_t$ ), то это указывает на наличие сорбции молекул вещества в неподвижной фазе. Таким образом, в ЭХ соединения выходят из колонки в порядке, соответствующем убыванию их размеров (молекулярных масс). В ЭХ разделение заканчивается до выхода пика растворителя, имеющего наименьшую массу, в то время как в других вариантах жидкостной хроматографии компоненты смеси элюируются после пика растворителя.

Величина  $K_d$  играет центральную роль в характеристике процесса, имеющего место в ЭХ, тем более что ее можно определить по результатам хроматографического эксперимента для каждой группы молекул определенного размера, выходящих отдельным пиком:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}.$$

Свободный объем определяют посредством элюирования большой инертной молекулы, например красителя «голубой декстран 2000» с массой  $2 \cdot 10^6$  Да. При заполнении колонки сферическими гранулами  $V_0$  составляет 30–35 % от общего объема колонки и оптимальная область для разделения молекул находится в пределах 55 % от общего объема, хотя на практике используется намного больший объем для разделения. Так, область разделения колонки с  $V_t = 100$  мл лежит в пределах 35–90 мл.

Общий объем растворителя  $V_t$  рассчитывают исходя из измеренного объема колонки, приходящегося на грамм сухого геля. К примеру, 1 г сухого сефадекса G-100 при набухании в воде занимает объем, равный 15–20 мл. Одинаковые массы различных твердых матриц при набухании с растворителем дают сильно варьируемые объемы.

Связь между удерживаемым объемом и молекулярной массой (или размером молекул) вещества описывается частной калибровочной кривой, т. е. каждый конкретный сорбент характеризуется своей калибровочной кривой, по которой оценивают область разделяемых на нем молекулярных масс.

Гель-хроматография имеет недостатки при работе с большими объемами, что существенно на начальных стадиях очистки. Колонка может быстро перегрузиться большим количеством разделяемой смеси. Разделение в ЭХ лучше проводить при низкой скорости элюента, что, однако, увеличивает время анализа.

Метод гель-фильтрации широко применяют не только для фракционирования, но и очистки макромолекул от примесей низкомолекулярных соединений (в том числе и солей). Кроме того, сухой гель можно использовать для концентрирования белков в растворах. Для этого в раствор белков засыпают, например, гранулы сефадекса. В процессе набухания он поглощает воду и низкомолекулярные компоненты раствора, а белки остаются в меньшем количестве растворителя, т. е. концентрируются. После полного набухания гель отделяется от раствора центрифугированием.

## 2.7.5. Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография (ИОХ) является важнейшим методом препаративного выделения биомолекул. ИОХ была разработана изначально для разделения малых молекул, но впоследствии адаптирована и для анализа макромолекул. Рутинное использование ионообменников для разделения биополимеров стало возможным только тогда, когда удалось химически модифицировать гидрофильные природные или синтетические полимеры различными функциональными группами. Разделяющая и связывающая способности ионообменников в сравнении с другими хроматографическими материалами значительно выше. К тому же сродство макромолекул к ионообменнику можно изменять, варьируя различные параметры последнего. Это позволяет в относительно короткое время эффективно разделить большие количества сложных смесей.

В качестве неподвижной фазы в ИОХ используют ионообменники – сорбенты-иониты, имеющие в своем составе ионизируемые группы. Сохранение электронейтральности сорбента обеспечивается наличием способных к ионному обмену противоионов, расположенных в непосредственной близости к поверхности.

В качестве подвижной фазы в ИОХ применяют водные растворы солей, кислот и оснований, т. е. системы растворителей, имеющих высокое значение диэлектрической проницаемости и способность ионизировать соединения. Обычно работают с буферными растворами, поддерживающими определенные значения рН.

Разделение компонентов смеси достигается за счет обратимого взаимодействия ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента. Ион введенного образца, взаимодействуя с противоположно заряженными группами сорбента, обменивается с противоионом. Происходит разделение макромолекул в соответствии с их суммарным зарядом при определенных значениях рН и ионной силы раствора. При пропускании раствора биомолекул через хроматографическую колонку, заполненную твердым пористым заряженным материалом, часть молекул задерживается на нем в результате электростатических взаимодействий. ИОХ можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть ионизированы каким-либо образом.

Ионообменники представляют собой гидрофильную полимерную матрицу с ковалентно связанными с ней функциональными заряженными группами, нейтрализованными в растворе легкоподвижными противоионами. В качестве матрицы для ИОХ используют микрогранулированную целлюлозу, а также сферические частицы из агарозы (сефароза), полиакриламида, полидекстрана (сефадекс). Матрица должна обладать не только механической прочностью и определенной пористостью, но и не вызывать денатурацию биомолекул и не адсорбировать их неспецифически. Связывающие способности ионообменника в случае биополимеров возрастают с увеличением пористости матрицы, так как для связывания становятся доступными как внешние, так и внутренние заряженные группы.

Ионообменники на основе полистирола и полифенола, которые применяются для разделения малых молекул, вследствие их гидрофобности, малого объема пор, высокой плотности заряженных групп для выделения биополимеров, как правило, не используют.

Сильные иониты, функциональные группы которых образованы сильными кислотами или основаниями, могут быть ионизированы полностью во всем диапазоне

рабочих значений рН (3–11). Слабые иониты, функциональные группы которых образованы слабыми кислотами или основаниями, могут быть ионизированы не полностью и лишь в ограниченной области рН.

Различают положительно заряженные анионообменники (аниониты), содержащие катионные группы ( $-\text{NR}_3^+$ ,  $-\text{NR}_2\text{H}^+$ ,  $-\text{NRH}_2^+$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ), например, диэтиламиноэтилсефарозу, диэтил(2-гидроксипропил)-аминоэтилсефадекс, и отрицательно заряженные катионообменники (катиониты), содержащие анионные группы ( $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ), например карбоксиметилсефарозу, сульфопропилсефадекс.

Аниониты сорбируют из подвижной фазы анионы, катиониты, соответственно, взаимодействуют с катионами. Механизм анионного обмена можно представить в виде уравнения



Аналогично уравнение для катионного обмена:



В первом случае ионы пробы  $\text{X}^-$  конкурируют с ионами подвижной фазы  $\text{Y}^-$  за ионные центры  $\text{R}^+$  ионообменника, во втором – в конкуренцию с ионами подвижной фазы  $\text{Y}^+$  за ионные центры  $\text{R}^-$  вступают катионы пробы  $\text{X}^+$ . Ионы анализируемой пробы, слабо взаимодействующие с ионообменником, при такой конкуренции будут слабо удерживаться в колонке и первыми выйдут из нее, и, наоборот, наиболее сильно удерживаемые ионы будут элюироваться из колонки последними.

Диэтиламиноэтильные группы ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ) имеют величину  $\text{p}K_a = 9,5$  и при низких значениях рН (ниже  $\text{p}K$ ) обладают большой способностью связывать отрицательно заряженные молекулы. Значение  $\text{p}K_a$  карбоксиметильных групп ( $-\text{OCH}_2\text{COO}^-$ ) составляет 4,5, так что они эффективно связывают положительно заряженные молекулы в диапазоне рН 5–11. Данная область значений рН подходит для хроматографирования большинства биополимеров. Только немногие биомолекулы стабильны вне этого диапазона рН, для их анализа используют сильные анионо- или катионообменники.

К сильным анионитам относятся, например, сефадексы, содержащие диэтил(2-гидроксипропил)-аминоэтил-группы, которые еще при рН 12 остаются положительно заряженными. Катионообменники с сульфопропильными группами ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ), несущими отрицательный заряд в области рН 2–10, используют в качестве сильных катионитов.

При выборе ионообменника для разделения биомолекул нужно помнить, при каких условиях они наиболее устойчивы. Не все биополимеры одинаково стабильны и биоактивны при значениях рН выше или ниже их изоэлектрической точки. Значение  $\text{pI}$  большинства биополимеров лежит либо в слабокислой, либо в слабощелочной области.

Состав связывающего и элюирующего буферов при хроматографировании компонентов пробы определяется свойствами аналитов, при этом важными параметрами являются значения рН и ионной силы, состав солей и емкость буфера. Поскольку взаимодействие биомолекул с ионообменником очень сильно зависит от значения рН, то во время проведения ИОХ необходимо поддерживать выбран-

ное значение рН постоянным. Для этого молярность компонентов буфера должна быть не меньше 10 ммоль/л. Ионная сила раствора при соответствующем значении рН выбирается такой, чтобы она позволяла эффективно адсорбироваться анализам, но при этом повышалась незначительно для их десорбции. Увеличение ионной силы раствора приводит к тому, что присутствующие ионы конкурируют за места связывания с макромолекулами, вследствие чего удерживание последних снижается. Ионная сила элюирующего буфера может быть повышена либо путем добавления нейтральных солей (NaCl, KCl), либо повышением молярной концентрации компонентов буфера при постоянном рН. Для адсорбции слабосвязывающихся компонентов на ионообменнике зачастую используют буферы с низкой ионной силой и низкой буферной емкостью.

При работе с ионообменниками нужно наносить пробу в том же буфере, который используют для уравнивания колонки (т. е. в связывающем буфере). Для перевода в нужный буфер применяют диализ или гель-фильтрацию. Например, 1 мл препарата пропускают через колонку с сефадексом G-25 объемом 10 мл, уравнивающую нужным буфером.

Более детально рассмотрим проведение ИОХ для фракционирования белков. Выбор ионита определяется изоэлектрической точкой белка. Эффективная сорбция белков происходит при значениях рН, отстоящих не менее чем на единицу от величины  $pI$  белка. В области рН меньше ( $pI - 1$ ) белки можно хроматографировать на катионитах, а в области рН больше ( $pI + 1$ ) – на аниотах. Приближение значения рН к величине  $pI$  способствует десорбции белка. Белки вытесняются веществами, понижающими их сорбцию на ионите. Понижение сорбции осуществляется повышением ионной силы раствора и/или изменением его рН.

Для выделения отрицательно заряженного белка используют анионообменник. При пропускании раствора белка через колонку прочность связывания белка с анионообменником зависит от количества отрицательно заряженных групп в молекуле. В случае разделения белков с помощью анионной ИОХ удерживающая мобильная фаза – буфер с высоким значением рН и низкой концентрацией солей, а элюирующая мобильная фаза – буфер или с высоким рН и высокой концентрацией солей (рис. 2.12), или с низким рН и низкой концентрацией солей.

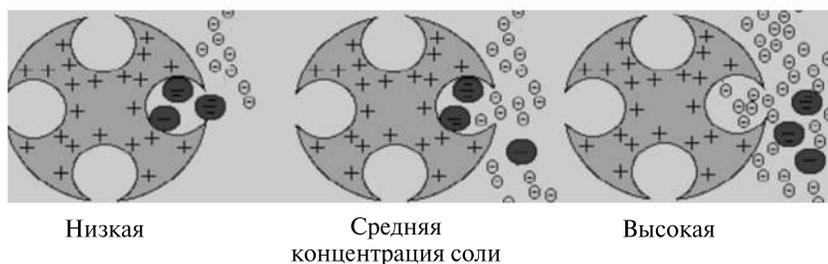


Рис. 2.12. Элюирование отрицательно заряженных белков с анионообменника буфером с высокой концентрацией солей (ИОХ)

В случае катионной ИОХ белков удерживающая мобильная фаза – буфер с низким значением рН и низкой концентрацией солей, а элюирующая мобильная фаза – буфер с низким рН и высокой концентрацией солей или с высоким рН и низкой концентрацией солей.

Для хроматографии на катионообменниках используют кислотные буферы (ацетатный, фосфатный,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и т. п.), на анионообменниках – основные буферы (трис, этаноламин, бис-трис, триэаноламин, фосфатный и т. д.).

Изменение рН (ионной силы) элюирующего буферного раствора можно проводить путем создания ступенчатой или градиентной элюции, т. е. концентрация элюирующего раствора изменяется в процессе снятия биомолекул с одной и той же колонки. Градиентный режим элюирования является эффективным, если необходимо разделить компоненты смеси, состоящей из веществ, удерживание которых в используемой хроматографической системе сильно отличается. При элюировании компонентов такой смеси в изократическом режиме нельзя достичь полного эффективного фракционирования аналитов. В этом случае, применив достаточно слабый элюент, можно добиться хорошего разделения наиболее слабо удерживаемых компонентов пробы, а более прочно сорбированные вещества будут выходить из колонки слишком поздно в виде сильно размытых пиков или вообще останутся в колонке. Если же применить более сильный элюент, способный обеспечить приемлемые значения фактора удерживания для прочно сорбирующихся компонентов, то слишком рано выйдут плохо удерживаемые вещества и первые из них могут не отделиться друг от друга. Градиентное элюирование позволяет решить такие проблемы и значительно повышает селективность метода.

### 2.7.6. Аффинная хроматография

Аффинная хроматография (АХ) (англ. affinity – сродство) – это разновидность адсорбционной хроматографии. АХ основана на уникальной способности биологически активных соединений к молекулярному распознаванию и образованию специфических и обратимо диссоциирующих комплексов. Если на поверхности стационарной фазы иммобилизовать один из компонентов комплекса (лиганд), то получится специфический сорбент для второго его компонента.

Научные основы метода заложены в 50-е гг. XX в., хотя впервые принцип АХ был описан в 1910 г. немецким ученым Э. Штаркенштейном, использовавшим крахмал для выделения амилазы. Термин «аффинная хроматография» был предложен П. Куатреказасом и соавторами в 1968 г.

Биоспецифические взаимодействия отличаются исключительной избирательностью, а зачастую и очень высокой степенью сродства между партнерами. Они базируются на взаимном пространственно-конфигурационном соответствии (взаимодополняемости или комплементарности) биомолекул или их фрагментов и реализуются за счет множественных межмолекулярных связей (ион-ионных, диполь-дипольных, ион-дипольных, водородных связей, вандерваальсовых сил, гидрофобных и  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг-взаимодействий). Биоспецифические взаимодействия лежат в основе множества строго детерминированных процессов, протекающих в организме. В качестве примеров служат взаимодействия между ферментами и их субстратами; гормонами и их рецепторами; антигенами и специфическими для них антителами; нуклеиновыми кислотами и специфическими белками, связывающимися с ними в процессе осуществления своих функций, – полимеразы, нуклеазы, гистоны, регуляторными белками, а также между самими нуклеиновыми кислотами-матрицами и продуктами их транскрипции.

АХ является уникальной среди технологий очистки, так как, по сути, это единственный метод, позволяющий выделить биомолекулы из комплексных смесей на основе их биологических функций или индивидуальной химической структуры. В отдельных случаях процедура очистки биомолекул с помощью стандартных методов может быть очень трудоемкой, времязатратной или даже невозможной, однако легкодостижимой с помощью АХ за одну стадию. АХ позволяет легко отделить активные биомолекулы (белки, НК, ферменты и др.) от денатурированных или функционально других форм, выделить чистые вещества, представленные в очень низких концентрациях, из больших объемов сырья, а также удалить специфические загрязнения. Помимо этого, АХ характеризуется высокой селективностью, воспроизводимостью и производительностью по отношению к искомому веществу. Недостатками АХ являются высокая стоимость и неспецифическая адсорбция.

К примеру, один из белков, обнаруженных в лейкоцитах, связывает витамин В<sub>12</sub>. Полагают, что этот белок секретируется в плазму, где участвует в транспорте витамина В<sub>12</sub> к тканям. Долгое время исследование этого белка представляло большие трудности, поскольку его не удавалось выделить в чистом виде с хорошим выходом обычными методами очистки. Методом АХ эта проблема была решена после того, как витамин В<sub>12</sub> был использован в качестве лиганда, иммобилизованного на матрице. Это почти в 10 000 раз увеличило степень очистки специфически связывающегося с витамином В<sub>12</sub> белка, выделенного с выходом > 90 % в одну стадию.

Неподвижной фазой в АХ служит твердый носитель, на котором иммобилизованы вещества (лиганды), способные специфически связываться с аналитами по принципу комплементарности. Мобильной фазой являются, как правило, буферные растворы, они могут содержать различные добавки. Разделение индивидуальных биомолекул базируется на избирательном связывании с лигандами, в основе которого лежат нековалентные связи (электростатические, гидрофобные взаимодействия, силы Ван-дер-Ваальса и др.).

Материалы для сорбента в АХ должны удовлетворять таким же требованиям, как и в случае других хроматографических методов, т. е. быть механически стабильными, пористыми, с большой удельной поверхностью, высокогидрофильными, нерастворимыми в подвижных фазах, химически устойчивыми, без неспецифической сорбции. Однако в дополнение к указанному матрица для АХ должна содержать разные функциональные группы (амино-, гидроксид-, тио-, карбокси-), к которым могут ковалентно присоединяться в качестве лигандов различные биомолекулы. В качестве матрицы для АХ используют агарозу (сефароза), полиакриламид (биогель Р), полиакриламид-агарозные гели (ультрагели), декстраны (сефадекс).

*Иммобилизация аффинных лигандов* — очень важная процедура для получения высокоселективной стационарной фазы. Необходимым условием при этом является сохранение биоспецифической активности лигандов. В качестве лигандов можно использовать субстраты или коферменты для выделения какого-либо фермента; антитела (антигены) — для выделения антигенов (антител); гормоны и витамины — рецепторных белков; лектины — полисахаридов, гликопротеинов и клеток; нуклеиновые кислоты — комплементарных оснований и т. д.

Лиганд может быть присоединен к матрице ковалентно или адсорбирован на ней в результате неспецифических или биоспецифических связей. Адсорбция молекул лигандов на поверхности матрицы, которая относится к физическим методам им-

мобилизации, происходит за счет нековалентных взаимодействий (сил Ван-дер-Ваальса, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий). Это простой метод, но существенным его недостатком является обратимость процесса, т. е. десорбция лигандов.

В основе биоспецифической иммобилизации лигандов лежит тот же принцип, что и в основе аффинной хроматографии, т. е. их присоединение обусловлено высокоспецифичными взаимодействиями. К примеру, бактериальные белки А, G избирательно с высоким сродством связываются с  $F_c$ -фрагментом антител, не участвующим во взаимодействиях с анализитами — антигенами. Конканавалин А (лектин) высокоспецифически связывает гликопротеины, белок авидин — низкомолекулярный биотин. На практике для такого метода иммобилизации лигандов используют матрицу, на которой уже присоединены белки А, G, авидин, конканавалин А.

Наиболее распространенным способом иммобилизации является химический способ, приводящий к образованию ковалентных связей между реакционно-способными группами лиганда и матрицы. Иммобилизация лиганда должна проводиться с участием той группы, которая не входит в участок, взаимодействующий с молекулой выделяемого вещества. Кроме того, активный центр лиганда должен быть правильно ориентирован в пространстве и максимально удален от поверхности матрицы. К примеру, молекула антитела (Y-образная форма) имеет в своей структуре неактивный для связывания антигенов  $F_c$ -фрагмент и два активных  $F_{ab}$ -региона. Поэтому молекулы антител должны быть присоединены к матрице через  $F_c$ -фрагмент (основание Y).

Взаимодействие целевого анализита и лиганда должно быть специфическим и обратимым. Комплекс «лиганд — биомолекула» должен диссоциировать при изменении параметров буферного раствора (рН, ионная сила и др.). Активные центры многих биологически активных веществ часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших структур лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Именно поэтому между матрицей и лигандом часто встраивают дополнительный блок, способствующий минимизации стерических препятствий, — спейсер. В качестве спейсеров служат бифункциональные молекулы, которые посредством одной функциональной группы связываются с матрицей, а другой — с лигандом. Таким образом происходит функционализация (или активация) матрицы. Наиболее распространенный способ активации — создание на поверхности матрицы электрофильных групп (карбокси-, amino-, эпокси- и др.), способных к взаимодействию с нуклеофильными группами лиганда. При этом процесс иммобилизации лиганда сводится к его инкубации с активированной матрицей.

Длина спейсера является критическим фактором, определяющим эффективность и селективность метода, и обычно составляет 9–12 атомов углерода. Если спейсер короткий, то стерические трудности в связывании биомолекулы с лигандом остаются; если длинный, то возникает опасность неспецифического связывания молекул со спейсером.

Один из наиболее распространенных носителей, используемых в биохимии уже на протяжении нескольких десятилетий, — сефароза. Известно несколько способов ее активации, однако чаще других применяют метод с использованием бромциана (BrCN). Преимуществом его является простота, высокая устойчивость образующихся связей. Активацию сефарозы осуществляют инкубацией ее водной

суспензии с раствором бромциана. Бромциан взаимодействует с гидроксильными группами сефарозы, в результате чего образуется имидокарбонат, содержащий электрофильный атом углерода. Помимо этого, в ходе реакции образуется неактивный карбамат, не способный к реакции с нуклеофильными боковыми группами аминокислот белка. При взаимодействии имидокарбоната с нуклеофильными группами, например  $\epsilon$ -аминогруппами лизина, происходит образование прочной ковалентной связи белка с активированной матрицей через остаток изомочевины или N-замещенного карбамата. Реакция активации матрицы бромцианом проходит только в щелочной среде с выделением бромистоводородной кислоты, для нейтрализации которой требуется постоянное добавление щелочи к реакционной смеси. Реакция бромциана с гидроксилами матрицы экзотермична, поэтому ее проводят при охлаждении. В качестве активных групп для иммобилизации белков могут служить также SH-группа цистеина, концевые аминогруппы и OH-группа тирозина. По активности данные группы располагаются в следующем порядке:  $-\text{SH} > -\text{NH}_2 > > -\text{OH}$ . Образующиеся тиоэфиры менее прочны, чем эфиры, а последние уступают по прочности амидным связям.

*Аффинная очистка* на хроматографической колонке заключается в первоначальном специфическом связывании биокомпонента пробы ( $T$ , англ. target molecule) с лигандом ( $L$ ) с образованием комплекса «лиганд – аналит» ( $L \cdot T$ ). Все остальные компоненты при этом выходят с растворителем. Последующее элюирование приводит к разрушению комплекса ( $L \cdot T$ ), и аналит ( $T$ ) вновь переходит в раствор. Элюирование искомым компонентом начинают, когда все несвязывающиеся компоненты вышли из колонки вместе со связывающим буфером, что можно контролировать спектрофотометрически (например, содержание белков по УФ-поглощению при 280 нм). Если аналиты очень сильно связаны с лигандами, после начала элюирования процесс можно приостановить от 10 мин до 2 ч, что увеличит время диссоциации аналита.

При подборе лиганда нужно учитывать, что слабая аффинность лиганда и искомого аналита может привести к потере последнего, а слишком высокая – к его низкому выходу, так как аналит может не десорбироваться с колонки во время элюирования. Для эффективной очистки с помощью АХ важна скорость связывающего буфера. В случае сильного родства лиганда и аналита, когда быстро достигается равновесное состояние, проба может хроматографироваться при высокой скорости потока. В противоположном случае, при низкой аффинности, должна быть использована низкая скорость. Оптимальная скорость для достижения эффективного связывания варьируется в зависимости от природы аналита.

*Элюирование разделенных компонентов* в АХ может быть селективным и неселективным. *Неселективное* снятие адсорбированных аналитов с колонки осуществляют, применяя для элюирования растворы с измененными (в сравнении со связывающим буфером) значениями pH, ионной силы, полярности, температуры. Элюирование путем изменения ионной силы буфера достигается введением соли (обычно NaCl) в раствор, для этого используют градиентное элюирование. К примеру, ферменты элюируют буфером с концентрацией соли 1 М NaCl или меньше. Полученный раствор нужного аналита от избытка солей может быть очищен диализом.

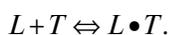
Изменение значения pH ведет к изменению степени ионизации заряженных групп лиганда и/или связанной биомолекулы. Это может влиять на связывание аналита с лигандом прямым образом, снижая аффинность лиганда и молекулы,

или непрямой – посредством изменения конформации молекулы. Наиболее общий способ элюирования заключается в снижении значения рН. Ограничения к его использованию обусловлены стабильностью матрицы, лиганда и аналита. Например, адсорбция протеаз осуществляется при рН 8,1, а десорбция – при рН 3,1. Если для элюирования используется раствор с низким рН, то фракции собираются в нейтрализующий буфер с высоким значением рН для восстановления нейтрального рН в собранной фракции (например, 1 М трис-НСl, рН 9,0; 60–200 мкл на 1 мл элюата). После такого элюирования колонка должна быть немедленно промыта буфером с рН 7.

Понижение полярности элюирующего буфера способствует десорбции биоконпонентов без инактивации. Обычно для этих целей используют диэтилендиоксид (до 10 %) или этиленгликоль (до 50 %). В некоторых случаях для снятия адсорбированных молекул применяют раствор детергента, разрывающий гидрофобные связи между белком и лигандом.

*Селективное* элюирование проводят с использованием буферов, в которых содержится реагент, конкурирующий за связывание либо с иммобилизованным лигандом, либо с исследуемой биомолекулой, – так называемое биоспецифическое элюирование. В первом случае конкурирующий реагент связывается с лигандом и вытесняет молекулы аналита с неподвижной фазы; в другом – реагент связывается с молекулой аналита и препятствует ее удерживанию на матрице. При подборе реагента для селективного элюирования нужно учитывать величины константа диссоциаций комплексов «лиганд – аналит» и «конкурирующий реагент – аналит».

**Кинетика в АХ.** Как указывалось ранее, взаимодействие «аналит – лиганд» должно быть специфическим и обратимым. Реакцию аналита ( $T$ ) с лигандом ( $L$ ) с образованием соответствующего комплекса ( $L \bullet T$ ) можно представить в виде следующей схемы:



Характеристикой обратимости процесса является константа диссоциации ( $K_D$ ):

$$K_D = \frac{[L][T]}{[L \bullet T]},$$

где  $[L]$  – концентрация свободного лиганда (не связанного с аналитом);  $[T]$  – концентрация свободного аналита (не связанного с лигандом);  $[L \bullet T]$  – концентрация комплекса.

В идеальном случае константа диссоциации комплекса «лиганд – аналит» в растворе должна находиться в пределах от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  М. Данные по константе диссоциации можно найти в литературных источниках. Взаимодействия биомолекулы и лиганда с константой диссоциации комплекса больше, чем  $10^{-4}$  М (например, реакция фермента и слабого ингибитора), слишком слабые, что позволяет успешно использовать их для АХ. И наоборот, если  $K_D$  меньше  $10^{-8}$  М (например, для комплекса гормона и его рецептора), то аналит связывается с лигандом слишком прочно и элюировать его из колонки, не вызвав дезактивации, будет очень сложно.

На практике для оценки эффективности связывания аналита аффинными лигандами используют соотношение, полученное Д. Грейвсом и Я. Ву (D. Graves, Y. Wu, 1974), которые разработали простые кинетические и равновесные модели аффинной сорбции и десорбции:

$$\frac{[T]_{\text{связ}}}{[T]_{\text{общ}}} \approx \frac{L_0}{K_D + L_0},$$

где  $[T]_{\text{связ}}$  – количество аналита, связанного с лигандом;  $[T]_{\text{общ}}$  – общее количество аналита в растворе;  $L_0$  – концентрация иммобилизованного лиганда, которая обычно составляет  $10^{-4}$ – $10^{-2}$  М.

Для хорошего связывания аналита с лигандом константа диссоциации комплекса должна быть по крайней мере на два порядка ниже, чем  $L_0$ , и находиться в диапазоне  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М. Для элюирования аналита с колонки величина  $K_D$  должна возрастать до  $10^{-1}$  –  $10^{-2}$  М. Значения константы диссоциации комплекса «лиганд – аналит» можно варьировать, изменяя параметры буфера (рН, ионная сила).

При проведении селективного элюирования в системе будет происходить взаимодействие конкурирующего реагента (С) и аналита:



Константа диссоциации этого процесса

$$K_{D_k} = \frac{[C][T]}{[C \bullet T]},$$

где  $[C]$  – концентрация свободного конкурирующего реагента;  $[T]$  – концентрация свободного аналита;  $[C \bullet T]$  – концентрация комплекса аналита с конкурирующим реагентом.

Соотношение количества элюируемого аналита к его общему связанному с лигандом количеству согласно равновесной модели Д. Грейвса и Я. Ву можно выразить следующим уравнением:

$$\frac{[T]_{\text{элюир}}}{[T]_{\text{связ}}} \approx \left( \frac{\rho}{\rho + 1} \right) \left\{ \frac{\rho C_0}{\rho C_0 + \frac{K_{D_k} L_0}{K_D}} \right\},$$

где  $\rho$  – отношение объема добавленного конкурирующего реагента и объема пор частиц матрицы (геля) (обычно 1–10);  $K_D$  – константа диссоциации иммобилизованного лиганда;  $K_{D_k}$  – константа диссоциации свободного конкурирующего реагента;  $C_0$  – концентрация конкурирующего реагента (обычно  $10^{-2}$  –  $10^{-1}$  М),  $L_0$  – концентрация иммобилизованного лиганда (обычно  $10^{-4}$  –  $10^{-2}$  М).

Если  $K_{D_k}$  и  $K_D$  схожи по величине, то для эффективного элюирования концентрации конкурирующего реагента и иммобилизованного лиганда должны быть одинаковые. Если  $K_{D_k}$  в десять раз больше (т. е. конкурентный лиганд связывается с аналитом более слабо), чем  $K_D$ , то для эффективного элюирования концентрация конкурирующего реагента должна в десять раз превышать концентрацию иммобилизованного лиганда.

**Металл-хелатная аффинная хроматография (МХАХ).** Это вариант аффинной хроматографии, который используется для выделения органических и биоорганических соединений из биологических образцов и объектов окружающей среды. В основе метода лежит различное сродство органических соединений к ионам некоторых переходных металлов.

Термин «хелатирование» (от лат. *chelate* – клешня) означает образование связей между ионами металлов и лигандами, имеющими несколько электронодонорных центров. Хелаты представляют собой центральный ион и координированные вокруг него лиганды.

МХАХ широко применяется для очистки пептидов и белков – металлопротеинов, антител, фосфорилированных и рекомбинантных гистидинмеченых белков. Чистота выделенного с помощью МХАХ белка может достигать 95 %. Адсорбция белков и пептидов в МХАХ базируется на обратимом взаимодействии между аминокислотами, выступающими в качестве доноров электронов, и ионами металла. МХАХ была основана на известном сродстве ионов переходных металлов, таких как  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  к гистидину и цистеину в водных растворах. В процессе связывания белков с ионами металла могут участвовать остатки различных аминокислот (глицин, аргинин, лизин, тирозин, гистидин, цистеин, аспарагиновая кислота), однако фактически сорбция белка определяется наличием гистидина. Он специфически связывается с двухвалентными ионами никеля, образуя стабильный комплекс.

Ионы металлов хелатируются полидентантными лигандами, иммобилизованными на матрице (агароза, сефароза, сшитый сополимер стирола и дивинилбензола), которая и служит в качестве неподвижной фазы в МХАХ. Выбор металла для МХАХ зависит от структуры анализируемых соединений. Катионы  $Ga^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zr^{4+}$  предпочтительны для сорбции фосфорсодержащих белков и пептидов, двухвалентные ионы  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  используют для очистки гистидинсодержащих белков. При изготовлении металл-аффинных сорбентов обычно применяют три(имино)диацетат или тетрадентатные (нитрилотриацетат, карбоксиметиласпартат) лиганды. Нитрилотриуксусная и иминодиуксусная кислоты хелатируют ионы  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  и т. п., при этом свободные орбитали атомов металлов способны участвовать в координационном взаимодействии с электронодонорными группами пептидов или белков. Комбинация тетрадентатного лиганда и иона металла ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), обеспечивающая сильное связывание катиона, причем два координационных сайта катиона остаются свободными для взаимодействия с биополимерами, получила наиболее широкое признание. Такая неподвижная фаза приводит к высокой степени извлечения и чистоте выделенного белка. К примеру, нитрилотриуксусная кислота удерживает ион  $Ni^{2+}$  четырьмя валентностями (координационное число  $Ni^{2+}$  может быть 4 или 6), и две валентности иона металла доступны для взаимодействия с кольцами имидазола гистидиновых остатков (рис. 2.13). Это соотношение оказалось наиболее эффективным для очистки гистидинсодержащих белков. В отличие от тетрадентатных лигандов иминодиуксусная кислота координирует двухвалентные ионы тремя валентностями, оставляя три валентности иона металла свободными для взаимодействия с кольцом имидазола гистидина.

В качестве подвижной фазы в МХАХ используют буферы с величиной рН 6–8 (это определяется свойствами сорбента), лучшим вариантом является нейтральный рН и высокая ионная сила раствора. Буфер не должен содержать в своем составе соли, способные хелатировать ионы металла (цитрат, ЭДТА и др.). Обычно используют фосфатный (10–200 мМ), ацетатный (50 мМ) и НЕРЕС (20 мМ) буфе-

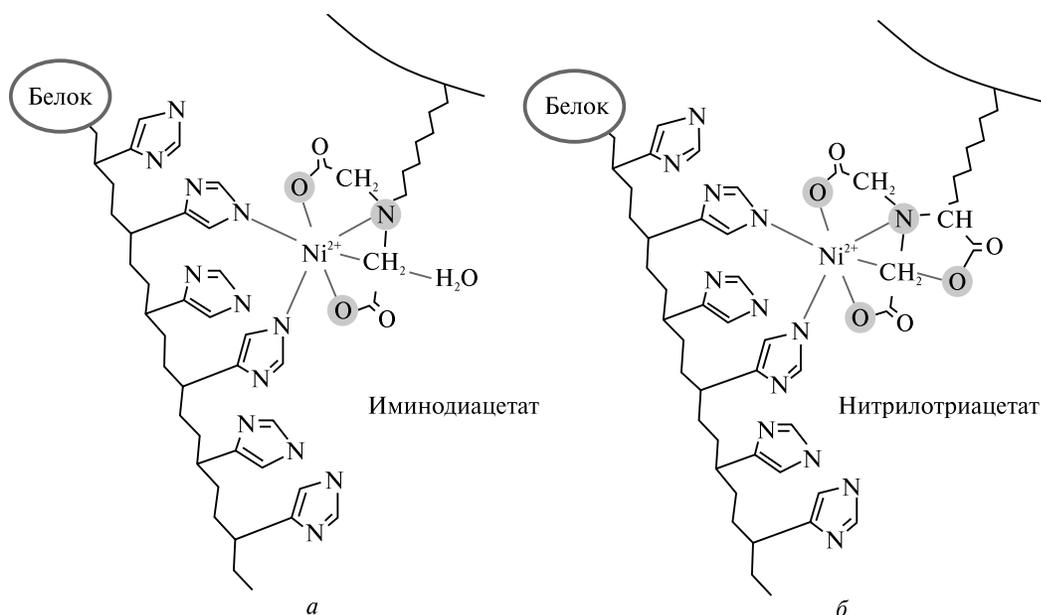


Рис. 2.13. МХА-хроматография гистидинсодержащих белков: тридентатный – иминодиацетат (*a*) и тетрадентатный – нитрилотриацетат (*б*) лиганды, иммобилизованные на матрице

ры. В образец необходимо добавлять NaCl до концентрации 0,15–0,5 М для того, чтобы увеличить ионную силу раствора пробы и минимизировать неспецифические ионные взаимодействия с аффинной матрицей. Можно создать такие условия (рН, концентрация солей), при которых взаимодействие анализа с лигандом будет наиболее сильным.

При выделении белков из пробы нужно, чтобы их атомы с электронодонорными группами, находящиеся на поверхности, были хотя бы частично не протонированы. Величина  $pK_a$  имидазольного цикла гистидина составляет  $\sim 6,7$ . Значит, при близких к 6 рН раствора половина остатков гистидина белка не будет протонирована и способна образовывать координационные связи. Другие аминокислоты имеют  $pK_a$  значительно выше, например  $pK_a$  тиольной группы цистеина  $\sim 8,5$ , а индольной группы триптофана –  $\sim 9,41$ , азота боковой цепи триптофана – 15, значит, при нейтральном рН остатки гистидина будут основными связывающими агентами. В определенных условиях в подобных взаимодействиях могут принимать участие также остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот. По прочности образуемых комплексов аминокислоты располагаются в ряд: His, Cys > Asp, Glu >> и др. Наличие остатков гистидина на поверхности белковой молекулы является необходимым и достаточным условием для ее сорбции на хелатирующем сорбенте – сорбция требует наличия как минимум двух близкорасположенных остатков гистидина, которые могут быть сближены как в первичной, так и в третичной структуре белка.

Десорбцию и элюирование связанного белка осуществляют обычно тремя способами: использование градиента рН; введение в буфер конкурентных комплексообразующих лигандов (глицин, гистидин, гистамин, имидазол); добавление в буфер мочевины, этиленгликоля, детергентов, спиртов. При понижении значения рН мобильной фазы (градиент рН 8–4) происходит протонирование электронодо-

норных групп белка и диссоциация его сорбционного комплекса. Для этой процедуры подходят ацетатный, цитратный или фосфатный буферы. Следует помнить, что иминодиацетатные группы неподвижной фазы также способны протонироваться и потерять связанный с ними ион металла при пониженных рН.

Молекулы белка можно вытеснить из сорбента лигандным обменом, т. е. конкурентными реагентами. К таким веществам относятся имидазол (0–0,5 М), гистидин (0–0,05 М), хлорид аммония (0–2 М) или другие вещества, которые имеют сродство к хелатированным ионам металла. Например, имидазол ( $pK_a$  6,95) образует с ионами  $Ni^{2+}$  более устойчивый комплекс, чем остатки гистидина белка, и элюирование его раствором проводят в нейтральном или слабощелочном буфере. Сорбционные комплексы можно разрушить при низких рН средним по силе хелатообразующим агентом (свободный гистидин) или сильным хелатирующим агентом (этилендиаминтетрауксусная кислота, 0,05 М). Этот способ эффективен для выделения ферментов, принадлежащих к классу металлопротеинов.

Одной из наиболее важных областей применения МХАХ является очистка рекомбинантных белков, меченных гистидином. Обычно такая метка состоит из шести или более остатков гистидина и прикреплена в молекуле белка к С- или N-концу. Даже один шаг очистки в большинстве случаев приводит к высокой степени чистоты препарата белка. Ионы  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  наиболее часто используют для очистки таких белков. Никель обеспечивает хорошее удерживание, но более склонен к неспецифическому связыванию, кобальт гарантирует более специфическое связывание и, следовательно, более высокую степень очистки, медь связывает гистидинмеченые белки более сильно, однако ее специфичность очень низкая.

### **2.7.7. Мультидименсиональная жидкостная хроматография**

Мультидименсиональная жидкостная хроматография (МДЖХ) представляет собой комбинацию нескольких хроматографических методов. МДЖХ позволяет разделить многокомпонентные пробы и получить желаемую степень чистоты искомого вещества. К примеру, сложную смесь белков, используя МДЖХ, можно эффективно разделить по двум признакам – гидрофобности и наличию заряда. В МДЖХ фракции, полученные на первой колонке (первом направлении), далее независимо друг от друга разделяют на второй колонке (по частям друг за другом на одной колонке или поочередно на двух колонках) (второе направление) и т. д. (рис. 2.14).

Комбинация хроматографических методов увеличивает разделение компонентов, которое не может быть достигнуто одним методом. При этом повышается пиковая емкость, т. е. число пиков, которые могут быть разделены между первым и последним пиком при заданном разрешении на хроматограмме. Это, по сути, число анализов, разделенных в результате комбинации методов. Условия хроматоградирования оптимизируют для каждой фракции, причем определенные компоненты могут быть целенаправленно обогащены или удалены. Времена выхода анализов на первой колонке должны быть известны, чтобы выбрать необходимые фракции. Преимуществом МДЖХ является то, что компоненты, которые коэлюируются на первом этапе, могут быть разделены на втором направлении.

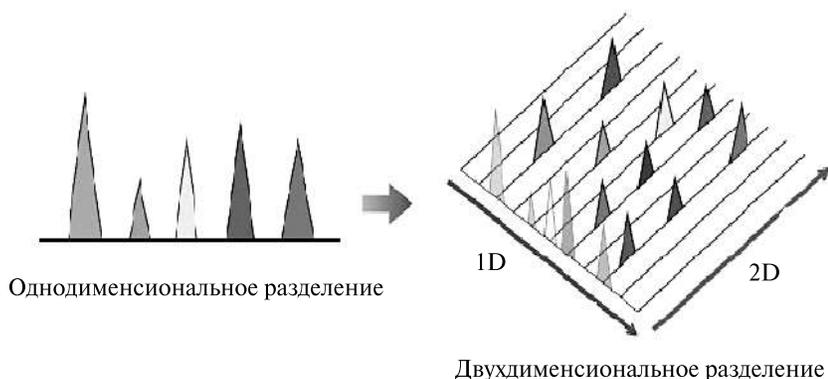


Рис. 2.14. Мультидизименсиональное разделение

В многомерной МДЖХ комбинацию методов обозначают крестиком между аббревиатурами методов (например, АХ × ИОХ). Для выполнения МДЖХ используют либо полностью автоматизированную систему (дополнительная инфраструктура на приборе: вторые насосы, термостатированные автосэмплеры и автосэмплер-загрузчики и т. п.), либо отдельные шаги выполняют вручную. Количество шагов (число направлений) определяется задачей, т. е. необходимой степенью чистоты компонента.

При проведении МДЖХ нужно соблюдать совместимость (смешиваемость, растворимость, вязкость, элюотропная сила) мобильных фаз следующих друг за другом методов. В отдельных случаях фракции между направлениями необходимо дополнительно обрабатывать (например, сменить буфер, сконцентрировать или разбавить) для того, чтобы повысить совместимость между элюирующей мобильной фазой первого направления и удерживающей фазой второго.

В МДЖХ методы, используемые на каждом направлении, могут быть некоррелирующими (ортогональными), это значит, что принципы разделения на каждом направлении должны быть разными. Примером такой ортогональности может служить сочетание ИОХ и ОФХ. В первом случае разделение базируется на различии в зарядах компонентов, во втором – на гидрофобности. К примеру, белки с одинаковым зарядом, различающиеся по гидрофобности, в случае ИОХ выйдут одним пиком на хроматограмме, но будут разделяться с помощью ОФХ. Ортогональными могут быть методы, в которых первое направление АХ или ИОХ, второе – ОФХ, ЭХ, ХГВ, нормально-фазовая хроматография. Для идеальной ортогональной двумерной хроматографии общая пиковая емкость (ПЕ) является произведением пиковых емкостей каждого направления ( $ПЕ_{2D} = ПЕ_{D1} \times ПЕ_{D2}$ ). Ортогональные системы с некоррелирующей селективностью ведут к наибольшей ПЕ и, как следствие, к наибольшему числу хорошо разделенных пиков.

Если в МДЖХ используют комбинацию не идентичных, но подобных (слабо коррелирующих) хроматографических методов (например, ХГВ и ЭХ, ОФХ и ЭХ), то пиковая емкость, а с этим и число анализов, которые могут быть разделены, уменьшается. ПЕ зависит также от способа элюирования. Градиентное элюирование повышает ПЕ больше, чем изократическое, что может способствовать улучшению суммарного результата. Селективность в хроматографии определяется не только стационарной, но и мобильной фазой, поэтому правильный подбор условий

хроматографирования может улучшить результат, даже если комбинируются методы с подобными механизмами разделения.

В случае полностью коррелирующих (подобных) методов (например, ХГВ и ОФХ) эффективность разделения невысокая из-за недостаточной разности в селективности обоих направлений, поэтому такая комбинация далеко не идеальна.

В противоположно коррелирующей системе (например, анионная и катионная ионообменная хроматография) время удерживания возрастает для каждого аналита в первом направлении, но во втором — уменьшается, что плохо влияет на общую ПЕ, которая падает с увеличением селективности между первым и вторым хроматографическими направлениями.

Данные разделения компонентов с помощью 2Д-ЖХ могут существовать в виде карт удерживания (англ. retention map), представляющих собой графики, в которых время удерживания второго направления (ось  $Y$ ) наносится относительно времени удерживания первого направления (ось  $X$ ). Вид такого графика зависит от того, комбинация каких методов была использована. Точки хаотически расположены в случае ортогональной 2Д-ЖХ; прямая линия от нуля — для коррелирующих методов; прямая обратная — для противоположно коррелирующих методов.

Для эффективной очистки комплексных биопроб (например, смеси полипептидов) можно использовать трехмерную хроматографию. На каждом отдельном хроматографическом направлении существуют конфликты между скоростью, разрешением, мощностью (пропускная способность колонки) и выходом. Все параметры невозможно оптимизировать одновременно. Например, высокое разрешение достигается в ущерб скорости и наоборот, поэтому на каждом шаге выбирают несколько основных параметров для достижения цели этапа.

На первом шаге (направлении) следует разделение и концентрирование компонентов из сырого экстракта, а также удаление загрязнений, важны высокие скорость и загрузка, второстепенным является разрешение. Для этого можно использовать аффинную, металл-аффинную, ионообменную и гидрофобную хроматографию.

На втором шаге для повышения эффективности очистки лучше выбрать метод с иным хроматографическим принципом разделения — ортогональный по отношению к первому. При этом основными параметрами хроматографирования являются высокие загрузка и разрешение, а второстепенные — скорость и выход. На данном этапе должна быть удалена основная часть мешающих компонентов (например, другие белки, НК, вирусы, токсины и т. п.). Для этого подходят ИОХ, адсорбционная (гидрофобная) и эксклюзионная хроматография.

На третьем направлении главными параметрами являются высокие разрешение и выход, второстепенными — скорость и загрузка. На данном этапе должны быть удалены следы загрязнений или ненужных веществ, а также ненужные мультимерные формы искомой биомолекулы. Для этих целей используют обращенно-фазовую и эксклюзионную хроматографию.

Для глубокой очистки компонентов (например, при получении белков для терапевтических целей) можно применять четыре или больше направлений.

### 3.1. Принцип метода.

#### Электрофоретическая подвижность частиц

Электрофорез (греч. φορέω – перенесение) – это метод, широко используемый для разделения и идентификации соединений, имеющих различные заряд и размер, с помощью постоянного электрического поля. Электрофоретическое разделение базируется на разной подвижности заряженных частиц под действием внешнего постоянного электрического поля.

Биологические молекулы – белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, пептиды и т. п. – находятся в водном растворе в виде частиц, несущих конкретный заряд. Заряд биомолекулы определяется входящими в ее состав группами, способными к электролитической диссоциации. Степень диссоциации групп зависит от многих факторов, в частности от рН среды. Общий заряд биомолекулы также может изменяться при ее взаимодействии с ионами или другими молекулами, поэтому электрофорез получил широкое применение для анализа и очистки различных биомолекул.

Электрофорез (ЭФ) как метод разделения предложен в 30-е гг. XX в. шведским ученым А. Тизелиусом, который за это открытие (наряду с работами по хроматографическому адсорбционному анализу) в 1948 г. получил Нобелевскую премию. А. Тизелиус разделил сыворотку крови человека на четыре компонента (альбумин,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины) в заполненной буфером U-образной трубке, подключенной к источнику постоянного тока. Ученый обнаружил, что компоненты пробы перемещаются со скоростью, определяемой их размером, формой и электрическим зарядом.

Первоначально ЭФ проводился в свободном растворе, но так как при ЭФ происходило выделение джоулевой теплоты, то образующиеся конвективные потоки очень сильно влияли на разделение. Для минимизации данного фактора стали разрабатываться техники ЭФ с использованием различных стабилизирующих матриц. Внедрение электрофоретических «носителей» привело к улучшению технологий и одновременно к упрощению фракционирования. Первыми матрицами были бумага, агаровый гель, крахмальные гели (1955), ацетатцеллюлозные пленки (1957), затем стали широко использовать полиакриламидный (1959) и агарозный (1961) гели. Применение пористых материалов привело к улучшению разделения макромолекул с учетом не только их заряда, но и размера. Крахмальные гели до сих пор находят применение в генетических исследованиях, а ацетатцеллюлозные пленки – в клинической диагностике. Агарозные гели используют главным образом для разделения фрагментов ДНК и иммунофоретического определения белков.

Полакриламидный гель (ПААГ), инертный и полностью прозрачный, позволяет проводить электрофоретическое разделение ДНК и белков с высоким разрешением. Дискретный ПААГ-ЭФ (1964) является основой современных высокоразрешающих электрофоретических методов в гелях и капиллярах. В дальнейшем возникли такие высокочувствительные электрофоретические техники, как двумерционный электрофорез (1975), методы блоттинга для ДНК (1975) и белков (1979), а также капиллярный электрофорез (1983).

Все электрофоретические техники имеют очень высокое разрешение, они широко используются в препаративных и аналитических целях. С помощью ЭФ могут быть разделены как анионные/катионные низко- или высокомолекулярные вещества, так частицы и клетки. Классический ЭФ стал стандартным методом в биохимической и биомедицинской аналитике для разделения и изолирования НК, углеводов, белков, ферментов и гликопротеинов, пептидов, аминокислот. В настоящее время ЭФ как метод анализа широко используется в фармации, клинико-диагностических лабораториях, биотехнологических производствах, ветеринарии, для контроля качества продуктов питания и косметических препаратов.

Электрофоретические методы можно классифицировать различными способами. К основным типам ЭФ относятся зональный электрофорез, позволяющий разделять биомолекулы в растворе или на различных носителях с использованием однородных буферов; изотахофорез, который проводят с использованием дискретных буферных систем; изоэлектрическое фокусирование, основанное на применении рН-градиентов. По степени денатурации разделяемых биомолекул ЭФ подразделяется на нативный и электрофорез в денатурирующих условиях. Электрофоретическое разделение можно проводить в одном (одномерный ЭФ) или в двух (двумерный ЭФ) направлениях. В зависимости от ориентации носителя (гель, др.) ЭФ может быть вертикальным или горизонтальным.

*Принцип ЭФ* заключается в том, что заряженные частицы движутся (мигрируют) под действием постоянного электрического поля, причем частицы пробы находятся в водном растворе. Электрофорез проводят в однородном электрическом поле (напряженность поля  $E$  одинакова во всех его точках).

Прежде чем перейти к характеристике движения заряженной частицы в постоянном электрическом поле, остановимся на важных параметрах электрического поля, к которым относятся потенциал, напряжение и напряженность. Электрическое поле обладает запасом электрической энергии, проявляющейся в виде электрических сил, действующих на находящиеся в поле заряженные тела. Для характеристики энергии, запасенной в каждой точке электрического поля, введено специальное понятие – электрический потенциал. Потенциал – это скалярная величина, характеризующая потенциальную энергию, которой обладает единичный положительный пробный заряд, помещенный в данную точку поля; она численно равна отношению потенциальной энергии заряда в поле к величине этого заряда. Разность потенциалов между двумя точками поля носит название электрического напряжения ( $v$ , В/м). Оно численно равно отношению работы  $W$ , которую нужно затратить на перемещение положительного заряда  $q$  из одной точки поля в другую (вдоль силовых линий поля) к величине этого заряда, т. е.  $U = W/q$ . Следовательно, напряжение  $U$ , действующее между различными точками электрического поля, характеризует запасенную в этом поле энергию, которая может быть отдана путем перемещения электрических зарядов между этими точками.

Напряженность поля (интенсивность поля) – векторная физическая величина, характеризующая электрическое поле в данной точке. Она численно равна отношению силы  $F$ , действующей на неподвижный точечный заряд, помещенный в данную точку поля, к величине этого заряда  $q$ . Напряженность электрического поля  $E$  в случае однородного поля представляет собой отношение электрического напряжения, действующего между двумя точками поля, к расстоянию между этими точками. При напряженности поля в 1 В/м на заряд в 1 Кл действует сила, равная одному ньютону (1 Н).

Для понимания сути электрофоретического разделения заряженных частиц необходимо знать, какие факторы влияют на скорость движения частиц в электрическом поле. Важной характеристикой заряженной частицы при ее движении в электрическом поле является ее *электрофоретическая подвижность*.

Рассмотрим изолированную частицу, взвешенную в идеальном диэлектрике. На частицу с зарядом  $q$ , движущуюся в электрическом поле с напряженностью  $E$ , действуют различные силы. Сила, ускоряющая частицу  $F_{\text{эф}}$  (измеряется в ньютонах), равна произведению общего заряда частицы на напряженность этого поля:

$$F_{\text{эф}} = qE = z_i e E,$$

где  $z_i$  – число заряда;  $e$  – элементарный заряд в колумбах.

При наложении электрического поля скорость движения частицы довольно быстро увеличивается до тех пор, пока электрическую силу, действующую на частицу со стороны электрического поля, не уравновесит сила трения. Сила трения  $F_{\text{тр}}$  препятствует движению ионов и пропорциональна скорости миграции заряженной частицы:

$$F_{\text{тр}} = f_c v_i,$$

где  $f_c$  – коэффициент трения;  $v_i$  – скорость миграции заряженной частицы.

Коэффициент трения ( $f_c$ ) характеризует сопротивление среды, он зависит от размера заряженной частицы, ее формы, степени сольватации, а также от вязкости жидкой среды и размера пор матрицы.

Если силы  $F_{\text{эф}}$  и  $F_{\text{тр}}$  приходят в равновесие, то заряженные частицы движутся в электрическом поле с постоянной скоростью. Из равенства ускоряющей силы и силы трения получим выражение для скорости частицы в поле  $v_i$ :

$$F_{\text{эф}} = F_{\text{тр}} \quad \text{или} \quad qE = f_c v_i,$$

$$v_i = \frac{qE}{f_c} = \mu_i E,$$

где коэффициент  $\mu_i$  обозначается как электрофоретическая подвижность.

*Электрофоретическая подвижность* ( $\mu_i$ ) – это скорость движения частицы (обычно выражаемая в см/с) при напряженности электрического поля в 1 В/см. Эта величина имеет размерность ( $\text{см}^2 \text{с}^{-1} \text{В}^{-1}$ ), а ее знак совпадает со знаком суммарного заряда макромолекулы.

Электрическое поле напряженностью  $E$  определяет скорость миграции частиц и может варьироваться экспериментально. При 20 В/см – это ЭФ с низкой напряженностью поля, а при 200 В/см – с высокой.

Для малых сферических частиц можно применить закон Стокса, чтобы рассчитать силу трения с учетом равенства коэффициента трения  $f_c = 6\pi\eta r$ , тогда для электрофоретической подвижности получим выражение

$$\mu_i = \frac{q}{f_c} = \frac{z_i e}{6\pi\eta r},$$

где  $z_i$  – число заряда;  $e$  – элементарный заряд в коломбах;  $\eta$  – вязкость раствора;  $r$  – радиус Стокса частицы (радиус гидратированного иона).

Для несферических биомолекул обычно действует эмпирически определенная связь между электрофоретической подвижностью и молекулярным весом:

$$\mu_i = \frac{q}{M^{2/3}}.$$

При этом в литературе встречаются и другие значения экспоненты молекулярной массы, которые находятся в пределах между 1/3 и 2/3.

Электрофоретическая подвижность является фундаментальной характеристикой молекул, т. е. величиной, характерной для данного вещества. Из вышеприведенных выражений следует, что электрофоретическая подвижность заряженных биомолекул зависит от следующих свойств частицы: массы, размера, формы (пространственной структуры), величины заряда (т. е.  $pK_a$ -значений заряженных групп в молекуле). Так, маленькие ионы в сравнении с большими и многократно заряженные в сравнении с однозарядными обнаруживают большую подвижность. Нейтральные аналиты не мигрируют в данных условиях.

Скорость миграции частиц, частично ионизированных в растворе (слабых кислот и оснований, которыми являются биомолекулы), в электрическом поле определяется эффективной подвижностью  $\mu_{эфф}$ . Она связана с электрофоретической подвижностью частиц и степенью диссоциации  $\alpha$ , которая равна отношению числа молекул  $n$ , распавшихся на ионы, к общему числу молекул  $N$  (т. е. отношению катионов или анионов к общей концентрации электролита):

$$\mu_{эфф} = \sum \alpha_i \mu_i.$$

Это значит, что для слабых кислот или оснований (например, пептиды или белки) скорость миграции, а поэтому и разделение можно оптимизировать посредством изменения значения рН электролита. Надо учитывать, что степень диссоциации  $\alpha$  зависит от природы и концентрации вещества, а также от температуры раствора. Так,  $\alpha$  растет при нагревании (поскольку диссоциация – процесс эндотермический, нагревание смещает равновесие вправо, в сторону продуктов диссоциации). При уменьшении концентрации вещества в растворе (т. е. при разбавлении) степень диссоциации также увеличивается.

В случае реального электрофореза процесс происходит не в диэлектрике, а в растворе электролита. В разбавленных растворах на заряженные частицы в электрическом поле могут действовать еще две другие силы, возникающие вследствие ионной атмосферы частицы – релаксирующая и ретардационная (замедляющая). Присутствие ионной атмосферы вокруг частицы приводит к тому, что ее электрофоретическая подвижность оказывается меньше, чем это предсказывается уравнением.

Согласно теории Дебая – Хюккеля каждая заряженная частица в растворе окружена диффузным облаком ионов, заряд которых противоположен заряду частицы; радиус такой оболочки зависит от ионной силы раствора. На значительных расстояниях от частицы суммарный заряд в любом элементе объема, достаточно большом по сравнению с атомными размерами частицы, равен нулю. Присутствие ионной атмосферы вокруг частицы приводит к тому, что потенциал на поверхности частицы снижается из-за снижения ее эффективного электростатического заряда. Кроме этого, электрическое поле действует и на ионы, окружающие искомую частицу. Поскольку знак заряда ионного облака противоположен знаку заряда частицы, облако будет смещаться в направлении, противоположном движению частицы, замедляя тем самым ее миграцию (*ретардационный эффект*, или эффект электрофоретического трения). Также имеет место замедляющий эффект иного рода, связанный с тем, что в электрическом поле одни ионы при перемещении приближаются к частице, а другие удаляются от нее. Вследствие этого в ионной атмосфере происходит непрерывное замещение ионов, что вызывает нарушение ее сферически симметричной формы, так как для вновь входящих ионов требуется определенное время, чтобы найти свое место в поле биомолекулы и прийти в равновесие с ее окружением. В результате двойной электрический слой позади частицы растягивается. Действие тормозящей силы такого типа называется *релаксационным эффектом*. Вследствие этих эффектов подвижность частицы уменьшается с увеличением ионной силы раствора.

При электрофоретическом разделении из-за прохождения электрического тока через раствор электролита образуется джоулева теплота ( $W$ ), которая прямо пропорциональна напряженности поля, эквивалентной электропроводности ( $\lambda$ ) и мольной концентрации ( $c$ ) электролита:

$$W = E^2 \lambda c.$$

Для эквивалентной электропроводности действительно выражение

$$\lambda = \mu_i z_i F,$$

где  $F$  – постоянная Фарадея.

В результате в электрофоретической ячейке может образоваться температурный градиент, который в случае ЭФ без матрицы приводит к конвективному перемешиванию раствора. Использование носителей для проведения ЭФ (гель и др.) способствует снижению влияния температуры на электрофоретическое разделение. Для минимизации разницы в температурах при проведении ЭФ с использованием носителей нужно применять очень тонкий слой геля, а также материалы с хорошей теплопроводностью, хотя и в этом случае повышение температуры может привести к конвективным потокам и увеличению диффузии заряженных частиц и, следовательно, размыванию разделенных зон.

Таким образом, электрофоретическая подвижность макромолекул зависит не только от их свойств, но и от напряженности электрического поля, состава и пористости разделяющей матрицы, вязкости среды разделения, температуры, состава разделяющего буфера (вид и концентрация ионов, значение pH).

Различают *абсолютную* и *относительную* электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность – это соотношение скорости ча-

стицы к напряженности электрического поля, вызывающей движение частицы, как показано выше. Относительная электрофоретическая подвижность — это отношение подвижности исследуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт. Относительная подвижность позволяет правильно подобрать силу поля и время разделения.

Напряженность поля ( $E$ ), созданного в электрофоретической ячейке между двумя электродами, к которым приложено определенное напряжение ( $U$ ), равно отношению приложенного напряжения к длине среды  $L$ , т. е. к длине электрофоретической ячейки. Учитывая это, скорость частицы в поле будет определяться следующим выражением:

$$v_i = \mu_i E = \mu_i \frac{U}{L} = \frac{L}{t}.$$

Из этого соотношения можно определить время, необходимое для прохождения частицей электрофоретического пути:

$$t = \frac{L}{v_i} = \frac{L^2}{\mu_i U}.$$

Время разделения частиц при ЭФ зависит от величины пути разделения и от приложенного напряжения. Кроме того, зная время разделения, величину приложенного напряжения и длину электрофоретического пути, можно на практике определить электрофоретическую подвижность частицы.

При проведении ЭФ на разделение компонентов пробы существенное влияние может оказать такое явление, как *электроосмос*. Множество материалов, которые используют в ЭФ, таких как стекло, аморфный кварц, тефлон, бумага, агар, агароза и ацетатцеллюлозная пленка, содержат заряженные, в большинстве своем кислые группы. Полисахариды агар и агароза, используемые в качестве гелей, могут включать в себя сульфатные и карбоксильные группы, у кварцевых капилляров речь идет о силанольных группах. Такие группы в слабощелочных или нейтральных электрофоретических растворах могут диссоциировать и таким образом заряжать поверхность. Эти иммобилизованные заряженные группы притягивают к себе положительные ионы из буфера, причем нейтральность системы в целом сохраняется. При подаче напряжения противоионы начинают двигаться к катоду, вовлекая в свое движение молекулы растворителя, образуя ток жидкости, направленный против движения отрицательно заряженных частиц пробы. Такой поток жидкости в кварцевых капиллярах в случае капиллярного ЭФ называется электроосмосом. В случае гель-ЭФ это явление (движение жидкости сквозь поры геля) обычно называют *электроэндоосмосом* (слова-синонимы). Электроосмос играет важную роль для разделения частиц в капиллярном электрофорезе. В случае же классического гель-ЭФ электроэндоосмос приводит к ухудшению разделения, а именно к размыванию разделенных зон. Для минимизации данного эффекта нужно использовать материалы, не несущие заряда. Величину электроэндоосмоса можно определить с помощью неионного красителя, например декстрана голубого.

## 3.2. Аппаратура, пробоподготовка, гели и условия проведения гель-электрофореза

Для проведения ЭФ нужны электрофоретическая камера, термостат для охлаждения и источник тока. В электрофоретической камере находятся катод и анод, к которым приложено постоянное напряжение. Обычно используется источник тока до 200 В и 150 мА, что определяется выбранным методом.

В электрофоретической камере электрический ток пропускают через проводник – буферный раствор, налитый в канал из изолирующего материала (например, стекла), или пропитывающий какую-либо поддерживающую среду – носитель (например, бумагу или гель). Буфер является участком электрической цепи. Электрическое сопротивление  $R$  буферного раствора задается двумя факторами – концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью.

Используют вертикальные или горизонтальные камеры. В вертикальных гель помещен в стеклянные трубки или между двумя стеклянными пластинами. Карманы для пробы в слое геля получают с помощью шаблона (гребня), который располагается между стеклянными пластинами при нанесении геля. Пробы наносятся в соответствующие карманы сверху на гель под катодный буфер. Для горизонтальных систем в основном используются гели, которые полимеризуются на инертной пленке, при этом их поверхность остается открытой. Пробы наносятся в углубления, получаемые в геле с помощью шаблона. Для данного варианта камер не требуется большого объема разделяющего буфера, процедура может быть выполнена при наложении полосок бумаги, пропитанных буфером. В горизонтальной камере используют более тонкие слои геля, чем в вертикальной, так как их можно лучше охладить, что является преимуществом. ЭФ желательно проводить в охлаждаемых камерах, что улучшает воспроизводимость и точность анализа. Контакт между буфером и гелем бывает прямым или посредством полосок бумаги, которые накладываются на гель. Все определяется конструкцией камер.

При проведении *пробоподготовки* нужно применять высокочистые реагенты. Нерастворенные частицы из пробы удаляются центрифугированием или фильтрацией, поскольку они могут забить поры геля. ЭФ чувствителен по отношению к высокой концентрации солей в пробе, так как это вносит дополнительные ионы. Концентрация солей должна быть ниже 50 ммоль/л. Соли из проб удаляют диализом или гель-фильтрацией.

При ЭФ белков для повышения растворимости некоторых макромолекул в пробу и гель могут вводиться неионные хаотропы (мочевина) в высоких концентрациях или неионные (тритон X-100) и цвиттер-ионные детергенты.

Пробу (2–50 мкл) в виде узкой полоски наносят на разделяющий гель, зона старта должна быть как можно уже. Для повышения плотности (утяжеления) проб и предотвращения интенсивного перемешивания с электродным буфером используют глицерин или сахарозу.

Молекулы ДНК и белков не поглощаются в видимом диапазоне, а потому невозможно визуально следить за их миграцией в геле. Если не применяются специальные устройства, сканирующие гель в УФ-свете, то в состав пробы необходимо включить видимую глазом метку, обладающую известной электрофоретической подвижностью. При этом метка должна мигрировать в ту же сторону, что и био-

молекулы, и не взаимодействовать с компонентами пробы. В качестве метки используют цветные красители, мигрирующие впереди биомолекул; и когда они достигают электрода, ЭФ считается завершенным. Вместе с тем краситель не должен слишком сильно отрываться от белков, чтобы его прохождению до конца пластины или трубки соответствовало использование большей части находящегося в них геля для фракционирования белков.

Для визуализации процесса ЭФ, когда биомолекулы мигрируют к аноду, обычно к пробе добавляют отрицательно заряженные красители бромфеноловый синий, ксилен-цианол, азокраситель оранжевый желтый. Бромфеноловый синий имеет окраску в щелочной и нейтральной средах, цвет ксилен-цианола синий. Оранжевый желтый обнаруживает бриллиантовую желтую окраску в нейтральной и кислой средах или красную – при  $\text{pH} > 9$ . Бромфеноловый синий – высокомолекулярная молекула, в сравнении с которой ксилен-цианол имеет меньшую подвижность, а оранжевый желтый – большую. В качестве положительно заряженного красителя для ЭФ в кислой среде, когда белки мигрируют в направлении катода, используют метиловый зеленый, или пиронин.

При выборе красителя нужно учитывать массу молекул, а также разную скорость миграции в различных гелях и буферах. К примеру, оранжевый желтый движется со скоростью, равной приблизительно скорости 50 бр ДНК-молекулы (англ. base pair, бр – пар оснований; 1 бр соответствует приблизительно 3,4 Å длины вдоль цепочки ДНК и с массой 618 или 643 Да для ДНК и РНК соответственно), а бромфеноловый синий – 200–400 бр ДНК в 1 % агарозном геле. Если необходимо увидеть биомолекулы схожего размера, то нужно использовать другой краситель, потому что бромфеноловый синий маскирует обнаружение таких аналитов. Ксилен-цианол мигрирует со скоростью, эквивалентной примерно 4 кбр ДНК в 1 % агарозном геле, поэтому его нельзя использовать для визуализации аналитов подобного размера.

**Гели для проведения ЭФ.** В качестве стабилизирующих матриц для проведения ЭФ в основном используют гели, хотя и ацетатцеллюлозные пленки еще находят применение в клинической химии и биомедицине для разделения белков биожидкостей. На пластиковой основе закрепляется пленка из ацетата целлюлозы. Ацетатцеллюлозные пленки имеют крупные поры, через которые проходят любые макромолекулы, поэтому разделение на таких пленках зависит только от заряда. Недостатком ЭФ на таких пленках является размывание разделенных зон вследствие молекулярной диффузии. Ацетатцеллюлозные пленки прозрачные, что облегчает оптическое детектирование, и легко растворяются в различных растворителях, вследствие чего ускоряется элюирование разделенных компонентов.

Гели нашли широкое применение благодаря своим свойствам. С ними легко работать и освобождать разделенные компоненты, их водно-солевые растворы хорошо проводят ток. После завершения ЭФ гели можно хранить в пластиковой упаковке в холодильнике.

Идеальный гель должен быть химически инертным, механически прочным и с регулирующимися порами, снижать конвекцию, быть простым в приготовлении, обладать высокой теплопроводностью, низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью, не иметь заряда на поверхности частиц (не вызывать электроэндомоса).

В крупнопористых гелях миграция частиц зависит только от нетто-заряда молекул, в мелкопористых гелях – как от их заряда, так и от радиуса молекулы.

При электрофорезе на таких гелях наряду с разделением частиц согласно их зарядам вступает в силу так называемый молекулярно-ситовой эффект, когда гелевая структура ведет себя по отношению к ионам как фильтр. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность заряженных частиц и степень их разделения оказывает соотношение линейных размеров. Ионы, превышающие размер пор геля, не проходят или проходят очень медленно, а более мелкие ионы быстрее проникают через поры матрицы. Таким образом, скорость миграции частиц зависит не только от заряда, но и от их размера, величины и формы пор геля, взаимодействия между матрицей геля и движущимися частицами (адсорбция и др.). Гели посредством адсорбции в своих порах раствора электролита минимизируют явление диффузии, которое противодействует разделению.

Гели для анализа можно приготовить самим или использовать готовые. В настоящее время наибольшее применение для проведения ЭФ находят гели на основе агарозы и полиакриламида.

*Агароза* — это особо чистая фракция природного полисахарида агара, извлекаемого из некоторых видов морских красных водорослей. Она является линейным полимером, в ее цепи чередуются  $\beta$ -D-галактопираноза и 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопираноза. Молекулярная масса агарозы составляет  $10^4$ – $10^5$  Да. Коммерческий препарат агарозы представляет собой белый порошок. Агароза не растворяется в воде, но при нагревании в воде она плавится, образуя прозрачную жидкость, которая при охлаждении превращается в полупрозрачный беловатый гель. Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей полисахаридов за счет водородных связей между ними.

Температура плавления и гелеобразования агарозы варьируется в зависимости от источника полисахарида, чистоты фракции и количества заряженных и незаряженных боковых групп в цепи полимера. Обычно агароза образует гель при температуре 32–45 °С и плавится при 80–95 °С. Для получения легкоплавкой агарозы (с температурой плавления 70 °С и гелеобразования 30 °С) в ее структуру вводят определенные группы для изменения физических свойств полимера. Хаотропные реагенты (мочевина, иодид калия), способные разрывать водородные связи, снижают температуру плавления и гелеобразования агарозы. Однако присутствие таких реагентов может понизить прочность или в отдельных случаях предотвратить образование геля. К примеру, гели обычной агарозы с 6 М мочевиной плавятся за 1,5 мин при 75 °С, но не застывают за 1 ч при 20 °С.

Растворы агарозы обнаруживают ярко выраженный гистерезис (т. е. разницу между температурами плавления и гелеобразования), больший, чем другие гидроколлоиды. Благодаря этому свойству агароза в качестве матрицы нашла широкое применение в ЭФ. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой, что позволяет не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную на кипящей бане агарозу предварительно охлаждают до 50–55 °С и уже при этой температуре дозируют и заливают в формы, что удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

Агароза содержит заряженные группы (главным образом сульфатные и немного карбоксильных), которые способны взаимодействовать с ионами буфера или заряженными группами биомолекул, что может привести к значительному электроосмотическому потоку. Предобработка агарозы в щелочном растворе вызывает гидролиз этих групп и улучшает характеристики геля.

Для количественного описания величины электроэндоосмоса в агарозных гелях используют коэффициент относительной миграции ( $m_r$ ), который равен отношению скоростей миграции незаряженного биополимера (только за счет электроэндоосмоса) и аналогичного по структуре полианиона при электрофорезе в агарозном геле данного типа. Обычно выделяют три типа агарозы: с низкой (LE), средней (ME) и высокой (HE) степенью электроэндоосмоса. Для агарозы типа LE коэффициент  $m_r$  находится в диапазоне  $0,1 \div 0,15$ ; ME —  $0,15 \div 0,2$ ; HE —  $0,23 \div 0,26$ . Выпускается также агароза с повышенной температурой плавления (HGT), для которой коэффициент  $m_r < 0,1$ .

Гели агарозы непрозрачны, однако это обусловлено не наличием примесей, а своего рода «кристаллизацией» геля и свидетельствует скорее о чистоте агарозы. Затвердевший гель представляет собой неравновесную систему — со временем он несколько уплотняется, выдавливая из себя жидкость. Этот процесс идет вначале довольно быстро, а потом — очень медленно. Тем не менее гели агарозы перед опытом следует выдерживать в течение 12 ч (открытые пластины для горизонтального ЭФ выдерживают во влажной камере). Сжатие сильнее выражено у более концентрированных гелей агарозы.

Контакт с кислородом воздуха не мешает застыванию агарозы, поэтому плоские гели для горизонтального электрофореза готовят путем заливки дозированного объема расплавленной агарозы на строго горизонтальную стеклянную пластинку нужного размера. Тем не менее горячую смесь агарозы с буфером имеет смысл кратковременно деаэрировать в вакууме. Разнообразные соли, детергенты и другие добавки смешивают с раствором агарозы в горячем виде (при 50–60 °С), они не препятствуют ее застыванию.

Агарозный гель относительно крупнопористый, размер пор варьируется в зависимости от концентрации агарозы: от 150 нм для 1 % до 500 нм для 0,16 % геля. Размер пор у агарозы намного больше, чем у полиакриламидных гелей (ПААГ), и поэтому НК и слишком большие для ПААГ белки могут быть разделены с помощью агарозы. Агарозу преимущественно используют для разделения больших молекул НК. Выбор концентрации агарозы, т. е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Например, при электрофорезе в вертикальной камере с концентрацией агарозы 0,8 % можно разделить белки и НК с массой  $5 \cdot 10^7$  Да, а в горизонтальной камере при 0,2 % концентрации агарозы — белки с массой  $10^8$  Да. Агарозные гели имеют достаточную прочность даже при низких концентрациях.

Прочность геля определяется как сила, которая может быть приложена для разрыва геля при данной концентрации, и выражается г/см<sup>2</sup>. Прочность 1 % геля больше 1200 г/см<sup>2</sup>. Благодаря высокой прочности геля стандартная агароза может образовывать гели при очень низкой концентрации (0,15 %).

*Полиакриламидные гели* химически инертны, стабильны механически, полностью прозрачны (для света с длиной волны выше 250 нм), упругие. Они имеют незначительный электроэндоосмос и легко готовятся, хорошо подходят для окрашивания многими реагентами. Их основными характеристиками являются размеры пор, которые образуются при его полимеризации. ПААГ обладает хорошим эффектом сита в широком диапазоне масс.

Полиакриламидные гели получают посредством сополимеризации мономеров акриламида  $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CONH}_2)$  со сшивающим агентом, в основном N, N'-

метиленбисакриламидом. В качестве инициатора полимеризации используют персульфат аммония, а также в полимеризационную смесь в качестве стабилизатора радикалов добавляют N, N, N'', N''-тетраметилэтилендиамин.

Инициирование полимеризации осуществляется следующим образом. При разрыве связи (O—O) в молекуле (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> формируются два свободных радикала, каждый из которых стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней, также образуя свободные радикалы. В свою очередь, каждый такой радикал вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с формированием нового радикала и т. д. Цепная реакция полимеризации идет до тех пор, пока два радикала, встретившись друг с другом, не образуют обычную ковалентную связь. По такому же механизму в растущую цепочку линейного полимера одной из своих концевых винильных групп может встроиться метиленбисакриламид. Если его второй конец встроится в состав другой линейной полимерной цепочки, то возникнет сшивка. Без агента, образующего поперечные сшивки, в геле формируются лишь продольно расположенные длинные тонкие волокна. Полимеризацию ПААГ нужно проводить без кислорода, который ведет к обрыву цепи. Гели должны быть использованы только на следующий день после приготовления, так как идет медленная постполимеризация.

Размер пор в ПААГ определяется общей концентрацией мономеров акриламида (%T) и количеством сшивающего агента от общего количества мономеров (%C, англ. cross linking):

$$\%T = 100 \frac{(A+B)}{V},$$

$$\%C = 100 \frac{B}{(A+B)},$$

где V — объем буфера в миллилитрах (обычно рассчитывают на 100 мл); A и B — массы акриламида и бис-акриламида в граммах соответственно.

Соотношение между акриламидом и сшивающим агентом определяют механические и физические свойства геля. При постоянном %C и возрастающем %T число звеньев полимерной цепи увеличивается и поры будут меньше. К примеру, для разделения больших протеинов подходит гель с низким %T (7,5), а для анализа малых протеинов — с высоким значением %T (15) при постоянном %C.

При постоянном %T и увеличении %C, начиная с некоторого низкого значения, размер пор уменьшается и достигает минимума при %C, равном 5; при дальнейшем увеличении %C размер пор увеличивается из-за образования коротких толстых сшивок полимерных цепей. При очень высоких и низких значениях %C получаются большие поры, так что содержание сшивки %C в геле, как правило, находится в диапазоне от 1 до 5. Однако размер пор ПААГ в результате определяется соотношением %T и %C, которое варьируется в зависимости от поставленной задачи.

Обычно при повышении концентрации акриламида снижают концентрацию бис-акриламида, и наоборот. Одновременное увеличение содержания обоих компонентов приводит к образованию гелей с повышенной жесткостью и хрупкостью, а одновременное снижение — к возрастанию мягкости и эластичности.

В настоящее время принято считать, что для разделения белков наиболее подходящим является гель со значением  $\%C = 2,67$  и значением  $\%T$  в диапазоне от 7,5 до 20. Например, гель с  $\%T = 4$  ( $\%C 2,7$ ) не обладает эффектом сита для разделения белков, они будут преимущественно разделяться из-за разницы в величинах их зарядов. В то же время гель с  $\%T = 8$  ( $\%C 2,7$ ) позволяет разделить белки в зависимости от разницы как в зарядах, так и в массе. Гель со значением  $\%C = 3$  имеет поры диаметром 5,3 нм для  $\%T = 5$  и 3,3 нм для  $\%T = 20$ .

К недостаткам ПААГ можно отнести как ограничения в размере пор ( $M > 800$  кДа не проходят), так и токсичность мономеров.

**Условия эксперимента, влияющие на электрофоретическое разделение.** Для хорошего разделения компонентов пробы при ЭФ нужно, чтобы они разбивались на узкие четкие зоны. Для этого следует минимизировать факторы, влияющие на их расширение. Подбор оптимальных условий электрофореза сводится к выбору следующих параметров: вид и пористость геля; природа, концентрация и pH буфера; напряжение и сила тока, а также объем и концентрация исходной пробы.

Как указывалось выше, при выборе геля для проведения ЭФ необходимо в первую очередь учитывать размер его пор. Именно соотношение размеров пор геля и биомолекул будет определяющим в разделении компонентов пробы. К тому же гелевая матрица препятствует диффузии молекул и, следовательно, размыванию зон, а также минимизирует термальную конвекцию. Во избежание перегрузки геля объем пробы не должен быть большим.

Выбор *температурного режима* при ЭФ определяется в первую очередь тем, что часть электрической энергии трансформируется в джоулевую теплоту, что должно быть компенсировано эффективным охлаждением системы. К тому же многие белки чувствительны к действию температуры и их разделение должно происходить при охлаждении.

В отсутствии охлаждения действуют факторы, уменьшающие разрешение. Конвекционные токи образуются в результате того, что у более теплого раствора вблизи центра подложки (геля) плотность ниже, чем холодный раствор у стенок камеры. Вода имеет максимальную плотность при 4 °С, и при этой температуре изменение плотности минимальное, поэтому нужно придерживаться данного значения  $T$ . Вследствие образования температурного градиента происходит деформация разделенных зон, так как части зоны в теплой секции геля (внутри) движутся скорее, чем в холодной части (наружная). Такая неравномерная скорость приводит к искривлению или иногда к перекрыванию зон. При более высокой температуре возрастает молекулярная диффузия, ведущая к размыванию и расширению зон, что особенно значимо, если процесс разделения длится несколько часов.

В открытых электрофоретических камерах происходит испарение, что может приводить к дегидратации геля и таким образом к локальному изменению ионной силы, поэтому камера должна быть закрытой.

Известно, что вязкость варьируется с температурой. Высокая температура приводит к размягчению геля и низкому коэффициенту трения. Этот эффект особенно заметен у агарозы.

Для контроля температуры в ходе электрофореза применяют термостаты. Использование водопровода не позволяет соблюдать точные температурные параметры, а проведение процесса в холодном помещении тоже не всегда эффективно, так как воздух является плохим проводником тепла.

Выбор *буфера и его параметров* имеет принципиальное значение для анализа, так как электрофоретическое разделение компонентов пробы происходит в буфере. Он обеспечивает необходимые условия разделения и определяет его эффективность. Буферная система ЭФ состоит из разделяющего (рабочего) буфера (наливается в электродные отсеки камеры), буфера для приготовления геля, буфера для растворения или разбавления пробы. Разделяемый буфер используется как источник ионов для поддержания тока и необходимого значения рН. Различают ЭФ с непрерывной буферной системой и дискретной. В случае непрерывной системы используется одинаковый буфер с постоянным значением рН для заполнения электродных отсеков и приготовления геля. Дискретная буферная система применяется для проведения изотахофореза, о чем будет сказано ниже.

*Значение рН* разделяемого буфера может оказывать драматическое влияние на электрофоретическое разделение. Это не так значимо в случае НК, олигонуклеотидов, нуклеотидов — их заряд всегда отрицательный из-за кислых фосфатных групп сахаров, изменение рН в пределах 4–10 незначительно влияет на их разделение. Однако для пептидов, белков (других амфотерных молекул) заряд зависит от величины рН. При рН ниже  $pI$  белки имеют положительный заряд и будут мигрировать к катоду, при рН больше  $pI$  у белков отрицательный заряд и они движутся к аноду. Оптимальное значение рН рабочего буфера обуславливает не максимальный заряд, а максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь. Для обеспечения хорошей электрофоретической подвижности и сохранения вместе с тем ощутимых различий в суммарных электрических зарядах белков выбирают рН буфера, отличающийся на 3–4 единицы от среднего значения  $pI$  для белков данного типа. Если эти значения неизвестны, то желательно составить себе представление о характере зарядов белков при различных рН по характеру их сорбции на ионообменных смолах. Иногда два или более белка дают одно пятно после разделения, т. е. проявляют одинаковую мобильность при выбранных условиях. В таких случаях разделение белков должно выполняться при двух различных значениях рН. Подтверждение чистоты и гомогенности образца должно проводиться несколько раз при разных значениях рН.

Для проведения ЭФ наиболее часто используют боратный, фосфатный, ацетатный, цитратный, барбитуратный и трис-буферы.

Для кислых белков оптимальные значения рН буфера оказываются в нейтральной или слабощелочной области (рН 7–9); миграция белков идет в направлении от катода к аноду. Для основных белков (гистоны, белки рибосом и др.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН 4–5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода к катоду. В качестве слабощелочных буферов для кислых белков применяют трис-НСl, трис-глициновый, трис-боратный или трис-барбитуратный. Для основных белков чаще всего используют трис-ацетатный, глицин-ацетатный буферы, а иногда, если белок это выдерживает, и просто уксусную кислоту в концентрации 0,9 М (0,9 М  $CH_3COOH$  имеет рН 2,4; 0,1 М — рН 2,87).

Разделение ДНК в агарозных гелях чаще всего проводят в буферах, приготовленных на основе трис-уксусной кислоты-ЭДТА (англ. Tris-acetate-EDTA (ТАЕ)) или трис-борной кислоты-ЭДТА (англ. Tris-boric acid-EDTA (ТВЕ)) с рабочим диапазоном рН в интервале 7,0÷9,2. Трис имеет значение  $pK_a$  8,07 при 25 °С, его используют

для приготовления слабощелочных буферов со значениями рН, близкими к физиологическим, в диапазоне 7,1÷9,0. По своей буферной емкости ТАЕ значительно уступает ТВЕ и по этой причине непригодна для длительных форезов и экспериментов, требующих высоких напряжений.

*Ионная сила* разделяемого буфера также влияет на качество разделения. Взаимодействие между заряженными группами на поверхности частиц и ионов буфера приводит к образованию ионной атмосферы вблизи заряженных макромолекул. Это, как указывалось выше, может привести к возникновению релаксирующего и ретардационного эффектов. Общим правилом ЭФ служит использование низкой ионной силы разделяемого буфера, необходимой для минимизации противоионного эффекта наряду с поддержанием адекватной растворимости компонентов образца. Однако в случае очень низкой ионной силы буфера может произойти агрегация белков. Очень часто для проведения ЭФ, например белков, выбирают концентрацию буфера в пределах 0,01÷0,1 М.

При выборе концентрации буфера также нужно учитывать допустимую мощность тепловыделения (выделение джоулевой теплоты).

Скорость заряженных частиц в электрофоретической камере прямо пропорциональна напряженности электрического поля. *Напряженность электрического поля* представляет собой отношение приложенной разности потенциалов к общей длине электрофоретического пути. При оценке напряженности поля на разделение принято измерять расстояние непосредственно между электродами. Проведение фореза при увеличении напряжения эквивалентно уменьшению длины геля. Для большинства случаев используется напряженность поля 20 В/см. Для разделения комплексных смесей, содержащих маленькие молекулы (аминокислоты, дипептиды) с высокой скоростью диффузии, приводящей к размыванию зон веществ, для минимизации вышеуказанной проблемы используют 200 В/см. К тому же высокое напряжение способствует образованию температурного градиента в системе.

В проводящей ток жидкости приложенному напряжению всегда отвечает определенная сила тока  $I$ , которая в соответствии с законом Ома выражается суммарным сопротивлением цепи  $R$  ( $I = U/R$ ). В гель-ЭФ проводящей жидкостью служит буфер, находящийся в порах геля.

Величина тока и напряженности поля в геле зависит от электропроводности разделяющего (рабочего) буфера. Электропроводность буфера (и, следовательно, его электрическое сопротивление) определяется двумя факторами – концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью.

Электропроводности буферных систем, в которых не участвуют легкоподвижные ионы сильных неорганических кислот и щелочей (например,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ), относительно невелики. Так, при одинаковых концентрациях ионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  в двух буферах электропроводность первого буфера будет заметно выше, чем второго. Относительно низкую электропроводность имеют трис-боратный, трис-глициновый и трис-барбитуратный буферы.

Перед проведением ЭФ нужно удалить или снизить (до 50 мМ) концентрацию соли в пробе, чтобы избежать изменения электропроводности системы. Свой вклад в проводимость вносят и мигрирующие в геле заряженные макромолекулы, но ввиду их низкой концентрации этим вкладом можно пренебречь.

Кроме суммарной электропроводности определенную роль играет электрофоретическая подвижность ионов буфера, мигрирующих в том же направлении, что и разделяемые макромолекулы. Качество разделения растет, если эти ионы по своей подвижности приближаются к самим макромолекулам. Таким свойством обладают большие органические ионы трис<sup>+</sup>, остатки барбитуровой и какодиловой кислот (анионы), а также цвиттер-ионы глицина и аланина. Следовательно, при прочих равных условиях трис-буфер следует предпочесть при фракционировании щелочных белков, а барбитуратный — для кислых белков вблизи нейтральной области рН буфера.

Электрический ток одинаков по всей длине электрической цепи, т. е. в любом сечении трубки или пластины геля. Разрывов или скачков тока по длине геля физически быть не может. Иначе обстоит дело с напряжением или напряженностью электрического поля. Если в любой электрической цепи последовательно включены два различных по своей величине сопротивления  $R_1$  и  $R_2$ , то одинаковый для всей цепи ток  $I$  протекает через первое из них за счет падения на нем напряжения  $U_1 = IR_1$ , а через второе — за счет  $U_2 = IR_2$ . Полное напряжение по всей электрической цепи  $U = U_1 + U_2$ . Если  $R_1$  сильно отличается от  $R_2$ , то и  $U_1$  также отличается от  $U_2$ . При изменении сопротивления двух участков распределение напряжения на них может существенно измениться, оставаясь в сумме неизменным.

При проведении ЭФ на геле, состоящем из двух последовательно расположенных участков, где при полимеризации были использованы разные буферы (содержащие ионы с разной подвижностью или просто различающиеся по концентрации), сопротивления этих участков могут оказаться разными. Это приведет к тому, что на этих участках будут различаться значения напряженности поля. Соотношение напряженностей поля на двух участках геля не зависит от их длины и определяется только концентрациями и подвижностями содержащихся в них ионов. В реальных буферных системах геля такую ситуацию можно представить в двух простейших вариантах.

В первом случае буферы и, соответственно, ионы на двух участках геля ( $A$  и  $B$ ) одинаковы, но концентрация буфера на участке  $A$  в 10 раз меньше. Это приведет к тому, что напряженность поля на участке  $A$  будет в 10 раз больше, чем на участке  $B$ . Скорость миграции ионов пропорциональна напряженности поля, и ионы на участке  $A$  будут мигрировать в 10 раз быстрее, чем такие же ионы на участке  $B$ ; это компенсирует разницу в их концентрациях. Число ионов, проходящее за 1 с через любое сечение обоих участков, а также через границу между ними, будет одинаковым, что и означает неизменность тока  $I$  по всей длине составного геля. При этом предполагается, что количество ионов на участке  $A$  не истощается — оно пополняется за счет ионов, поступающих из электродного буфера.

В другом случае концентрация ионов на обоих участках одинакова, но ионы на участке  $A$  отличаются меньшей электрофоретической подвижностью. Речь идет о подвижности в свободной жидкости, так как сетка геля не препятствует миграции малых ионов. Например, пусть в геле  $A$  содержатся отрицательные ионы глицина (при щелочном рН), а в геле  $B$  — ионы хлора. Меньшая подвижность ионов обуславливает большую величину сопротивления. Суммарное напряжение распределится между участками  $A$  и  $B$  так, что напряженность поля на участке  $A$  бу-

дет выше, причем именно настолько, чтобы скорость миграции ионов глицина, пропорциональная произведению их подвижности на напряженность поля, стала точно такой же, как и у ионов хлора. Этому опять требует условие неизменности величины тока вдоль всего геля.

В более сложных случаях может различаться как подвижность ионов, так и их концентрация, но всегда в двух последовательно расположенных участках геля устанавливается такая напряженность поля, которая компенсирует все различия и обеспечивает постоянство тока во всем геле. Очень важно, что это различие существенным образом влияет и на соотношение скоростей миграции одних и тех же биомолекул на двух участках геля. На том участке, где напряженность поля выше, биомолекулы будут двигаться быстрее, чем на соседнем.

В непрерывной системе сопротивление геля не должно заметным образом изменяться в процессе электрофореза. Как следствие этого, не должна изменяться и расходимая мощность. Повышение напряжения источника, работающего в режиме постоянного тока, или уменьшение силы тока при постоянном напряжении свидетельствует о каких-то неполадках в электрической цепи, например о высыхании фитилей или нарушении контактов между ними и гелем.

**Градиент напряженности электрического поля.** Варьирование силы электрического поля вдоль длины геля, т. е. создание градиента, например *электрического поля*, приводит к улучшению разделения медленно движущихся компонентов.

В стандартном методе используется постоянная сила тока вдоль геля, когда изменение напряжения на единицу дистанции постоянно. В таких гелях высокоподвижные частицы хорошо разделяются, но медленные частицы группируются в диффузную зону вблизи источника из-за слабого разделения. Разделение вблизи начала геля может быть улучшено путем генерирования градиента силы поля вдоль геля. Высокая сила поля вблизи источника увеличивает скорость медленно движущихся частиц.

Такой градиент может быть получен с помощью клиновидного по форме геля. В нем сопротивление увеличивается с уменьшением площади поперечного сечения. Тонкий конец клиновидного геля помещается вблизи нанесения пробы, и образец мигрирует к толстому концу, где сопротивление меньше. Этот гель отливается в наклонном формате.

### **3.3. Визуализация разделенных зон и количественное определение веществ**

Для анализа результатов ЭФ после его завершения требуется прежде всего визуализировать картину распределения полос в геле и определить количество аналитов в зонах. Пятна веществ можно проявить непосредственно в геле либо использовать технику блоттинга, при которой разделенный рисунок переносится на тонкий мембранный материал. Выбор метода детектирования зависит от концентрации компонента в разделенной зоне и от необходимой степени чистоты вещества.

Существуют различные способы визуализации разделенных зон на геле: окрашивание органическими красителями; окрашивание ионами серебра; негативное

окрашивание, когда окрашивается непосредственно гель, а не пятна веществ; маркирование флуоресцентными или радиоактивными веществами. В целом такая визуализация представляет собой многоступенчатую процедуру: извлечение геля из камеры; фиксация (преципитация) разделенного вещества в геле (например, белков с помощью раствора уксусной кислоты); окраска всего геля красителями, которые неселективно взаимодействуют с биомолекулами; стабилизация окрашенного комплекса; отмывка окрашенного геля; сушка геля; качественное и количественное определение разделенных компонентов. Процедуры фиксации вещества в геле и окрашивание геля можно совмещать.

Окрашенные гели хранятся некоторое время. При хранении геля разделенные зоны достаточно быстро размываются вследствие диффузии. Поэтому при необходимости сохранения геля во влажном состоянии его накрывают полиэтиленовой пленкой и помещают в холодильник. Более надежным способом хранения гелей в течение продолжительного времени является их высушивание.

Гель с картиной, полученной после разделения компонентов сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления разделенных зон, называют *электрофореграммой*.

Среди недостатков визуализации с помощью окрашивания можно отметить относительную трудоемкость процедуры, невозможность следить за ходом электрофореза в реальном времени, токсичность некоторых применяемых красителей, воздействие красителей на структуру биомолекул и необходимую предварительную фиксацию молекул в геле.

Другой путь визуализации разделенных компонентов в геле основан на способности биомолекул поглощать свет в УФ-диапазоне. Поэтому можно просканировать гель в УФ-свете и определить местоположение биомолекул в геле. В настоящее время существует коммерческая специальная аппаратура, позволяющая следить за миграцией ДНК или белков в геле в автоматическом режиме непосредственно в ходе электрофореза и получать оцифрованное изображение в любой момент времени. При использовании этого подхода предварительная фиксация биомолекул в геле не требуется. К недостаткам такого подхода можно отнести малую избирательность метода и относительно высокую стоимость оборудования.

Наиболее распространенный способ непосредственного детектирования белков или нуклеиновых кислот в геле является метод с использованием *органических красителей*, прочно связывающихся с разделенными молекулами. Существует много пригодных для этого красителей. Они должны обладать высокой чувствительностью, позволяющей определять малые количества вещества, а интенсивность окраски должна быть пропорциональна количеству вещества независимо от его типа.

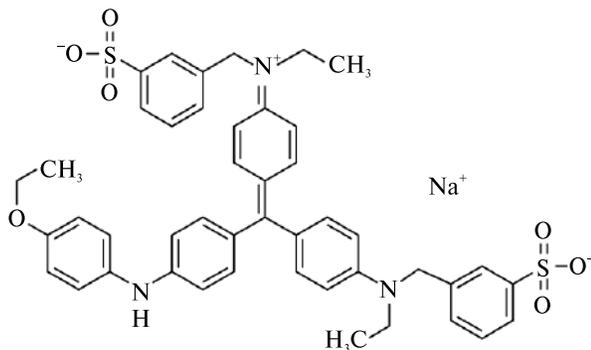
При анализе белков могут использоваться специальные вещества с учетом специфических свойств различных белков. В анализе белков начиная с 1960-х гг. наиболее часто применим краситель кумасси бриллиантовый синий, реагирующий только с белками, что дает низкий фоновый сигнал.

Существуют различные методики окрашивания, в которых используют сильнокислые растворы кумасси. В простейшем случае гель погружается в 0,02 % раствор кумасси в 10 % уксусной кислоте при 50 °С, одновременно белки фиксируются в уксусной кислоте. Далее избыток красителя удаляется путем промывки геля

10 % уксусной кислотой при комнатной температуре. Предел обнаружения белка в пятне с помощью кумасси составляет около 0,1 мкг.

Кумасси бриллиантовый синий – название двух модификаций красителя G-250 и R-250, серосодержащих производных трифенилметана, разработанных для текстильной индустрии. В настоящее время они также широко используются в аналитической биохимии для идентификации белков.

Кумасси бриллиантовый синий G-250 ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ ) отличается от R-250 ( $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ ), структурная формула которого изображена ниже, наличием двух метильных групп.



Название «Coomassie» – зарегистрированный товарный знак компании Imperial Chemical Industries. Название произошло от города Кумаси (англ. Kumasi) в Республике Гана (Западная Африка). Буква «R» (англ. red – красный) в названии красителя (coomassie brilliant blue R-250) указывает на то, что синий цвет красителя имеет слабый красноватый оттенок. Вариант красителя с буквой «G» имеет слабый зеленоватый оттенок (англ. green). Цифрой 250 обозначается чистота красителя.

Цвет красителей зависит от кислотности среды. Форма красителя «G» изучена достаточно детально. При pH ~ 0 краситель имеет красную окраску и максимум поглощения составляет 465 нм; при pH, близких к единице, – зеленый цвет с максимумом поглощения при 620 нм; при pH выше двух – ярко-синий с максимумом поглощения при 595 нм. При pH 7 краситель «G» имеет коэффициент поглощения, равный  $43\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

Разная окраска раствора кумасси – это результат различного заряда молекулы красителя. В красной форме все три атома азота заряжены положительно, два остатка серной кислоты имеют экстремально низкий  $pK_a$  (1,15 и 1,82) и заряжены отрицательно. Поэтому при pH, близких к нулю, краситель представляет собой катион с суммарным зарядом +1. Зеленый цвет соответствует форме красителя, не несущей заряда, т. е. нейтральным молекулам. При pH 7 лишь атом азота в составе остатка дифениламина несет положительный заряд, поэтому молекула в целом является анионом с суммарным зарядом –1 и имеет голубую окраску.

Молекулы красителя связываются с молекулами белка, образуя комплекс «белок – краситель». Во время формирования комплекса имеют место два типа взаимодействий. Красная форма красителя является донором свободных электронов

для групп белка, способных ионизоваться, т. е. белок заряжается отрицательно, что приводит к разрушению нативной структуры белка и, соответственно, обнаружению гидрофобных «карманов». Гидрофобные участки белка связываются нековалентно с неполярными участками красителя посредством вандерваальсовых сил, позиционируя положительно заряженные аминокислотные группы белка (остатки лизина, гистидина, аргинина) вблизи отрицательно заряженных сульфонильных групп красителя, что усиливает взаимодействие белка и красителя посредством ионного взаимодействия. Образование комплекса стабилизирует отрицательно заряженную анионную форму красителя, тем самым генерируя синюю окраску даже в кислой среде, когда большая часть молекул существует в растворе в катионной форме. Это служит основой для определения концентрации белка в растворе или пятне геля. Количество комплекса в растворе является мерой концентрации белка и может быть оценено спектрофотометрически по величине поглощения. При связывании с белками спектр поглощения красителя меняется, в кислой среде красная форма красителя (не связанная с белком) трансформируется в голубую форму комплекса «белок – краситель». Исходный кислый раствор кумасси имеет максимум поглощения при длине волны 465 нм, после связывания с белком и изменения окраски максимум поглощения смещается к 595 нм. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка в пробе или пятне. Различные белки отличаются своей способностью связывать краситель, поэтому для каждого белка лучше строить отдельную калибровочную кривую.

Кумасси бриллиантовый синий не проявляет строгой специфичности по отношению к белкам, в определенных условиях он может окрашивать также фосфолипиды, но присутствие НК не мешает развитию окраски. Реагенты, обычно применяемые в биологических манипуляциях, за исключением детергентов, не влияют на процесс окраски белков.

Отмывка несвязанного красителя из геля может занимать много времени. Процедура окрашивания должна быть достаточно длительной, чтобы краситель мог проникнуть внутрь геля, после чего избыток красителя удаляют. Продолжительность окрашивания и отмывки красителя очень зависит от толщины геля, поэтому в современных методах прослеживается тенденция использования гелей толщиной до 1 мм.

Более чувствительный метод детектирования белков и НК – это *окраска ионами серебра*. Данный метод примерно в 100 раз чувствительнее, чем окрашивание органическими красителями, предел обнаружения составляет 1 нг вещества. Существуют различные варианты метода, например, белки фиксируются в геле уксусной кислотой и этанолом, затем гель многократно промывается водой и погружается в раствор с нитратом серебра. Ионы серебра восстанавливаются функциональными группами белков (тио-, аминокислотными) или пептидной связью либо пуриновыми основаниями ДНК до металлического серебра, при этом пятна молекул окрашиваются от темно-коричневого до черного цвета. Компоненты буфера или гелевая матрица не восстанавливают ионы серебра. Для восстановления в общем геле не всех ионов серебра реакцию нужно своевременно остановить путем сильного изменения pH, что достигается с помощью разбавленного раствора уксусной кислоты или раствора глицина.

При оценке белков методом окрашивания не всегда можно получить строгое количественное соотношение белковых фракций в пробе, так как количество красителя, связываемого различными белками, неодинаково. В случае высокой концентрации белка в пятне происходит быстрое насыщение красителем (недостаточное окрашивание) и может наблюдаться недооценка количества белка. При малых концентрациях белка в пятне краситель находится в избытке и поэтому может связать большее количество красителя, что приведет к переоценке количества белка в пробе. К тому же при оценке белков методом окрашивания нужно учитывать, что разные белки имеют различную аффинность по отношению к красителю и лучше вводить внутренний стандарт, что минимизирует ошибку при расчете концентрации нужного белка.

Для последующего анализа разделенных белков или НК с помощью масс-спектрометрии или Вестерн-блоттинга важны методы визуализации, при которых окрашивается основа (гель), а не пятна веществ. Это так называемое *негативное окрашивание*, которое выполняется с помощью смеси из додецилсульфата натрия (ДСН), имидазола и сульфата цинка. В результате получается белый непрозрачный грунт (образуется комплекс солей, которые можно снова растворить с помощью ЭДТА), но при этом белки остаются в растворенной форме. В данном случае используют свойство ДСН выпадать в осадок на холоду. Чувствительность метода лежит между окрашиванием кумасси и серебра.

**Сканирование окрашенных гелей в денситометре.** Разделенные и окрашенные вещества должны быть оценены количественно. Количество вещества в каждой фракции ориентировочно определяют по интенсивности окраски связанного красителя. Для этого используются денситометры (хроматографические спектрофотометры), с помощью которых измеряется абсорбция света пятном вещества.

Денситометр – это прибор для измерения оптической плотности, т. е. степени ослабления света прозрачными объектами или отражения света непрозрачными объектами. В общем случае конструкция денситометра содержит источник излучения, обычно света, и некий приемник, измеряющий интенсивность этого излучения либо после прохождения через исследуемый объект, либо после отражения от него. Под измерением значения оптической плотности в случае работы с прозрачными материалами обычно понимают определение ее интегральной величины ( $D$ ), равной десятичному логарифму отношения потока излучения, падающего на объект ( $I_0$ ), к потоку излучения, прошедшего через него ( $I$ ):  $D = \lg(I_0/I)$  (т. е. логарифм от величины, обратной коэффициенту пропускания материала). Коэффициент пропускания выражает относительную долю энергии света, проходящего через то или иное прозрачное тело определенной толщины. Встроенное в денситометр микропроцессорное устройство вычисляет оптическую плотность  $D$ , используя измеренное значение коэффициента пропускания.

В денситометре луч света проходит все участки электрофоретического геля, пятна разделенных веществ поглощают свет в большей степени, чем свободный гель. Измеренная разница между оптическим сигналом слоя геля, не содержащего и содержащего биомолекулы, соотносится с количеством вещества в пятне. В результате получают профиль оптической плотности ( $D$ ) по длине геля, который представляет собой диаграмму с пиками (денситограмма) (рис. 3.1).

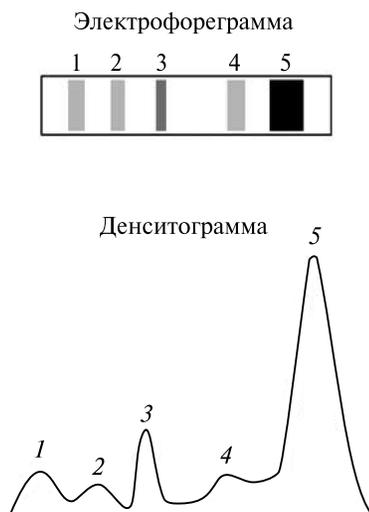


Рис. 3.1. Денситограмма, полученная при сканировании электрофореграммы с помощью денситометра

На денситограмме можно определить площадь каждого пика, она соответствует интенсивности окрашенной зоны в геле и, следовательно, количеству вещества в данной зоне. Оценка производится с помощью калибровки, которая строится в координатах «площадь пика – концентрация стандартного вещества». Так можно получить калибровочные кривые для различных белков, находящихся в разделяемой смеси. Разрешение денситометра определяется шириной луча света, фокусировкой светового луча (например, 100 мкм – оптимум для белого света, 50 мкм – для лазерного излучения) и шириной шага сканирования (т. е. расстоянием между двумя шагами измерения, которое должно быть меньше, чем ширина луча). Чем больше ширина луча, тем больший участок геля он охватит, и для близко расположенных зон будут неверно определены максимумы и минимумы поглощения. В случае сильно узкого луча снижается интенсивность света, что тоже приводит к искажению результатов.

В последние годы широко развивается *видеоденситометрия*. В этом случае окрашенные гели фотографируют и интенсивность окраски каждого пятна на фотографии высокого разрешения оценивается с помощью специальных компьютерных программ. Специальные софт-программы помогают распознавать пятна веществ, количественно их оценивать и документировать. Принцип метода заключается во введении изображения геля в компьютер с помощью видеокамеры или цифровой камеры с последующим сравнением интенсивностей пятен стандартных и определяемых соединений.

Видеоденситометр состоит из осветительного блока, видеокамеры с платой видеоввода или сканера, персонального компьютера с установленным соответствующим программным обеспечением. Программа обработки данных позволяет выполнять следующие функции: вводить изображения гелей и сохранять их с высоким качеством и разрешением; выделять на введенном изображении геля рабочий участок,

на котором будет производиться дальнейшая обработка изображения; производить автоматический или ручной поиск пятен; проводить обработку пятен, переводить их в форму хроматографических пиков, рассчитывать значения  $R_f$  и площади пиков; измерять содержание вещества в анализируемых пятнах (в относительных единицах); вводить значения концентраций для построения градуировочных зависимостей: линейной интерполяции; линейной аппроксимации более чем через две точки; квадратичной интерполяции; автоматически вычислять содержание вещества в анализируемых пятнах по введенным калибровочным значениям; представлять результаты в виде печатных документов. Количественную обработку пятна в видеоденситометрии проводят по двум характеристикам: по площади пятна и его объему в пространстве. При этом в качестве третьей координаты используют яркость (интенсивность окраски пятна).

Для визуализации используют *флуоресцентные красители* или искомые вещества в пробе перед разделением маркируют *флуорофорами или радиоактивными изотопами*. Для количественной оценки применяют флуоресцентное сканирование или автордиографию. Эти методы чувствительны так же, как окрашивание серебром. Флуоресцентные метки возбуждаются светом и излучают более длинноволновый свет, регистрируемый фотосенсорами, такими как CCD-камера, снабженная соответствующими фильтрами эмиссии. Камера делает цифровой снимок геля, позволяя проводить дальнейший анализ полученных данных. Наиболее распространенным красителем ДНК является бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид). Этот краситель относится к соединениям, способным интеркалировать (от лат. *calarius* – вставной, добавочный) между парами оснований ДНК. Водные растворы бромистого этидия флуоресцируют в оранжевом свете при 590 нм (возбуждение при 300, 336, 360 или 545 нм). При интеркаляции бромистого этидия в двунитевые участки ДНК его флуоресценция резко усиливается (примерно в 20 раз). Однако бромистый этидий прокрашивает и однонитевые участки НК при связывании с фосфатными группами.

Для окрашивания белков часто используют флуоресцентный краситель SYPRO® Ruby (комплекс рутения) (возбуждение при 302 или 470 нм, эмиссия при 618 нм), который нековалентно связывается с белками. Процедура окрашивания не содержит реагентов (формальдегид, глутаровый альдегид, детергент Tween-100), вызывающих необратимые изменения в аминокислотах. Поэтому она подходит для последующего масс-спектрометрического анализа разделенных с помощью ЭФ белков. Краситель SYPRO® Ruby не отличается специфичностью и подходит для определения общего белка. Фосфорсодержащие белки и гликопротеины можно определить с помощью флуоресцентных красителей Pro-Q™ Diamond и Pro-Q™ Emerald соответственно. Чувствительность данного метода схожа с таковой для окрашивания серебром, но превосходит его по линейному динамическому диапазону.

Радиоактивно меченые вещества детектируют с помощью автордиографии. Гель высушивают фильтровальной бумагой и приводят в контакт с радиографической пленкой.  $\gamma$ -Кванты или  $\beta$ -частицы, испускаемые радиоактивной меткой, вызывают потемнение пленки. Пятна на пленке соответствуют их расположению на геле. Интенсивность потемнения пленки пропорциональна концентрации вещества в пятне геля.

**Блоттинг.** После ЭФ зачастую нужно экстрагировать биомолекулы из геля в раствор, для чего используют различные кислоты или органические растворители.

тели. Экстракты, полученные таким образом, не могут применяться без дополнительной обработки для последующего секвенирования молекул или анализа с помощью масс-спектрометрии. Пробы, полученные экстракцией из геля, как правило, должны быть сконцентрированы, а соли, детергенты, составные части геля – удалены. Обработка проб такими способами, как диализ, хроматография и т. п., может привести к потере значительного количества вещества. К тому же многие гидрофобные белки или молекулы с очень большой массой плохо элюируются из геля. Эти проблемы минимизируют, используя технику блоттинга.

Блоттинг (англ. blotting – промокание) – это техника перенесения разделенных биомолекул на какой-либо материал (получение реплики пятен). Обычно биомолекулы переносятся из геля на мембрану. Используют нейлоновые, нитроцеллюлозные (исторически первые) и поливинилиденфторидные мембраны, которые различаются по емкости и типу связывания биомолекул. Все они обладают механической прочностью и устойчивы к реагентам, используемым для детектирования. Биомолекулы перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения. В результате процесса «промокания» молекулы удерживаются на тонком поверхностном слое мембраны для детектирования.

Важным моментом в процедуре блоттинга является фиксирование биомолекул на мембране. Мембраны из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида (PVDF) используют благодаря их свойству неспецифично связывать белки. Связывание белков основано как на гидрофобных взаимодействиях, так и на электростатических взаимодействиях между мембраной и белком. Нитроцеллюлозная мембрана дешевле PVDF, но гораздо более хрупкая и хуже выдерживает повторное нанесение меток. НК могут ковалентно связываться с химическими группами на поверхности нейлоновой мембраны, что усиливается УФ-облучением (остатки тимидина связываются с аминоклуппами нейлоновой мембраны). НК связываются нековалентно с нитроцеллюлозной мембраной (точный механизм связывания неясен). Состав буфера для блоттинга определяется целью исследования.

Биомолекулы, перенесенные на мембрану, концентрируются на ней и могут быть определены с помощью аффинных реагентов. Эффективность перенесения молекул из геля на мембрану можно проверить, используя красители, например кумасси голубой или азокраситель пунцовый S ( $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ ), который обладает большей чувствительностью и растворимостью в воде.

При проведении блоттинга нужно исключить взаимодействие между мембраной и реагентами, используемыми для детектирования биомолекул. Блокирование неспецифичных связываний достигается помещением мембраны в разбавленный раствор белка, например бычьего сывороточного альбумина. Такой белок прикрепляется к мембране во всех местах, где не присоединились исследуемые биомолекулы. Данная методика способствует более точному количественному определению искомым веществ.

Существуют различные техники блоттинга для макромолекул: белков – Вестерн-блоттинг (электроблоттинг), ДНК – Саузерн-блоттинг (капиллярный), РНК – Ноузерн-блоттинг (капиллярный).

При *электроблоттинге* перенос макромолекул осуществляется с помощью действия электрического поля (т. е. по принципу электрофореза). Как правило, белки движутся к аноду. Система собирается в следующем порядке от катода до анода:

подложка, три листа фильтровальной бумаги, пропитанные буфером, гель, мембрана, три листа фильтровальной бумаги, пропитанные буфером, подложка. Необходимо, чтобы мембрана была расположена между гелем и положительно заряженным анодом, тогда белки будут перемещаться в направлении анода.

*Капиллярный блоттинг* является простым аппаратным вариантом и основан на использовании капиллярных сил для перенесения разделенных молекул из геля на мембрану. Мембрана накладывается на гель, находящийся на фильтре, концы которого погружены в емкость с буфером; сверху на мембрану помещается пачка фильтрованной бумаги под грузом. В результате капиллярных сил буфер движется вверх из участка с высоким содержанием воды в зону с низким содержанием воды (мембрана), перенося с собой биомолекулы из геля на мембрану. Недостаток метода – его длительность.

*Вакуумный блоттинг* осуществляется со специальной аппаратурой и является быстрым способом (до 2 ч).

### 3.4. Электрофоретические техники

Существуют три принципиально различные электрофоретические техники: зонный электрофорез, изотахофорез и изоэлектрическое фокусирование (рис. 3.2).

#### 3.4.1. Зонный электрофорез

Зонный электрофорез (ЗЭФ) – это простая классическая электрофоретическая техника разделения биомолекул, основанная на различиях в их электрофоретических подвижностях. ЗЭФ применяют для анализа комплексных смесей, определе-

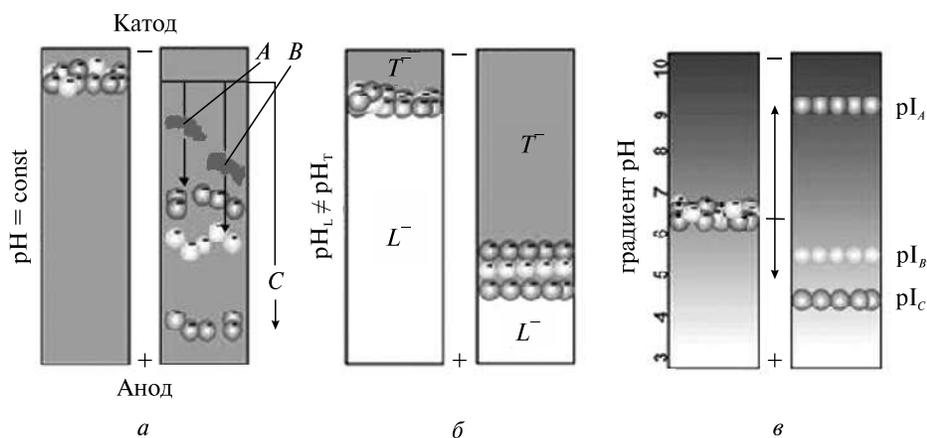


Рис. 3.2. Электрофоретические техники:  
 а – зонный электрофорез: A, B, C – компоненты пробы;  
 б – изотахофорез: L – лидирующий буфер, T – терминальный буфер;  
 в – изоэлектрическое фокусирование

ния чистоты и молекулярной массы изолированных белков и НК, для различных диагностических тестов.

Для проведения ЗЭФ используют *гомогенную* буферную систему: один и тот же буфер для подготовки геля в электродных резервуарах и в пробе; буфер имеет постоянный состав и значение pH. Растворенные в буфере субстанции наносятся на гелематрицу узкой полосой, затем с постоянной скоростью они мигрируют под действием электрического поля в зависимости от их заряда к катоду/аноду и располагаются в геле по зонам в соответствии с электрофоретической подвижностью (ЭФП). Эта подвижность молекул зависит от заряда, массы, формы и размера. Величина заряда молекул обуславливается величиной pH и температурой буфера. Расстояние пробега за единицу времени служит мерой электрофоретической подвижности заряженных частиц. Относительную ЭФП определяют, используя ионный краситель (анионный бромфеноловый синий или катионный метиленовый голубой) в качестве стандарта. ЭФ начинают при низкой силе тока (например, 1 мА в течение 30 мин), чтобы компоненты пробы вошли в гель. Далее в процессе фореа ток повышается до 2–3 мА. На практике используется напряженность поля 10–100 В/см, время анализа в зависимости от аппаратуры и задачи может длиться от 30 мин до 18 ч.

Цель ЗЭФ – получить как можно более четкие и хорошо разделенные зоны веществ. Причинами расплывчатых зон могут стать плохо сформированный гель, комплексный состав пробы, наличие в пробе очень схожих по свойствам компонентов, нанесение пробы широкой полосой в зоне страта, неоптимальные условия анализа (pH, ионная сила буфера).

В ЗЭФ используются как однородные гели, так и ПААГ с *градиентом пор*, которые улучшают разделение больших молекул. У таких гелей размер пор изменяется вдоль направления миграции частиц. Градиент в размере пор геля получают посредством непрерывного изменения концентрации акриламида в процессе получения полимера. Постепенное уменьшение среднего размера пор вдоль градиента достигается путем увеличения концентрации акриламида. Белки двигаются до тех пор, пока не достигнут места, где они остаются неподвижными, как бы «засевшими» в порах геля. ПААГ с градиентом пор можно приобрести у фирм-производителей или приготовить с использованием градиент-форматора, который представляет собой два сообщающихся сосуда с одинаковым объемом. Из сосуда 2 с высококонцентрированным гелем гель выливается в полимеризационную кассету, а в это время гель из сосуда 1 с гелем меньшей концентрации выливается в сосуд 2. Так в кассете концентрация геля уменьшается снизу вверх, следовательно, размер пор уменьшается сверху вниз.

ЗЭФ в градиенте пор имеет ряд существенных преимуществ. Во-первых, ему присуще самоограничение миграции белков в геле. По мере продвижения в электрическом поле белковые зоны попадают в области все более мелких пор, трение о гель усиливается, движение зон замедляется. Если размеры молекул достаточно велики, то в какой-то момент миграция их может практически прекратиться. Биомолекулы каждой зоны мигрируют до своего конечного положения, соответствующего их размерам, независимо друг от друга. Достигнув этого положения, они могут оставаться в нем неограниченно долго. К моменту окончания процесса фракционирования все зоны занимают свое стационарное положение, которое сохраняется, пока включено электрическое напряжение. Таким образом, экспери-

ментатору не нужно наблюдать за окончанием ЭФ. Во-вторых, в ходе ЭФ происходит непрерывное сужение разделенных зон. Это следствие того, что молекулы в передней части каждой зоны постоянно оказываются в области чуть более мелких пор, чем идущие в задней части этой же зоны. Впереди идущие молекулы тормозятся гелем немного сильнее, а идущие сзади их постепенно догоняют. Этот процесс противодействует диффузии веществ из зоны.

По существу, картина разделения зон при электрофорезе в градиенте пор геля зависит только от соотношения размеров аналитов и характера градиента. Выбор буфера и электрического режима электрофореза играет второстепенную роль. Поэтому можно использовать любые буферы сравнительно малой концентрации (0,03–0,05 М), достаточной лишь для сохранения знака заряда аналита. Это позволяет повысить напряженность поля, что для данного метода немаловажно, так как скорости миграции молекул при приближении к конечным положениям существенно уменьшаются.

В продаже существуют различные градиентные ПААГ. К примеру, фирма Pharmacia предлагает гели в виде пластин с рабочими размерами  $78 \times 78 \times 2,7$  мм для двух интервалов концентраций ПААГ: 2–16 % и 4–30 % (ПААГ 2/16 и ПААГ 4/30). Рабочие диапазоны молекулярных масс для ПААГ 2/16 составляют от 100 до 5000 кДа, для ПААГ 4/30 – от 50 до 2000 кДа. Для ПААГ 4/30 это означает, что при достаточно длительном электрофорезе белки с молекулярной массой менее 50 кД могут выйти из геля, а имеющие массу более 2000 – не войдут в него.

**Определение молекулярной массы биомолекул. График Фергюсона.** При ЭФ в пористых гелях электрофоретическая подвижность белков и ДНК зависит не только от величины их заряда, но и от молекулярного радиуса. Вследствие этого с помощью зонного ЭФ можно определить физико-химические параметры белков. Для этого смесь белков разделяется на гелях (агарозных или ПААГ) с различной концентрацией (значит, с разным размером пор) при одинаковых условиях (температура, состав буфера, время разделения). Для гелей с различной концентрацией получают разные величины пробега отдельных компонентов и определяют среднюю величину относительной электрофоретической подвижности (ЭФП). Далее выявляют зависимость в координатах: логарифм ЭФП (ось  $Y$ ) – концентрация геля (для ПААГ %  $T$  при %  $C = \text{const}$ ) (ось  $X$ ), как правило, прямая. Такие зависимости называются *графиками Фергюсона*. Наклон прямой является мерой величины молекулы и определяется как коэффициент задержки  $K_r$  (или ретардационный).

Подвижность макромолекул в ПААГ может быть выражена следующей формулой (формула Фергюсона):

$$\lg R_f = \lg \mu_0 - K_r T,$$

где  $K_r$  – ретардационный коэффициент (степень воздействия матрицы на подвижность);  $R_f$  – относительная электрофоретическая подвижность макромолекулы в геле;  $\mu_0$  – подвижность макромолекулы в свободном растворе;  $T$  – процент концентрации мономера в геле.

Для глобулярных белков наблюдается линейная зависимость между величиной данного коэффициента и радиусом молекулы, который можно определить по наклону прямой (ось  $Y$  –  $\lg R_f$ ; ось  $X$  – %  $T$ ). Если ЭФП и размер молекулы известны, можно рассчитать величину общего заряда макромолекулы.

Данный метод ЗЭФ позволяет определить массу искомой макромолекулы, используя стандартные вещества, без ее предварительной денатурации. Существует линейная зависимость между коэффициентами задержки и молекулярной массой белков.

Для смеси белков, разделенных на ПААГ, по положению прямых (ось  $Y - \lg R_f$ ; ось  $X - \%T$ ) можно сделать следующие выводы:

- параллельные прямые указывают на идентичный размер, но различный заряд (например, у изоэнзимов);
- пересечение нескольких прямых в одной точке в области концентрации геля меньше  $2\%T$  указывает на различные полимеры одного белка – у них одинаковый заряд, но разный размер;
- прямые имеют разный наклон и не пересекаются, значит, белок, у которого самая верхняя линия, меньше и больше по заряду, чем все остальные;
- прямые пересекаются в области концентрации геля, равной  $2\%T$ , следовательно, белок, для которого отрезается наибольший фрагмент, соответствующий оси  $Y$ , больше, чем другие, и по размеру, и по заряду.

**Зонный ЭФ с детергентами.** Как указывалось, электрофоретическая подвижность каждого белка зависит и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно меняться в зависимости от условий фореа. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белков надо исключить влияние всех остальных. Это и позволяет сделать техника проведения электрофореза белков в ПААГ с использованием детергентов, направленная на снижение влияния заряда макромолекулы на ее электрофоретическую подвижность. Суть ее заключается в том, что детергенты образуют комплекс с молекулой белка, при этом заряд комплекса определяется зарядом молекул детергента, собственный заряд белка при этом нивелируется. В результате белки разделяются в зависимости от значения только одного параметра – их молекулярной массы. Использование детергентов приводит к денатурации белков, поэтому такой метод электрофоретического анализа называется ПААГ-ЭФ в денатурирующих условиях.

Данная техника применима, как правило, для разделения белков, а не ДНК. В отличие от белков ДНК отрицательно заряжена в широком диапазоне рН. Поэтому при  $\text{pH} > 3$  ДНК будет двигаться в сторону анода, хотя величина рН может влиять на степень диссоциации групп и на величину общего заряда ДНК. Другое существенное различие заключается в том, что НК имеют остающуюся одинаковой плотность заряда, т. е. отношение молекулярной массы к заряду остается постоянным. Именно поэтому для определения молекулярной массы не нужно сообщать молекулам одинаковый заряд с помощью детергентов.

Наиболее широко применяемая на практике техника ЭФ в денатурирующих условиях – это ПААГ-ЭФ с использованием анионного детергента – додецилсульфата натрия (ДСН) (англ. sodium dodecyl sulfate (SDS)). Молекулы детергента ДСН прочно связываются с большинством белков в соотношении 1,4 мг ДСН на 1 мг белка, образуя при этом комплекс белок-(ДСН)<sub>n</sub> с отрицательным зарядом. Количество ДСН, связанного в комплекс, зависит только от размера белка, а не от его заряда или аминокислотной последовательности. Этот комплекс формируется благодаря взаимодействиям между алкильными (гидрофобными) фрагментами детергента и гидрофобными участками белковой поверхности, причем отрицательно заряжен-

ная часть ДСН экспонирована наружу. Собственный заряд белков перекрывается зарядом ДСН. При этом образуются анионные мицеллы с постоянным нетто-зарядом на единицу массы (эллипсоидные формы), имеющие высокую электрофоретическую подвижность. В данных условиях все полипептиды будут с одинаковым удельным зарядом. В таком случае единственным фактором, который может повлиять на подвижность белков в ПААГ, является размер белка, а точнее, его масса. Это значит, что молекулярная масса белков может быть определена по относительной подвижности белка в геле, а наличие одной полосы в нем может являться хорошим критерием чистоты препарата. Обычно на таких электрофореграммах наблюдается четкое разделение полос.

Для разделения белков в соответствии с их молекулярной массой перед началом ДСН-ПААГ-ЭФ белковую смесь нагревают при 95 °С с избытком ДСН. Детергент впоследствии может быть удален при переносе белков на мембраны. ДСН приводит к разрыву водородных связей в молекулах белка, происходит разрушение третичной и вторичной структур и выпрямление молекул белков. Для разрушения дисульфидных мостиков добавляют восстанавливающие серосодержащие соединения (2-меркаптоэтанол, дитиотреитол). При этом происходит восстановление дисульфидных связей, что предотвращает выпетливание денатурированных полипептидов и приводит к дальнейшей денатурации белков и разрушению белок-белковых комплексов. Свободные SH-группы белка должны быть защищены посредством алкилирования иодацетамидом.

При электрофорезе в ПААГ с 0,1 % ДСН в определенной области существует линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы  $\lg M$  белка (логарифм используется из-за больших значений масс) и относительным расстоянием его миграции в геле ( $R_f$ ). Низкомолекулярные комплексы движутся быстрее, чем высокомолекулярные. Для определения массы неизвестного белка одновременно с фракционированием исследуемой смеси проводят электрофорез «белков-маркеров», молекулярные массы которых точно известны. По окончании фореза, измерив пути миграции лидирующего красителя (бромфенолового синего) и каждого из маркеров, можно рассчитать значения  $R_f$ , а зная молекулярные массы маркеров, построить экспериментальную зависимость значений  $R_f$  от их молекулярной массы. Если пористость геля выбрана удачно, то такая зависимость будет линейной. Определив  $R_f$  для интересующего нас белка, из графика можно найти для него величину  $\lg M$  и рассчитать  $M$ . В случае ПААГ с постоянным значением %  $T$  линейность наблюдается в конкретной области, которая определяется величиной соотношения молекулярной массы и диаметра пор геля. В данном случае общая линейная область получается лучше с градиентными гелями, чем с гелями с фиксированными значениями пор. С ДСН-ПААГ-ЭФ можно вычислить молекулярную массу белка с точностью 5 % в области масс  $10^4 - 10^6$  Да.

В целом при использовании ДСН-ПААГ-ЭФ исходят из следующих допущений: белки после обработки ДСН полностью находятся в денатурированном состоянии; количество молекул ДСН, связанных с полипептидом, пропорционально его длине и молекулярной массе; собственный заряд полипептида несуществен в сравнении с зарядом связанного с ним ДСН.

Многие белки связывают ДСН в аномально низком соотношении. Причиной может быть их необычный состав или наличие в нем молекул углеводов. К этой группе относятся белки с высоким положительным или отрицательным зарядом.

Электрофоретическая подвижность комплексов может меняться в зависимости от замен отдельных аминокислот, конформационных изменений в белках. К примеру, гликопротеины хуже связываются с ДСН, чем негликолизированные белки, и поэтому при одинаковых размерах движутся в геле медленнее их. В данном случае необходимо, чтобы углеводная компонента приобрела отрицательный заряд. Для этих целей можно использовать боратный буфер (трис-борат-ЭДТА).

Сильнокислые белки не связывают ДСН, для них применяют катионные детергенты, которые денатурируют белки немного слабее, чем ДСН. В качестве такого детергента может быть использован гексадецилтриметиламмоний бромид в сильнокислом буфере с рН 3,5–5. Данная техника часто применяется для разделения мембранных гликопротеинов.

### 3.4.2. Изотахофорез

Изотахофорез (ИТФ) (греч. *iso* – равный, *tacho* – скорость) представляет собой вид электрофореза, при котором все заряженные компоненты движутся в электрическом поле с одинаковыми скоростями. Разделение заряженных частиц в ИТФ, как и в ЗЭФ, основано на различиях в их подвижности в электрическом поле. Однако при ИТФ все виды ионов мигрируют в одном направлении, образуя набор зон, находящихся в равновесном состоянии и перемещающихся с одинаковыми скоростями.

ИТФ основан на принципе регулирующей функции Кольрауша (англ. *KRF*), представляющей собой сумму отношений концентрации иона к его электрофоретической подвижности (скорости). В 1897 г. Ф. Кольрауш описал условия стабильного электрофоретического процесса с движущейся границей (дал первое теоретическое обоснование поведению движущихся в электрическом поле частиц).

Регулирующая функция Кольрауша является постоянным законом – при электрокинетическом разделении значение *KRF* остается постоянным в любой точке (не изменяется с течением времени):

$$KRF = \sum_i \frac{z_i c_i}{\mu_i} = \text{const.}$$

В условиях стационарного равновесия регулирующая функция Кольрауша одинакова для различных мигрирующих зон.

ИТФ как метод разделения начал распространяться в 1970-х гг., после того как были детально исследованы его основы и преимущества. При ИТФ электрофоретическое разделение заряженных частиц в электрическом поле происходит с использованием дискретной буферной системы (см. рис. 3.2). Дискретная буферная система состоит из «быстрого» ведущего (лидирующего, *L*) электролита, катионы или анионы которого имеют большую электрофоретическую подвижность, чем любой катион или анион пробы, и «медленного» замыкающего (терминального, *T*) электролита, катионы или анионы которого имеют меньшую подвижность, чем любой ион пробы. Оба электролита имеют одинаковые противоионы (*R*), выступающие в качестве буферных компонентов. В ИТФ компоненты пробы, которую помещают между лидирующим и замыкающим буферами, разделяются в порядке понижения их электрофоретической подвижности на примыкающие друг к другу зоны, находящиеся в равновесном состоянии и перемещающиеся с одинаковыми скоростями.

При «классическом» зонном ЭФ разделяемые ионы находятся в однородном электрофоретическом буфере и движутся в электрическом поле с разными скоростями.

ИТФ применяется как для аналитического, так и препаративного разделения пептидов, белков, нуклеотидов, органических кислот с высоким разрешением. Это простая и быстрая техника. Ее используют для определения абсолютной электрофоретической подвижности заряженных частиц, а также для концентрирования следовых количеств веществ из больших объемов пробы. Таким образом можно достигнуть концентрирования компонентов в один миллион раз при некоторых разновидностях ИТФ.

Технику ИТФ более детально рассмотрим на примере разделения отрицательно заряженных частиц, которые движутся от катода к аноду. Пространство анода и основную часть электрофоретической камеры заполняют лидирующим электролитом, катодный отсек – терминальным электролитом. Проба, вносимая в катодное пространство, разделяется на компоненты между ведущим электролитом, движущимся быстрее пробы, и вторичным, у которого подвижность меньше пробы.

После подачи напряжения анионы пробы располагаются в ряд по их убывающей подвижности. Ион с большей подвижностью следует сразу за лидирующим электролитом, с меньшей – перед терминальным, а ионы с очень большой подвижностью – непосредственно с лидирующим буфером. Так ионы разделяются по зонам, и в системе ничего больше не происходит, наступает стационарное состояние. При таком состоянии все зоны (например, три: первая *A* сразу за ведущим буфером, далее вторая *B* и третья *C*) движутся с одинаковой скоростью (изотахо условия), которая определяется скоростью лидирующего электролита ( $V_L$ ):

$$V_L = V_A = V_B = V_C = V_T,$$

$$\mu_L E_L = \mu_A E_A = \mu_B E_B = \mu_C E_C = \mu_T E_T.$$

При этом электрофоретические подвижности компонентов в зонах уменьшаются в ряду (от лидирующего электролита (*L*) до замыкающего электролита (*T*)), а сила поля, наоборот, увеличивается.

Снижение электрофоретической подвижности в зонах приводит к росту в них сопротивления. В соответствии с законом Ома при постоянстве силы тока в цепи повышение сопротивления на участке цепи сопровождается увеличением силы (напряженности) поля на этом участке. Следовательно, в области ионов с меньшей подвижностью устанавливается большая сила поля, в области ионов с большей подвижностью – низкая сила поля, т. е. в системе возникает градиент напряженности поля. Он способствует более четкому разделению компонентов на зоны. При попадании менее подвижных ионов в зону с большей подвижностью они тормозятся меньшей силой поля и возвращаются в свою зону. Если же ионы попадают в зону с еще меньшей подвижностью ионов и большей силой поля, то, наоборот, они ускоряются полем и снова возвращаются в свою зону. Чередование эффектов торможения-ускорения приводит к четкому разделению зон компонентов пробы, в результате чего получаются очень хорошие электрофореграммы для оценки. Здесь наблюдается важнейшее свойство техники ИТФ: самокорреляция зон веществ – существенное отличие от ЗЭФ, где зоны размываются вследствие диффузии молекул.

При ИТФ разделение ионов происходит в соответствии с их подвижностями, а концентрация в каждой зоне зависит от концентрации предшествующего иона.

В условиях стационарного равновесия в соответствии с регулирующей функцией Кольрауша концентрация ионов в каждой зоне устанавливается на определенном уровне и зависит только от концентрации предшествующего иона. Это означает, что концентрация ионов ( $C_i$ ) в любой зоне определяется первым или лидирующим ионом ( $C_L$ ):

$$C_i = C_L \frac{\mu_L + \mu_R}{\mu_L} \frac{\mu_i}{\mu_i + \mu_R} \frac{z_L}{z_i},$$

где  $C_i$  и  $C_L$  – концентрация исследуемого и лидирующего ионов;  $\mu_i$ ,  $\mu_L$  и  $\mu_R$  – электрофоретические подвижности исследуемого иона, лидирующего и противоиона;  $Z_i$  и  $Z_L$  – заряд соответствующих ионов.

При этом каждая зона в целом электронейтральна (число положительно и отрицательно заряженных ионов в каждой зоне одинаково).

Поскольку зоны анионов мигрируют к аноду с одинаковой скоростью, противоions будут мигрировать в противоположном направлении, т. е. к катоду, с такой скоростью, чтобы суммарный перенос заряда через поперечное сечение геля в каждой точке был равен нулю (соблюдение принципа электронейтральности). Вследствие действия принципа электронейтральности в пределах каждой зоны проявляется эффект концентрирования. По мере достижения равновесного состояния концентрация анионов в зонах возрастает (зоны сжимаются). Ширина отдельных зон (по завершении процесса) соответствует абсолютному количеству в смеси того или иного аниона.

В условиях ИТФ концентрация ионов в зонах не может отличаться от той, которая задана концентрацией ведущего иона и подвижностями ведущего и исследуемого ионов. Если же концентрация какого-либо иона, содержащегося в пробе, ниже концентрации ведущего иона, то он будет сконцентрирован, и разбавлен, если его концентрация выше концентрации ведущего иона. В этом и заключается эффект концентрирования в ИТФ, т. е. возможно концентрировать разбавленные образцы на десять порядков.

В ИТФ зоны имеют гомогенную концентрацию по всей длине. Длина каждой зоны прямо пропорциональна абсолютному количеству в ней аналита, однако не зависит от концентрации компонента в исходной пробе. Следует отметить, что минимальное количество изучаемого соединения, поддающееся выявлению, зависит от концентрации лидирующего иона. Уменьшение этой концентрации (например, на порядок) позволяет в такой же степени снизить наименьшее регистрируемое количество данного вещества, поскольку возможность его выявления в конечном счете определяется длиной соответствующей зоны. Однако слишком сильное снижение концентрации нецелесообразно, так как в этом случае зоны могут двигаться с разумной скоростью только при таком градиенте напряжения, который невозможно создать с помощью существующих в настоящее время источников питания. Следует избегать и чрезмерно высоких концентраций, приводящих к затруднениям, связанным с отводом выделяющегося тепла.

Для улучшения разрешения зон в условиях ИТФ в исходный образец добавляют вещества-разделители (спейсеры), которые по своей электрофоретичес-

кой подвижности занимают промежуточное положение между двумя наиболее близкими по этому параметру компонентами смеси. Для разделения белковых зон применяют амфолиты-носители, образующие линейный градиент подвижности. Существенным недостатком амфолитов является то, что часть их молекул может обладать такими же подвижностями, как и отдельные исследуемые белки, что приведет к расширению белковых зон. Впрочем, иногда такое действие амфолитов оказывается полезным, так как некоторые белки при слишком высокой концентрации склонны выпадать в осадок. Применяют также и другие спейсеры, такие как аминокислоты или слабые кислоты. В качестве спейсеров для разделения флуоресцентных зон могут быть использованы нефлуоресцирующие вещества, и наоборот, флуоресцирующие спейсеры – для непрямого детектирования и количественной оценки зон нефлуоресцирующих аналитов.

При изотахофорезе наряду с эффектом концентрирования наблюдается также явление повышения резкости границ между зонами.

Для изотахофореза желателно использовать узкие трубки ( $d_i = 0,4-0,6$  мм,  $L = 50-100$  см) и проводить его в полиакриламидных гелях, не проявляющих по отношению к исследуемым веществам свойств молекулярного сита. Для аналитического ИТФ существуют коммерческие приборы – тахофоры.

Важной характеристикой ИТФ является то, что разделившиеся зоны различаются по температуре (вследствие разной силы поля в зонах) и их можно детектировать термометрическим детектором. По интегральной кривой тепловыделения определяют разницу температур между соседними зонами, что служит мерой градиента напряженности поля, т. е. разницу электрофоретических подвижностей двух ионов. Длина отрезков дифференциальной кривой тепловыделения соответствует ширине зоны вещества, а также служит мерой абсолютного количества вещества в пробе. Кроме теплового детектора используют и другие – кондуктометрический, или детектор, основанный на измерении градиента потенциала. Для веществ, поглощающих в ультрафиолетовом свете, созданы высокочувствительные УФ-детекторы.

Принцип ИТФ применяют и в дискретном гель-ЭФ.

**Дискретный электрофорез (диск-ЭФ).** Данный метод представляет собой электрофоретическое разделение заряженных частиц в ПААГ с помощью дискретной системы. Метод был разработан Л. Орнштейном и Б. Дэвисом в 1962 г. для разделения белков. В настоящее время он является первой техникой, которую надо выбрать для анализа смесей белков неизвестного состава. Дискретность диск-ЭФ базируется на использовании гелей различной структуры (мелко- или крупнопористых), а также разных буферных систем (значение рН, ионная сила и вид ионов). Дискретность диск-ЭФ позволяет осуществить разделение аналитов в системе с помощью двух техник – изотахофореза и зонного ЭФ.

Диск-ЭФ позволяет предотвратить агрегацию белков при их вхождении в гель и получить четкие разделенные зоны компонентов. Метод отличается высокой разрешающей способностью, хорошей воспроизводимостью, простотой и быстротой выполнения. Например, 1 мкл пробы можно разделить за 20 мин. Метод позволяет также концентрировать аналиты из очень разбавленных проб. С помощью диск-ЭФ одновременно можно определить как электрофоретическую подвижность, так и коэффициент диффузии биомолекул в водных растворах.

Диск-ЭФ используется довольно часто для разделения белков, которые отрицательно заряжены при нейтральном рН. Рассмотрим систему диск-ЭФ на примере разделения анионов. Гель-матрица состоит из крупнопористого собирающего (концентрирующего) и мелкопористого разделяющего геля. Буфер, которым пропитывается концентрирующий гель, состоит из 125 мМ трис-НСl (рН 6,8), разделяющий – из 375 мМ трис-НСl (рН 8,8). Электродный буфер (катодный и анодный) состоит из 25 мМ трис и 192 мМ глицина (рН 9,1). Чтобы не потерять дискретность зон из-за диффузии ионов, собирающий гель наносится в виде тонкой полосы (1 см) на разделяющий гель непосредственно перед началом фореза. Значение рН буфера пробы на две единицы меньше, чем рН разделяющего геля. Проба помещается со стороны катодного резервуара.

Глицин ( $pK_a$  2,3 и 9,6) представляет собой амфотерную аминокислоту со значением изоэлектрической точки 6,06. Это значит, что при рН 6,8 глицин не заряжен и является цвиттер-ионом, а при рН 8,8 находится преимущественно в анионной форме.

В собирающем геле осуществляется процесс изотоафореза. В качестве лидирующего электролита выступают хлорид-анионы, имеющие высокую электрофоретическую мобильность, конечным электролитом служат анионы глицина. После подачи напряжения анионы глицина из верхнего катодного резервуара (рН 9,1) движутся в собирающий гель, а анионы  $Cl^-$  буфера собирающего геля – в обратном направлении. В собирающем геле значение рН составляет 6,8, при этом значении глицин существует преимущественно в незаряженной форме и имеет крайне низкую электрофоретическую подвижность. В собирающем геле это приводит к недостатку переносчиков заряда и, следовательно, повышению сопротивления и локальному скачку в силе поля. Компоненты пробы оказываются между лидирующим и терминальным электролитом и вследствие градиента силы поля разделяются на узкие зоны в соответствии с их электрофоретической подвижностью.

Собирающий гель – крупнопористый (например, % $T$  = 4, % $C$  = 3), в нем отсутствует эффект молекулярных сит, поэтому разделение аналитов в данном геле происходит исключительно в соответствии с их зарядами, но не размерами.

Полосы биомолекул в собирающем геле компактно с постоянной скоростью движутся в направлении анода до границы с мелкопористым разделяющим гелем (например, % $T$  = 12, % $C$  = 3). При переходе в мелкопористый гель макромолекулы встречают высокое сопротивление из-за трения, что вызывает их торможение и увеличивает разделение полос еще больше. В разделяющем геле с рН 8,8 глицин становится анионом, обгоняет биомолекулы и мигрирует к аноду. Недостаток переносчиков заряда исчезает. Анионы пробы теперь оказываются в гомогенном буфере. В разделяющем геле действуют принципы обычного ЗЭФ и аналиты разделяются как по размеру, так и по заряду.

Буферные системы могут быть разными по составу, что определяется значением рI разделяемых молекул.

### 3.4.3. Изоэлектрическое фокусирование

В 1912 г. японские исследователи К. Икеда и С. Сузуки опубликовали свои работы по выделению глутамата натрия с помощью электролизера, который состоял из трех отсеков, разделенных ионопроницаемыми мембранами. Это время

принято считать временем появления на свет метода изоэлектрофокусирования (ИЭФ). Практическое использование ИЭФ стало возможным только после изобретения в 1966 г. шведскими исследователями особого типа амфотерных электролитов – амфолинов.

При обычном ЭФ вещества разделяются благодаря различию в их зарядах при заданном рН буферного раствора. В ИЭФ фракционирование основано на различиях в изоэлектрических точках (рI) биомолекул, что значительно увеличило разрешающую силу электрофореза и повысило его специфичность.

ИЭФ – это электрофоретический способ, при котором биомолекулы движутся в электрическом поле в градиенте рН до тех пор, пока не достигнут такого значения рН, при котором их общий заряд (нетто-заряд) и, следовательно, скорость перемещения будут равны нулю. Местоположение каждой биомолекулы на геле определяется значением ее рI (см. рис. 3.2).

ИЭФ применяют для анализа только амфотерных соединений, которые могут быть заряжены и положительно, и отрицательно. Такие соединения содержат группы, способные нести различный электрический заряд в зависимости от значения рН среды. Изоэлектрическая точка амфотерной молекулы – это значение рН, при котором молекулы существуют в цвиттер-ионной форме без нетто-заряда.

При ИЭФ в геле искусственно формируется стабильный градиент рН – значение рН увеличивается в направлении от анода к катоду. Заряженные амфотерные биомолекулы, вначале равномерно распределенные в среде или внесенные в нее в виде одной полосы, движутся в соответствии с их фактическим зарядом в направлении противоположно заряженного электрода. Так, если молекула на конкретном участке градиента при данном значении рН заряжена положительно, то она будет мигрировать к катоду, т. е. в сторону увеличения рН. По мере продвижения положительный заряд этой молекулы будет уменьшаться, а отрицательный – возрастать, например за счет депротонирования заряженных аминокрупп или карбоксильных групп. В итоге молекула достигнет такой зоны, где ее электрический заряд окажется равным нулю. Это произойдет в том месте градиента рН, где значение рН будет равным рI молекулы. Как только молекула случайно выйдет за пределы зоны рI, она тотчас приобретет отличный от нуля заряд и вынуждена будет вернуться к равновесному положению. Таким образом, электрическое поле прямо противодействует диффузии, и при соответствующих условиях белки или иные амфотерные молекулы достигают равновесного положения, вблизи которого они концентрируются в виде необычайно узких зон. Эти зоны остаются очень узкими неограниченно долго, т. е. до тех пор, пока сохраняется электрическое поле. Завершение ИЭФ контролируется по снижению силы тока.

Время завершения процесса изофокусирования в ПААГ можно определить с помощью окрашенных маркеров, нанесенных на гель в различные точки одновременно с исследуемым образцом. Процесс считается завершенным, если все маркеры образуют полосы в установленном месте. В качестве таких маркеров используют амфотерные краски или окрашенные белки. Последние являются хорошими индикаторами фокусирования. Чаще всего этим целям служат ферритин лошади с рI 4,2–4,6, гемоглобин человека или животных с рI 7,0–7,3, миоглобин с рI 7,5. Ферритин является индикатором для изофокусирования в кислой области рН, гемоглобин и миоглобин – в щелочных областях рН.

Техника ИЭФ хорошо подходит для разделения белков и пептидов. Общий заряд белка — это сумма положительных и отрицательных зарядов боковых групп в аминокислотных остатках. При низком значении рН подавляется диссоциация карбоксильных групп аминокислот и они нейтральны, но в более высокой области рН становятся отрицательно заряженными. Аминогруппы или имидазольные гетероциклы, наоборот, имеют положительный заряд при низком рН, а при высоком они нейтральны. В процессе ИЭФ участвуют не все ионогенные группы данного белка, а только те, которые лежат на поверхности белковой глобулы и контактируют с растворителем. Только они могут диссоциировать, определяя суммарный заряд белка. В силу этого значение рI для одного и того же белка может изменяться в зависимости от его конформации. Конформационные перестройки происходят в результате окисления, разрыва внутримолекулярных дисульфидных мостиков, при частичной денатурации белка, образовании комплексов с липидами, углеводами и др. Наконец, это может произойти просто в силу присущей данному белку конформационной изомерии. Таким образом, наличие двух близкорасположенных линий после ИЭФ еще не свидетельствует о том, что они принадлежат двум разным белкам.

К примеру, гемоглобин и его разновидности различаются по величине рI более чем на 1 ед. в диапазоне рН 6,6–7,5. Поэтому ИЭФ является стандартным методом диагностики данного белка. При изоэлектрофокусировании 79 вариантов человеческого гемоглобина на геле обнаруживают 50 различных рI-позиций.

В качестве среды разделения в ИЭФ используют ПААГ и агарозу, причем желателен незаряженный материал для предотвращения явления электроэндоосмоса. Лучшие результаты получают на крупнопористых и очень тонких гелях, нанесенных на пластинку. Контроль величины градиента рН можно выполнить, используя электроды. Однако при измерении градиента рН с помощью электродов существует проблема, заключающаяся в том, что электроды очень медленно реагируют при низких температурах. Кроме того,  $\text{CO}_2$  из воздуха диффундирует в гель и образует карбонат-анионы, что приводит к занижению значения рН. Ошибки минимизируются путем использования стандартных белков с известным значением рI, которые анализируют параллельно с пробой. Значение рI компонентов пробы можно определить по рН-калибровке.

*Разрешение* в ИЭФ — это минимальное различие в величинах рI двух амфотерных молекул, которое обеспечивает и четкое разделение соответствующих зон. Разделение двух молекул с близкими рI зависит от их размера, вязкости среды, напряженности электрического поля, диапазона градиента рН (узкий или широкий). Большие молекулы фокусируются лучше, так как скорость диффузии обратно пропорциональна размеру молекулы. Повышение вязкости пробы путем добавления инертных веществ (сахароза, глицерин) способствует сокращению молекулярной диффузии и, следовательно, получению более четких зон. Узкие градиенты рН особенно эффективны для белков с близкими значениями рI. Повышение силы поля посредством увеличения напряжения способствует усилению миграции ионов, но при этом нужно помнить о выделении джоулевого тепла и возникновении температурного градиента.

Максимальное различие между значениями  $pI$  ( $\Delta pI$ ) компонентов определяют по формуле

$$\Delta pI = 3,07 \sqrt{\frac{D(dpH / dx)}{-E(d\mu / dpH)'}}$$

где  $D$  – коэффициент молекулярной диффузии компонента;  $dpH/dx$  – градиент  $pH$ ;  $E$  – напряженность электрического поля, В/см;  $(d\mu/dpH)'$  – изменение электрофоретической подвижности компонента при изменении  $pH$  в области, близкой к  $pI$ .

Формула показывает, что хорошее разрешение может быть получено для веществ с низким коэффициентом диффузии и достаточно большим значением изменения электрофоретической подвижности в точке, близкой к изоэлектрической. Хорошему разрешению способствует высокая напряженность поля и плавный градиент  $pH$ . Разрешающая способность ИЭФ при использовании геля, приготовленного с применением свободных амфолитов, составляет 0,02 ед.  $pH$ , а при использовании гелей с химически фиксированным градиентом  $pH$  – около 0,001 ед.  $pH$ .

Существует два способа создания градиента  $pH$ . Первый заключается в использовании свободных разделяющих амфолитов, второй – иммобилизованного градиента  $pH$ , когда буферные группы являются составной частью геля.

*Свободные разделяющие амфолиты* – это синтетические смеси из нескольких сотен различных алифатических полиамино-поликарбоновых кислот (200–700 Да), представляющих гомологический ряд, различающийся очень незначительно по величинам  $pI$ . Для создания градиента  $pH$  применяют смеси амфолитов в диапазоне  $pI$  от 3 до 10 ед.  $pH$ . Градиент  $pH$  в геле с помощью свободных амфолитов формируется электрическим полем. Обычно используют гели с 1–2 % амфолитов. При разнице в 0,05 ед.  $pH$  образуется линейный градиент, при разнице в 0,1 – ступенчатый. Амфотерные гомологи должны быть равномерно концентрированы и без каких-либо пропусков в шкале  $pH$ . Такого рода смеси для ИЭФ выпускаются под разными фирменными названиями: амфолины, фармалиты, сервалиты и биолиты.

Разрешающая сила изофокусирования зависит от наличия двух близкорасположенных амфолитов, ограничивающих изоэлектрическую зону, необходимую для прекращения движения изоэлектрической формы аналита.

Для ИЭФ не подходят природные амфолиты, такие как аминокислоты или пептиды, так как они в их точке  $pI$  имеют очень низкую буферную емкость и значение  $pK_a$  amino- и карбоксильных групп слишком отдалено от величины  $pI$ .

Идеальные амфолиты должны обладать высокой буферной емкостью и растворимостью в точке  $pI$ , хорошей и равномерной проводимостью в точке  $pI$ , не взаимодействовать с биомолекулами, иметь низкую молекулярную массу.

Особенностью амфотерных веществ является то, что при растворении в воде каждое из них стремится изменить  $pH$  раствора таким образом, чтобы приблизить его к своему значению  $pI$ . При этом протоны диссоциируют от остатков кислот и присоединяются к аминогруппам. Для осуществления ИЭФ амфолиты не только должны задавать каждой точке градиента определенное значение  $pH$ , но и обеспечивать в этой точке буферную емкость, достаточную для того, чтобы это значение не зависело от присутствия биомолекул в растворе. Амфолиты действуют как цвиттер-ионные буферы и удерживают молекулы в растворе. Хорошая буферная емкость достигается у амфолитов, если значение  $pK_a$  отличается от  $pI$

на 1,5 или меньше единиц рН. Желательно, чтобы амфолиты максимально отличались от анализируемых соединений по способу окраски и легкости отделения.

Сравнительно небольшая молекулярная масса амфотерных молекул позволяет отделить их от сфокусированных белков после элюции из геля с помощью гель-фильтрации, диализа или высаливания.

ПААГ для ИЭФ обычно готовят смешиванием амфолитов с раствором мономера до полимеризации. Кроме того, амфолиты могут вводиться в заранее приготовленный гель путем диффузии (в случае использования пластинок). Это препятствует возможности их модификации в процессе полимеризации геля.

Градиент рН из свободных амфолитов формируют следующим образом. Растворяют до суммарной концентрации смесь всех амфолитов, перекрывающих выбранный интервал значений рI. В состав смеси входят амфолиты с различными значениями рI примерно в эквимольном соотношении. Как и в случае смеси различных буферов, их совокупное воздействие на водную среду определит некоторое среднее значение рН, одинаковое по всему объему геля. При таком рН лишь один из амфолитов (если для него  $pI = pH$ ) может оказаться незаряженным. Для всех остальных амфолитов значения рI будут более или менее заметно отличаться от исходного рН смеси, поэтому практически все они окажутся положительно (щелочные) или отрицательно (кислые) заряженными. После нанесения амфолиты находятся на гелевой матрице хаотично. При наложении электрического поля все амфолиты начнут мигрировать в направлении анода или катода в зависимости от знака их заряда. Никаких других ионов в растворе быть не должно. Быстрее других движутся амфолиты с максимальным или минимальным значением рI, так как при исходном рН они несут наибольший положительный или отрицательный заряд. Амфолиты с низким значением рI (отрицательно заряженные) движутся к анодному, а с высоким рI (положительно заряженные) – к катодному концу геля. Амфолиты с промежуточным значением рI располагаются между ними, образуя своеобразный ряд и передавая свое значение рН окружению. При этом амфолиты разряжаются, и, как следствие, проводимость в геле уменьшается. Между тем для обеспечения миграции белков вдоль градиента рН и для поддержания самого градиента необходимо наличие электрического поля – жидкость должна оставаться электропроводящей. На практике электропроводность раствора сильно снижается, но не до нуля. Таким образом возникает стабильный непрерывный градиент рН, при этом анодная сторона геля будет кислой, а катодная – основной. Такой градиент рН зависит от температуры, поэтому разделение проводят при определенных температурных значениях. На аноде задается низкий рН (0,5 М  $H_3PO_4$ ), а на катоде – высокий рН (0,5 М NaOH), поэтому пришедшие туда амфолиты разряжаются или перезаряжаются и не могут покинуть разделяющий гель. Например, при достижении кислым амфолитом анода его основные группы заряжаются положительно и он будет мигрировать назад к катоду.

Значение рН католита и анолита должно быть выше, чем крайние значения рI применяемого амфолита. В случае когда ИЭФ проводится в узких градиентах рН, подбор электролитов имеет первостепенное значение, так как слишком большая разница между рН амфолита и электролита приводит к расширению градиента рН и уменьшению его разрешающей способности.

При подготовке градиента рН в гель могут добавляться низкомолекулярные амфотерные окрашенные маркеры для простого определения рН.

Основными факторами, влияющими на стабильность рН-градиента, являются концентрация амфолитов, время анализа, наличие электроэндоосмоса геля, значение рН катода и анода. В случае длительного времени анализа градиент рН, полученный с помощью свободных амфолитов, начинает дрейфовать в обе стороны, но преимущественно в сторону катода (например, из-за явления электроэндоосмоса, взаимодействия амфолитов). Это может привести к потере основных белков. Увеличение времени ИЭФ от 4 до 24 ч ведет к изменению градиента рН: чем меньшая концентрация амфолитов используется, тем больше будет градиент рН. Данные недостатки можно минимизировать, используя иммобилизованные градиенты рН.

*Иммобилизованные градиенты рН* абсолютно стабильны во времени и повышают разрешение метода. В настоящее время применяются преимущественно коммерческие гели, в основном полиакриламидные, в составе которых находятся заполимеризованные иммобилины с общей структурной формулой  $H_2C = CH-C(O)-NH-R$ , где радикал R содержит карбоксильную или третичную аминогруппу. Эти иммобилины являются производными акриламида и одновременно слабыми кислотами или слабыми основаниями, которые различаются по значениям  $pK_a$ . Коммерчески используются кислоты с  $pK_a$  3,6 и 4,6, а также основания (третиаминогруппы) с  $pK_a$  6,2; 7,0; 8,5; 9,3. Градиент рН создают путем непрерывного изменения соотношения двух как минимум иммобилинов в смеси. На практике гели с рН-градиентом получают посредством смешивания двух различных растворов иммобилинов с помощью градиент-форматора, аналогично получению геля с градиентом пор.

Посредством очень узких иммобилизованных градиентов (до 0,01 рН ед./см) можно достигнуть высокого разрешения ( $\Delta pI = 0,001$ ). Это позволит разделить белки, отличающиеся всего на одну аминокислоту. Возможно также получение очень широких линейных и нелинейных градиентов в области рН от 2,5 до 12. Во время анализа такие градиенты остаются неизменными, что значительно повышает воспроизводимость результатов.

С помощью ИЭФ можно получить для белков или других амфотерных биочастиц, например вирусов, электрофоретические «кривые титрования» (электрофоретические кривые в координатах: рН – электрофоретическая подвижность) (рис. 3.3).

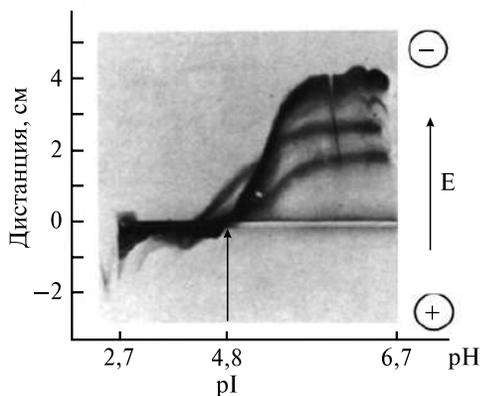


Рис. 3.3. Электрофоретические «кривые титрования»

Данный способ был разработан А. Розенбергом в 1977 г. в целях определения оптимальных значений рН для проведения ЭФ белков. Техника проведения анализа заключается в следующих операциях. До нанесения пробы в геле формируется градиент рН от анода к катоду (в вертикальной камере анод – снизу, катод – сверху). Далее гель с градиентом рН поворачивают на 90° и пробу наносят в узкую канавку, сформированную в центре пластины параллельно градиенту рН, и проводят ЭФ. Гель расположен так, что катод находится сверху и значения рН возрастают слева направо. В этом случае приложенное электрическое поле перпендикулярно градиенту рН и амфолиты не движутся, так как они находятся в своих точках рI и не несут заряда. Белки, несущие различный заряд в зависимости от значения рН в точке входа в гель, движутся сквозь гель с различными подвижностями и образуют зоны. Данные зоны представляют собой кривые титрования, они отражают зависимость миграции компонентов пробы от значения рН. Изоэлектрическая точка белков находится в том месте, где кривая пересекает узкую канавку для нанесения пробы.

С помощью данного метода можно получить различную информацию о белках. Например, как изменяется мобильность белка вблизи точки рI, также можно определить оптимум рН для проведения нативного ЭФ или ионообменной хроматографии белков.

#### **3.4.4. Двумерный гель-электрофорез**

Двумерный гель-электрофорез (2D-ЭФ) представляет собой комбинацию двух электрофоретических техник и обладает высокой чувствительностью и высоким разрешением, что позволяет использовать данный метод для разделения комплексных экстрактов, полученных из клеток, органов и других биообразцов. Исследование сложных многокомпонентных биосмесей методами одномерного ЭФ затруднено, так как многие зоны различных компонентов перекрываются, что препятствует выявлению большого количества биомолекул (как правило, не более 100). Изначально 2D-ЭФ был разработан для анализа протеома, но может быть использован и для разделения НК. Основные принципы двумерного электрофореза в полиакриламидном геле были сформулированы С. Раймондом и Б. Ауриллом в 1962 г. при разделении белков плазмы. Они показали, что электрофорез в двух направлениях с использованием ПААГ с различной концентрацией акриламида позволяет получить информацию о разделении белков, сходных по зарядам и размерам.

Электрофорез в первом направлении проводят обычным способом, затем полученную электрофореграмму применяют без фиксации и окрашивания в качестве стартовой зоны для электрофореза во втором направлении. Как правило, направление электрического поля во втором направлении перпендикулярно таковому в первом. Если оба этапа электрофореза осуществляются в идентичных условиях, то скорость миграции макромолекул в обоих направлениях одинакова и зоны разделения молекул располагаются по диагонали. Подобные системы улучшают разделение лишь, поскольку оно зависит от удлинения пути миграции разделяемых белков. Для значительного повышения разрешения необходимо на втором направлении изменить по крайней мере один из электрофоретических параметров. При этом чем выше степень разрешения электрофоретических методов, применяемых в каждом направлении, тем эффективнее будет их комбинация.

Двумерный гель-электрофорез НК и белков выполняется различным образом в зависимости от свойств макромолекул. Существенным отличием НК от белков является то, что НК уже при рН больше 2,5 несут отрицательный заряд и имеют одинаковую плотность заряда, т. е. отношение заряда к молекулярной массе остается постоянным. Поэтому для определения массы молекулам НК не нужно сообщать одинаковый заряд с помощью заряженных детергентов, как в случае с белками. Известно, что на общий заряд НК можно влиять только при низких значениях рН. При проведении двумерного электрофореза НК первое и второе направления различаются условиями проведения (значения рН буфера, концентрация геля, содержание добавок в рабочем буфере и др.).

Для разделения белков с помощью 2D-ЭФ существует большое количество разновидностей метода. В зависимости от изменений, вводимых при электрофорезе во втором направлении, можно выделить следующие типы 2D-ЭФ: без изменений значений рН в обоих направлениях или с изменением рН; диск-ЭФ с последующим электрофорезом в денатурирующих условиях; ИЭФ с последующим ДСН-ПААГ электрофорезом.

В 2D-ЭФ без изменения значения рН используется эффект молекулярного сита, свойственный полиакриламидным гелям различной концентрации. На первом этапе проводят электрофорез в ПААГ с низкой концентрацией акриламида (например, %T 4,75), а на втором — электрофорез в градиенте концентрации акриламида (%T 4—20 или 2—30). При проведении 2D-ЭФ с изменением значений рН при переходе от первого направления ко второму важным моментом является то, что после первого разделения гель необходимо уравновесить буфером, используемым для второго направления.

Диск-электрофорез с последующим электрофорезом в ДСН-ПААГ дает превосходное разрешение, если первый этап ЭФ проводить в относительно разбавленных гелях при рН, подходящем для всех белков, присутствующих в смеси. Такой метод не только обладает хорошей разрешающей способностью, но и позволяет определить молекулярные массы разделяемых компонентов, поскольку подвижность белков при миграции в гелях, содержащих ДСН, зависит лишь от размеров молекул. Методы такого рода широко применяются для разделения природных смесей белков.

Наиболее часто используемой разновидностью 2D-ЭФ для анализа белков является комбинация ИЭФ и ДСН-ПААГ-ЭФ, предложенная в 1975 г. П. О'Фарреллом (Р. O'Farrell). Эта техника на каждом направлении использует различные свойства белков и обладает высоким разрешением, что делает возможным разделение до 5000 белков за один анализ. Разрешение этого метода настолько велико, что позволяет разделить два практически идентичных белка, отличающихся одной заряженной аминокислотой. Такие различия имеют большое значение при сравнительном изучении гомологичных белков различных видов растений и животных, а также при определении генетических изменений в структуре белка, возникающих в результате точечной мутации.

Техника проведения данного 2D-ЭФ заключается в том, что на первом этапе проводят ИЭФ, а на втором — выполняется ДСН-ПААГ-ЭФ. Принципы разделения молекул на двух этапах различны. На первом этапе решающим фактором является значение изоэлектрической точки белка, на втором — его молярная масса.

Неразделенными в результате остаются только те белки, которые неразличимы как по изоточке, так и по массе, однако данное сочетание встречается редко.

Качество проведения 2D-ЭФ во многом зависит от того, насколько хорошо приготовлены исследуемые образцы. Пробоподготовку для 2D-ЭФ очень важно провести корректно, аккуратно и быстро (могут образоваться комплексы). При подготовке пробы нужно учитывать наличие в смеси ферментов, способных модифицировать искомые белки и ингибировать действие протеаз (ферменты, расщепляющие белки). Необходимо исключить из пробы липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, ионы солей или твердые частицы, которые забивают поры геля. Это достигается высаждением белков смесью из трихлоруксусной кислоты, ацетона и детергента. Важной задачей является максимальная экстракция белков из биообразца, солиubilизация максимального количества белков и поддержание их растворимости во время 2D-ЭФ. В соответствии с существующей в настоящее время практикой белки денатурируют для получения линейных цепей так, чтобы полипептидные последовательности могли быть сопоставлены с соответствующими им генами. Для этого белки переводят в раствор с помощью водных смесей, содержащих (8 М) мочевины (хаотропный агент), неионный детергент (цвиттер-ионный тритон X-100), а также меркаптосоединение, под действием которого осуществляется восстановительный разрыв дисульфидных связей (2-меркаптоэтанол). В таком растворе происходит солиubilизация, денатурация и разделение полипептидных цепей, при этом заряд цепей не изменяется.

Для проведения *ИЭФ на первом направлении* обычно применяют гели с иммобилизованными градиентами рН, закрепленными на пластинке, которая разрезается на полоски в сухом состоянии ( $3 \times 0,5 \times 240$  мм). Перед использованием полосок для ИЭФ их необходимо подвергнуть процедуре регидратации. Для регидратации используют специальные растворы, в состав которых входят мочевины, неионные детергенты, восстановитель (дитиотреитол), обладающий буферными свойствами амфолин, глицерин, бромфеноловый синий. Полоски регидратируются и на них проводят ЭФ в трубочках или специальных камерах.

Пробу можно нанести на сухую полоску перед ее помещением в регидратирующий раствор. Это позволяет избежать осаждения белков в точке нанесения и разделить большие объемы пробы. Второй способ заключается в нанесении пробы в определенное место градиента рН, ближе к аноду. При этом разделение должно проходить в основном градиенте рН (время проведения в нем не должно быть большим, так как некоторые белки в такой среде в точке рI нестабильны). Объем пробы в данном случае не должен превышать 150 мкл, так как может наблюдаться высаждение белков на старте.

Время разделения на первом направлении определяется длиной полоски геля и диапазоном градиента рН. Более длительное время (12–18 ч) нужно для разделения в узком градиенте рН на длинных полосках. С помощью ИЭФ не удастся достичь высокого разрешения при разделении белков. Этим методом можно получить около 100 белковых полос.

После окончания процедуры изоэлектрического фокусирования белки, находящиеся в полоске с градиентом рН, разделяют *в денатурирующих условиях на втором направлении*. Для этого гель, извлеченный из трубки, может быть сразу использован для проведения ДСН-ПААГ-ЭФ (в катодный резервуар наливают буфер, содержа-

щий 3 % ДСН) или его уравнивают (выдерживают до 2 ч) в специальном буфере (мочевина – 3 М, 2-меркаптоэтанол – 5 %, ДСН – 3 %, трис-НСl – 375 мМ, рН – 8,8). В результате последней процедуры белки денатурируют с образованием отрицательно заряженного комплекса с ДСН. Полоску накладывают на стартовую зону пластины «второго направления». Если используется вертикальная камера, то контакт между двумя гелями обеспечивают, заливая место их соприкосновения стартовым буфером или (для надежности) расплавленным раствором агарозы в этом же буфере. В случае использования горизонтальной камеры полоску просто кладут в специальное углубление. Электрофорез ведут в направлении, перпендикулярном длине полоски. Каждая неомогенная белковая полоса на ИЭФ-геле может дать несколько пятен на ДСН-ПААГ, если при новых условиях электрофореза подвижности первоначально образовавшихся ее нескольких белков окажутся неодинаковыми. Для улучшения разрешающей способности используют пластины с градиентом концентрации акриламида. В результате на пластине второго направления после окрашивания геля выявляется картина распределенных по всей поверхности пятен. Получается так называемая двумерная белковая карта – «фингерпринтинг» (англ. fingerprinting; finger – палец, print – отпечаток). На одной пластине геля при анализе одной ИЭФ-полоски можно выявить более 5000 пятен белков.

Визуализация белков на геле достигается применением техники их окрашивания. Идентифицировать непонятные белки можно с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии, для чего белки предварительно извлекаются из геля и переводятся в раствор.

При сравнении полученных пептидных карт различных белков оказывается, что все идентичные пептиды располагаются в определенных (одних и тех же) местах, за исключением пептидов, по которым белки отличаются друг от друга. Данным методом впервые обнаружено, что при замене одного остатка глутаминовой кислоты в молекуле гемоглобина на остаток валина образуется серповидноклеточный гемоглобин, встречающийся при одном из видов анемии.

Разрешение данного варианта 2D-ЭФ можно повысить, используя узкие градиенты рН или большие пластины геля. Проблема метода состоит в трудности воспроизведения позиции пятен белков, особенно в первом направлении.

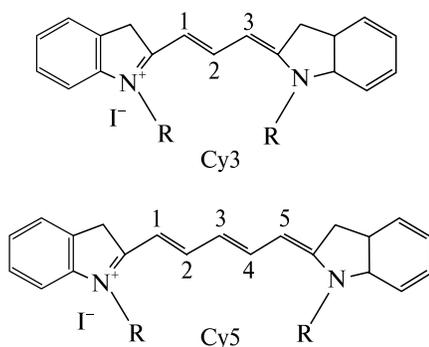
Получаемые с помощью электрофореза фингерпринтовые карты сложных белковых смесей – основной метод протеомики. Далее проводят анализ изображения 2D-ЭФ с помощью методов биоинформатики. Положение каждой выявленной белковой фракции на 2D-электрофореграммах можно охарактеризовать по вертикальной и горизонтальной координатам. Позиция по первой из них является функцией молекулярной массы, а по второй – заряда. Итоговый массив информации о выявленных белках систематизируют и обобщают в форме специализированного компьютерного банка.

**Двумерный дифференциальный гель-электрофорез (2D-ДЭФ).** Двумерный гель-ЭФ позволяет разделить и количественно оценить множество белков, однако, несмотря на наличие хороших компьютерных программ для обработки 2D-электрофореграмм, возникают трудности в сравнении пятен белков с очень близкими значениями изоэлектрических точек и масс на различных пластинах (англ. spot-in-spot), полученных для разных проб. Эти ограничения позволяют преодолеть 2D-ДЭФ (англ. differential gel electrophoresis (2D-DIGE)), предложенный в 1997 г. М. Унлю и соавторами.

Данный вариант двумерного ЭФ значительно повышает надежность качественной и количественной оценки компонентов разделяемой смеси. Он позволяет установить различия в составе белков двух различных биопроб внутри одного геля. В этом методе перед проведением ЭФ белки сравниваемых проб маркируются с помощью флуоресцентных цианиновых красителей (Cy2, Cy3 или Cy5), имеющих различные длины волн возбуждения и эмиссии. Cy2-, Cy3- и Cy5-меченые белки обнаруживают при длинах волн возбуждения/эмиссии: 488/520, 532/580 и 633/670 нм соответственно.

Цианиновые красители представляют собой молекулы, содержащие цепь из нечетного числа метиновых групп ( $-\text{CH}=\text{}$ ) между двумя атомами азота с делокализованным зарядом. Наиболее распространенные на данный момент цианиновые красители для научных исследований в области наук о жизни (англ. life science) были синтезированы А. Ваггонером с коллегами из университета Карнеги – Меллон в начале 1990-х гг. Эти красители получены модификацией цианинового красителя индоцианина зеленого. Все они содержат два индолениновых кольца по обоим концам полиметиновой цепочки. У красителей обнаружено свойство слабого неспецифического связывания с биомолекулами, они характеризуются яркой флуоресценцией из-за больших коэффициентов поглощения и хороших квантовых выходов. Коммерческие красители предлагаются в виде ряда реакционноспособных производных N-гидроксисукцинимидных эфиров, малеимидов, азидов и других производных, пригодных для научно-прикладных исследований.

Есть две разновидности цианиновых красителей: сульфированные и несulfированные цианины. Во многих случаях они взаимозаменяемы, поскольку их спектральные свойства почти идентичны. Эти два типа красителей различаются своей растворимостью в воде. Сульфированные красители водорастворимы, и для их использования в водной среде для маркирования не требуется добавлять органический растворитель. Они также менее склонны к агрегации в воде. Несульфированные красители имеют следующие обозначения: Cy3, Cy5, Cy7. «Cy» означает «цианин», а цифра – число атомов углерода между индолениновыми кольцами. Cy2 – производное оксазола, а не индоленина и является исключением из этого правила.



Меченные цианиновыми красителями пробы объединяют и разделяют с помощью 2D-ЭФ, в котором первое направление – ИЭФ, второе – ДСН-ПААГ-ЭФ. Одинаковые белки, меченные различными красителями, мигрируют к одной и той же позиции в геле. Красители для этого метода модифицируются по заряду и мас-

се так, чтобы одинаковые белки из различных проб занимали одинаковые места на геле. Визуализация пятен выполняется с помощью флуоресцентного сканера. Сканирование проводят для каждого флуоресцентного маркера отдельно при его длине эмиссии.

Существует *два способа маркирования белков*: минимальное и насыщенное маркирование. В первом случае маркирование производится по  $\epsilon$ -аминогруппам остатков лизина, входящих в состав белка, с помощью флуоресцентного маркера с основной группой, компенсирующей потерю положительного заряда при маркировании. В качестве таких маркеров, как правило, используют активированные N-гидроксисукцинимидные эфиры цианиновых красителей (Cy3, Cy5), которые содержат реакционноспособную группу и поэтому быстро и с высоким выходом взаимодействуют с аминогруппами биомолекул в водно-органической среде. При этом не наблюдается изменения значения изоэлектрической точки белка. Для всех маркеров прирост по массе одинаковый, поэтому не происходит сдвига по молекулярной массе. В случае маркирования по остатку лизина многократное маркирование минимизируется тем, что используется дефицит красителя (*минимум маркирования*); обычно количество маркированного протеина составляет 3–5 %. Это дает возможность оставшуюся часть (95 %) неокрашенных молекул анализировать с помощью масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией пробы при содействии матрицы (МАЛДИ). Масса маркированных и нативных молекул может различаться на 460 Да, поэтому при извлечении из геля низкомолекулярных белков (меньше 20 кДа) для последующего анализа нужно вырезать участок геля чуть больше по размеру, чем цветное пятно, чтобы в нем остались все молекулы соединения. Несмотря на то что маркируется незначительная часть белков, чувствительность метода высокая, предел обнаружения составляет порядка 0,15–0,5 нг белка. Процедура маркирования заключается в инкубировании красителей с клеточным лизатом (400 пикоМ флуорофора на 50 мкг белка) на льду в темноте в течение 30 мин.

*Насыщенное маркирование* осуществляется посредством нейтрального красителя по остаткам цистеина в белках, причем предварительно должны быть разрушены все дисульфидные связи с помощью восстановителей. Для маркирования преимущественно используют малеимиды цианиновых красителей, способные реагировать с тиолами с образованием конъюгатов. Молекулы таких производных красителя содержат одну реакционноспособную группу. Использование данных красителей позволяет маркировать все остатки цистеина в молекуле белка. Вследствие этого метод с насыщенным маркированием обладает большей чувствительностью (примерно на порядок), чем метод, базирующийся на минимальном маркировании, так как большее количество флуорофора включено в каждую молекулу белка. Однако при данном способе маркирования могут быть потеряны белки, не содержащие остатки цистеина. Данный метод подходит для анализа очень маленького объема образца.

Особенностью 2D-ДЭФ является то, что он позволяет использовать *внутренний стандарт* для обнаружения каждого отдельного белка. С помощью внутреннего стандарта можно более точно оценить различия между образцами, что увеличивает статистическую значимость результатов, помогает сократить число повторений анализа.

Внутренний стандарт получают путем смешивания аликвот всех анализируемых проб, и поэтому он содержит все белки из всех проб. Это значит, что каждый белок в анализируемой пробе присутствует и во внутреннем стандарте, кото-

рый используется для прямого количественного сравнения внутри каждого геля и между гелями.

Техника внутреннего стандарта используется в клинической диагностике для сравнения белкового состава здоровой и опухолевой тканей и выявления маркеров опухоли, т. е. белков, характерных только для опухолевой ткани. К примеру, есть два образца, полученных соответственно из контрольной и опухолевой ткани. Смешивают  $1/3$  часть контрольного и  $1/3$  часть опухолевого образца для получения стандарта и маркируют его красителем Cy2. Оставшиеся  $2/3$  контрольного образца маркируют красителем Cy3, а  $2/3$  опухолевого образца – Cy5. Далее все три меченых образца объединяют и анализируют с помощью 2D-ЭФ. При оценке белковых рисунков сравниваются только те пятна, которые собраны в месте локализации стандарта. Это дает возможность надежной количественной оценки даже в том случае, если концентрация белков из разных проб различается в пределах 5 %. Получить такие значения с помощью классического окрашивания невозможно даже при пятикратном повторении. Метод позволяет оценить количество белка в пятне по соотношению интенсивностей флуоресценции пятен в контрольной и опухолевой тканях.



## 4.1. Принцип и сущность метода

Капиллярный электрофорез (КЭ) – это электрофоретический метод разделения частиц с использованием кварцевого капилляра ( $d_i = 10\text{--}200$  мкм), к концам которого приложено высокое напряжение. КЭ является самой эффективной техникой разделения, доступной для анализа как малых, так и больших молекул, позволяющей анализировать ионные и нейтральные компоненты различной природы с высокой экспрессностью. КЭ нашел широкое применение в биохимии, молекулярной биологии, фармацевтической индустрии судебной химии, клеточной биологии, экологии, пищевой промышленности и химической индустрии.

Преимуществами КЭ являются небольшой объем пробы (1–50 нл), незначительный расход буферных растворов (1–2 мл в день), малое время анализа, высокие разрешение и чувствительность ( $10^{-16}\text{--}10^{-21}$  М), уникальная эффективность ( $N \sim 10^5\text{--}10^6$ ), возможность работать как с водными, так и неводными средами. КЭ пригоден для анализа более широкого диапазона аналитов по сравнению с другими аналитическими методами разделения. Условия анализа биокомпонентов можно максимально приблизить к нативным. В отличие от ВЭЖХ в КЭ отсутствует неподвижная фаза и, следовательно, нет проблем со «старением» материала фазы и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы. В КЭ используются современные методы детектирования, что позволяет легко обрабатывать данные, полученные в виде электрофореграмм (как хроматограммы в ВЭЖХ).

Главным ограничением широкого применения метода классического ЭФ была низкая эффективность разделения из-за тепловых эффектов и конвекции жидкости. Эта проблема частично решилась благодаря использованию неконвективной среды в гель-электрофорезе. Несмотря на то что разделение в геле довольно широко распространено, особенно в биохимии, очевидны и его ограничения: длительное время анализа, недостаточная эффективность, трудности при детектировании и автоматизации, трудоемкость. В 1967 г. шведский ученый С. Хиртен предложил проводить электрофоретическое разделение не на плоскости, а в открытых трубках с диаметром 3 мм, тем самым положив начало методу КЭ. Позже в 1974 г. Р. Виртанен использовал стеклянные капилляры с внутренним диаметром, равным 0,2 мм. В 1979 г. Ф. Миккерс ввел в КЭ чувствительные детекторы – УФ и по электропроводимости. Наконец, в 1981 г. Д. Йоргенсон и К. Д. Лукас продемонстрировали возможности КЭ при использовании кварцевого капилляра с равномерным по длине внутренним диаметром 75 мкм и прозрачным для УФ-света. Кроме того, в мире был уже накоплен значительный опыт по возможностям детектирования аналитических сигналов в потоке. В 80-е гг. XX в. уже были созданы и запущены в серийное производство первые коммерческие приборы (США, 1988). С этого времени начинается

активное развитие метода КЭ в его современном представлении. Сегодня развиваются новые микромасштабные технологии (микрочип-КЭ) для анализа отдельных клеток и молекул.

КЭ легко автоматизируется для точного количественного анализа и простоты использования. Наличие флуоресцентного или УФ-детектирования в КЭ позволяет получать воспроизводимые количественные результаты. При анализе сложных систем выпадают процедуры окрашивания и денситометрии, необходимые в гель-ЭФ. КЭ хорошо совмещается с методами масс-спектрометрии, основанными на «мягких» способах ионизации (например, МАЛДИ МС).

В сравнении с аппаратным оформлением ВЭЖХ и ГЖХ капиллярный электрофорез имеет относительно простую инструментальную конфигурацию (рис. 4.1). Прибор для КЭ состоит из следующих компонентов: капилляр из плавленого кварца, источник высокого напряжения ( $U$  до  $\pm 30$  кВ, полярность изменяется в зависимости от применения детектирования со стороны катода или анода), два электрода, два резервуара для буферов, детектор. Современные приборы для КЭ дополнительно оборудованы приспособлением для ввода пробы и термостатом. Разделение в КЭ может быть выполнено как с положительной, так и отрицательной полярностью электродов. Зная значения  $pK_a$  для компонентов пробы, можно выбрать буфер с подходящим значением рН, чтобы образец двигался в сторону детектора.

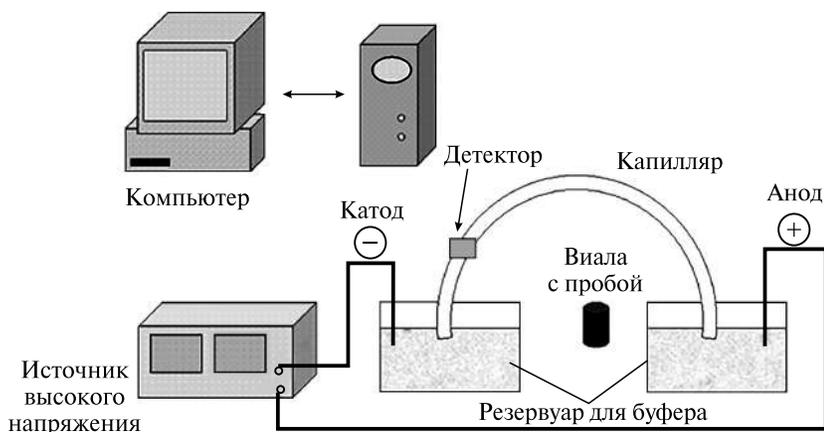


Рис. 4.1. Система для капиллярного электрофореза

Концы капилляра, предварительно заполненного электролитом (буфером), погружаются в буферные растворы, находящиеся в резервуарах с электродами, которые связаны с источником высокого напряжения. Для ввода пробы посредством различных техник конец капилляра вводится в сосуд с пробой на короткое время. Кварцевый капилляр сам служит кюветой для УФ-измерений. После подачи напряжения к концам капилляра компоненты пробы начинают двигаться с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы, и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Различают общую ( $L_{\text{общ}}$ ) и эффективную ( $L_{\text{эфф}}$ ) длину капилляра, в первом случае речь идет о полной длине капилляра от входного до выходного конца, а во втором — об участке от входного конца до зоны детектирования.

Разделенные компоненты в КЭ детектируются, сигналы детектора оцифровываются и представляются в графическом виде зависимости «напряжение – время», т. е. в виде электрофореграммы. Пики на электрофореграмме соответствуют анализам в образце. Качественной характеристикой анализа является время миграции, а количественной – высота или площадь пика, которая пропорциональна концентрации вещества.

## 4.2. Физические основы метода

Капиллярный электрофорез основывается на принципах классического ЭФ, т. е. на разделении аналитов в электрическом поле по разности их подвижностей, зависящих от заряда и массы. Особенность КЭ состоит в том, что на скорость миграции частиц в капилляре значительное влияние оказывает явление электроосмоса. Скорость компонентов пробы в КЭ определяется как их электрофоретической подвижностью, так и скоростью электроосмотического потока.

**Электроосмотический поток (ЭОП).** ЭОП – это течение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля. Высокая эффективность КЭ обусловлена именно этим феноменом. Электроосмос является следствием поверхностного заряда на внутренних стенках капилляра. ЭОП – результат действия электрического поля на двойной электрический слой, образующийся на границе «поверхность капилляра – водный раствор электролита», заполняющий капилляр.

В водной среде большинство твердых поверхностей несут избыточный заряд. Это может быть результатом ионизации поверхностных функциональных групп молекул, из которых состоит капилляр, и/или адсорбции заряженных частиц на поверхности капилляра. В КЭ главным образом используют капилляры из плавленого кварца. Плавленый кварц на своей поверхности несет преимущественно силаноксидные группы ( $>Si=O$ ), которые при контакте с водой подвергаются гидролизу и образуют силанольные группы ( $SiOH$ ). Поверхностные нейтральные силанольные группы в кварцевых капиллярах могут диссоциировать с образованием отрицательно заряженных ионов. Скорость и степень гидролиза зависят от температуры и состава водного раствора, в частности от величины рН. При  $pH < 2$  диссоциация силанольных групп практически полностью подавлена и поверхность становится нейтральной. Кислотные свойства поверхностных силанольных групп характеризуются константой диссоциации первой ступени  $K_{1a} \sim 3 \cdot 10^{-3}$ . Поэтому при  $pH > 2,5$  на поверхности уже находится некоторое количество диссоциированных силанольных групп ( $SiO^-$ ), количество которых возрастает с увеличением рН, придающих поверхности отрицательный заряд. Этот отрицательный заряд компенсируется положительно заряженными ионами буфера, что приводит к образованию неподвижного двойного электрического слоя. Так, на границе раздела «кварц – водный раствор электролита» возникает двойной электрический слой (ДЭС), как в конденсаторах. Образование ДЭС происходит самопроизвольно в результате стремления системы уменьшить энергию Гиббса поверхностного слоя. Диэлектриком, разделяющим обкладки этого конденсатора, являются молекулы воды, гидратирующие как силанольные группы, так и катионы. Первую обкладку двойного

слоя составляют отрицательно заряженные гидратированные силанольные группы. В приповерхностном слое электролита к отрицательно заряженной поверхности кварца примыкают гидратированные катионы, образующие вторую обкладку двойного слоя.

Положительная часть ДЭС делится на две части: первая (неподвижная) непосредственно примыкает к поверхности кварца (рис. 4.2), а вторая (диффузная) располагается на некотором удалении от поверхности (рис. 4.3).

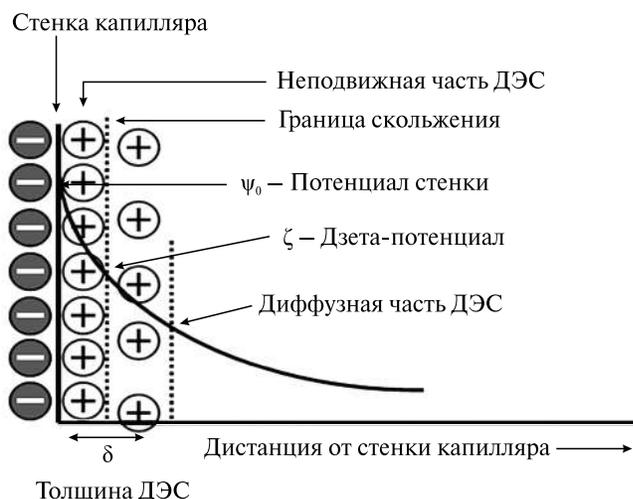


Рис. 4.2. Схема двойного электрического слоя на стенке кварцевого капилляра

Ввиду мощного электростатического взаимодействия с поверхностью часть катионов, так же как и силанольные группы, частично теряет гидратирующую воду, в результате чего первый слой катионов, непосредственно контактирующий

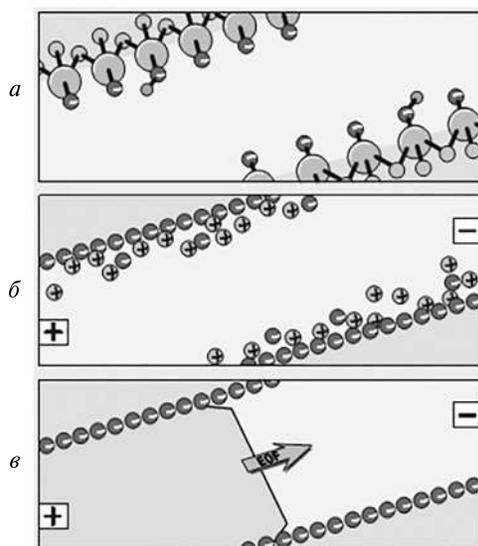


Рис. 4.3. Образование электроосмотического потока:  
 а — отрицательно заряженная поверхность кварцевого капилляра;  
 б — гидратированные катионы, аккумулирующиеся вблизи поверхности;  
 в — поток жидкости, движущийся к катоду при наложении электрического поля

с поверхностью, становится весьма малоподвижным. Остальная часть нейтрализующих отрицательный заряд катионов распространяется в толщу раствора, образуя так называемую диффузную часть второй обкладки двойного слоя. Распределение катионов между неподвижным и диффузным слоями, а следовательно, и толщина двойного слоя зависят в первую очередь от общей концентрации электролита в растворе. Чем она выше, тем большая часть положительного заряда диффузного слоя перемещается в неподвижный слой и тем меньше становится толщина диффузного слоя. Чем меньше ионная сила раствора, тем дальше распространяется диффузный слой в толщу раствора. При концентрации бинарного однозарядного электролита  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  М толщина двойного электрического слоя составляет в среднем 30–50 мкм. Таким образом, при диаметре внутреннего канала кварцевого капилляра 50–70 мкм практически вся жидкость, заполняющая капилляр, представляет собой диффузную часть двойного электрического слоя.

Между двумя слоями положительного слоя проходит так называемая граница скольжения (см. рис. 4.2). Это проявляется в том, что при наложении вдоль капилляра электрического поля неподвижная часть остается на месте, в то время как диффузная часть начинает мигрировать к катоду, увлекая за собой в силу межмолекулярного сцепления всю массу жидкости в капилляре. Так, в электрическом поле положительно заряженный жидкий поток движется как единое целое к катоду. Это явление и обозначают как электроосмотический поток. В случае кварцевых капилляров электроосмотический поток направлен к катоду.

ЭОП осуществляет пассивный перенос раствора внутри капилляра. Он может быть настолько большим, что с ним смогут перемещаться положительно заряженные частицы, нейтральные молекулы и даже отрицательно заряженные ионы.

**Распределение зарядов в ДЭС.** Общий потенциал, создаваемый диссоциированными силанольными группами, пропорционален заряду. Часть этого потенциала нейтрализуется положительными зарядами ионов неподвижной части второй обкладки двойного слоя (см. рис. 4.2), а остальная часть – положительными зарядами диффузной части. При этом падение потенциала, возникающего на стенке капилляра, происходит линейно в области неподвижной части двойного слоя и экспоненциально в области его диффузной части. Такой экспоненциальный спад потенциала лежит в основе эффекта электроосмоса. Данный электрокинетический потенциал обозначают как  $\zeta$ -потенциал (дзета-потенциал), измеряемый в вольтах. В КЭ  $\zeta$ -потенциал служит мерой заряда на стенке капилляра и возрастает с увеличением плотности заряда на поверхности.

Скорость ЭОП ( $V_{\text{ЭОП}}$ ) может быть упрощенно описана с помощью уравнения Гельмгольца – Смолуковского:

$$V_{\text{ЭОП}} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4\pi\eta}.$$

Скорость ЭОП пропорциональна диэлектрической проницаемости среды ( $\varepsilon$  – диэлектрическая константа электролита), напряженности приложенного поля ( $E$ ), количеству зарядов на стенке капилляра или возникающему при этом  $\zeta$ -потенциалу и обратно пропорциональна вязкости электролита ( $\eta$ ).

Коэффициент пропорциональности между скоростью ЭОП и напряженностью электрического поля представляет собой электрофоретическую подвижность ЭОП:

$$\mu_{\text{ЭОП}} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta}.$$

Время, необходимое для преодоления жидкостью эффективной длины капилляра вследствие возникающего ЭОП, называют временем миграции ЭОП ( $t_{\text{ЭОП}}$ ). Его экспериментально определяют из электрофореграммы по времени миграции нейтрального компонента — маркера ЭОП. В свою очередь, скорость ЭОП на практике вычисляют по формуле

$$V_{\text{ЭОП}} = \frac{L_{\text{эфф}}}{t_{\text{ЭОП}}}.$$

За напряженность электрического поля принимают отношение приложенной разности потенциалов ( $U$ ) к общей длине капилляра ( $L_{\text{общ}}$ ). Таким образом, электрофоретическую подвижность ЭОП вычисляют из экспериментальных данных по формуле

$$\mu_{\text{ЭОП}} = \frac{L_{\text{общ}}L_{\text{эфф}}}{t_{\text{ЭОП}}U}.$$

В кварцевых капиллярах скорость ЭОП в сильной степени зависит от рН раствора, т. е. от степени диссоциации силанольных групп. В сильнокислых растворах ЭОП отсутствует, в слабокислых — его скорость незначительна (например, при рН = 3  $V_{\text{ЭОП}} = 0,2$  мм/с). При переходе в нейтральную и щелочную область рН скорость ЭОП возрастает до максимально возможной (например, в 20 мМ боратном буфере при рН = 9  $V_{\text{ЭОП}} = 2$  мм/с). Для уменьшения времени анализа или для анализа многозарядных анионов необходимо работать с буферами низкой концентрации и при щелочных значениях рН.

Скорость ЭОП также зависит от концентрации электролита в ведущем буфере. Чем выше концентрация, тем больше становится доля катионов в неподвижной части ДЭС, а толщина диффузной части уменьшается. В итоге падение потенциала становится круче (т. е. величина дзета-потенциала снижается) и, соответственно, уменьшается скорость ЭОП.

Кроме изменения величины рН и концентрации буфера существуют различные *способы управления ЭОП*. Благодаря химической модификации поверхности капилляров ЭОП может контролироваться, исключаться или обращаться. Минимизировать ЭОП можно, если капилляры покрыть изнутри линейным полиакриламидом или метилцеллюлозой (толщина 5–10 мкм) путем модификации силанольных групп. С другой стороны, химическая модификация силанольных групп в кварцевом капилляре может дать устойчивый фактор гидролиза групп, что приводит к длительной стабильной работе капилляра.

Введение в разделительный буфер положительно заряженных поверхностно-активных веществ (бромид цетилтриметиламмония) позволяет изменить направление ЭОП в кварцевом капилляре (рис. 4.4). На кварцевой поверхности капил-

ляра сорбируются молекулы ПАВ своими положительно заряженными частями, занимая все вакансии в ближайшем к поверхности слое. При этом их гидрофобные фрагменты обращены наружу. Ставшая гидрофобной поверхность при дальнейшей промывке буферным раствором, содержащим ПАВ, сорбирует еще один слой поверхностно-активного катиона, ориентированного заряженным концом наружу. В результате первый слой двойного электрического слоя становится положительным, а второй, в том числе и его диффузная часть, — отрицательным. Таким образом, ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

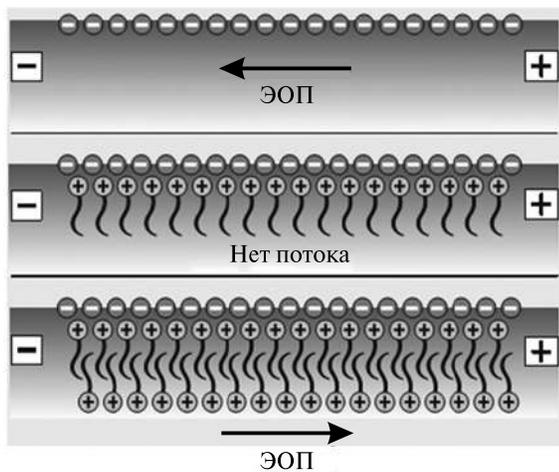


Рис. 4.4. Изменение направления ЭОП с помощью катионного детергента

Уникальной особенностью ЭОП является *плоский профиль потока* в капилляре (см. рис. 4.4). Электроосмотический поток и электромиграция частиц располагаются в продольном направлении. В любой точке разреза капилляра преобладает одинаковая скорость потока, благодаря чему образуется поршневой профиль потока, который при движении зон компонентов внутри капилляра практически не вызывает их уширения. Это обуславливает высокую эффективность разделения и позволяет получить на электрофореграмме узкие пики. По эффективности КЭ значительно превосходит ВЭЖХ. В ВЭЖХ-колонках гидродинамический поток слоистый (ламинарный), имеет параболический профиль. В ВЭЖХ-колонке происходит постоянный обмен молекул пробы между мобильной и стационарной фазами. Вещества в идеальном случае движутся вертикально по отношению к направлению потока разделяющей фазы и сильно замедляются, что приводит к расширению пика. В КЭ такой обмен веществ не происходит или совсем незначителен.

**Скорость и время миграции заряженных частиц в КЭ.** При анализе образцов методом КЭ существенную и иногда решающую роль в переносе их компонентов через капилляр играет ЭОП, который способствует пассивному транспорту зоны пробы, но не ее разделению.

Общая скорость электромиграции иона ( $V_i$ ) при КЭ складывается из двух величин – скорости движения иона под действием электрического поля ( $V_{ЭФ}$ ) и скорости движения ЭОП ( $V_{ЭОП}$ ):

$$V_i = V_{ЭФ} + V_{ЭОП}.$$

Первая зависит от природы иона, а вторая – от свойств диффузной части двойного электрического слоя в капилляре, мерой которой является  $\zeta$ -потенциал поверхности.

С учетом того, что скорость заряженных частиц и ЭОП определяется напряженностью электрического поля, получим выражение

$$V_i = (\mu_{ЭФ} + \mu_{ЭОП})E = \mu_{общ}E.$$

Из последнего уравнения следует, что общая электрофоретическая подвижность частицы в КЭ является суммой ее собственной электрофоретической подвижности и подвижности ЭОП (при положительной скорости ЭОП):

$$\mu_{общ} = \mu_{ЭФ} + \mu_{ЭОП}.$$

В КЭ-приборе с кварцевым капилляром из-за существующего ЭОП детектор располагается в непосредственной близости от катода. Катионные компоненты пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять ЭОП (рис. 4.5). Скорость их движения складывается из скорости ЭОП и скорости электромиграции, поэтому на выходе капилляра катионы появляются первыми и тем раньше, чем больше их электрофоретическая подвижность.

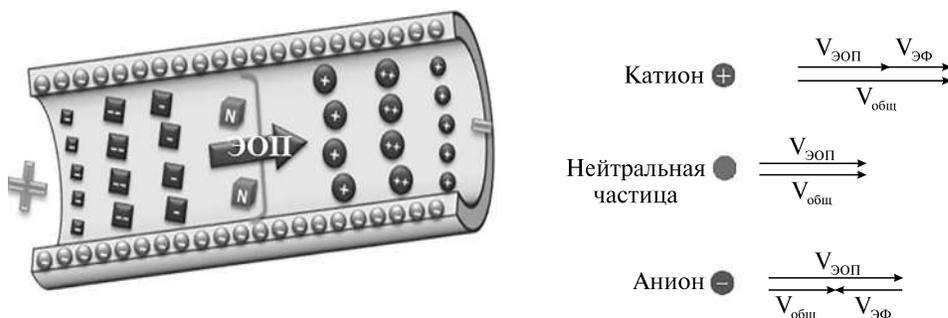


Рис. 4.5. Скорость миграции заряженных частиц в КЭ

Нейтральные компоненты пробы способны перемещаться только под действием ЭОП. Все незаряженные молекулы движутся с одинаковой скоростью, равной скорости ЭОП, и не могут быть разделены, в то время как разделение заряженных ионов возможно благодаря их различной электрофоретической подвижности. Анионные компоненты будут перемещаться к аноду со скоростями меньшими, чем скорость ЭОП ( $\text{pH}$  разделяющего буфера  $> 3$ ). По сути, их скорость представляет разницу между скоростью ЭОП и их электрофоретической подвижностью. Медленно мигрирующие анионы появятся на выходе после ЭОП, а те, чья скорость электромиграции по абсолютной величине превышает скорость ЭОП, будут выходить из капилляра в прианодное пространство.

В отличие от  $\mu_{ЭОП}$  собственную электрофоретическую подвижность частицы ( $\mu_{ЭФ}$ ) нельзя определить непосредственно из электрофореграммы, поэтому из результатов эксперимента находят общую подвижность. Определив из эксперимента  $\mu_{общ}$  и  $\mu_{ЭОП}$ , находят  $\mu_{ЭФ}$ .

Общую подвижность частицы можно рассчитать, зная ее время миграции ( $t_m$ ), т. е. время, необходимое компоненту для прохождения им эффективной длины капилляра ( $L_{ЭФФ}$ ) от зоны ввода пробы (начала капилляра) до зоны детектирования:

$$t_m = \frac{L_{ЭФФ}}{v_i},$$

$$t_m = \frac{L_{ЭФФ} L_{общ}}{\mu_{общ} U}.$$

### 4.3. Капилляры. Ввод пробы. Детектирование

*Капилляры* для КЭ изготавливают преимущественно из высокочистого плавленого кварца (аморфный кварц). Кроме того, используют капилляры из тефлона, борсиликатного стекла, термопластичных полимеров. При выборе материала для капилляра определяющим, помимо механических свойств, является его способность пропускать УФ-свет. Капилляр должен иметь очень маленький диаметр для эффективного отвода тепла. К такому выводу пришел еще А. Тизелиус, но технически реализовать данное свойство стало возможно только в начале 1980-х гг. Внутренний диаметр ( $d_i$ ) капилляра может находиться в диапазоне 10–200 мкм, а внешний ( $d_0$ ) – 130–500 мкм, длина составляет 10–100 см. Наиболее распространены капилляры с  $d_i$  50 и 75 мкм,  $d_0$  350 мкм, длиной 75 см. С более тонкими капиллярами возникают проблемы: они забиваются мелкими частицами. Для повышения механической прочности кварцевые капилляры сверху покрываются слоем полиимида толщиной 10–25 мкм. В случае детектирования внутри капилляра (англ. online) полиимидное покрытие в зоне детектирования снимают, оставляя для прохождения света зону чистого кварца. Капилляр закрепляется в специальной пластиковой кассете. Надежное термостатирование капилляра является основным условием получения воспроизводимых времен миграции определяемого соединения и площади результирующего пика, что важно для количественного анализа.

Кварцевый капилляр имеет неограниченный ресурс использования при соблюдении основных правил работы. При необходимости (нужно перейти к другой геометрии и типу) капилляр можно заменить, что является несложной процедурой. Важной характеристикой капилляра выступает состояние его концов, особенно в зоне ввода пробы, т. е. его торцевой срез должен быть выполнен строго под углом 90° к боковым стенкам капилляра. В противном случае можно получить пики с «хвостами» или ввод пробы будет невозможным.

Анализ методом КЭ можно проводить только тогда, когда капилляр находится в кондиционном состоянии. С точки зрения анализа кондиционное состояние капилляра следует понимать так, что выполняемые последовательно анализы должны быть воспроизводимы как по временам миграции, так и по площадям пиков.

При подготовке к работе в первый раз кварцевый капилляр обычно промывают метанолом (5–10 мин), деионизированной водой (5–10 мин), раствором 1 М NaOH (5–10 мин) и снова деионизированной водой. Цель первой операции заключается в удалении с поверхности различных загрязнений. Щелочная промывка предназначена для осуществления максимальной диссоциации силанольных групп. Для того чтобы привести очищенную и подготовленную поверхность в равновесие с раствором рабочего электролита (буфера), капилляр промывают этим раствором (20–30 мин). При правильно проведенном кондиционировании времена миграции контрольных или тестовых веществ остаются постоянными при последовательных вводах. Если времена миграции тестовых веществ уменьшаются, это свидетельствует о недостаточном времени кондиционирования.

В процессе работы с капилляром его периодически промывают 0,1 М раствором NaOH (2–10 мин), деионизированной водой и рабочим буфером (5 мин). Если для работы используется фосфатный буфер с рН больше 2,5, то капилляр промывают 10 % раствором фосфорной кислоты, дистиллированной водой и рабочим буфером. Перед сменой рабочего буфера капилляр промывают 5 мин новым буфером для установления равновесия.

Буферные растворы в электродных резервуарах должны периодически обновляться, так как вследствие электролиза значение рН раствора у катода возрастает, а у анода падает. Концы капилляра должны быть удалены от электродов на расстояние 2 мм, чтобы предотвратить попадание в капилляр электролитически образующихся кислоты и основания.

Для капилляров с модифицированной поверхностью процедура подготовки такая же, только 0,1 М NaOH заменяется метанолом, так как покрытие капилляров неустойчиво в щелочной среде.

При анализе на поверхности кварца могут сорбироваться различные примеси: многовалентные катионы, склонные к образованию гидроксокомплексов, катионные ПАВ, вещества белковой природы, обладающие свойствами амфолитов, и др. Все они нарушают структуру диффузного слоя и уменьшают  $\zeta$ -потенциал, что приводит к уменьшению скорости ЭОП и увеличению времени миграции анализируемых ионов. Сорбция в зависимости от химической природы примесей и состава рабочего электролита может быть обратимой или практически необратимой. Часть сорбированных примесей удаляется с поверхности при промывке раствором рабочего электролита (если сорбция обратимая). Тогда, подбирая время промывки, удается при последовательных анализах сохранять постоянными времена миграции компонентов. Если в пробах имеются примеси, сорбирующиеся практически необратимо, нужно периодически промывать капилляр растворами, которые способны удалить накопившиеся примеси. Состав этих растворов следует выбирать, руководствуясь химическими свойствами сорбированных веществ. Часто более эффективным средством борьбы с такими примесями является их предварительное удаление на этапе подготовки пробы к анализу.

Параметры капилляра влияют на время миграции компонентов, разрешение, чувствительность, детектирование, отвод тепла, адсорбцию компонентов на стенках капилляра.

**Модифицированные капилляры.** Первоначально большинство разделений в КЭ проводили с использованием немодифицированных кварцевых капилляров. Одна-

ко необратимость адсорбции белков, пептидов, фрагментов ДНК, а также электростатические взаимодействия разделяемых соединений с внутренней поверхностью капилляров приводят к значительному снижению эффективности и разрешающей способности, невозпроизводимости результатов. Это требует дополнительных усилий по регенерации капилляров или их замене. Главная цель модифицирования внутренней поверхности кварцевого капилляра состоит в изменении величины и направления ЭОП для улучшения эффективности разделения, а также снижения адсорбции.

**Ввод пробы.** В сравнении с ВЭЖХ ввод проб в КЭ намного труднее из-за ее существенно меньшего объема (нл). В рутинном анализе крайне важна воспроизводимость ввода очень малых объемов. В КЭ существуют следующие способы ввода проб: гидростатический, гидродинамический, электрокинетический.

При *гидростатическом способе* (принцип сифона) ввод пробы осуществляется гравитационными силами путем изменения уровня/высоты резервуара, содержащего образец, относительно резервуара с буферным раствором на выходе из капилляра (обычно  $h = 5-10$  см). Вводимый объем пробы зависит от этой разницы и длительности введения.

*Гидродинамический способ* – наиболее используемая техника ввода проб в КЭ. Ввод пробы обусловлен созданием разницы в давлении на концах капилляра. Чем больше разница в давлении и длительность ввода, тем больший объем пробы можно ввести. Чрезмерно длительное время ввода может привести к искажению сигнала, так как зоны компонентов не в полной мере разделяются перед зоной детектора. Изменения давления (перепад давления) можно достигнуть созданием либо избыточного внешнего давления инертного газа, приложенного к резервуару с образцом на входе, либо вакуума на выходе капилляра.

Вводимый объем пробы ( $V_{\text{ввод}}$ ) может быть рассчитан с помощью уравнения

$$V_{\text{ввод}} = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L},$$

где  $\Delta P$  – разница давлений между концами капилляра, Па;  $d$  и  $L$  – внутренний диаметр и общая длина капилляра соответственно;  $t$  – время ввода пробы;  $\eta$  – вязкость пробы.

Объем вводимой пробы зависит только от разницы давлений и времени ввода пробы. При показателях времени ввода порядка нескольких секунд разность давлений лежит в области нескольких миллибар. Гидродинамический способ ввода не нарушает состава пробы, что позволяет вводить пробу из одной емкости несколько раз.

При *электрокинетическом вводе* пробы к концам капилляра прикладывается высокое напряжение на фиксированный промежуток времени, при этом входной конец капилляра погружают в раствор пробы. Ионы пробы перемещаются в капилляр пропорционально их электрофоретической подвижности, а также благодаря ЭОП. При данном способе ввода нужно учитывать состав буфера, в котором растворена проба. Ионы матричного буфера, если обладают более высокой подвижностью, чем компоненты пробы, будут быстро поступать в капилляр, и это снизит концентрацию задаваемого аналита. Например, растворение пробы в воде способствует обогащению компонентов пробы в капилляре. Для контроля ввода пробы используют внутренний стандарт.

Данным способом можно добиться высокой селективности ввода компонентов пробы благодаря различию в их электрофоретических подвижностях. Компоненты с большей подвижностью будут концентрироваться в капилляре по сравнению с малоподвижными ионами, которые в случае недостаточного времени ввода вообще могут не попасть в капилляр. Следствием этого является то, что состав введенной пробы будет отличным от состава исходной оригинальной пробы. Это означает, что электрокинетический способ ввода пробы подразумевает только однократный ввод образца из одной емкости. Данный способ ввода пробы наименее воспроизводим.

Количество молей каждого вводимого аналита ( $Q_i$ ) в капилляр с общей длиной ( $L_{\text{общ}}$ ) определяется его общей электрофоретической подвижностью ( $\mu_{\text{общ}}$ ), приложенным напряжением ( $U$ ), временем ввода ( $t$ ), отношением проводимостей рабочего буфера и пробы ( $k_{\text{буф}}/k_{\text{пр}}$ ), внутренним радиусом капилляра ( $r$ ), концентрацией аналита ( $C$ , моль/л):

$$Q_i = \mu_{\text{общ}} t \pi r^2 C \left( \frac{U}{L_{\text{общ}}} \right) \left( \frac{k_{\text{буф}}}{k_{\text{пр}}} \right).$$

Данный способ ввода применяют в капиллярном гель-ЭФ, капиллярной электрохроматографии, а также при использовании в капилляре рабочих буферов с высокой вязкостью.

**Детектирование.** В системах КЭ регистрация разделенных компонентов может осуществляться различными способами:

- непосредственно в капилляре в части, близкой к выходному концу, в режиме реального времени (англ. on-capillary). В зоне детектирования с внешней стенки капилляра снимают защитное полиимидное покрытие. Этот способ характерен для большинства коммерческих систем капиллярного электрофореза;
- непосредственно на выходном конце капилляра (end-capillary);
- вне системы КЭ (off-capillary), при этом, как правило, детектор представляет собой отдельный самостоятельный прибор (например, масс-спектрометр) и соединен с системой капиллярного электрофореза специальным интерфейсом.

В капиллярном электрофорезе используют те же принципы детектирования, что и в ВЭЖХ. Важным преимуществом КЭ перед ВЭЖХ, помимо плоского профиля ЭОП, о котором уже упоминалось выше, является отсутствие соединительных гидравлических линий между узлами «ввод пробы – капилляр» и «капилляр – детектор», которые в случае ВЭЖХ могут приводить к уширению зоны вещества за счет внеколоночного размывания.

В КЭ используют различные виды детекторов: фотометрический в УФ-видимой области спектра, флуоресцентный, электрохимический, масс-спектрометрический, по проводимости, по показателю преломления. Наиболее распространены коммерческие приборы с УФ- или флуоресцентными детекторами, которые могут быть соединены с масс-спектрометром.

При проведении оптических измерений непосредственно в капилляре (on-capillary) зона детектирования узкая и короткая. Чувствительность метода КЭФ с УФ-детектированием может быть повышена в соответствии с законом Бугера –

Ламберта – Бера за счет увеличения длины оптического пути при использовании капилляров с расширенным световым путем.

Один из способов заключается в том, что зону детектирования выполняют в форме пузырька (англ. bubble-cell), что приводит к увеличению чувствительности в 3–5 раз. Для этого капилляр промывается кислотой и охлаждается в ледяной бане, надувание соответствующего участка (увеличение в 3–4 раза) происходит водяным паром. Другой способ состоит в том, что участку капилляра придают Z-образную или квадратную форму, применение Z-ячейки позволяет увеличить чувствительность в 20–40 раз.

Более распространенный путь увеличения чувствительности КЭ – концентрирование пробы или повышение коэффициента молярной экстинкции путем оптимизации длины волны (в основном смещение в коротковолновую область спектра).

В случае оптического детектирования нужно использовать рабочие буферы, которые не имеют поглощения в детектируемой зоне длины волн. Для этих целей подходит боратный буфер, обладающий высокой оптической прозрачностью.

Детектирование с помощью флуоресцентного детектора базируется на естественной флуоресценции аналитов или их производных. Данный детектор обладает большей селективностью и высокой чувствительностью в сравнении с УФ-детектором. В настоящее время распространены лазерные источники света.

Амперометрический детектор используют, если нужно анализировать вещества, способные окисляться или восстанавливаться на электродах.

В случае использования детекторов, оптических, флуоресцентных, амперометрических, по проводимости возможно *косвенное детектирование* аналитов. Для этого в рабочий буфер вводят вещество, дающее устойчивый базовый сигнал, который снижается при прохождении аналитом зоны детектирования. К примеру, соединения без хромофорных групп или с низким коэффициентом экстинкции (сахара) могут регистрироваться непрямой абсорбцией в случае УФ-детектирования (рис. 4.6). В данном случае мигрирующий буфер смешивается с сильно поглощающим электролитом (например, сорбиновой кислотой), имеющим подвижность, схожую с ионами пробы. Вещества, малопоглощающие или непоглощающие, вызывают понижение общей абсорбции в мигрирующем буфере и детектируются на электрофореграмме в форме негативных пиков.

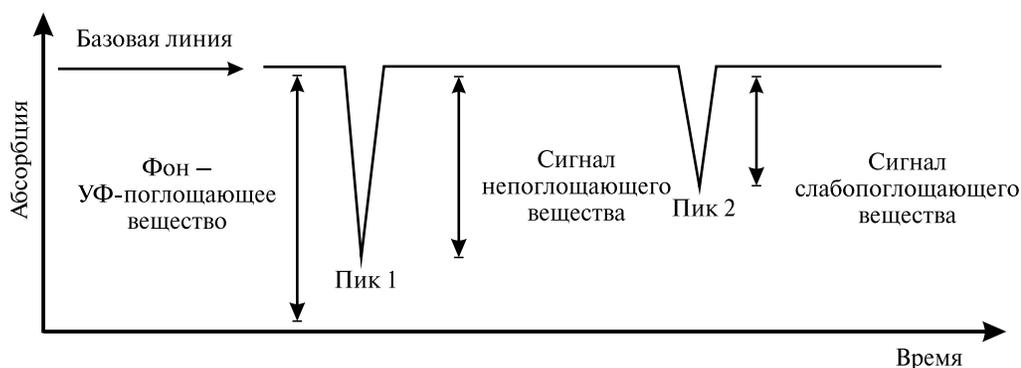


Рис. 4.6. Электрофореграмма, полученная при косвенном УФ-детектировании разделенных компонентов в КЭ

## 4.4. Эффективность, разрешение, селективность и чувствительность

Капиллярный электрофорез относится к группе комбинированных методов анализа, в которых объединены два основных процесса: предварительное разделение компонентов сложной смеси и их определение/детектирование. Важными характеристиками разделения являются разрешение, эффективность и селективность. Для конечного определения наиболее актуален параметр чувствительности, в первую очередь зависящий от типа используемого детектора.

### 4.4.1. Эффективность

Метод капиллярного электрофореза характеризуется высокой эффективностью (до миллиона теоретических тарелок). Это можно объяснить прежде всего уникальным свойством ЭОП в кварцевом капилляре, который заключается в формировании плоского профиля потока, практически не вызывающего при движении зон компонентов их уширения.

Рассмотрим, какие факторы определяют эффективность разделения в КЭФ. Индивидуальные компоненты исходной пробы, проходя через капилляр, разделяются на узкие концентрационные зоны, которые регистрируются детектором и на электрофореграмме образуют соответствующие пики. В КЭ, как и в ВЭЖХ, главным образом два фактора определяют качество разделения компонентов. Первый фактор – это разница во временах миграции ( $t_i$ ), т. е. временах выходов компонентов; чем она больше, тем лучше разделение. Второй фактор – это ширина зоны компонента (дисперсия), т. е. ширина пика ( $\omega$ ); чем больше ширина, тем хуже разделение.

В КЭ эффективность разделения определяется расширением зоны компонента при ее прохождении через капилляр. Эффективность тем выше, чем уже зарегистрированный пик, представленный на электрофореграмме при том же времени удерживания. Пик – это кривая, которая описывает постепенное нарастание концентрации компонента на выходе из колонки и последующем ее уменьшении. В идеальном случае зона компонента, выходящего из капилляра, образует гауссову кривую распределения концентрации (равномерное параболическое распределение), т. е. пик на электрофореграмме является симметричным. Кривая Гаусса в теории вероятностей описывает отклонения от среднего значения некоей величины, подверженной флуктуациям. Для гауссова распределения (нормального распределения) ширина пика  $\omega = 4\sigma$  ( $\sigma$  – стандартное отклонение для пика). Главным фактором, влияющим на расширение пика, выступает диффузия. Если представить, что зона компонента в капилляре представляет собой узкую полосу, то со временем она будет расширяться вследствие диффузии молекул из области с высокой концентрацией в середине полосы в область с низкой концентрацией по краям зоны.

Для аналита, который в капилляре проходит определенное расстояние ( $x$ ) с определенной скоростью ( $v$ ) за определенное время ( $t$ ), в соответствии с законом

диффузии Эйнштейна действительно выражение для пространственной дисперсии дискретной зоны ( $\sigma^2$ ):

$$\sigma^2 = 2Dt = 2D\left(\frac{x}{v}\right) = \left(\frac{2D}{v}\right)x = Hx,$$

где  $t$  — время миграции компонента;  $D$  — коэффициент диффузии молекулы.

Дисперсия случайной величины — мера разброса данной случайной величины, т. е. ее отклонения от математического ожидания.

Константа пропорциональности между пространственной дисперсией дискретной зоны и пройденным расстоянием определяется как высота теоретической тарелки  $H$ :

$$H = \frac{\sigma^2}{x}.$$

Этот термин заимствован из теории дистилляции, при которой разделение протекает на отдельных участках, названных тарелками. Высота тарелки обозначается как высота, эквивалентная теоретической тарелке. Это дисперсия, приходящаяся на единицу длины. Чем меньше величина  $H$ , тем уже пик и лучше разделение. Высота тарелки — это параметр процесса, учитывающий совокупность ряда физических факторов, размывающих зону, а его размерность совпадает с размерностью длины.

Для определения высоты, эквивалентной теоретической тарелке, в ВЭЖХ используют уравнение Ван Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv,$$

где  $v$  — линейная скорость компонента;  $A$ ,  $B$ ,  $C$  — константы для определенной колонки.

Константу  $A$  в уравнении обозначают как вихревую диффузию, и она обусловлена тем, что разные молекулы анализируемого соединения проходят различный путь в заполненной стационарной фазой колонке. Константа  $C$  характеризует массоперенос через фазы в колонке и обусловлена тем, что для анализа необходимо определенное конечное время для установления равновесия между стационарной и мобильной фазами. Константа  $B$  характеризует продольную диффузию молекул в колонке, которая происходит вдоль оси колонки.

В случае КЭ константы  $A$  и  $C$  равны нулю, так как капилляр не заполнен, в нем отсутствует неподвижная фаза, и в идеальном случае в уширение зон разделенных компонентов вносит вклад только продольная диффузия. Для КЭ значение  $H$  составляет  $< 1$  мкм, а для ВЭЖХ —  $\sim 10$  мкм.

Эффективность в численном выражении определяется высотой, эквивалентной теоретической тарелке, и числом теоретических тарелок. Для анализа, проходящего капилляр длиной  $L_{\text{эфф}}$ , число теоретических тарелок ( $N$ ) является безразмерной величиной:

$$N = \frac{L_{\text{эфф}}}{H} = \frac{L_{\text{эфф}}x}{\sigma^2} = \frac{L_{\text{эфф}}^2}{\sigma^2} = 16 \frac{L_{\text{эфф}}^2}{\omega^2}$$

с учетом того, что  $\sigma = \omega/4$  — стандартное отклонение в единицах длины;  $x = L_{\text{эфф}}$ .

Эффективность, выраженная числом теоретических тарелок, может быть определена непосредственно из электрофореграммы по уравнению

$$N = 5,54 \left( \frac{t}{\omega^{1/2}} \right)^2,$$

где  $t$  – время миграции компонента;  $\omega^{1/2}$  – ширина пика на половине его высоты.

Для КЭ число теоретических тарелок, с учетом того, что в расширение зон вносит вклад только продольная диффузия, определяется величиной приложенного напряжения. Это следует из нижеприведенного уравнения, полученного для капилляра с эффективной длиной  $L_{\text{эфф}}$  и общей длиной  $L_{\text{общ}}$ :

$$N = \frac{L_{\text{эфф}} x}{\sigma^2} = \frac{L_{\text{эфф}}^2}{2Dt} = \frac{\mu_{\text{общ}} L_{\text{эфф}} U}{2DL_{\text{общ}}}$$

с учетом того, что  $x = L_{\text{эфф}}$ ;  $\sigma^2 = 2Dt$ ;  $t = L_{\text{эфф}}/v$ ;  $v = \mu_{\text{общ}} E$ ;  $E = U/L_{\text{общ}}$ .

Число  $N$  возрастает с увеличением напряжения и уменьшением коэффициента диффузии (в противоположность ВЭЖХ, где число тарелок с уменьшением коэффициента диффузии сильно снижается). В КЭ величина  $N$  не зависит от длины капилляра при постоянном соотношении  $L_{\text{эфф}}/L_{\text{общ}}$ .

Из вышеуказанного уравнения следует, что увеличение силы электрического поля способствует разделению компонентов, так как они при этом находятся не так долго в капилляре и, следовательно, имеют меньше времени для диффузии. Вместе с тем из уравнения видно, что такие макромолекулы, как ДНК и белки с низкими коэффициентами диффузии, обнаруживают меньшее расширение зон, чем малые молекулы.

Однако и для разделения малых молекул с высоким коэффициентом диффузии эффективность КЭ очень высока. К примеру, электрофоретическая подвижность сульфата гуанина составляет  $4 \cdot 10^{-4}$  см<sup>2</sup>/Вс, а коэффициент  $D = 0,7 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с, тогда теоретическое число  $N = 857\,000$  при  $U = 15\,000$  В.

#### 4.4.2. Факторы, влияющие на эффективность

На практике измеренная эффективность (число  $N$ , рассчитанное по данным электрофореграммы) обычно ниже теоретической. Причиной этого является то, что теоретические расчеты учитывают расширение зоны только из-за продольной диффузии. Однако в реальности расширению зон компонентов, помимо продольной диффузии, могут способствовать различные эффекты, каждый из которых генерирует свое стандартное отклонение ( $\sigma_i$ ). Как и в ВЭЖХ, в КЭ имеет место аддитивность дисперсий ( $\sigma^2$ ) при совместном действии различных причин, приводящих к суммарному уширению полос. В итоге это приводит к уменьшению числа  $N$  или увеличению значения  $H$  соответственно. Наблюдаемая дисперсия ( $\sigma_{\text{набл}}^2$ ) будет представлять собой сумму дисперсий всех механизмов:

$$\sigma_{\text{набл}}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \dots = \sum \sigma_i^2.$$

На эффективность могут влиять следующие параметры: начальная ширина зоны ввода пробы, температурные эффекты, адсорбция веществ на стенках капил-

ляра, значение рН и ионная сила рабочего буфера, электродисперсия, вводимые добавки в буфер, разница уровней жидкости в буферных резервуарах. Всеми этими параметрами можно управлять, создавая оптимальные схемы разделения.

При вводе пробы очень важно, чтобы начальная длина зоны ввода пробы была минимальна. Если длина будет больше, чем дисперсия, обусловленная диффузией, то эффективность и разрешение начнут снижаться. Предполагая, что раствор пробы входит в капилляр как прямоугольная пробка, дисперсию дополнительного расширения пиков за счет ввода пробы ( $\sigma_{\text{ввод}}^2$ ) можно выразить следующей формулой:

$$\sigma_{\text{ввод}}^2 = \frac{l^2}{12},$$

где  $l$  – длина зоны ввода пробы.

Длина зоны ввода пробы зависит от коэффициента диффузии молекул и времени задачи. Макромолекулы имеют величину  $D$  в 100 раз меньшую, чем для малых молекул, поэтому требуют меньших длин зон ввода. К примеру, для длины зоны ввода пробы  $l = 1$  число  $N$  составит 238 000 ( $D = 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с) и 1,4 млн ( $D = 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с); для  $l = 10$  число  $N$  составит 164 000 ( $D = 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с) и 385 000 ( $D = 10^{-6}$  см<sup>2</sup>/с).

В идеале величина зоны ввода пробы должна быть как можно меньше, а ее длина составлять не более 1–2 % от общей длины капилляра. Для капилляра длиной 70 см длина зоны ввода (1 %) соответствует 7 мм (или 14 нл для  $d_i = 50$  мкм). Существующие инструменты в КЭ позволяют воспроизводимо загружать такие маленькие объемы пробы. Однако на практике достижение низких пределов обнаружения требует увеличения объема пробы или ее концентрирования.

**Параметры рабочего буфера.** Выбор рабочего (разделяющего) электролита – чрезвычайно важная задача для успешного разделения в любом варианте КЭ. При выборе буфера следует обращать внимание на множество факторов.

В случае слабых кислот и оснований рН играет большую роль, так как влияет на степень диссоциации (форма нахождения компонента в растворе) и, следовательно, на изменение электромиграции, т. е. определяет скорость течения жидкости в капилляре. Как правило, нужно выбирать буфер с диапазоном рН =  $pK_a(\text{аналит}) \pm 1$ . К тому же значение рН оказывает влияние и на ЭОП, так как дзета-потенциал зависит от рН. Очень высокий ЭОП ведет к короткому времени анализа, но при этом уменьшается разрешение между катионами и анионами, у которых  $\mu_i < \mu_{\text{ЭОП}}/2$ . Чувствительность ЭОП к изменению рН раствора определяет использование рабочих электролитов с высокой буферной емкостью (интервал буферного действия рН =  $pK_a \pm 1$ ; для КЭ даже лучше  $pK_a \pm 0,5$ ). Одну и ту же пробу можно разделить в КЭ, используя буферы с крайними значениями рН (2,5 и 10,5). Благодаря высокой стабильности кварцевого капилляра при электрофоретическом разделении можно использовать буферные системы с рН от 2 до 12.

Ионная сила влияет как на подвижность ионов, так и на ЭОП. Высокая ионная сила способствует минимизации электростатического взаимодействия ионов пробы со стенками капилляра. Однако высокая ионная сила при одновременной высокой подвижности ионов рабочего буфера ведет к высокой силе поля и выделению большой джоулевой теплоты в капилляре, что снижает эффективность разделения. Выходом является использование капилляров с очень малым диаметром или цвиттер-ионных составляющих в буфере, которые вводят в очень больших

концентрациях и мобильность которых лучше соответствует подвижности аналитов. Цвиттер-ионные молекулы обладают большой буферной емкостью, но не вносят значительного вклада в общую электропроводность системы.

Концентрация и вид ионов буфера различным образом влияют на эффективность разделения. ЭОП увеличивается по мере уменьшения концентрации буфера. С одной стороны, концентрацию буфера нужно выбирать настолько высокой, чтобы значение pH оставалось постоянным и по возможности минимизировались эффекты перегрузки, но, с другой стороны, чтобы ЭОП допускал быстрое время анализа и не появлялось дополнительное уширение полос из-за тепловыделения. В капиллярах с маленьким внутренним диаметром используют буферы с высокой концентрацией. Для капилляров с  $d_i = 75$  мкм обычно выбирают буферы с концентрациями от 10 до 50 мМ.

Идеальный буфер для КЭ должен обладать следующими свойствами: достаточная буферная емкость в выбранном диапазоне pH; малое поглощение на длине волны детектирования; низкая подвижность ведущего иона; компоненты буфера не должны взаимодействовать с компонентами пробы, так как это может привести к изменению заряда аналита и, следовательно, скорости его миграции.

*Уровень жидкости в буферных резервуарах* должен поддерживаться одинаковым, что важно как для эффективности, так и для воспроизводимости времени миграции компонентов. Незначительная разность между уровнями буферов во входном (погружен конец капилляра, в который входит проба) и выходном сосудах может привести к возникновению в капилляре гидродинамического потока с параболическим профилем, что сказывается на эффективности разделения. Влияние разницы в уровнях жидкостей зависит от диаметра, длины капилляра и вязкости буфера.

Так, разность в уровнях жидкостей в сосудах, равная 2 мм, может изменить время миграции компонентов на 2–3 % в капилляре с  $d_i = 50$  мкм и на 10 % в капилляре с  $d_i = 100$  мкм.

Автоматическая система контроля уровня жидкостей в резервуарах будет поддерживать необходимый аналитику уровень во время добавления жидкости в сосуд.

**Адсорбция на стенках капилляра.** Взаимодействие веществ со стенками капилляра ведет к искажению формы пиков (появление «хвостов»), потере компонентов и изменению ЭОП, что ухудшает воспроизводимость анализа.

Молекулы пробы могут адсорбироваться на стенках за счет взаимодействия с отрицательно заряженными силанольными группами кварца. В результате этого  $\xi$ -потенциал, образовавшийся на поверхности кварца, изменяется и, как следствие, изменяется подвижность ЭОП, из-за чего происходит изменение времени миграции всех компонентов. Кроме того, из-за сильной адсорбции молекул пробы на стенках капилляра уменьшается интенсивность пиков, что приводит в экстремальном случае к асимметричным пикам с большими «хвостами».

Для предотвращения адсорбции веществ используют следующие приемы:

- добавление в буфер веществ, препятствующих взаимодействию аналитов со стенками капилляра;
- высокая концентрация солей в буфере;
- динамическое покрытие капиллярной стенки полимерами;
- одинаковый заряд аналитов и стенок капилляра.

Повышение ионной силы рабочего буфера приводит к вытеснению ионов пробы от отрицательно заряженной стенки капилляра.

Простейший метод модифицирования поверхности кварцевого капилляра состоит в добавлении к буферному раствору таких веществ, которые предпочтительнее адсорбируются на поверхностных силанольных группах. Формирование такого защитного слоя снижает адсорбцию аналитов вследствие гидрофобного или электростатического отталкивания. Однако надо помнить, что это повлияет и на ЭОП.

Детергенты в концентрации ниже их ККМ также могут быть выбраны в качестве модификаторов. Мономерные молекулы детергента способны взаимодействовать с аналитами за счет ионных (заряженным фрагментом) или гидрофобных (алкильной цепью) сил, тем самым препятствуя адсорбции аналитов на стенках капилляра.

Динамическое покрытие капиллярной стенки может осуществляться промывкой капилляра перед анализом раствором различных полимеров – полиакриламид, декстран и др. – или просто добавлением полимеров в разделяющий буфер, в результате чего происходит снижение или обращение ЭОП, увеличение вязкости рабочего буфера, что может привести к значительному повышению эффективности анализа. При этом модификаторы не должны мешать детектированию.

**Потеря эффективности в результате температурных эффектов.** При наложении электрического поля в капилляре, заполненном буфером, протекает электрический ток, величина которого зависит от удельной проводимости буфера и диаметра капилляра. При прохождении тока через проводник выделяется джоулевая теплота. Типичное образование теплоты находится в диапазоне от 0,5 до 5 Вт/м. Отвод тепла, выделяемого за счет электрической мощности, происходит через стенки капилляра, что приводит к возникновению в буфере радиального температурного градиента.

Температурный градиент между центром капилляра и окружающей средой демонстрирует рис. 4.7.

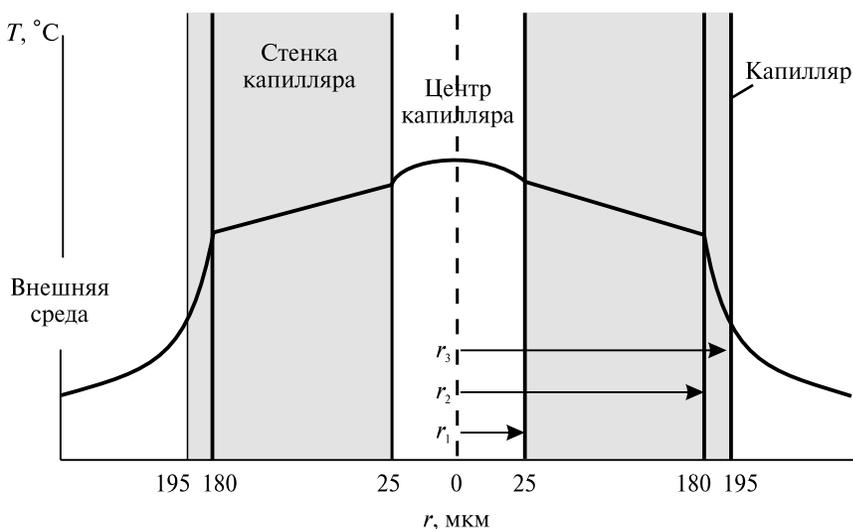


Рис. 4.7. Схема температурного градиента от центра капилляра к окружающей среде:

$r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$  – радиусы открытого канала, кварцевой стенки и стенки с полимерным покрытием соответственно  
 $(r_1 = 25; r_2 = 180; r_3 = 195 \text{ мкм})$

Тепловое равновесие в капилляре устанавливается достаточно быстро. Оно характеризуется сравнительно малым различием температуры раствора в радиальном направлении во внутреннем канале капилляра и устойчивым градиентом температур между внутренней и внешней стенкой капилляра. Разница в температуре внутри капилляра при оптимальных условиях составляет меньше  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , однако разница со внешней температурой может быть больше  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Образование температурного градиента сильно зависит от размера капилляра, электропроводности буфера, приложенного напряжения, охлаждения капилляра. Температурный градиент в капилляре приводит к потере эффективности разделения и поэтому должен сводиться к минимуму. Разница в температуре между серединой и стенками капилляра возрастает пропорционально квадрату диаметра капилляра. Поэтому используют капилляры с диаметром  $< 100\text{ }\mu\text{м}$  и эффективное охлаждение, например путем охлаждения жидкости. Другая возможность уменьшения влияния джоулевой теплоты состоит в снижении концентрации буфера и/или использовании буфера с низкой ионной электропроводностью. Часто применяют цвиттер-ионные буферы или буферы с низкой подвижностью ионов (например, фосфат (борат) лития лучше, чем хлорид (сульфат) калия).

Вследствие температурного градиента в буфере может возникнуть градиент вязкости, перпендикулярный направлению ЭОП. Поэтому вещество перемещается медленнее в зоне с высокой вязкостью (стенки капилляра), чем в зоне с меньшей вязкостью (середина капилляра), что влечет за собой уширение полос и снижение эффективности.

Для минимизации влияния температуры на анализ в современных приборах используют термостаты.

*Электродисперсия* обусловлена различием в электропроводности пробы и рабочего буфера и приводит к асимметричным пикам (рис. 4.8).

В капилляре находится рабочий буфер (основной электролит), в котором разделяются заряженные компоненты пробы под действием электрического поля. В результате зоны компонентов мигрируют с различными скоростями. Рабочий

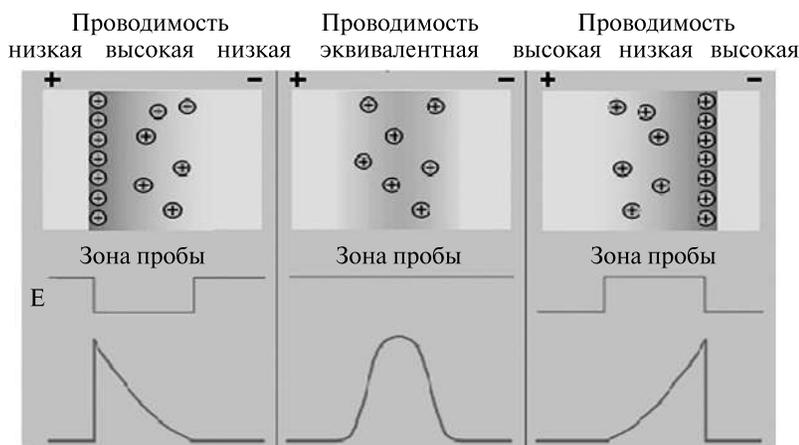


Рис. 4.8. Электродисперсия из-за несоответствия проводимости пробы и рабочего буфера

буфер должен обеспечивать постоянные условия для ионов пробы во время их разделения. Это значит, что эти условия не должны зависеть от состава пробы, только тогда компоненты могут быть идентифицированы по их временам миграции.

Скорость зоны анализа является продуктом электрофоретической подвижности заряженного анализа и локальной силы (напряженности) электрического поля в этой зоне. Роль рабочего буфера — сохранять эти два фактора постоянными. Присутствие заряженных анализов в зоне влияет на локальное электрическое поле в ней. Это вытекает из того, что сила тока пропорциональна локальной силе поля и электропроводности раствора. Сила тока остается постоянной на протяжении всей длины капилляра. Это означает, что в зоне, где проводимость выше в сравнении с чистым рабочим буфером, локальная сила поля будет ниже, и наоборот.

Ионы анализа в зоне почти всегда в определенной степени будут изменять локальную проводимость в сравнении с чистым рабочим буфером. Вместе с тем хорошо подобранный рабочий буфер стремится настолько возможно минимизировать этот эффект.

Если электропроводностью зоны пробы нельзя пренебречь по сравнению с электропроводностью буфера, это приведет к уширению полос. Эффект усиливается с ростом различия в подвижностях ионов пробы и буфера.

Для достижения хороших результатов разделения необходимо совпадение подвижностей ионов пробы и рабочего буфера, в котором проходит разделение. При сравнимой подвижности анализа и буферных ионов либо если концентрация анализа намного меньше (в 100 раз) концентрации ионов в буфере, общая сила поля во всем капилляре остается постоянной, т. е. не изменяется вследствие локальных различий в проводимости. Результатом этого являются симметричные пики анализов на электрофореграмме (см. рис. 4.8).

Если между электропроводностью в буфере и в зоне пробы существует большое различие, то локальное нарушение электрического поля приводит к искажениям зон и вследствие этого — к уменьшению эффективности разделения. Если подвижность пробы намного меньше таковой рабочего буфера, то в зоне пробы существуют меньшая проводимость, большее сопротивление и, следовательно, большая сила поля, чем в зоне ведущего электролита. В таком случае передний фронт пика резкий, во время как конец пика диффузный, так как ионы, отстающие вследствие диффузии, еще тормозятся и меньшей силой поля, т. е. возникает пик с большим «хвостом».

Если подвижность пробы выше подвижности буфера, то в зоне пробы существуют большая проводимость и более низкое сопротивление, чем у рабочего буфера. Это приводит к снижению напряженности поля в зоне пробы. В результате передний фронт зоны пробы будет диффузным (ионы пробы, попадая в зону поля с большей силой, ускоряются в направлении миграции и отрываются от зоны пробы), а хвостовая часть — более резкой (ионы также попадают в зону поля с большей силой, но как бы подталкиваются полем, ускоряются в направлении миграции и возвращаются обратно в зону пробы).

Если электропроводность зоны пробы больше, чем у разделительного буфера, это приводит к разбавлению пробы при ее вводе, и наоборот. Такое положение объясняется законом Кольрауша, который требует постоянной электропроводности на всем участке разделения.

### 4.4.3. Разрешение

В КЭ, как и в ВЭЖХ, разрешение ( $R$ ) пропорционально числу  $N$ :

$$R = \sqrt{\frac{N(\gamma - 1)}{4}},$$

где  $\gamma = t_2/t_1$  – фактор разделения;  $t_2$  и  $t_1$  – время миграции компонентов 1 и 2 соответственно.

Повышение фактора  $\gamma$  приводит к улучшению разделения пиков, а увеличение  $N$  уменьшает ширину пика. В КЭ в отличие от ВЭЖХ отсутствует понятие мертвого времени.

При оценке разделения двух компонентов в капилляре важным фактором является разрешение. В КЭ чаще всего разрешение двух компонентов определяют по электрофореграмме так же, как в ВЭЖХ, по формуле

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{\omega_1 + \omega_2},$$

где  $t_1$  и  $t_2$  – время миграции компонентов 1 и 2 соответственно;  $\omega_1$  и  $\omega_2$  – ширина пиков 1 и 2 при основании.

Разрешение в КЭ в первую очередь управляет эффективностью, а не селективностью. В этом заключается важное отличие КЭ от ВЭЖХ, где картина прямо противоположная. Благодаря узким зонам компонентов в КЭ даже очень малые различия в электрофоретической подвижности веществ (в некоторых случаях  $< 0,05\%$ ) оказываются достаточными для полного разделения.

Разрешение для двух компонентов также выражено относительно эффективности с учетом того, что время или скорость миграции частицы может быть замещено ее электрофоретической мобильностью:

$$R = \frac{1}{4} N^{\frac{1}{2}} \left( \frac{\Delta\mu_{\text{общ}}}{\mu_{\text{общ. ср}}} \right),$$

где  $\Delta\mu = \mu_{\text{общ}2} - \mu_{\text{общ}1}$ ;  $\mu_{\text{ср}} = 1/2(\mu_{\text{общ}1} + \mu_{\text{общ}2})$ ;  $\mu_{\text{общ}1}$  и  $\mu_{\text{общ}2}$  – общая электрофоретическая подвижность компонентов 1 и 2 соответственно;  $\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{ЭОП}} + \mu_{\text{ЭФ}}$ .

Разрешение можно выразить через выражение

$$R = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{\sqrt{2}} \right) \Delta\mu_{\text{общ}} \left\langle \frac{U}{D(\mu_{\text{ср}} + \mu_{\text{ЭОП}})} \right\rangle^{1/2}$$

с учетом того, что  $N = (\mu_{\text{общ}} L_{\text{эфф}} U) / (2DL_{\text{общ}})$ ;  $U$  – приложенное напряжение.

Это уравнение также описывает влияние ЭОП на разрешение.

В отличие от эффективности, которая увеличивается линейно с приложенным напряжением, для разрешения этого не наблюдается, так как оно зависит от  $\sqrt{U}$ . Напряжение должно быть увеличено в четыре раза, чтобы удвоить разрешение. Однако тогда возрастет джоулевая теплота в капилляре, что снизит преимущества, полученные от такого действия.

#### 4.4.4. Селективность

Несмотря на высокую эффективность, достигаемую в КЭ, селективность разделения, особенно в зонном варианте, может быть недостаточной, в первую очередь из-за осуществления процесса разделения внутри одной фазы. Селективность разделения в КЭ может быть улучшена за счет изменения рН ведущего электролита, введения в состав буфера различных добавок (ПАВ, макроциклов), органических растворителей. Следует иметь в виду, что все эти факторы будут сказываться также на скорости ЭОП. Однако сам по себе ЭОП не отвечает за изменение селективности разделения и определяет лишь изменение времени миграции (на равную величину для всех компонентов пробы).

Значение рН определяет заряд компонентов пробы и поэтому существенно изменяет селективность системы разделения. Поэтому разделение можно оптимизировать изменением величины рН и типа буфера. Наибольшее различие в способности к перемещению для слабых электролитов, т. е. наивысшая селективность достигается тогда, когда значение рН буфера лежит между значениями  $pK_a$  компонентов пробы.

Органические растворители (метанол, ацетонитрил, изопропанол и др.), которые вводят в буферный раствор в концентрации от нескольких долей процента до 30 % (об.), с одной стороны, могут повышать растворимость анализируемых соединений, делая КЭ пригодным для анализа веществ с ограниченной растворимостью в водных средах. С другой стороны, органические добавки способны уменьшать гидрофобные взаимодействия между анализируемыми компонентами, а также влиять на подвижность ЭОП и собственную электрофоретическую подвижность аналита.

Среди используемых в КЭ добавок наиболее популярны поверхностно-активные вещества. Их введение в состав буферных растворов позволяет в разной степени влиять на селективность, причем определяющими факторами являются тип ПАВ и его концентрация. В КЭ могут быть использованы как заряженные (катионные и анионные), так и нейтральные ПАВ (цвиттер-ионные). При концентрации ниже ККМ мономерные формы ионогенных ПАВ могут выступать как ион-парные добавки, а также влиять на растворимость гидрофобных компонентов смеси и модифицировать стенки капилляра.

Макроциклические реагенты как компоненты ведущих электролитов широко распространены в КЭ. Макроциклическими называют циклические органические соединения, молекулы которых содержат не менее девяти атомов в цикле, причем не менее трех из них – гетероатомы. В этом качестве чаще всего выступают атомы O, N и S. К макроциклическим соединениям относят циклодекстрины, краун-эфиры, криптанды, каликсарены и др. Все они способны взаимодействовать как с неорганическими веществами, так и с органическими субстратами различной природы. При этом происходит включение фрагментов анализируемых веществ в полость макроцикла (МЦ). В образующихся в этом случае комплексах включения (по типу «гость – хозяин») «хозяином» служит макроцикл, а «гостем» – субстрат. В зависимости от своего строения МЦ могут связывать незаряженные и заряженные субстраты. Движущей силой ассоциации макроцикла и субстрата могут быть нековалентные взаимодействия самых разных типов: ион-ионные, ион-ди-

польные, гидрофобные и водородные связи. Соотношение размеров полости МЦ и субстрата, конформация МЦ и возможность ее изменения при комплексообразовании, а также природа и концентрация используемого макроцикла считаются важными факторами, влияющими на селективность разделения.

Некоторые макроциклические реагенты – краун-эфиры, циклодекстрины и макроциклические антибиотики – могут выступать также в качестве хиральных агентов для разделения оптических изомеров. В КЭ они являются составной частью рабочего электролита, и селективность разделения будет определяться типом и концентрацией макроцикла, а также добавками органических модификаторов, ПАВ и температурой. Использование макроциклических добавок как для хиральных, так и для ахиральных разделений возможно в зонном и мицеллярном вариантах, причем селективность последнего будет выше за счет распределения компонентов смеси между тремя фазами макроцикла: водной, псевдостационарной мицеллярной и псевдостационарной.

#### 4.4.5. Чувствительность

Основным способом детектирования в капиллярном электрофорезе является фотометрический, чувствительность которого не всегда достаточна, что обусловлено внутренним диаметром капилляра.

Подходы к увеличению чувствительности можно разделить на три категории: увеличение длины оптического пути, использование высокочувствительных селективных детекторов, стратегия концентрирования образца перед непосредственным электрофоретическим разделением.

О повышении чувствительности УФ-детектирования путем увеличения оптического пути сказано в п. 4.3.

Предел обнаружения УФ-детекторов составляет  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  М, флуоресцентных –  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М, флуоресцентных с лазерным источником света –  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М. Флуоресцентные детекторы с лазерной индукцией (англ. laser induced fluorescence detection (LIF)) введены в КЭ в середине 80-х гг. XX в. (Gassman, 1985; Burton, 1986). Поскольку при онлайн-детектировании оптической кюветой является фрагмент капилляра, то использование лазерного света позволяет передать большую интенсивность излучения малому объему, что значительно повышает чувствительность. К тому же лазерный свет монохроматический, что дает возможность селективно возбуждать флуоресценцию отдельных молекул.

Один из наиболее общих подходов к увеличению концентрационной чувствительности в КЭ – это различные способы концентрирования пробы, к которым относятся стэкинг (англ. stacking) и свипинг (англ. sweeping).

**Электростэкинг.** Это простейший метод концентрирования пробы в КЭ (англ. fieldamplified sample stacking (FASS), если ввод пробы гидродинамический; field-amplified sample injection (FASI), если ввод пробы электрокинетический). Эффект базируется на том, что сила электрического поля вдоль капилляра, заполненного электролитом, обратно пропорциональна проводимости электролита на данном участке. Для реализации этого метода проба должна иметь более низкую проводимость, чем рабочий буфер в капилляре. Впервые эффект ввода пробы с низкой проводимостью описан Ф. Миккерсом в 1979 г.

В зоне пробы с малой проводимостью возникает большая сила поля, чем на участке рабочего буфера, у которого проводимость больше, а сила поля меньше (рис. 4.9). При вводе пробы в капилляр ионы пробы движутся с высокой скоростью в своей зоне с высокой силой поля и достигают зоны основного электролита с низкой силой поля. На границе зон проводимости они тормозятся и таким образом концентрируются. В сконцентрированном и предварительно разделенном виде аналиты переходят в основной электролит и там продолжают, но уже медленнее, движение к детектору. Это позволяет получать очень узкие зоны определяемых компонентов, и, как следствие, концентрация их в зоне оказывается значительно выше, чем в исходной пробе. Электростэкинг пробы применим только к заряженным аналитам. Важно, чтобы ионная сила и с этим проводимость буфера пробы были по меньшей мере в 10 раз меньше, чем у основного электролита. Этого можно достигнуть разбавлением пробы буфером (его концентрация должна быть в 10 раз меньше, чем концентрация рабочего буфера) или водой.

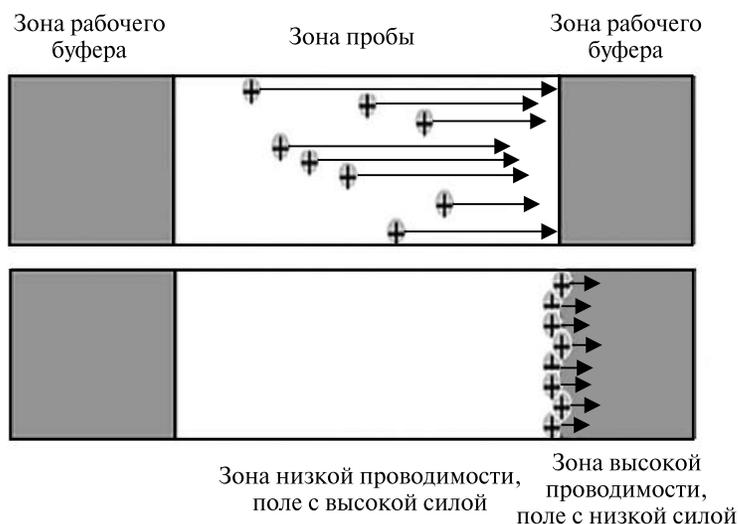


Рис. 4.9. Электростэкинг

В том случае, когда электропроводность раствора пробы больше, чем электропроводность рабочего электролита, падение напряжения на участке, занятом пробой, резко уменьшается (т. е. сила поля низкая). В результате скорость электромиграции компонентов пробы уменьшается, они медленнее достигают границы зоны, а при переходе в рабочий электролит скорость их движения увеличивается под действием поля с большей силой. В итоге происходит размывание зон, они накладываются друг на друга, и эффективность разделения резко ухудшается. Если электропроводности ведущего электролита и пробы одинаковы, то падение напряжения на всей длине капилляра равномерно и компоненты пробы равномерно перемещаются каждый с присущей ему скоростью.

**Однобуферный стэкинг.** Другая техника стэкинга заключается в использовании влияния значения рН буфера на заряд биомолекул и хорошо подходит для концентрирования амфотерных соединений. Значение рН пробы должно отличаться

ся от рН рабочего буфера. Проба с высоким значением рН вводится в капилляр с рабочим буфером, имеющим низкий рН (рис. 4.10). Подвижность ионов пробы при прохождении скачка рН на приграничной поверхности между раствором пробы и буфером изменяется, и происходит концентрирование пробы. Например, в капилляр вводятся белки в растворе с высоким рН (выше рI заряжены отрицательно) и разделяются в рабочем буфере с низким рН. Сначала белки вследствие отрицательного заряда перемещаются в капилляре в направлении анода (детектор на стороне катода), далее протонируются в приграничном слое буфера и прекращают свое перемещение (отсутствие эффективного заряда). Благодаря диффузии и миграции ионов  $H^+$  и  $OH^-$  ступенька рН исчезает, белки становятся положительно заряженными, и далее происходит обычное разделение компонентов.

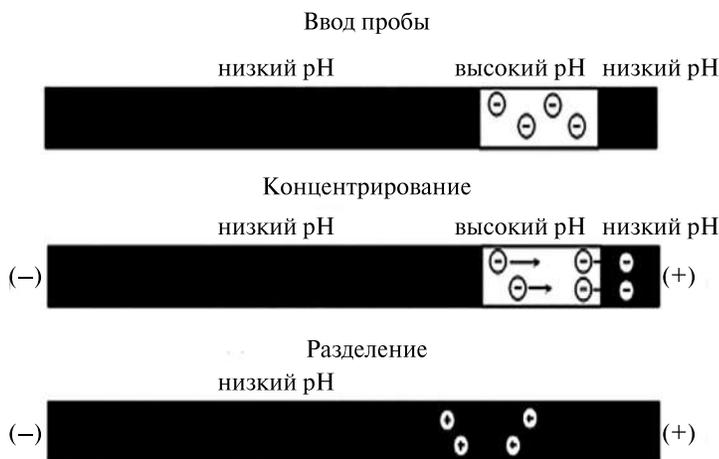


Рис. 4.10. Однобуферный стэкинг

**Двухбуферный стэкинг.** Базируется на использовании для концентрирования пробы изотахофоретической техники в режиме реального времени. Для проведения стэкинг-процесса необходимо применять лидирующий и терминальный электролиты, чьи подвижности, соответственно, несколько больше или меньше, чем подвижности ионов пробы.

В качестве разделительного буфера обычно используют лидирующий электролит, которым заполняют капилляр (рис. 4.11). После ввода пробы в капилляр в электродный резервуар вводится терминальный буфер и подается напряжение. Проба находится между лидирующим и терминальным буферами, т. е. соблюдаются условия ИТФ. За счет изотахофоретического механизма компоненты пробы, подвижность которых находится между подвижностью лидирующего и терминального электролитов, концентрируются в узкие полосы. После этого в электродном резервуаре терминальный буфер заменяется на лидирующий, который является рабочим. Через некоторое время зона терминального электролита из-за диффузии и миграции ионов расплывается, и далее уже реализуется разделение ионов на зоны в лидирующем буфере. При этом методе порог обнаружения снижается примерно в 500 раз.

**Свипинг.** Это техника концентрирования нейтральных частиц в мицеллярной электрокинетической хроматографии. Ее суть заключается в том, что аналиты концентрируются псевдостационарной мицеллярной фазой, которая проникает в зону

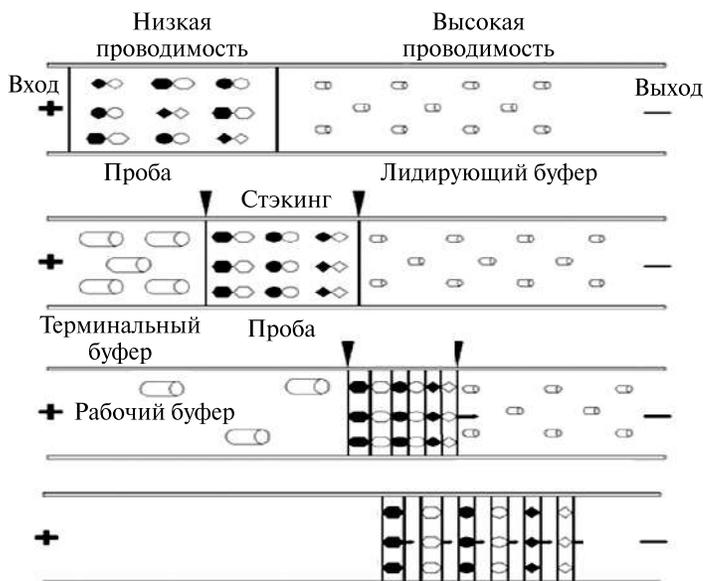


Рис. 4.11. Двухбуферный стэкинг

образца, где такая фаза отсутствует. При этом (в отличие от стэкинга) проводимость раствора образца близка к проводимости ведущего электролита. В ряде случаев сви́пинг позволяет получать 100-кратное концентрирование без использования стадии предварительного концентрирования пробы.

## 4.5. Варианты капиллярного электрофореза

Наиболее распространенными вариантами метода КЭ являются капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ), изотахофорез (КИТФ), изоэлектрофокусирование (КИЭФ), капиллярный гель электрофорез (КГЭ), аффинный капиллярный электрофорез (АКЭ), мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ), а также капиллярная электрохроматография (КЭХ).

### 4.5.1. Капиллярный зонный электрофорез

Капиллярный зонный электрофорез используется для анализа широкого круга ионизируемых органических соединений и неорганических ионов. В КЗЭ капилляры заполняются только буфером, условия соответствуют ЭФ без носителя, разделение происходит в результате разницы между электрофоретическими подвижностями разделяемых соединений. В КЗЭ величина pH и ионная сила мигрирующего буфера, а также сила электрического поля являются постоянными. Повышение селективности в КЗЭ может быть достигнуто за счет изменения pH или ионной силы разделительного буфера, путем введения в состав буфера различных добавок (ПАВ, макроциклы, органические растворители и т. д.). При разработке методики анализа с помощью КЗЭ в первую очередь (как, впрочем, и для других

вариантов КЭ) подбирают подходящий рабочий буфер. Для начала работы с неизвестной по составу пробой обычно выбирают серию буферов, которые охватывают диапазон рН 2–9. Наиболее часто используют фосфатный буфер с рН 2,5 и 7,0, а также боратный с рН 9.

КЗЭ пригоден для разделения только ионогенных компонентов пробы, тогда как нейтральные соединения, не обладающие собственной электрофоретической подвижностью, движутся со скоростью ЭОП и выходят в зоне нейтральных компонентов, зоне маркера ЭОП единым пиком.

В приборах для проведения КЭ с кварцевым капилляром полярность входного конца чаще всего положительная (анод), и ЭОП переносит зону пробы к катоду. Вблизи выхода со стороны катода установлен УФ-детектор. При этих условиях катионные компоненты пробы, мигрируя к катоду, обгоняют ЭОП и первыми достигают детектора в виде отдельных зон, которые на электрофореграмме регистрируются индивидуальными пиками. Через некоторое время детектора достигает и зона исходного раствора, в которой остались нейтральные компоненты пробы. В зависимости от того, поглощают они УФ-свет или нет, на электрофореграмме регистрируется прямой (в некоторых случаях обратный) пик, который часто называют системным. Для идентификации системного пика в пробу добавляют специальные вещества – маркеры ЭОП, например бензиловый спирт. Что касается анионных компонентов пробы, то их поведение зависит от соотношения скоростей ЭОП и электромиграции анионов. Если скорость миграции аниона превышает скорость ЭОП, то такой анион рано или поздно выйдет из капилляра в прианодное пространство (это нежелательно, так как некоторые анионы, например хлорид, попадая в рабочий буферный раствор, будут, разряжаясь на аноде, вызывать коррозию платинового электрода). Если же скорость электромиграции аниона меньше скорости ЭОП, то такой анион может быть зарегистрирован на той же электрофореграмме после выхода системного пика. В этом варианте КЗЭ с положительной полярностью могут определяться катионные компоненты проб и большинство органических анионов.

**Капиллярный гель-ЭФ.** Это вариант КЗЭ, в котором разделение осуществляется как по мобильности компонентов, так и по размерам. Данный метод используют для анализа белков, НК, олигонуклеотидов и пептидов. ДНК или белки, модифицированные детергентом ДСН, при различных массах имеют схожие соотношения масс/заряд, и в растворе их невозможно разделить. В геле, который проявляет свойства молекулярного сита, возможно разделение по размеру. Большие молекулы при движении в геле сильнее замедляются, чем малые. Преимущества капиллярного метода по сравнению с пластинчатым гель-ЭФ состоят в высокой степени автоматизации и быстром и эффективном разделении. В отличие от гель-ЭФ в капиллярном варианте возможно онлайн-детектирование, что минимизирует сложную процедуру окрашивания пластинчатого геля. Капилляр заполняется гелем, как электрофоретической средой. В качестве гелей применяют агарозу, целлюлозу, декстраны и прежде всего полиакриламидный гель.

Важнейшим условием использования геля в капилляре является полное исключение ЭОП. Если это условие не выполняется в достаточной степени, гель вымывается из капилляра наружу, и разделение становится невозможным. Регулирование ЭОП достигается нанесением динамического слоя или химическим модифицированием капилляра.

ПААГ может применяться в двух видах – линейном и поперечно-сшитом. Линейный полимер состоит из одного мономера, размеры его пор определяются концентрацией мономера, обычно % $T$  находится в диапазоне от 0 до 12. Такой полимер представляет собой линейные полимерные цепочки, которые удерживаются вместе посредством физических взаимодействий (физические гели). При низкой концентрации линейный полимер в виде буферного раствора (% $T$  до 6) можно легко под давлением вводить в капилляр и заменять после каждого анализа. Он не образует ковалентных связей со стенками капилляра. В случае более высоких концентраций мономера растворы полимера становятся высоковязкими, поэтому, начиная с концентрации % $T = 8$ , их следует полимеризовать в капилляре. Селективность этих высокомолекулярных линейных гелей (например, % $T = 12$ ) схожа с селективностью поперечно-сшитых гелей. Эффективность метода с такими гелями может составлять 600 000 теоретических тарелок. Для достижения высокой эффективности и селективности и в этом случае следует останавливать ЭОП. Любой дополнительный поток ионов внутри капилляра уменьшает эффективность разделения.

Поперечно-сшитый гель состоит из двух мономеров (акриламид и бис-акриламид), его поры хорошо контролируются в сравнении с линейным, поэтому он обладает большей селективностью. Полимеризация геля всегда происходит внутри капилляра. Он является жестким гелем в сравнении с линейным, его замена в капилляре невозможна. В некоторых случаях гель при полимеризации в капилляре может сшиваться с нанесенным на стенки капилляра поверхностным слоем. Этот способ дает высокую целостность покрытия капилляра и, как следствие, приводит к очень высокой эффективности. Используя этот метод с применением поперечно-сшитых и связанных со стенкой капилляра ковалентными силами гелей, удалось получить наивысшие эффективности в КЭ (30 млн теоретических тарелок на метр).

ПААГ непроницаем для УФ-лучей с длиной волны меньше 250 нм (поглощает в районе 230 нм), поэтому для детектирования в данном случае зачастую применяются лазерно-индуцируемую флуоресценцию. Для УФ-детектирования в качестве матриц используют декстраны или ПЭГ с молекулярной массой в области 100 кДа, которые прозрачны в УФ-области.

#### 4.5.2. Капиллярный изотахофорез и изофокусирование

**Капиллярный изотахофорез (КИТФ).** В КИТФ в отличие от КЗЭ используется дискретная буферная система, состоящая из лидирующего (ведущего) и терминального (конечного) электролитов. Принцип капиллярного ИТФ тот же, что и для гели-ИТФ. В системе ИТФ лидирующий буфер содержит ионы с наибольшей подвижностью, а терминальный электролит – ионы с наименьшей. Подвижность любого иона пробы находится между ними. Ввиду разницы мобильностей электролитов при наложении постоянного тока образуется градиент потенциала внутри капилляра. В ведущем электролите сила тока меньше, чем в терминальном. Компоненты пробы в капилляре разделяются по их электрофоретической мобильности между лидирующим и терминальным буферами. В условиях КИТФ электроосмотический поток должен быть исключен. Разделенные зоны движутся к детектору с одинаковой скоростью. В качестве детекторов используются интегральный и дифференциальный детектор по электропроводности, а также УФ-детектор. В случае интеграль-

ного детектора по электропроводности получают ступенчатую кривую – изотахофореграмму, высота ступеньки которой отображает качественную характеристику аналита, а длина ступеньки является количественным индикатором. Дифференциальный детектор дает фореграмму с пиками. В настоящее время капиллярный ИТФ широко комбинируют с масс-спектрометрией. В зависимости от природы образца анализ длится от 5 до 30 мин. Капиллярный ИТФ характеризуется высокой точностью и чувствительностью ( $10^{-6}$ – $10^{-7}$  моль/л).

**Капиллярное изофокусирование.** Принцип разделения в капиллярном и планшетном ИЭФ одинаков. КИЭФ используется для разделения амфотерных соединений, различающихся по величине  $pI$ . Разделение компонентов пробы происходит по значениям их изоэлектрической точки в градиенте  $pH$ , который получают с помощью амфолитов – смеси полиамино-поликарбоновых кислот, отличающихся своими значениями  $pI$ . ИЭФ в геле имеет ряд недостатков. Его процедура пока не автоматизирована, времязатратная и требует окрашивания геля для детектирования. К тому же использование различных вариантов гелей ведет к плохой воспроизводимости результатов. Переход к ИЭФ в капилляре позволяет решить эти проблемы.

Обычно во всех техниках КИЭФ используются модифицированные капилляры, чтобы уменьшить или полностью подавить ЭОП. Это необходимо для возможности образования градиента  $pH$ . В противном случае ЭОП быстро вынесет раствор амфолита из капилляра и сделает невозможным проведение фокусировки. Капилляры могут быть преобразованы химически, например путем модификации силанольных групп, ионизация которых ответственна за образование ЭОП. Другой вариант – покрытие стенок капилляра полимерами (метилцеллюлозой или линейным ПААГ) путем добавления их в рабочий буфер. Преимущество последнего способа заключается в том, что поверхности с нанесенными слоями полимеров проявляют более высокую стабильность к щелочным растворам ( $pH \sim 9$ ).

В отличие от ИЭФ на плоской подложке образование градиента  $pH$  и фокусировка белков в капилляре протекают в одну стадию. ИЭФ протекает в градиенте  $pH$  с низким значением у анода и высоким – у катода. Капилляр заполняют раствором смеси пробы и амфолитов, конец капилляра у катода погружают в разбавленный раствор  $NaOH$ , а другой конец – в разбавленный раствор  $H_3PO_4$ . Для предотвращения миграции буфера из электродных резервуаров в капилляр значение  $pH$  катода должно быть выше, чем  $pI$  всех основных амфолитов, а  $pH$  анода – ниже, чем  $pI$  всех кислых амфолитов. При подключении постоянного электрического тока амфолиты располагаются согласно своим значениям  $pI$  вдоль участка разделения и тем самым создают градиент  $pH$ . Белки пробы под действием электрического поля движутся в системе с градиентом  $pH$  до тех пор, пока сохраняют заряд. При достижении точки со значением  $pH$ , соответствующем их изоэлектрической точке, электрофоретическая миграция заканчивается. Окончание фокусировки определяется по падению тока до постоянной небольшой величины.

В случае КИЭФ возможно детектирование по УФ-поглощению при 280 нм, так как амфолиты поглощают при более низких значениях длин волн.

Так как онлайн-детектор находится на определенном расстоянии от конца капилляра, градиент  $pH$  должен быть сформирован перед детектором, чтобы не потерять при детектировании сильноосновные или сильнокислые компоненты пробы. Этого можно достичь, если часть капилляра после детектора заполнить специальным реагентом. Распространенным способом является добавление к раствору амфолитов

сильноосновного соединения, например N, N, N', N''-тетраметилэтилендиамина (подбирается соответствующая концентрация), которое очень быстро мигрирует к основному концу градиента рН и этим изолирует заднюю часть капилляра от градиента рН.

После того как компоненты пробы сфокусированы и разделены в капилляре, они должны пройти через детектор. Поскольку коммерческие приборы позволяют детектировать аналиты только в одной точке, то они каким-то образом должны быть подведены к детектору (мобилизоваться) в соответствии с их фокусированием.

Различают три метода мобилизации: одношаговое фокусирование с мобилизацией посредством ЭОП; фокусирование с мобилизацией с помощью давления; фокусирование с химической мобилизацией.

**Одношаговое фокусирование с мобилизацией посредством ЭОП.** В данном методе фокусирование белков и их подведение к детектору осуществляются одновременно. ЭОП подавлен, но не полностью, что и способствует мобилизации белков. Градиент рН создается только в небольшом фрагменте капилляра, чтобы не потерять ЭОП. Большая часть капилляра блокируется N,N,N',N''-тетраметилэтилендиамином, и поэтому в ней рН остается щелочным. Этот метод обычно используют для ИЭФ в диапазоне рН 4,5–8,5. Но он слабо подходит для разделения сильноосновных белков, так как они в таких условиях не успевают сфокусироваться. Преимуществом метода является быстрота и простота выполнения.

**Фокусирование с мобилизацией с помощью давления.** В данном случае ЭОП подавлен, фокусирование и мобилизация белков отделены друг от друга. Первый шаг – фокусирование белков, затем с помощью давления они подталкиваются к детектору. Во время мобилизации сфокусированных белков необходимо создать высокую силу поля, чтобы не возникло перемешивания компонентов пробы вследствие гидродинамического потока.

**Фокусирование с химической мобилизацией.** В этом методе ЭОП подавлен, а фокусирование и мобилизация белков отделены друг от друга. Мобилизация достигается путем изменения химического состава анолитов или католитов (добавление основания, кислоты или солей). Наиболее распространенный метод – добавление NaCl. Перед началом мобилизации ток в капилляре остается на низком уровне, который свидетельствует о завершении фокусирования компонентов, однако начинает возрастать при вхождении ионов хлора в капилляр. Позже, когда ионы Cl<sup>-</sup> уже присутствуют в капилляре, происходит резкий скачок тока, что указывает на завершение мобилизации аналитов. На практике это обуславливает изменение рН в конце капилляра.

Например, в случае катодной мобилизации часть ионов NO<sup>-</sup> заменяется анионами хлора, что вызывает понижение рН в капилляре перед катодом и смещение рН-градиента. Такое «разбавление» рН-градиента приводит к тому, что белки теперь находятся при рН, которое не соответствует их pI; они расфокусируются и получают снова положительный заряд, так что могут мигрировать к катоду и там детектироваться. Нейтральные и щелочные белки хорошо мобилизуются к катоду, и время их мобилизации коррелирует с pI. Однако кислые белки мобилизуются к катоду с низкой эффективностью, обычно они выходят широкими зонами. Для кислых белков подходит анодная мобилизация, протоны могут быть замещены катионами натрия. Данный метод имеет наибольшую разрешающую способность.

### 4.5.3. Аффинный капиллярный электрофорез

Аффинный капиллярный электрофорез (АКЭ) является частным случаем зонного электрофореза. АКЭ используется для изучения нековалентных специфических взаимодействий биомолекул, которые лежат в основе многих жизненно важных процессов в организме, а также клеточных рецепторов и лекарств. Он нашел широкое применение в био- и фармацевтике. АКЭ позволяет детектировать онлайн-взаимодействие биомолекул в растворе при значениях pH и ионной силы, близких к физиологическим. При этом используется очень малое количество образца и не требуется высокой степени очистки аналита.

АКЭ — один из самых распространенных методов функциональной биоаналитики. С помощью АКЭ определяют стехиометрию взаимодействия рецептора (белок, ДНК, пептид, антитело и т. д.) и лиганда (заряженный полисахарид, лекарственное соединение, белок, пептид, антиген и т. д.) и константу их связывания (константа аффинности).

Принцип АКЭ основан на том, что при взаимодействии рецептора и лиганда формируется комплекс, электрофоретическая подвижность которого отличается от подвижности исходного рецептора. Необходимым условием является существенное отличие заряда и/или молекулярной массы образующегося комплекса от заряда и массы исходного рецептора.

Методика проведения АКЭ заключается в том, что в рабочий буфер, в котором концентрация лиганда постоянно повышается, вводят постоянное количество искомого рецептора (аналита). Иными словами, происходит титрование рецептора возрастающим количеством лиганда. Результирующая подвижность рецептора, находящегося в равновесии с лигандом, будет представлять собой среднее из подвижности свободного и связанного рецепторов (рис. 4.12).

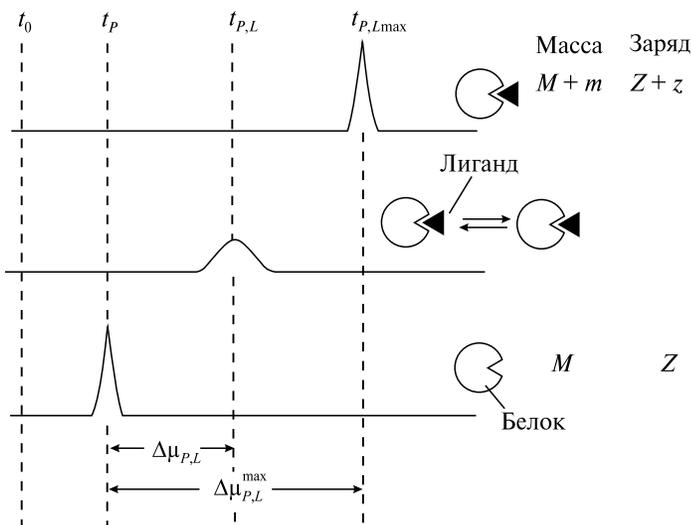


Рис. 4.12. АКЭ: изменение электрофоретической подвижности рецептора  $P$  (белок с массой  $M$  и зарядом  $Z$ ) при связывании с низкомолекулярным лигандом  $L$  (масса  $m$ , заряд  $z$ )

Величину константы аффинности можно определить на основании экспериментально выявленной зависимости подвижности рецептора (время миграции) от концентрации свободного лиганда с учетом того, что между аналитом и лигандом устанавливается равновесие ассоциация – диссоциация. В АКЭ не нужно знать точное количество свободного или связанного рецептора (или лиганда), так как для определения константы аффинности используются изменения во времени миграции рецептора (или лиганда).

Равновесие в системе при взаимодействии рецептора ( $P$ ) с моновалентным (одно место связывания) лигандом ( $L$ ) и константу аффинности ( $K_a$ ,  $M^{-1}$ ) можно описать следующим образом:



$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]},$$

где –  $[P]$ ,  $[L]$  и  $[PL]$  – концентрация рецептора, лиганда и их комплекса соответственно.

Долю рецептора  $\alpha$ , связанного в комплекс с лигандом, от общей концентрации рецептора в системе с учетом действия закона масс (материального баланса) можно представить выражением

$$\alpha = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}.$$

Выражая концентрацию комплекса  $[PL]$  через константу аффинности, получим следующие соотношения:

$$\alpha = \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]};$$

$$\frac{\alpha}{[L]} = K_a - \alpha K_a.$$

Изменение времени миграции рецептора ( $\Delta t_L$ ) при определенной концентрации лиганда составляет

$$\Delta t_L = t_{P,L} - t_P,$$

где  $t_{P,L}$  – время миграции рецептора при данной концентрации лиганда;  $t_P$  – время миграции без добавки лиганда.

Долю рецептора  $\alpha$ , связанного в комплекс, можно выразить через время миграции рецептора:

$$\alpha = \frac{\Delta t_L}{\Delta t_{L\max}},$$

где  $\Delta t_{L\max}$  – максимальное изменение времени миграции рецептора; это означает, что наступило насыщение активной стороны рецептора лигандом (весь рецептор связан с лигандом в комплекс  $PL$ ).

Преобразование последнего уравнения с учетом того, что  $(\alpha/[L] = K_a - \alpha K_a)$ , дает следующее выражение:

$$\left( \frac{\Delta t_L}{\Delta t_{L_{\max}}} \right) \left( \frac{1}{[L]} \right) = K_a \left( 1 - \frac{\Delta t_L}{\Delta t_{L_{\max}}} \right).$$

Для получения константы аффинности необходимо линеаризовать полученное уравнение методом Скэтчарда. Строится зависимость  $(\Delta t_L/\Delta t_{L_{\max}})(1/[L])$  от  $\Delta t_L/\Delta t_{L_{\max}}$ , а константа  $K_a$  определяется либо по тангенсу угла наклона прямой, либо по величине отрезка, отсекаемого прямой при пересечении с осью абсцисс.

Для определения параметров лигандрецепторного взаимодействия традиционно используют графические методы (Скэтчарда, Хилла и др.), позволяющие трансформировать результаты в линейную форму в целях дальнейшего применения способов линейной регрессии.

#### 4.5.4. Мицеллярная электрокинетическая хроматография

Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) – метод разделения, основанный на комбинации электрофоретического и хроматографического принципов разделения. МЭКХ была введена в практику макроанализа японским ученым С. Терабе в 1984 г. и получила наиболее широкое распространение среди других вариантов КЭ, так как может быть использована для анализа не только заряженных, но и нейтральных соединений. МЭКХ позволяет определять большой спектр веществ с различными гидрофобными и гидрофильными свойствами. Метод нашел применение для анализа аминокислот, нуклеотидов, витаминов, белков, ароматических углеводов, различных фармацевтических препаратов, взрывчатых веществ и др.

В состав рабочего буферного раствора вводят поверхностно-активное вещество, которое при определенных концентрациях формирует псевдостационарную мицеллярную фазу. В МЭКХ используют катионные, анионные, цвиттер-ионные ПАВ в концентрациях, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования. При таких концентрациях ПАВ находятся в растворе электролита преимущественно в форме мицелл. Мономеры состоят из гидрофобного «хвоста» и гидрофильной (например, в случае анионного ПАВ отрицательно заряженной) «головы». При формировании в водной среде мицелл мономеры агрегируются гидрофобными концами внутрь, а полярными – наружу, внешняя сферическая поверхность мицеллы становится заряженной. Каждая мицелла окружена собственным двойным электрическим слоем, внешнюю диффузную часть которого формируют противоионы, присутствующие в растворе ведущего электролита. Число мономеров, образующих мицеллу, может колебаться от 60 до 100 молекул.

Детергенты, используемые в МЭКХ, должны удовлетворять следующим требованиям: хорошо растворяться в буфере ( $\gg$  ККМ), незначительно поглощаться в УФ-области, иметь небольшую вязкость.

Механизм разделения компонентов пробы в МЭКХ базируется на различном распределении аналитов между двумя движущимися фазами: водной, управляемой ЭОП, и псевдостационарной – мицеллярной (рис. 4.13). Нейтральные частицы в КЗЭ не могут разделиться электрофоретически, а только транспортируются ЭОП.

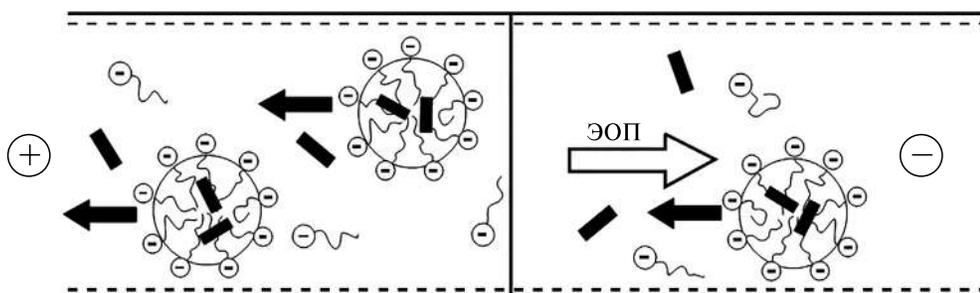


Рис. 4.13. Схема разделения аналитов с помощью МЭКХ в кварцевом капилляре:  
 $\ominus$  — детергент;  $\blacksquare$  — аналит

В МЭКХ незаряженные компоненты пробы в результате взаимодействия с заряженными мицеллами приобретают электрофоретическую подвижность ( $\mu_i$ ), которая зависит от подвижности мицелл ( $\mu_{MC}$ ) и фактора удерживания  $k'_i$  компонента в мицелле:

$$\mu_i = \mu_{MC} \left( \frac{k'_i}{1 + k'_i} \right).$$

Фактор удерживания определяется из соотношения времени миграции аналита ( $t_i$ ), мицеллы ( $t_{MC}$ ) и ЭОП ( $t_{ЭОП}$ ):

$$k'_i = \frac{t_i - t_{ЭОП}}{t_{ЭОП} \left( 1 - \frac{t_i}{t_{MC}} \right)}.$$

Фактор удерживания зависит от концентрации мицелл в ведущем электролите. Увеличение объема мицеллярной «псевдостационарной фазы» будет способствовать удерживанию в ней аналита. Удерживание аналитов в мицеллярной фазе базируется на электростатических и гидрофобных взаимодействиях.

Время миграции мицеллы можно определить с помощью компонента, полностью удерживаемого мицеллярной фазой. Маркером мицелл, например, является гидрофобный краситель Судан III, который имеет высокий коэффициент массового распределения и удерживается исключительно в мицеллах. Время миграции ЭОП можно определить по времени миграции полностью не удерживаемого мицеллами компонента (ацетон, метанол).

В соответствии с их полярностью или наличием заряда аналиты обладают различным сродством к мицеллярной фазе и отсюда — разной скоростью миграции. Время миграции всех аналитов лежит в определенном интервале, который ограничивается ЭОП и временем миграции мицелл. Чем сильнее аналит взаимодействует с мицеллой, тем дольше он удерживается в мицеллах, и, следовательно, возрастает его время миграции. Если нейтральный аналит не взаимодействует с мицеллами, он выходит из капилляра вместе с ЭОП, а если прочно удерживается в мицеллах, то вместе с ними. Наиболее гидрофобные соединения удерживаются мицеллами наиболее сильно. Различное взаимодействие мицелл и нейтральных компонентов лежит в основе их разделения в МЭКХ.

Чаще всего в анализе используют анионные ПАВ, особенно широкое применение нашел ДСН (в воде ККМ 8–9 мМ). Ни мицеллярная, ни мономерная форма АПАВ не взаимодействуют со стенкой кварцевого капилляра, но при подаче на капилляр высокого напряжения обе формы мигрируют к аноду, в то время как ЭОП направлен к катоду. Если в капилляр на анодной стороне ввести пробу, содержащую нейтральные и заряженные компоненты, то ЭОП будет переносить их к катоду, а навстречу будет двигаться поток отрицательно заряженных мицелл АПАВ. Нейтральные компоненты пробы могут распределяться между фазами раствора и мицеллярной, причем константа этого распределения специфична для каждого вида молекул пробы. В результате на выходе капилляра (катодной стороне) компоненты регистрируют в следующем порядке: ЭОП, анионы, нейтральные компоненты (полярные, среднеполярные, неполярные), катионы, мицеллы. Менее полярные аналиты мигрируют к детектору с меньшей скоростью, чем более полярные, так как они в большей степени взаимодействуют с гидрофобной частью мицеллярной фазы.

В МЭКХ можно легко управлять *селективностью*, используя различные детергенты или их смеси и физические параметры мицелл – размер, заряд или геометрию. Кроме того, МЭКХ может быть выполнена с применением солей желчных кислот, мощных эмульгаторов или микроэмульсий (масло в воде или вода в масле). Данный метод носит название микро-эмульсионной МЭКХ (англ. micro-emulsion electro-kinetic chromatography (МЕЕКС)). Во всех случаях селективность можно изменить, варьируя концентрацию, величину рН буфера, температуру, используя добавки – мочевины, ионы металлов и др.

*Разрешение МЭКХ* зависит от вида и концентрации детергента ( $k'_i$  растет с увеличением концентрации ДСН), температуры (в общем случае  $k'_i$  снижается с ростом  $T$ ), введения органических модификаторов (метанол, пропанол, ацетонитрил, обычно < 40 % по объему) в водную фазу, значения рН водной фазы (обычно рН > 6 для генерирования эффективного ЭОП). Например, добавление в буфер органических растворителей приводит к снижению фактора удерживания и ослаблению ЭОП. Надо отметить, что значение ККМ детергентов в буферах меньше, чем в воде (например, ККМ для ДСН в воде составляет 8 мМ, а в обычно используемых буферах снижается до 3 мМ).

МЭКХ широко применяется в фармацевтике для разделения энантиомеров ( $D$ -,  $L$ -изомеры), которое происходит в результате различного взаимодействия энантиомеров с так называемым хиральным селектором. Для этого в буфер кроме мицеллообразующих детергентов вводят вещества, способные образовывать энантиоселективную фазу, например циклодекстрины (рис. 4.14). Циклодекстрины образуются при ферментативном разложении крахмала, состоят из 6–8 единиц мономеров глюкозы ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) и представляют собой молекулярные капсулы, в которых гидрофильные НО-группы обращены наружу, а гидрофобные углеводородные скелеты – внутрь. Остатки  $D$ -глюкозы придают молекулам циклодекстринов молекулярную асимметрию, так что энантиомеры могут селективно распознаваться и включаться в цикл.

Смесь незаряженных хиральных молекул распределяется между циклодекстринами, которые нейтральны и транспортируются ЭОП к катоду, и ДСН-мицеллами, которые обладают отрицательным зарядом и движутся с высокой скоростью в направлении, противоположном ЭОП.

В результате энантиомер, который сильно связан с мицеллами, движется к катоду медленнее, чем его изомер, сильно интегрированный в циклодекстрины. Связи-

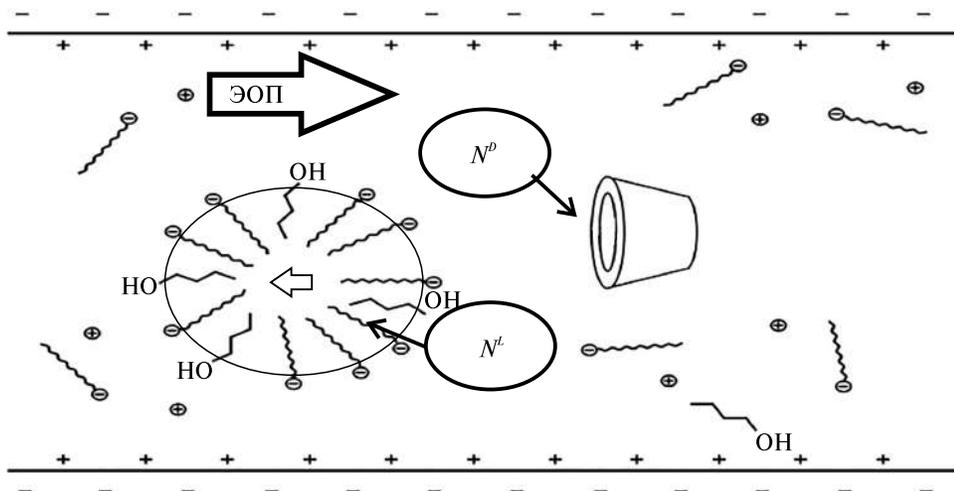


Рис. 4.14. Схема разделения энантиомеров ( $N^D$ ,  $N^L$ ) с помощью МЭХ в кварцевом капилляре (буфер содержит детергент ДСН и циклодекстрины)

вание энантиомера с циклодекстрином основывается на водородных связях, гидрофобных, электростатических или диполь-дипольных взаимодействиях, взаимодействиях с переносом заряда. Высокая эффективность МЭХ позволяет выполнить хиральное распознавание даже при очень низкой энантиоселективности.

**Обработка результатов в капиллярном электрофорезе.** Целью любого анализа является получение ответов на вопросы: какие компоненты присутствуют в анализируемом образце и в какой концентрации. Первый из вопросов — это задача качественного анализа, второй — количественного. Для решения обеих задач в КЭ перед анализом пробы обязательно проводят процедуру градуировки системы путем измерения одной или нескольких смесей с известным качественным и количественным составом.

В КЭ используют те же принципы интегрирования пиков, методы градуировки, способы формирования отчетов, как в газовой и жидкостной хроматографии. По аналогии с ВЭЖХ большинство детекторов в КЭ являются концентрационными, для которых высота или площадь пика прямо пропорциональна концентрации вещества, образующего пик.

Качественный анализ обычно состоит в сравнении времени миграции, полученного для стандарта и компонента пробы, измеренного в одинаковых условиях. Если эти времена совпадают с заданной точностью (обычно окно идентификации не превышает 5%), то считают, что искомое вещество в пробе найдено, и переходят к количественному анализу. Тем не менее такой способ идентификации вещества не всегда надежен, особенно в случае анализа проб со сложной матрицей.

Несмотря на высокую разделительную способность КЭ, качественный анализ близкорасположенных пиков может вызывать некоторые трудности. В этом случае можно использовать метод добавок. В пробу, для которой затруднена идентификация некоего вещества, вносят это вещество и проводят повторный анализ. Если на электрофореграмме появляется новый пик, это означает, что анализируемый компонент ранее в пробе отсутствовал. Если же один из имеющихся на электро-

фореграмме пиков увеличился по высоте (площади), то можно утверждать, что это и есть искомый компонент. Концентрацию добавки обычно выбирают так, чтобы высота (площадь) интересующего нас пика увеличилась не более чем в 2–3 раза.

Количественный анализ в КЭ принципиально не отличается от такового в ВЭЖХ, поскольку в основе лежит прямо пропорциональная зависимость высоты (площади) пика от концентрации вещества при использовании концентрационных детекторов, какими являются, например, фотометрические и флуориметрические детекторы. Суть количественного определения сводится к следующему:

- выбирают метод градуировки: внешнего стандарта (абсолютной градуировки), внутреннего стандарта, метод добавок и т. д.;
- определяют, какую величину отклика детектора – высоту пика или площадь пика – будут использовать;
- анализируют стандартные растворы с известными концентрациями веществ и для каждого компонента строят градуировочную зависимость отклика детектора от концентрации вещества;
- анализируют пробу неизвестного состава и по градуировочному графику находят концентрацию определяемых веществ.

#### 4.5.5. Капиллярная электрохроматография

Капиллярная электрохроматография (КЭХ) – это электрокинетический метод разделения, представляющий собой гибрид двух аналитических техник – хроматографии (распределение между двумя фазами) и капиллярного электрофореза (электромиграция и ЭОП).

Оригинальная идея метода была высказана еще в 1974 г. В. Преториусом (V. Pretorius), однако техника получила развитие только к началу 1990-х гг. В 1995 г. было показано (N. W. Smith, M. B. Evans), что эффективность КЭХ с насадочной колонкой может достигать  $10^6$  теоретических тарелок.

КЭХ является высокоэффективным и ультрасенситивным методом, требующим минимального расхода реагентов и пробы. В настоящее время КЭХ используют для разделения и анализа широкого спектра соединений – высоко- и низкомолекулярных, органических и неорганических. КЭХ находит широкое применение в протеомике.

В КЭХ, как и в ВЭЖХ, разделение компонентов смеси происходит в кварцевых капиллярных колонках ( $d_i = 50–200$  мкм), заполненных неподвижной фазой, но в отличие от ВЭЖХ течение жидкости (мобильной фазы) через колонку осуществляется под действием не давления, а электрического поля. Транспортные функции в КЭХ осуществляет электроосмотический поток. ЭОП определяется свойствами подвижной фазы (вязкостью и диэлектрической постоянной) и величиной дзета-потенциала, возникающего на поверхности внутренних стенок капилляра и материала неподвижной фазы. Стационарная фаза в КЭХ выполняет две функции: во-первых, содержит центры удерживания компонентов пробы, во-вторых, обеспечивает размещение фиксированных зарядов для генерации ЭОП. В КЭХ, как и в ВЭЖХ, могут быть использованы фазы с различными свойствами (ионообменные, обращенные, нормальные, аффинные). Избирательность КЭХ регулируется выбором стационарной фазы. Подвижная фаза представляет собой смесь органичес-

кого растворителя (например, ацетонитрил) и буфера (фосфатный, pH 8). Режим элюирования может быть изократическим или градиентным.

Детектирование в КЭХ осуществляется непосредственно в капилляре (онлайн) или вне системы (оффлайн). Широко используются флуоресцентные и УФ-детекторы, а также масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации. Приборы для высокоэффективного капиллярного электрофореза могут комплектоваться капиллярными колонками, превращаясь таким образом в электрохроматографы.

Более высокая эффективность КЭХ в сравнении с ВЭЖХ обусловлена плоским профилем ЭОП, который уменьшает размывание зон компонентов в колонке. Отсутствие перепада давления в КЭХ-колонке позволяет увеличить ее длину, использовать более мелкие частицы сорбента, более плотно и равномерно упакованный сорбент, более тонкие слои привитой фазы.

Механизм разделения в КЭХ базируется на хроматографическом удерживании компонента неподвижной фазой и на электрофоретической миграции в подвижной фазе. Нейтральные аналиты в КЭХ разделяются за счет различного распределения между мобильной и стационарной фазами, разделению заряженных аналитов будет дополнительно способствовать различие в их электрофоретических подвижностях. Проблемы КЭХ обусловлены адсорбцией аналитов на стационарной фазе, электростатическим взаимодействием, необходимостью сохранять интенсивный ЭОП.

В КЭХ используют три вида колонок – насадочные с гранулированным или монолитным наполнителем, полые (рис. 4.15). В полых колонках стационарную фазу образуют привитые полимерные пористые слои, связанные (привитые) ковалентными связями или нековалентными взаимодействиями с внутренними стенками кварцевого капилляра. Для получения покрытия используют полиакриламид, полисахариды, гидроксिलированный полиэфир и ацетат целлюлозы. Полые колонки применяют для разделения белков и пептидов.

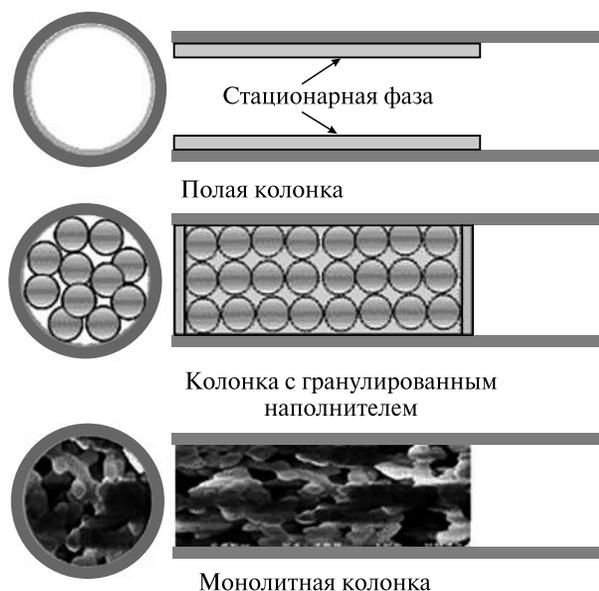


Рис. 4.15. Виды колонок, используемых в КЭХ

Другой вариант колонок для КЭХ – это насадочные колонки, заполненные гранулированным (сферическим) сорбентом (1–5 мкм) (рис. 4.16).

Слой сорбента в колонке с ее обоих концов удерживается фриттами, которые образуются путем сплавления материала насадки. Гранулированные материалы насадки – это те же материалы, которые обычно применяют в ВЭЖХ-колонках. Насадочные колонки обеспечивают лучшее удерживание и более высокую эффективность, чем полые. Недостатком данных колонок являются фритты. Последние способствуют появлению центров зарождения пузырьков воздуха, приводящих к нестабильности базовой линии, прерыванию тока в системе и уменьшению ЭОП.

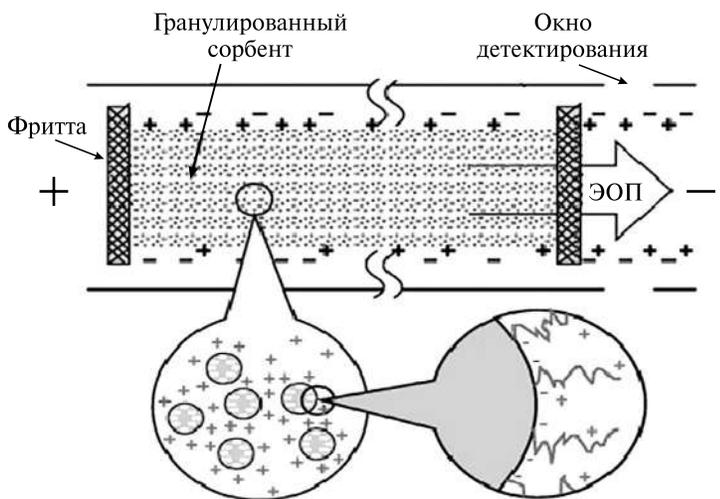


Рис. 4.16. Насадочная колонка с гранулированным наполнителем для КЭХ

При изготовлении колонок с гранулированной насадкой предусматривается полая часть в качестве окна детектирования, которая может служить также в качестве отдельного участка для ускорения ЭОП.

Для увеличения скорости ЭОП используют сегментированные насадочные колонки. В таких колонках один сегмент заполняется одним видом стационарной фазы для разделения компонентов, другой (вспомогательный) – иным видом стационарной фазы (или остается полым) для генерации и поддержания ЭОП. В сегментированных колонках можно точно отрегулировать избирательность анализа путем изменения длины различных сегментов.

Монолитные колонки представляют собой насадочные колонки, но заполняются сплошным (монолитным) материалом, и использование фритт не требуется. Монолиты – пористые полимерные стационарные фазы. Благодаря макропористой структуре монолита обеспечивается хорошая проницаемость колонок, а химический состав поверхности монолита хорошо контролируется. Монолитные стационарные фазы были разработаны как сорбенты для ВЭЖХ с пониженным в 3–5 раз рабочим давлением для фракционирования биополимеров. Монолиты получают на основе золь-гелей, акриламидов, полистиролов, полиметилакрилатов, кремнеземов. Избирательность и ЭОП регулируют подбором степени гидрофобности и заряда монолита. Интенсивный ЭОП достигается в монолитных колонках путем при-

менения монолитов с высоким содержанием заряженных частиц. Такие монолиты можно получить либо полимеризацией с включением заряженных мономеров, либо постфункционализацией нейтрального пористого монолитного материала.

В последнее время для анализа синтетических пептидов, белков получили распространение монолиты с кольцевым ЭОП, которые позволяют исключить возможность необратимой адсорбции и электростатического связывания биомолекул при сохранении интенсивного ЭОП и, следовательно, достигать высокой скорости разделения. Такая колонка представляет собой капилляр, на внутренние стенки которого для получения кольцевого ЭОП наносится положительно заряженный слой полимера, а полость капилляра заполняется нейтральной объемной стационарной фазой, например сополимером, полученным полимеризацией мономеров винилбензолхлорида и диметилметакрилат этиленгликоля. Разделение белков и пептидов в такой колонке происходит за счет комбинации механизмов обращенно-фазовой хроматографии и электрофоретической миграции.

Сложность разделения компонентов биологических образцов способствовала развитию многомерной электрохроматографии. Разрабатываются двухмерные системы «КЭХ – КЭХ» или «ВЭЖХ – КЭХ». Такие системы обеспечивают идеальные профили потоков, позволяют значительно повысить эффективность и селективность анализа биомолекул (пептиды, белки и др.), значительно уменьшить время разделения и объемы исследуемых проб.

Дальнейшее развитие методов анализа биомолекул базируется на создании тандемных методов. Возможность соединения масс-спектрометрических детекторов в онлайн-комбинации с ВЭЖХ и КЭ обеспечила перспективу создания таких систем, как «ВЭЖХ – КЗЭ – МС» и «ВЭЖХ – КЭХ – МС». В то же время использование КЭ и КЭХ для анализа биомолекул в микрочипах представляет перспективную область решения сложных аналитических задач протеомики.

### 5.1. Ферменты в качестве аналитических реагентов

#### 5.1.1. Понятие и сущность метода

Ферменты являются биологическими катализаторами, которые ускоряют химические превращения определенных соединений (субстраты) в продукты. В клетках организма протекают тысячи химических реакций, катализируемых ферментами. Ферменты как катализаторы обладают уникальным свойством – специфичностью, т. е. способностью избирательно взаимодействовать с одним или несколькими родственными соединениями на фоне большого числа разнообразных веществ. Высокая специфичность ферментов является продуктом длительной эволюции.

Исследование реакций с участием ферментов началось еще в первой половине XIX в. (К. Кирхгоф, 1811–1814; Й. Я. Берцелиус, 1835). Специфичность ферментативной активности установлена Э. Фишером в конце XIX в. Важный вклад в развитие представлений о действии ферментов внесли Л. Анри (1903), Л. Михаэлис и М. Ментен (1913), Г. Бриггс и Дж. Холдейн (1925). Ими написаны работы по кинетике и механизму ферментативных реакций. Аналитическое применение этих реакций приходится на 50-е гг. XIX в. – вначале в биохимических и медицинских исследованиях, позднее и в других областях. Первый известный ферментативный анализ, о котором сообщил Г. Озанн (G. Osann) в 1845 г., заключался в определении гидропероксида с помощью фермента пероксидазы.

Ферментативные методы анализа получили большое распространение, так как они относительно просты в исполнении, характеризуются минимальной пробоподготовкой (или ее отсутствием), не требуют для проведения дорогостоящего оборудования. Ферментативный катализ внес существенный вклад в развитие аналитической химии сложных органических и биоорганических молекул. Высокая специфичность ферментов, их способность узнавать индивидуальные молекулы в сложных смесях обеспечили аналитическую химию новыми специфическими агентами. Высокие скорости реакций, катализируемые ферментами, позволяют усилить химический сигнал и существенно повысить чувствительность анализа.

В общем ферментативные методы анализа служат для определения субстратов и соединений, воздействующих на каталитическую активность ферментов, так называемых эффекторов, активаторов и ингибиторов, а также каталитической активности ферментов. В основе ферментативного анализа лежат природные биохимические процессы обмена веществ, которые воспроизводятся *in vitro*. В настоящее время известно более 4500 ферментов, однако только немногие используются в ка-

честве химических реагентов. Развитие биотехнологии и генетической инженерии позволило получать и производить ферменты с новыми свойствами в необходимых количествах.

Ферментативный анализ нашел широкое применение в клинической диагностике, экологии, криминалистике, сельском хозяйстве, пищевой и косметической промышленности, биотехнологиях. Ферменты используют для анализа как низкомолекулярных соединений, так и макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) в сложных биохимических смесях. Применение ферментов в качестве аналитических реагентов позволяет селективно определить малые количества особо важных метаболитов, лекарственных соединений, антибиотиков, пестицидов, наркотиков, различных токсических и других веществ в разных биопробах.

### 5.1.2. Строение, способ и механизм действия ферментов

Ферменты – это биоорганические молекулы, преимущественно белки с молекулярной массой  $10^4$ – $10^5$  Да. По химическому строению ферменты могут быть сложными и простыми. Последние представляют собой полипептидные цепи, в которых остатки отдельных аминокислот связаны ковалентной амидной связью. Сложные ферменты включают в свой состав низкомолекулярные органические соединения или неорганические ионы (кофакторы), необходимые для проявления каталитической активности. Такой активный комплекс называют холоферментом. Он состоит из апофермента (неактивный белковый компонент) и кофактора (кофермент, простетическая группа или ион металла). Кофакторы выполняют следующие функции: участвуют в акте катализа (перенос электрона, протона, химических групп); осуществляют контакт между ферментом и субстратом; стабилизируют оптимальную конформацию фермента.

В процессе катализа в контакт с субстратом вступает не вся молекула фермента, а ее определенный участок, который называется *активным центром*, ответственный за присоединение и превращения субстрата. Эта зона фермента формируется при образовании полипептидной цепью третичной структуры. Отдельные фрагменты аминокислот сближаются между собой, образуя определенную конфигурацию активного центра. Важная особенность строения активного центра заключается в том, что его поверхность химически и пространственно (т. е. подходящее относительное расположение выпуклых и вогнутых областей фермента и субстрата) соответствует (комплементарна или взаимодополняема) поверхности субстрата, т. е. аминокислотные остатки данного участка способны вступать в химическое взаимодействие с определенными группами субстрата.

Стерическое соответствие активного центра фермента и структуры субстрата было описано Э. Фишером (1894) в виде модели «ключ – замок». Концепция индуцированного соответствия Д. Кошланда (1959) предполагает, что субстрат при сближении с ферментом (активным центром) индуцирует в нем такое пространственное расположение аминокислот и перераспределение заряда, в результате которого активный центр приобретает определенную реакционноспособную конфигурацию. При этом менее специфический субстрат в отличие от высокоспецифического не способен индуцировать такие структурные изменения.

В активном центре различают две зоны (подцентра) – адсорбционный участок, ответственный за присоединение субстрата, и каталитический участок, отвечающий за химическое превращение субстрата.

Главная функция *адсорбционного* подцентра – связывание, фиксация молекулы субстрата и передача этой молекулы каталитическому участку в наиболее оптимальной ориентации для данного подцентра. Связывание субстрата с адсорбционным центром происходит за счет слабых, но кинетически быстро возникающих связей и поэтому является обратимым. В образовании фермент-субстратных комплексов участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а в ряде случаев также ковалентные, координационные связи. При этом высокая структурная организация реализуется посредством многочисленных связывающих центров. Структура адсорбционного подцентра определяет субстратную специфичность фермента.

*Каталитический* подцентр – это область активного центра фермента, которая участвует в химических преобразованиях субстрата. Формируется он за счет радикалов двух, иногда трех аминокислот, расположенных в разных местах полипептидной цепи фермента, но пространственно сближенных между собой за счет изгибов этой цепи. В состав каталитического подцентра большинства ферментов входят такие аминокислоты, как *сер*, *цис*, *гис*, *тир*, *лиз*. Сложные ферменты в каталитическом участке содержат кофактор.

Кроме активного центра ряд ферментов снабжен *регуляторным* (*аллостерическим*) центром. С этой зоной фермента взаимодействуют вещества, влияющие на его каталитическую активность. Аллостерический центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому какого-то определенного низкомолекулярного (иногда высокомолекулярного) вещества изменяется третичная структура белковой молекулы. Вследствие этого изменяется конфигурация активного центра, сопровождающаяся либо увеличением, либо понижением каталитической активности фермента. Данное явление лежит в основе так называемой аллостерической регуляции каталитической активности ферментов.

**Способ и механизм действия ферментов.** Химическая реакция является результатом взаимодействия молекул реагирующих веществ. Ее произвольное протекание возможно, если изменение свободной энергии системы будет отрицательным ( $\Delta G < 0$ ). С достаточной скоростью реакция протекает только тогда, когда необходимая часть реагирующих молекул обладает энергией, превышающей некоторую критическую величину, называемую энергией активации ( $E_a$ ).

Роль ферментов как катализаторов состоит в увеличении скорости химической реакции. Они не являются компонентами реакций и не расходуются (хотя нельзя исключить побочных влияний условий среды на активность фермента). Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне. Другими словами, фермент осуществляет реакцию по другому пути с более низкой величиной  $E_a$ . При этом значение свободной энергии реакции ( $\Delta G$ ) не изменяется, так как  $\Delta G$  не зависит от пути реакции. Химическая реакция, как катализируемая, так и не катализируемая ферментом, независимо от ее пути, имеет одинаковую величину стандартного изменения свободной энергии. Действуя на скорость реакции, ферменты не изменяют равновесия между прямой и обрат-

ной реакциями (не сдвигают точку равновесия), они лишь ускоряют достижение равновесия химической реакции.

Ферменты являются *высокоэффективными* катализаторами. Благодаря каталитическому действию ферментов в организме становится возможным протекание таких реакций, которые без катализатора шли бы в сотни и тысячи раз медленнее. Добавка незначительного количества фермента ( $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М) ускоряет превращение субстрата в  $10^8$ – $10^{15}$  раз. Например, энергия активации распада гидропероксида в растворе составляет 76 кДж/моль, и при комнатной температуре такая реакция протекает крайне медленно. В присутствии иодид-ионов энергия активации снижается до 57 кДж/моль и скорость реакции увеличивается в 2000 раз. Фермент каталаза снижает значение  $E_a$  до величины 8 кДж/моль, и скорость реакции увеличивается в  $10^{11}$  раз при 25 °С. Ферменты катализируют за короткое время (1 с) превращения от 100 до 1000 молекул субстрата.

Ферментативная реакция – это, как правило, *многостадийный процесс*, в котором на первой стадии образуется комплекс между ферментом и субстратом (рис. 5.1). На образование комплекса указывают многочисленные экспериментальные данные, в том числе и кинетические. Некоторые фермент-субстратные комплексы были выделены в чистом виде.

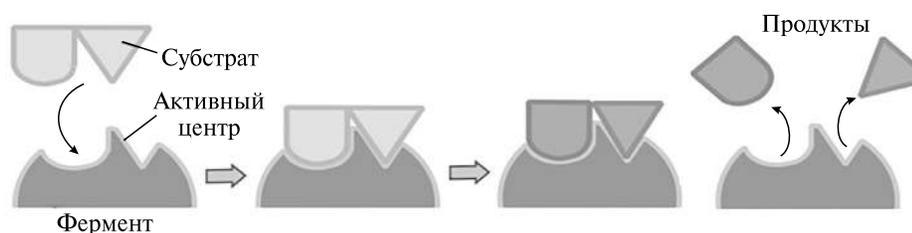


Рис. 5.1. Стадии ферментативного катализа

Связывание субстрата происходит в нескольких точках активного центра фермента, что приводит к изменению структуры субстрата, его деформации за счет изменения энергии связей в молекуле, т. е. происходит активация субстрата. Вследствие химической модификации субстрат превращается в новое вещество – продукт (или продукты). Образовавшееся вещество (продукт) утрачивает способность удерживаться в активном центре фермента, и фермент-субстратный комплекс, вернее комплекс «фермент – продукт», распадается. Таким образом, в механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется как тонкой трехмерной структурой активного центра, так и уникальной структурной организацией всей молекулы фермента, обеспечивающей высокую каталитическую активность и специфичность действия биокатализатора.

Ферменты в качестве *аналитических реагентов* обладают рядом преимуществ, к которым в первую очередь стоит отнести высокую специфичность и каталитическую активность, многообразие определяемых веществ, низкие пределы обнаружения веществ, экспрессность и достоверность результатов.

*Специфичность* действия фермента – это способность ускорять протекание одной определенной реакции, не влияя на скорость остальных, даже очень похожих.

Именно эта способность ферментов позволяет использовать их в качестве высоко-селективных химических реагентов в анализе. Специфичность ферментов основана на комплементарности пространственной конфигурации его активного центра и субстрата и является гарантом достоверности и надежности ферментативного метода при исследовании отдельных соединений в многокомпонентных смесях.

Специфичность ферментов обусловлена их уникальной аминокислотной последовательностью, от которой зависит конформация активного центра, взаимодействующего с компонентами реакции. Специфичность ферментов может быть *абсолютной*, когда фермент катализирует только превращение одного субстрата и не реагирует с его производными или гомологами. Например, глюкокиназа фосфорилирует только глюкозу, аргиназа расщепляет только аргинин, уреазы — мочевины. *Относительная групповая* специфичность проявляется, когда фермент действует только на определенный тип химической связи, независимо от структуры остатка молекулы, либо катализирует только превращения молекул, имеющих специфическую функциональную группу (например, амино-, фосфатную или метильную). Так, все протеолитические ферменты расщепляют пептидную связь, но пепсин — связь, образованную аминокислотными группами ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин и триптофан), химотрипсин — связь, сформированную карбоксильными группами этих же аминокислот, а трипсин — пептидную связь, образованную карбоксильной группой лизина и аргинина. *Стереохимическая* специфичность проявляется в том, что фермент катализирует превращения определенных стереоизомеров. Например, аспартаза реагирует только с фумаровой кислотой (*транс*-изомер), но не с малеиновой (*цис*-изомер).

Фермент является *химическим усилителем* сигнала. В результате ферментативной реакции с участием одного активного центра в течение определенного времени образуются  $10^5$ – $10^7$  молекул продукта. Это позволяет увеличить чувствительность анализа в  $10^5$ – $10^7$  раз и в результате обнаружить ультрамалые количества веществ.

К несомненным достоинствам ферментативного анализа относятся простые способы подготовки проб, исключающие потерю исследуемых компонентов. В некоторых случаях возможен прямой анализ пробы без ее предварительной подготовки, например при абсолютной специфичности фермента к исследуемому веществу и отсутствии в пробе каких-либо мешающих факторов.

Для ферментативного анализа характерна простая и быстрая процедура измерений, исключающая использование дорогостоящего оборудования. В большинстве ферментативных определений применяют фотометрические способы измерения результатов. Для этого все компоненты искусственной тестовой системы (буфер, коферменты, активаторы, вспомогательные ферменты) и пробу смешивают в фотометрической кювете. После измерения начальной оптической плотности добавляют стартовый фермент, который инициирует реакцию. В конце реакции (через определенный промежуток времени) повторно измеряют оптическую плотность тестовой системы. Из разницы оптических плотностей в начале и в конце реакции на основании закона Бугера — Ламберта — Бера рассчитывают концентрацию искомого соединения.

Кроме вышеперечисленных достоинств ферментативных методов анализа можно назвать и универсальность применения, высокую надежность и устойчивость к мешающим факторам, низкие затраты на проведение анализа (время, оборудование, расходные материалы), а также использование безопасных реактивов.

По словам одного из основоположников ферментативного анализа Г. Бергмана, ферментативный анализ как принцип свободен от недостатков и ошибок, так как он представляет систему для измерений, которую успешно использует живая клетка уже в течение миллионов лет.

В целом отличие ферментов от неорганических катализаторов заключается в том, что они имеют на несколько порядков более высокую молекулярную активность, действуют в мягких условиях (1 атм, 37 °С, рН 6–8), обладают высокой специфичностью, способны образовывать полиферментные комплексы (работают по типу конвейера) и почти не дают побочных продуктов.

### 5.1.3. Элементы кинетики ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса – Ментен

Для конструирования энзимологических аналитических систем необходимо знание кинетики ферментативных процессов. Аналитическим сигналом в кинетических методах анализа, к которым относятся ферментативные, является скорость процесса или пропорциональная ей величина.

Скоростью химической реакции ( $v$ , моль/лс) называется изменение концентрации реагента или продукта ( $dC$ ,  $dP$ , моль/л) в единицу времени ( $dt$ , с) в единице объема системы:

$$v = -\frac{d[C]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}.$$

При постоянной температуре скорость химической реакции прямо пропорциональна произведению молярных концентраций реагентов, возведенных в степени их стехиометрических коэффициентов.

В общем случае для реакции, которая представлена стехиометрическим уравнением



кинетическое уравнение для скорости реакции записывается следующим образом:

$$v = k[A]^a[B]^b[C]^c.$$

Коэффициент  $k$  – константа скорости реакции. Физический смысл  $k$  – константа скорости численно равна скорости реакции, когда концентрация каждого из реагирующих веществ составляет 1 моль/л или когда их произведение равно единице. Константа скорости реакции зависит от природы реагирующих веществ и от температуры, но не зависит от их концентраций.

Реальные химические процессы редко описываются простым механизмом и, как правило, представляют собой сложные реакции, в которых кроме молекул могут участвовать и такие неустойчивые промежуточные образования, как ионы, свободные радикалы, активные комплексы и т. п. Сложные реакции подразделяются на параллельные, последовательные и сопряженные. Обычно различные стадии серии последовательных реакций протекают с разными скоростями, поэтому общая скорость этого сложного взаимодействия определяется стадией, протекающей с наименьшей скоростью. Эта стадия реакции называется лимитирующей.

Ферментативные методы анализа основаны на использовании зависимости скорости катализируемой ферментом химической реакции от концентрации реагирующих субстратов и фермента. Для ферментативной реакции скорость существенно зависит от количества добавленного фермента, т. е. скорость реакции будет являться мерой каталитической активности фермента. О скорости ферментативной реакции можно судить как по убыли субстрата, так и по приросту продукта. Практическое определение скорости ферментативной реакции основано на измерении начальной скорости реакции (при малых степенях превращения). Начальная скорость — это скорость в первые моменты инкубации, пока еще сохраняется пропорциональная зависимость между нарастанием продукта и временем инкубации, когда превращению подверглось не более 10–15 % субстрата. Основное правило работы с ферментом — это определение начальной скорости ферментативной реакции. Использование начальной скорости позволяет не учитывать такие мешающие факторы, как действие обратимого фермента, ингибирование фермента продуктом или наступающее со временем дезактивирование фермента.

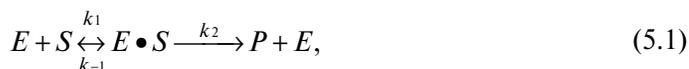
Для практического использования ферментов в биоаналитических методах необходимо знание уравнения Михаэлиса — Ментен, которое описывает зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата и является главным уравнением ферментативной кинетики.

Кинетика ферментативной реакции (т. е. зависимость скорости реакции от ее условий) определяется в первую очередь *свойствами катализатора*, вследствие чего она значительно сложнее, чем кинетика некаталитических реакций. Ферменты — это не пассивные катализаторы, а скорее комплексные молекулярные «машины», обнаруживающие большое разнообразие механизмов. Так, одни ферменты работают только с одним субстратом, а другие — с двумя или несколькими различными, при этом порядок присоединения разных субстратов может быть строго определенным или любым.

Биокинетика, предмет которой — исследование количественных закономерностей развития биологических процессов на молекулярном уровне, начала развиваться в начале XX в. При изучении кинетики ферментативных реакций была обнаружена их важная особенность (не свойственная обычным химическим реакциям), связанная с явлением насыщения фермента субстратом. Оказалось, что зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (в условиях существенного избытка субстрата по сравнению с ферментом) представляет собой гиперболу, которая асимптотически приближается к граничному значению так называемой максимальной скорости.

Для объяснения гиперболической зависимости скорости ферментативной реакции А. Браун (A. J. Brown, 1902) и затем В. Анри (V. Henri, 1903) впервые выдвинули гипотезу о том, что на первом этапе реакции образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс, который на втором этапе распадается с образованием продукта и свободного фермента. Это, в сущности, является фундаментальным положением ферментативной кинетики. Впоследствии данная идея нашла развитие в работах Л. Михаэлиса (L. Michaelis) и М. Ментен (M. L. Menten), опубликовавших в 1913 г. свою теорию общего механизма ферментативных реакций, а позднее в трудах Г. Бриггса (G. E. Briggs) и Дж. Холдейна (J. B. S. Haldane, 1925).

Кинетическую схему простейшей ферментативной реакции, когда один субстрат ( $S$ ) превращается в продукт ( $P$ ), можно представить следующим образом:



где  $k_1$  – константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса из фермента ( $E$ ) и субстрата ( $S$ );  $k_{-1}$  – константа скорости реакции диссоциации фермент-субстратного комплекса на фермент и субстрат;  $k_2$  – константа скорости реакции превращения фермент-субстратного комплекса в фермент и продукт ( $P$ ).

Ферментативная реакция протекает в два этапа. На первом фермент вступает во взаимодействие с субстратом с образованием промежуточного фермент-субстратного комплекса ( $E \bullet S$ ), что, по сути, является простой реакцией ассоциации. Этот этап быстрый и обратимый, он не сопровождается какими-либо химическими изменениями субстрата. На втором этапе комплекс ( $E \bullet S$ ), в основе образования которого лежат нековалентные взаимодействия, распадается на свободный фермент и продукт реакции. При условии, что начальные концентрации субстрата ( $[S]_0$ ) и фермента ( $[E]_0$ ) фиксированы и известны, концентрация субстрата значительно превышает концентрацию фермента ( $[S]_0 \gg [E]_0$ ) и достаточно высока для постоянного перевода фермента в комплекс ( $E \bullet S$ ) (т. е. условия насыщения фермента субстратом), то вторая стадия является лимитирующей, и в целом общая реакция нечувствительна к дальнейшему повышению концентрации субстрата.

В общем виде скорость ферментативной реакции можно представить в виде выражения

$$v_0 = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E \bullet S]. \quad (5.2)$$

Суммарная скорость образования промежуточного комплекса ( $E \bullet S$ ) – это разница между скоростями элементарных реакций, которые ведут к формированию и расходу комплекса

$$\frac{d[E \bullet S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[E \bullet S] - k_2[E \bullet S], \quad (5.3)$$

где  $[E]$ ,  $[S]$  и  $[E \bullet S]$  – концентрация свободного фермента, свободного субстрата и фермент-субстратного комплекса соответственно.

Учитывая тот факт, что фермент, изначально присутствующий только в свободной форме ( $E_0$ ), в процессе реакции находится как в виде фермент-субстратного комплекса ( $E \bullet S$ ), так и в виде молекул свободного фермента ( $E$ ), уравнение материального баланса для фермента имеет вид

$$[E]_0 = [E \bullet S] + [E]. \quad (5.4)$$

Точное аналитическое решение уравнения (5.3) представляет большие сложности. Для практического применения кинетические выражения нужно переформулировать для использования величин, которые можно измерить экспериментально. Величины  $[E \bullet S]$  и  $[E]$  нельзя измерить прямым образом, поэтому на практике используют приближения квазиравновесных и квазистационарных концентраций.

Для теоретического объяснения ферментативного процесса Михаэлис и Ментен ввели два допущения. На первом этапе ферментативной реакции (5.1) быстро устанавливается термодинамическое равновесие между ферментом, субстратом и фермент-субстратным комплексом по сравнению со скоростью последующей стадии:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[E \bullet S]. \quad (5.5)$$

В этих условиях устанавливается постоянная концентрация фермент-субстратного комплекса, который не распадется с образованием продукта через последующую реакцию. Реакция распада комплекса ( $E \bullet S$ ) с образованием продукта протекает намного медленнее, чем его обратный распад на свободные фермент и субстрат ( $k_2 \ll k_1, k_{-1}$ ). Комплекс ( $E \bullet S$ ) принято называть комплексом Михаэлиса – Ментен.

Во-вторых, концентрация субстрата сохраняется постоянной, потому что она значительно превышает концентрацию фермента (т. е. расходом субстрата можно пренебречь).

В соответствии с теорией Михаэлиса – Ментен механизм ферментативного процесса можно представить состоящим из двух стадий: первая – обратимая и быстрая, вторая – необратимая и медленная. В этом случае вторая стадия реакции практически не влияет на первую, и для выражения концентрации комплекса ( $E \bullet S$ ) можно воспользоваться константой диссоциации комплекса ( $K_S$ ):

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[E \bullet S]}, \quad (5.6)$$

$$[E \bullet S] = \frac{[E][S]}{K_S}.$$

Преобразование уравнения (5.2) с учетом того, что концентрация субстрата не меняется в процессе реакции (при  $[S]_0 \gg [E]_0$ ) и в начальный момент времени приблизительно равна его начальной концентрации ( $[S] = [S]_0$ ), а также выражения  $[E]$  из уравнения (5.4) и  $[E \bullet S]$  из уравнения (5.6) в результате позволяет получить следующее уравнение для скорости процесса:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E \bullet S] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_S + [S]}. \quad (5.7)$$

Уравнение (5.7), полученное Л. Михаэлисом и М. Ментен, описывает гиперболическое приближение скорости реакции к ее максимальному значению. С увеличением концентрации субстрата скорость будет максимальной, если концентрация субстрата превысит величину константы диссоциации ( $K_S$ ). Кроме того, константа  $K_S$  характеризует сродство фермента к субстрату. Однако нужно помнить, что центральное положение кинетики Михаэлиса – Ментен, а именно постоянная концентрация комплекса ( $E \bullet S$ ) в течение процесса, было выведено при условии быстрого достижения термодинамического равновесия между ферментом, субстратом и комплексом. Только при этих условиях маленькая величина  $K_S$  означает высокую аффинность фермента и субстрата.

В 1925 г. Г. Бриггс и Дж. Холдейн для выражения концентрации фермент-субстратного комплекса использовали принцип квазистационарных приближений (принцип стационарности Боденштейна). Они предположили, что комплекс ( $E \bullet S$ )

быстро достигает стационарного состояния (быстрее, чем равновесного). В таких условиях реакция распада комплекса ( $E \bullet S$ ) с образованием продукта не должна быть намного медленнее, чем распад на свободные фермент и субстрат, и концентрация субстрата не должна быть безусловно большей в сравнении с концентрацией фермента. В ферментативной кинетике это наиболее часто используемое допущение, однако для объяснения многих сложных механизмов (например, кооперативных) используют условие быстрого достижения равновесия.

За исключением первой стадии реакции (стадия инициации, обычно длится миллисекунды после смешивания фермента и субстрата), концентрация промежуточного комплекса ( $E \bullet S$ ) остается приблизительно постоянной, пока субстрат фактически не израсходуется. Комплекс ( $E \bullet S$ ) образуется в результате ассоциации и расходуется либо вследствие диссоциации на свободные  $E$  и  $S$ , либо конвертируется в продукт. Ввиду этого скорость образования комплекса почти в течение всего реакционного процесса равна скорости его распада, т. е.  $[E \bullet S]$  остается в стационарном состоянии:

$$\frac{d[E \bullet S]}{dt} \approx 0. \quad (5.8)$$

Преобразование выражения (5.3) с учетом уравнения (5.8) (при условии  $[S]_0 \gg \gg [E]_0$ ) даст выражение

$$\frac{d[E \bullet S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[E \bullet S] - k_2[E \bullet S] \approx 0. \quad (5.9)$$

Найдем  $[E \bullet S]$  из уравнения (5.9) и подставим в него значение  $[E]$ , полученное из уравнения (5.4):

$$[E \bullet S] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2},$$

$$[E \bullet S] = \frac{k_1([E]_0 - [E \bullet S])[S]}{k_{-1} + k_2}.$$

В результате получим уравнение для концентрации комплекса ( $E \bullet S$ ):

$$[E \bullet S] = \frac{k_1 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + (k_{-1} + k_2)}, \quad (5.10)$$

Поделив числитель и знаменатель уравнения (5.10) на  $k_1$ , имеем

$$[E \bullet S] = \frac{[E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}. \quad (5.11)$$

Соотношение констант в уравнении (5.11) обозначим как  $K_M$ :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (5.12)$$

По решению номенклатурной комиссии ИЮПАК (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) константу  $K_M$  принято называть константой Михаэлиса.

Подставляя выражение (5.11) для  $[E \bullet S]$  в уравнение (5.2), получим уравнение для скорости образования продукта. Для начальной стадии реакции можно пренебречь уменьшением концентрации субстрата. Тогда начальную скорость реакции выразим с помощью величин, которые можно измерить:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E \bullet S] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]}. \quad (5.13)$$

Уравнение (5.13), выражающее количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции, является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики. Его принято называть *уравнением Михаэлиса – Ментен*.

Максимальная скорость реакции наступает при высокой концентрации субстрата ( $[S] \gg K_M$ ), когда фермент полностью насыщен субстратом, т. е. всецело находится в форме комплекса ( $E \bullet S$ ). Тогда для скорости получим выражение

$$v_0 = V_{\max} = k_2[E]_0. \quad (5.14)$$

Комбинирование уравнений (5.13) и (5.14) дает выражение

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}. \quad (5.15)$$

Уравнение (5.13) свидетельствует, что зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при  $[E]_0 = \text{const}$  является гиперболической функцией (рис. 5.2).

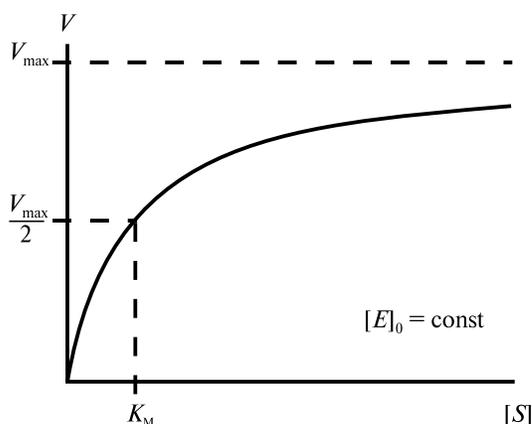


Рис. 5.2. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Анализ уравнения Михаэлиса – Ментен позволяет объяснить наблюдаемые в эксперименте закономерности. Начальная скорость ферментативной реакции при фиксированной концентрации фермента и малых концентрациях субстрата изменяется линейно с концентрацией субстрата (подчиняется кинетике первого порядка), но для высоких концентраций субстрата скорость реакции уже не зависит от его концентрации (подчиняется кинетике нулевого порядка).

Если  $[S] \ll K_M$ , тогда можно принять, что  $(K_M + [S]) \approx K_M$  и начальная скорость реакции прямо пропорциональна начальной концентрации субстрата, а выражение (5.13) примет вид уравнения для реакции первого порядка:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M} \quad \text{или} \quad v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M} = \text{const}[S]. \quad (5.16)$$

В соответствии с уравнением (5.16) при низких значениях  $[S]$  начальная скорость реакции может быть использована для расчета количества субстрата. В этой области можно судить о скорости реакции по концентрации субстрата.

В том случае, если  $[S]$  значительно превышает  $K_M$ ,  $\{[S]/(K_M + [S])\} \approx 1$  и  $v_0 \approx V_{\max}$ , уравнение для начальной скорости реакции имеет вид уравнения (5.14). При высокой концентрации субстрата начальная скорость реакции от нее не зависит. Тогда реакция подчиняется кинетике нулевого порядка  $v = k_2$  (при полном насыщении фермента субстратом), целиком определяется концентрацией фермента, а ее скорость достигает максимального значения. При таких условиях ( $[S] \gg K_M$ ) начальная скорость реакции может быть использована для определения общего количества фермента, представленного в образце. Это идеальная область для выявления активности фермента, так как здесь расход субстрата во время реакции не влияет на скорость.

На практике уравнение Михаэлиса – Ментен может быть использовано для определения концентрации субстрата, если  $[S] < 0,1 K_M$ , а если  $[S] > 10 K_M$  – для определения фермента. Нужно помнить, что принятое квазистационарное состояние, лежащее в основе этого выражения, верно, если  $[S]_0 \gg [E]_0$ , и что на практике концентрация субстрата берется в избытке, обычно порядка  $10^3[E]$ .

Как правило, реальные механизмы ферментативных процессов включают большее число промежуточных соединений фермента с субстратом. Однако уравнение Михаэлиса – Ментен феноменологически описывает практически все ферментативные реакции, а наблюдаемые отклонения связаны, как правило, с усложнением простейшей схемы. Это объясняется тем, что уравнение Михаэлиса отражает фундаментальную особенность ферментативных реакций: участие в процессах лабильных промежуточных комплексов субстрата и активного центра фермента. Все кинетические схемы, включающие стадии образования и расщепления промежуточных соединений, приводят к зависимостям скорости реакции от концентрации субстрата подобных уравнению Михаэлиса – Ментен.

### 5.1.4. Кинетические параметры уравнения Михаэлиса – Ментен

В уравнении Михаэлиса – Ментен есть два кинетических параметра, имеющих важное значение для характеристики любого фермента. Это константа Михаэлиса ( $K_M$ ) и максимальная скорость реакции ( $V_{\max}$ ), с помощью которых можно охарактеризовать эффективность работы фермента.

Параметр  $V_{\max}$  дает характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции (моль/л). Он определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента

и при избытке субстрата. Величина  $V_{\max}$  — это предел, к которому стремится скорость реакции при бесконечном повышении концентрации субстрата.

Физический смысл константы Михаэлиса заключается в том, что она представляет собой отношение суммы констант скорости распада комплекса ( $E \cdot S$ ) ( $k_{-1}$  и  $k_2$ ) к константе скорости его образования ( $k_1$ ) и выражается уравнением (5.12), которое может быть преобразовано так:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1}. \quad (5.17)$$

Отношение  $k_{-1}/k_1$  представляет собой константу диссоциации фермент-субстратного комплекса ( $K_S$ ), характеризующую меру связывания фермента с субстратом. Тогда уравнение (5.17) трансформируется в выражение

$$K_M = K_S + \frac{k_2}{k_1}. \quad (5.18)$$

Константа Михаэлиса всегда больше константы диссоциации фермент-субстратного комплекса (субстратной константы) на величину ( $k_2/k_1$ ). Поэтому  $K_M$  также является мерой аффинности (сродства) фермента к своему субстрату при условии, что  $k_2/k_1$  мало в сравнении с  $K_S$ , т. е. ( $k_2 \ll k_{-1}$ ), о чем было упомянуто выше. При снижении значения  $K_S$  возрастает субстратная аффинность фермента, т. е. тем больше сродство фермента к данному субстрату и тем выше начальная скорость реакции. При увеличении  $K_S$  сродство фермента к субстрату снижается, и реакция при небольших концентрациях субстрата протекает неэффективно.

Числовое значение константы Михаэлиса можно определить, если допустить, что  $K_M = [S]$ , тогда уравнение (5.15) примет вид

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{2}. \quad (5.19)$$

Из этого следует, что константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину своего максимального значения и имеет размерность концентрации (моль/л). Численные значения  $K_M$  обычно лежат в пределах  $10^{-2}$ – $10^{-8}$  М, легко воспроизводятся и не зависят от концентрации фермента. К примеру, константа Михаэлиса для каталазы (субстрат — гидропероксид) составляет 25 мМ, для гексокиназы мозга (субстрат *D*-глюкоза) — 0,05 мМ,  $\beta$ -галактозидазы (субстрат *D*-лактоза) — 4,0 мМ.

Если фермент характеризуется высоким значением  $K_M$ , то это означает, что потребуется относительно высокая концентрация субстрата, чтобы увеличить скорость катализируемой этим ферментом реакции до половины максимальной. Низкая величина  $K_M$  указывает на то, что 1/2 от  $V_{\max}$  достигается при относительно низкой концентрации субстрата.

Константа  $K_M$  полезна для сравнения действия различных ферментов и «пригодности» альтернативных субстратов для одного и того же фермента. Лучший субстрат для фермента, для которого характерно наивысшее значение  $V_{\max}$  и низшее  $K_M$ , т. е. субстрат, дающий наивысшее соотношение  $V_{\max}/K_M$ .

Константа  $K_M$  зависит от вида фермента и субстрата. Она помогает идентифицировать фермент, так как является характеристической константой фермента

при определенных условиях. В то же время  $K_M$  есть функция температуры и pH среды, она зависит от присутствия других веществ, играющих роль ингибитора или активатора.

Эффективное значение  $K_M$  может измениться в результате связывания с ферментом какого-либо лиганда (например, аллостерического эффектора). Необычно высокое или низкое значение  $K_M$  может указывать на изменения в ферменте, индуцированные связыванием с лигандом.

### 5.1.5. Экспериментальное определение параметров уравнения Михаэлиса – Ментен

Параметры уравнения Михаэлиса – Ментен  $K_M$  и  $V_{max}$  определяют поведение ферментативной системы, и их расчет является главной задачей кинетического эксперимента. Константу Михаэлиса можно вычислить по графику (гипербола), построенному в прямых координатах зависимости начальной скорости реакции  $v_0$  от начальной концентрации субстрата  $[S_0]$ . Отрезок на абсциссе, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой  $K_M$ . Однако из прямой зависимости  $v_0$  от  $[S]$  очень трудно определить значение  $V_{max}$ , поскольку максимальная скорость является в данном случае асимптотической величиной и вычисляется недостаточно верно. Из-за трудности точного графического определения  $V_{max}$  таким способом можно найти только приблизительную величину константы Михаэлиса.

Для точного нахождения параметров  $K_M$  и  $V_{max}$  используют несколько способов линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен, т. е. преобразуют его в уравнение прямой. Для построения такого графика необходимо определить в одинаковых условиях при различных концентрациях субстрата и  $[E] = \text{const}$  начальные скорости ферментативной реакции. Для оценки  $K_M$  и  $V_{max}$  при заданных экспериментальных условиях используют четыре графических метода: Лайнуивера – Берка, Эдди – Хофсти, Хайнса – Вульфа, Эйзенталя – Корниш-Боудена.

В методе *Лайнуивера – Берка* (метод двойных обратных величин) уравнение Михаэлиса – Ментен алгебраически перегруппировывается (исходя из того принципа, что если существует равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные величины также будут равны) в уравнение, имеющее вид

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}S}. \quad (5.20)$$

Уравнение (5.20) – это уравнение прямой линии:  $y = ax + b$ . Если в соответствии с этим уравнением построить график в координатах  $1/v_0$  (ось  $Y$ ) от  $1/[S]$  (ось  $X$ ), то получим прямую линию (рис. 5.3).

Тангенс угла наклона прямой будет равен величине  $K_M/V_{max}$ ; отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой  $1/V_{max}$  (обратная величина максимальной скорости). Если продолжить прямую линию за ось ординат, тогда на оси абсцисс отсекается отрезок, соответствующий обратной величине константы Михаэлиса ( $-1/K_M$ ), так как при  $1/v_0 = 0$  имеем соотношение

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_M}{SV_{max}}, \text{ откуда } K_M = -[S]. \quad (5.21)$$

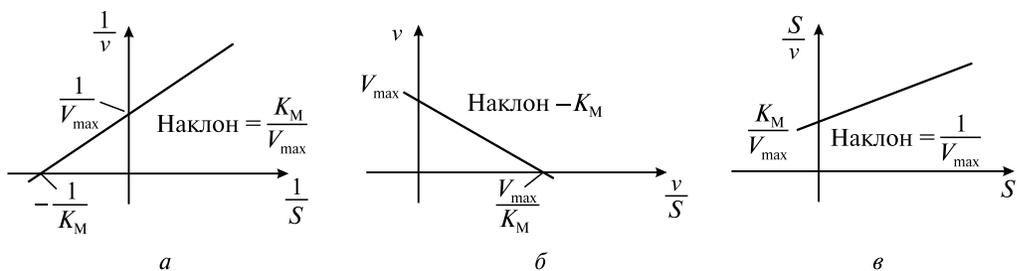


Рис. 5.3. Графики: Лайнуивера – Берка (а); Эдди – Хофсти (б); Хайнса – Вульфа (в)

Таким образом, величину  $K_M$  можно вычислить из данных наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси ординат, или из длины отрезка, отсекаемого от оси абсцисс в области отрицательных значений.

Недостатком метода является то, что при большинстве экспериментальных измерений работают с относительно высокой концентрацией субстрата, поэтому точки на левой стороне диаграммы накладываются друг на друга. Кроме того, при низкой концентрации субстрата даже незначительные ошибки при определении  $v_0$  приводят к большим ошибкам в величине  $1/v_0$  и таким образом в  $K_M$  и  $V_{\max}$ . Тем не менее данный метод используется даже для анализа кинетических данных ферментов с несколькими субстратами.

Дифференциальная перегруппировка уравнения Михаэлиса – Ментен по методу Хайнса – Вульфа приводит к выражению

$$\frac{S}{v_0} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}}. \quad (5.22)$$

Данное уравнение можно получить, преобразуя уравнение Лайнуивера – Берка путем умножения правой и левой частей на концентрацию субстрата.

Графическая зависимость приведена на рис. 5.3. График в координатах  $[S]/v_0 - [S]$  представляет собой также прямую, отсекающую на оси ординат отрезок, равный  $(K_M/V_{\max})$ , а на оси абсцисс – отрезок, равный  $K_M$ , при этом тангенс угла наклона полученной прямой дает величину  $1/V_{\max}$ .

В соответствии с методом Эдди – Хофсти уравнение Михаэлиса – Ментен алгебраически перегруппировывается в уравнение

$$v_0 = V_{\max} - \frac{vK_M}{[S]}. \quad (5.23)$$

Данное уравнение можно получить, преобразуя уравнение Лайнуивера – Берка путем умножения правой и левой частей на произведение начальной и максимальной скоростей ( $v_0 \cdot V_{\max}$ ).

График, построенный в координатах  $v_0 - v_0/[S]$ , дает прямую линию, тангенс угла наклона которой дает значение  $-K_M$ , а отрезок на оси ординат равен  $V_{\max}$ . Кроме того, отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен  $V_{\max}/K_M$ , так как при  $v_0 \rightarrow 0$   $V_{\max} \approx K_M(v_0/[S])$  или  $V_{\max}/K_M \approx (v_0/[S])$ . Этим методом получим более точные результаты, чем методом Лайнуивера – Берка.

Метод Эйзенталя и Корниш-Боудена («прямой график»  $v, [S]$ ) является очень точным графическим методом. Эйзенталь и Корниш-Боуден предложили принци-

пиально иной метод графического представления результатов исследования кинетики ферментативной реакции. В качестве основы авторы использовали следующую форму уравнения Михаэлиса – Ментен:

$$V_{\max} = v_0 + \frac{K_M v_0}{[S]} \tag{5.24}$$

Каждой концентрации субстрата  $[S]_i$  на кинетической кривой соответствует значение начальной скорости  $v_i$  ( $i = 1, n$ ). Значения  $[S]_i$  с обратным знаком откладываются на оси абсцисс, на оси ординат – значения  $v_i$  (рис. 5.4). Через полученные пары точек проводят прямые, пересекающие оси координат в точках  $(-[S]_i, 0)$  и  $(0, v_i)$ . Все полученные прямые должны пересекаться в одной точке. Проекция общей точки пересечения прямых на ось  $X$  равна  $K_M$ , на ось  $Y$  –  $V_{\max}$ . В реальных экспериментах, конечно, единой точки пересечения не будет, но будет область, в которой наиболее высока плотность пересекающихся прямых. Границы этой области позволят достаточно точно определить кинетические параметры.

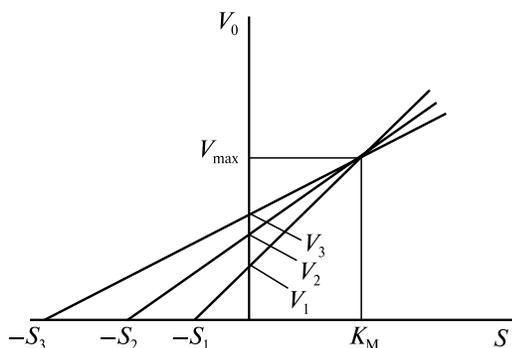


Рис. 5.4. График в координатах  $v - [S]$  (по методу Эйзенля и Корниш-Боудена)

Преимущества такого графика очевидны: для его построения не требуется никаких расчетов, он позволяет очень просто выявить ошибочные данные (такие прямые будут выпадать из основной совокупности прямых).

Указанные способы линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен охватывают различные области концентрации субстрата, когда возможны отклонения от линейности. Поэтому значения, определенные разными способами, целесообразно сравнивать между собой.

### 5.1.6. Аллостерические эффекты. Многосубстратные реакции

Следует отметить некоторые ограничения применения уравнения Михаэлиса – Ментен, обусловленные множественными формами ферментов и их аллостерической природой. В этом случае зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата (кинетическая кривая) будут не гиперболического вида, а могут иметь экстремумы или носить сигмоидный характер ( $S$ -образная кривая). Такие экспериментальные результаты нельзя описать уравнением Михаэлиса – Ментен,

что связано с изменением механизма реакций. Известно несколько механизмов, приводящих к немихаэлисовым зависимостям. Отклонения от уравнения Михаэлиса – Ментен могут быть вызваны ингибированием или активацией реакции избытком субстрата, а также аллостерическими эффектами.

**Аллостерические эффекты. Уравнение Хилла.** В свое время большое внимание исследователей привлекали часто наблюдаемые отклонения от уравнения Михаэлиса – Ментен, приводящие к *S*-образной зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Впервые такая модель была рассмотрена Р. Хиллом в 1909 г. при интерпретации зависимости степени насыщения гемоглобина кислородом от парциального давления кислорода. По сути, степень насыщения гемоглобина кислородом и степень насыщения фермента субстратом эквивалентны и могут рассматриваться в рамках одного подхода.

Существуют белки с несколькими центрами связывания, между которыми наблюдается взаимодействие, т. е. связывание одного или нескольких лигандов – низкомолекулярных соединений – изменяет аффинность по отношению к другим лигандам. Данный феномен называют кооперативностью. Положительная или отрицательная кооперативность встречается, если аффинность белка к другим лигандам соответственно возрастает или снижается. Гомотропная или гетеротропная кооперативность проявляется, если связывание определенного лиганда влияет на аффинность белка по отношению к другому лиганду идентичного или другого типа.

К таким белкам относятся аллостерические ферменты с олигомерной структурой, т. е. состоят из нескольких субъединиц, объединенных в единое целое связями слабого характера. Аллостерические ферменты наряду с активными центрами имеют специальные регуляторные (аллостерические) центры. Активные и аллостерические центры пространственно разобщены. Для аллостерических ферментов характерным свойством является наличие кооперативных эффектов. К аллостерическим центрам могут присоединяться низкомолекулярные соединения, называемые эффекторами (аллостерические регуляторы), в качестве которых могут выступать гормоны, ионы металлов, кофакторы, иногда – субстраты. Молекула эффектора, связываясь в аллостерическом центре, вызывает в молекуле фермента конформационные изменения, затрагивающие активный центр, в результате чего изменяется его сродство к субстрату или эффектору. Эффекторы обратимо взаимодействуют с аллостерическими центрами. Действие эффекторов, как правило, наблюдается при определенной концентрации субстрата. Положительные эффекторы увеличивают активность фермента (активаторы), отрицательные (ингибиторы) – понижают. Термин «аллостерический» был предложен Ж. Мано и Ф. Жакобом в 1961 г.

Аллостерические ферменты (*E*), проявляющие положительную кооперативность, имеют сигмоидную зависимость скорости реакции (*v*) от концентрации субстрата (*S*) (рис. 5.5). Для интерпретации таких зависимостей применяют модель Хилла. Уравнение Хилла для описания кооперативных взаимодействий фермента с несколькими центрами связывания:

$$E + nS \leftrightarrow E \cdot S_n \rightarrow E + P,$$

$$v = \frac{V_{\max} S^n}{K_d + S^n}, \quad (5.25)$$

где *v* – скорость ферментативной реакции; *V*<sub>max</sub> – максимальная скорость реакции при концентрации субстрата, стремящейся к бесконечности; *K*<sub>d</sub> – константа дис-

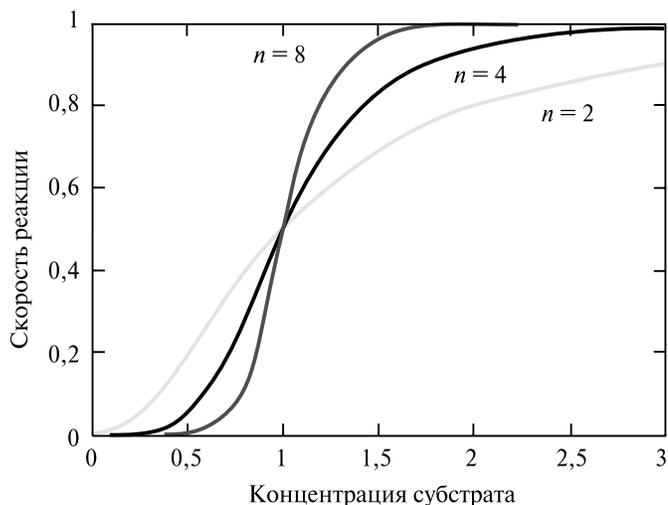


Рис. 5.5. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата для аллостерических ферментов

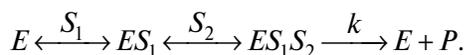
социации комплекса  $E \cdot S_n$ ;  $n$  — суммарное число связывающих центров в олигомерной молекуле фермента или коэффициент Хилла.

Коэффициент Хилла является мерой силы кооперативных взаимодействий при связывании лиганда. Коэффициент Хилла должен быть целым числом, но экспериментально определяемые величины часто не являются таковыми. В этих случаях за число связывающих участков принимают следующее большее по величине целое число.

**Многосубстратные реакции.** Ферменты катализируют, как правило, реакции с участием двух субстратов. Односубстратные реакции в большинстве случаев являются частным случаем двусубстратных, протекающих в режиме большого избытка одного из компонентов реакции. Например, гидролитические реакции происходят при постоянном избытке воды, в силу чего имеют кажущийся односубстратный характер. Известны случаи, когда механизм каталитического действия включает взаимные реакции большого числа субстратов.

При анализе механизмов многосубстратных реакций полезную информацию дает исследование зависимостей скоростей реакций от концентрации всех субстратов. Эти зависимости позволяют определить механизмы и получить определенную информацию о возможной последовательности стадий. В реакции с двумя субстратами участвуют активный центр  $E$ , субстрат  $S_1$ , субстрат  $S_2$  и возможны два принципиально разных механизма реакции.

Первый заключается в том, что активный центр фермента последовательно образует комплексы с первым ( $ES_1$ ) и вторым субстратом ( $ES_1S_2$ ), а лимитирующей стадией является реакция, протекающая в тройном комплексе (константа скорости  $k$ ):



Второй механизм заключается в том, что стадии взаимодействия субстратов с активным центром фермента разделены каким-либо необратимым химическим превращением (пинг-понг-механизм):



На первой стадии происходит образование комплекса активного центра с первым субстратом ( $ES_1$ ) (константа скорости  $k_1$ ). За этим следует химическое превращение образовавшегося комплекса с образованием интермедиата  $X$ , с которым необратимо реагирует второй субстрат  $S_2$ . Комплекс  $XS_2$  распадается с образованием продукта ( $P$ ) (константа скорости  $k_2$ ).

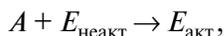
Из эксперимента можно определить механизм реакции. Для этого исследуют зависимость скорости реакции от концентрации одного субстрата при постоянной концентрации другого, варьируя от серии к серии экспериментов концентрацию последнего. Для пинг-понг-механизма графики зависимости скорости реакции от концентрации в двойных обратных координатах ( $1/v - 1/S$ ) будут представлены серией параллельных прямых, для механизма с образованием тройного комплекса — серией пересекающихся в одной точке прямых.

## 5.2. Ферментативные эфффекторы

### 5.2.1. Активаторы и необратимые ингибиторы

Ферментативные эфффекторы — это вещества, изменяющие скорость ферментативного катализа и регулирующие за счет этого метаболизм. Среди них различают ингибиторы, которые замедляют скорость реакции, и активаторы, ускоряющие ферментативную реакцию.

*Активаторы* ферментативного катализа действуют через различные механизмы. Они могут защищать молекулу фермента от инактивирующих воздействий или же образуют с субстратом комплекс, который более активно связывается с активным центром фермента. Активаторы ( $A$ ) могут активировать фермент для катализа по следующей схеме:



Например, взаимодействуя с ферментом, имеющим четвертичную структуру, активаторы разъединяют его субъединицы ( $SE$ ) и тем самым открывают доступ субстрату к активному центру (рис. 5.6). В качестве активаторов могут выступать ионы (например, катионы  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ ), анионы относительно неспецифичны. Наличие неизвестной концентрации активатора в образце может привести к ошибкам в анализе.

*Ингибиторы* — это вещества, подавляющие каталитическую активность ферментов. Взаимодействуя с активным центром фермента, ингибиторы по тому или иному механизму прерывают каталитический цикл и таким образом уменьшают скорость ферментативной реакции. Различают два основных класса ингибиторов — обратимые и необратимые.

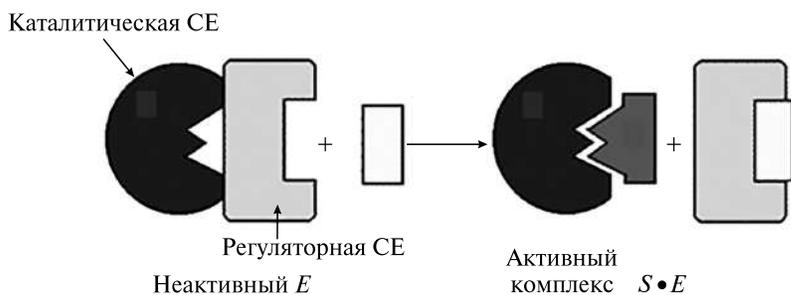


Рис. 5.6. Активирование фермента, имеющего четвертичную структуру

*Необратимые ингибиторы* (или инактиваторы) инактивируют фермент, образуя с его аминокислотами или другими компонентами структуры химическую связь. Обычно это ковалентная связь с одним из участков активного центра. Такой комплекс практически не диссоциирует в физиологических условиях. В другом случае ингибитор нарушает конформационную структуру молекулы фермента, тем самым вызывая его денатурацию. Необратимые ингибиторы просто уменьшают концентрацию активного фермента в образце.

Необратимыми ингибиторами ферментов могут выступать сильные яды и многие лекарственные вещества природного или синтетического происхождения. Метаболитами также бывают ингибиторы ферментов в процессах регуляции.

Необратимыми ингибиторами являются фторсодержащие фосфорорганические соединения, используемые в качестве пестицидов или боевых отравляющих веществ (например, зарин, заман, ви-газ). Яркий пример необратимого ингибирования – ингибирование ацетилхолинэстеразы фторорганическими соединениями. Ацетилхолинэстераза катализирует гидролиз ацетилхолина, избыток которого может полностью блокировать передачу нервного импульса через синапс. Фосфорилируя активный центр ацетилхолинэстеразы, соединения этого класса образуют прочные химически инертные соединения, блокируя центральную нервную систему человека, животного или насекомого. Классическим примером

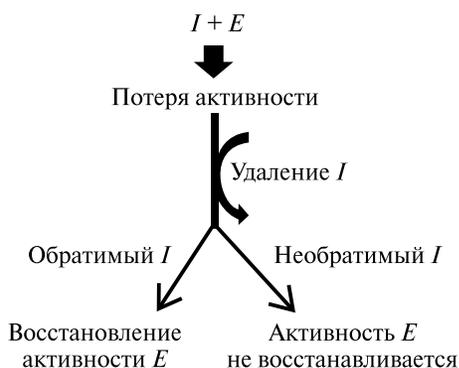


Рис. 5.7. Схема действия ингибитора ( $I$ ) на фермент ( $E$ )

необратимого ингибитора является цианид-ион или монооксид углерода, взаимодействующий с гем-содержащими ферментами или переносчиками кислорода. Образова комплексы с гем-содержащими белками, эти соединения необратимо выводят их из биохимических процессов.

При необратимом ингибировании имеет место реакция второго порядка активного центра фермента ( $E$ ) и ингибитора ( $I$ ), протекающая с образованием неактивного ферментативного производного ( $EI$ ). Большинство ингибиторов ферментов действуют обратимо, т. е. не вносят в молекулу фермента каких-либо изменений после своей диссоциации. Основным вопросом, требующим решения при изучении подавления ферментативной активности, является выяснение обратимости или необратимости эффекта ингибирования. Для этого из системы необходимо вывести ингибитор, например, диализом или гель-фильтрацией. Если фермент восстанавливает каталитическую активность, значит, имеем дело с обратимым ингибитором, если активность фермента не восстанавливается – ингибирование необратимо (рис. 5.7).

### 5.2.2. Обратимые ингибиторы

*Обратимые* ингибиторы воздействуют на специфическую активность и параметры уравнения Михаэлиса – Ментен ( $K_M, V_{max}$ ). Собственно процесс ингибирования в данном случае представляет собой полное или частичное подавление активности фермента при сохранении его первичной и пространственной структуры. Обратимые ингибиторы связываются с ферментами посредством нековалентных взаимодействий. Действие обратимых ингибиторов может быть снято избытком субстрата или добавлением веществ, изменяющих химическую структуру ингибитора.

Обратимые ингибиторы в отличие от необратимых образуют с ферментом динамический комплекс, отличающийся по своим кинетическим свойствам от свободного фермента. Характерная черта обратимого ингибирования – наличие равновесия между ферментом и ингибитором. При этом константа равновесия, или *константа ингибирования* ( $K_I$ ), служит мерой сродства фермента и ингибитора и выражает эффективность действия ингибитора.

Можно выделить следующие типы обратимого ингибирования – конкурентное, неконкурентное, бесконкурентное, а также ингибирование смешанного типа. Принцип действия ингибитора и тип его ингибирования определяют путем сравнения кинетики реакции в присутствии ингибитора и без него.

Классическая кинетическая схема обратимого ингибирования односубстратных ферментативных реакций в общем виде представлена на рис. 5.8.

Обратимый ингибитор ( $I$ ) может связываться с ферментом ( $E$ ), фермент-субстратным комплексом ( $E \bullet S$ ) или с обоими одновременно. Константа диссоциации комплекса ( $EI$ ) или ( $ESI$ ) называется константой ингибирования  $K_I$ . Чем ниже константы ингибирования, тем эффективнее действует ингибитор.

Для получения уравнения начальной скорости реакции ( $v_0$ ) в измеряемых величинах ( $[E]_0, [S], [I]$ ) (в условиях квазистационарного состояния) нужно учитывать, что фермент расходуется на образование комплекса не только с субстратом, но и с ингибитором. Поэтому в случае обратимого ингибирования в уравнение матери-

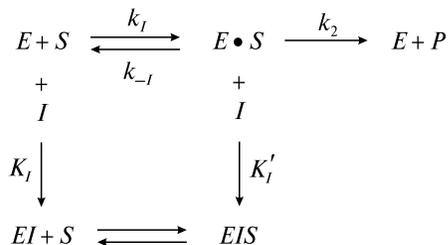


Рис. 5.8. Схема различных типов обратимого ингибирования активности односубстратного фермента

ального баланса для фермента (5.4) вводят величины  $[EI]$  (конкурентное и неконкурентное ингибирование) и  $[EIS]$  (неконкурентное и бесконкурентное ингибирование). Концентрацию комплекса «фермент – ингибитор» выражают через общую концентрацию ингибитора  $[I]$ , используя уравнения констант ингибирования.

Для обратимого ингибирования уравнение Михаэлиса – Ментен можно представить в общем виде:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{\alpha' + \frac{\alpha K_M}{[S]}}, \quad (5.26)$$

где  $\alpha = 1 + [I]/K_I$ ;  $\alpha' = 1 + [I]/K'_I$ .

В условиях отсутствия обратимого ингибирования  $\alpha = \alpha' = 1$ .

Уравнение Лайнуивера – Берка для данной формулы скорости имеет вид

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{V_{\max}} + \left( \frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]}. \quad (5.27)$$

*Конкурентный ингибитор* конкурирует с субстратом за связывание с активным центром фермента, и в результате присоединения ингибитора к ферменту не происходит образования продукта. Строение молекулы конкурентного ингибитора сходно со структурой субстрата и/или почти совпадает с поверхностью активного центра. Степень этого сходства может быть выше, чем с субстратом. При этом концентрация способного к катализу фермента снижается и скорость образования продуктов реакции резко падает.

Конкурентное ингибирование зависит от соотношения «ингибитор – субстрат» и не зависит от абсолютной концентрации ингибитора. Субстрат в высоких концентрациях вытесняет ингибитор с фермента. Конкурентное ингибирование наблюдается, если степень ингибирования уменьшается при увеличении концентрации субстрата.

В качестве конкурентных ингибиторов выступает большое число химических веществ эндогенного и экзогенного происхождения. Эндогенные вещества являются регуляторами метаболизма и называются антиметаболитами. Многие из них используются при лечении онкологических и микробных заболеваний, так как они ингибируют ключевые метаболические реакции микроорганизмов (например,

сульфаниламиды) и опухолевых клеток. Однако при избытке субстрата и малой концентрации конкурентного ингибитора его действие отменяется.

Ингибитор ( $I$ ) связывается с ферментом обратимо и образует неактивный комплекс ( $EI$ ) (см. рис. 5.8, 5.9).

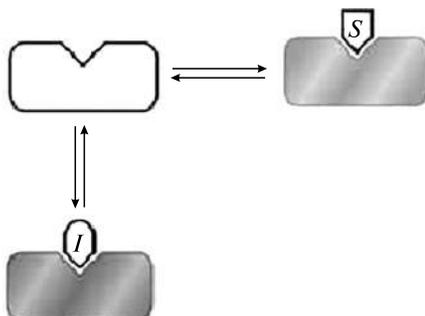


Рис. 5.9. Схема действия конкурентного ингибитора

Константа диссоциации комплекса ( $EI$ ) называется константой ингибирования  $K_I$  и выражается уравнением

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}. \quad (5.28)$$

Уравнение Михаэлиса – Ментен в присутствии конкурентного ингибитора (в условиях квазистационарного состояния, т. е.  $d[E \bullet S]/dt = 0$ , имеет вид

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}. \quad (5.29)$$

Для конкурентного ингибитора  $\alpha > 1$ ,  $\alpha' = 1$ .

При постоянной концентрации ингибитора и возрастающей концентрации субстрата скорость реакции стремится к предельной скорости ( $V_{\max}$ ), при постоянной концентрации субстрата и возрастающей концентрации ингибитора – к нулю.

Константа Михаэлиса, связанная с константой ингибирования нижеприведенным выражением, называется эффективной (кажушейся) константой и зависит от величин  $[I]$  и  $K_I$ :

$$K_{M, \text{эф}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right). \quad (5.30)$$

Значение  $[S]$  при  $v_0 = V_{\max}/2$  есть  $K_{M, \text{эф}}$ .

В случае ингибирования важным является не только определение величины константы Михаэлиса, предельного значения скорости, но и константы ингибирования. Из выражения (5.30) можно рассчитать константу конкурентного ингибирования.

Экспериментально данные параметры можно найти, решая задачу графическим методом, например в координатах Лайнуивера – Берка:  $1/v_0 - 1/[S]$ . Уравнение Лайнуивера – Берка для данной формулы скорости имеет вид

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \left( \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]}. \quad (5.31)$$

Графическое представление уравнения скорости по методу Лайнуивера – Берка дает прямую с наклоном  $(1 + [I]/K_I)K_M/V_{\max}$ , точка пересечения с осью  $Y$  – значение  $1/V_{\max}$ , а точка пересечения с осью  $X$  – значение  $-1/K_{M, \text{эф}}$  (рис. 5.10). Одинаковые участки оси  $Y$  отсекаются прямыми для разных концентраций ингибитора, в то время как отрезок на оси  $X$  уменьшается с увеличением концентрации ингибитора.

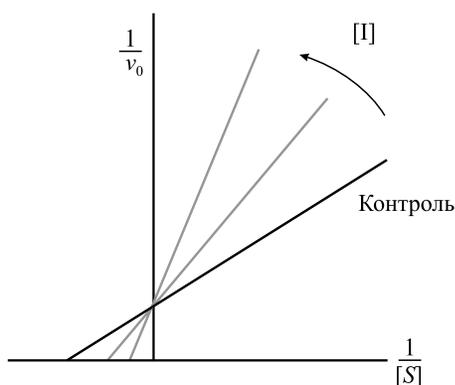


Рис. 5.10. График Лайнуивера – Берка для конкурентного ингибирования активности фермента

В двойных обратных координатах серия экспериментальных кривых, полученных при различных концентрациях ингибитора, будет представлена пучком прямых, пересекающихся в точке  $1/V_{\max}$  (см. рис. 5.10). Получение прямых для разных концентраций ингибитора позволяет диагностировать вид ингибирования. Данный метод можно использовать для определения структуры активного центра фермента.

Максимальная скорость  $V_{\max}$  при этом типе торможения не зависит от присутствия ингибитора (не изменяется), а константа Михаэлиса  $K_M$  растет. Чем больше концентрация конкурентного ингибитора, тем больше кажущаяся величина константы Михаэлиса.

*Неконкурентное ингибирование* выражается в том, что и ингибитор, и субстрат присоединяются к ферменту, не конкурируя за один и тот же центр связывания.

Неконкурентные ингибиторы, как правило, имеют неприродное происхождение. Пример неконкурентного ингибирования – ингибирование  $\alpha$ -амилазы мальтозой (продуктом реакции). В промышленности применяется противогрибковый препарат этоний, который является неконкурентным ингибитором сахарозы грибов. В медицине его используют как антисептик.

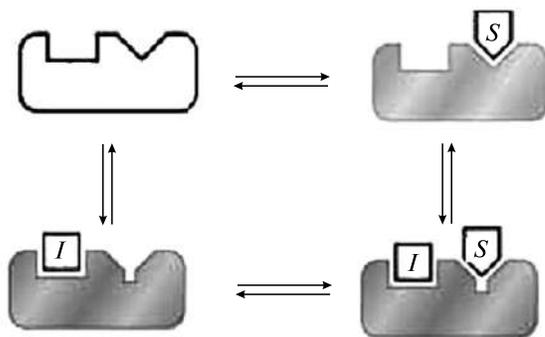


Рис. 5.11. Схема действия неконкурентного ингибитора

Неконкурентный ингибитор связывается с ферментом на участке, отличающемся от центра связывания субстрата (см. рис. 5.8, 5.11). Ингибитор связывается либо со свободным ферментом ( $E$ ), либо с фермент-субстратным комплексом ( $E \cdot S$ ), при этом обе формы комплексов ( $EI$ ) и ( $ESI$ ) неактивны, т. е. продукт не образуется. Константы ингибирования  $K_I$  и  $K'_I$  для неконкурентного типа ингибирования выражаются следующими уравнениями:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad (5.32)$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}. \quad (5.33)$$

Неконкурентные ингибиторы приводят к изменению конформации активного центра фермента, поэтому активность фермента уменьшается. Ингибитор не мешает взаимодействию субстрата с ферментом, но уменьшает скорость реакции из-за неактивности образующихся комплексов на поверхности фермента. Если такой ингибитор связывается со свободным ферментом, то ингибитор не имеет влияния на сродство фермента по отношению к его субстрату. Неконкурентный ингибитор влияет на каталитические функции фермента, а не на его способность связывать субстрат.

Неконкурентное ингибирование зависит от абсолютной концентрации ингибитора и не зависит от соотношения «ингибитор – субстрат». Ингибиторы взаимодействуют с ферментом вне активного центра, и избыток субстрата не влияет на их ингибирующую способность, как в случае с конкурентными ингибиторами. Если достигается обратимость ингибирования, т. е. восстановление активности фермента под действием отличных от субстрата веществ, такое ингибирование называется неконкурентным.

Уравнение Михаэлиса – Ментен при равенстве констант ( $K_I = K'_I$ ) для неконкурентных ингибиторов имеет вид

$$v_0 = \frac{[S]}{[S] + K_M} \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}. \quad (5.34)$$

Для неконкурентного ингибитора  $\alpha = \alpha' > 1$ . В этом случае константа Михаэлиса остается постоянной величиной, а изменяется (уменьшается) максимальная скорость процесса, которую можно представить уравнением

$$V_{\max, \text{эф}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}. \quad (5.35)$$

Если  $[I] = K_I$  и  $[S] = K_M$ , то скорость реакции ингибирования будет равна  $V_{\max}/4$ .

Линеаризация уравнения (5.34) и обработка экспериментальных данных для неконкурентного ингибирования в координатах  $1/v_0 - 1/[S]$  позволяет определить  $K_M$ ,  $V_{\max}$ ,  $K_I$ , зная концентрацию ингибитора. Уравнение Лайнуивера – Берка для данной формулы скорости имеет вид

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_{\max}} + \left(\frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)K_M}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]}. \quad (5.36)$$

Графическое представление этого уравнения дает прямую с наклоном  $(1 + [I]/K_I)K_M/V_{\max}$ , точка пересечения с осью  $Y$  – значение  $(1 + [I]/K_I)/V_{\max}$ .

Графики, полученные для разных концентраций ингибитора, различаются по наклону, не имеют общей точки пересечения на оси ординат (рис. 5.12). Отрезок, отсекаемый на оси ординат, для ингибированного фермента больше, чем для свободного, что указывает на снижение  $V_{\max}$  в присутствии неконкурентного ингибитора. При пересечении с осью абсцисс в области отрицательных величин прямые дают различные отрезки, но при равенстве  $K_I = K_I'$  они имеют одну точку пересечения – значение  $(-1/K_M)$ .

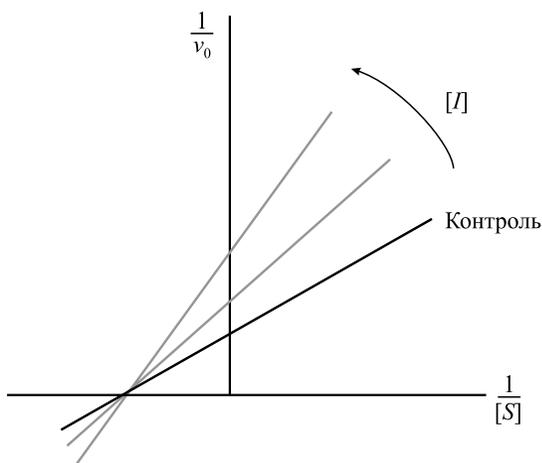


Рис. 5.12. График Лайнуивера – Берка для конкурентного ингибирования ( $K_I = K_I'$ )

Устранить снижение  $V_{\max}$  в случае неконкурентного ингибирования не удастся, как бы ни была высока концентрация субстрата. Однако данные ингибиторы не имеют значительного влияния на константу Михаэлиса.

Примером неконкурентного ингибирования является действие реагентов, обратимо связывающихся с тиогруппами ( $-\text{SH}$ ) остатков цистеина в белках. Ионы тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ ) и их производные ингибируют такие ферменты с образованием меркаптидов.

При *бесконкурентном ингибировании* ингибитор связывается исключительно с фермент-субстратным комплексом, но не со свободным ферментом, т. е. бесконкурентный ингибитор в отсутствие субстрата не присоединяется к ферменту (рис. 5.13).

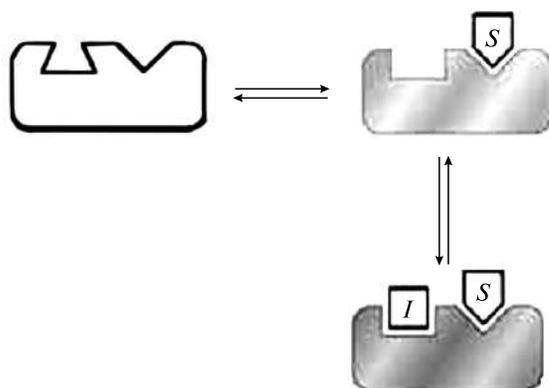


Рис. 5.13. Схема действия бесконкурентного ингибитора

Субстрат, связываясь с ферментом, изменяет его конформацию, что делает возможным связывание с ингибитором. Ингибитор, в свою очередь, так меняет конформацию фермента, что катализ становится невозможным.

Уравнение Михаэлиса – Ментен для бесконкурентных ингибиторов имеет вид

$$v_0 = \frac{[S]}{[S] + \frac{K_M}{\left(1 + \frac{K_I}{[I]}\right)}} \cdot \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_I}{[I]}\right)}. \quad (5.37)$$

Для бесконкурентного ингибитора  $\alpha = 1$ ,  $\alpha' > 1$ .

Уравнение Лайнуивера – Берка для данной формулы скорости:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_{\max}} + \left(\frac{K_M}{V_{\max}}\right) \frac{1}{[S]}.$$

Графическое представление этого уравнения дает прямую с наклоном  $K_M/V_{\max}$ , точка пересечения с осью  $Y$  – значение  $(1 + [I]/K_I)/V_{\max}$ , точка пересечения с осью  $X$  – значение  $-(1 + [I]/K_I)/K_M$ . Поскольку и константа Михаэлиса, и максимальная

скорость изменяются в равной степени, то в координатах Лайнуивера – Берка графики, построенные для разных концентраций ингибитора, имеют вид параллельных прямых (рис. 5.14). Такой вид множества прямых является диагностикой бесконкурентного ингибирования.

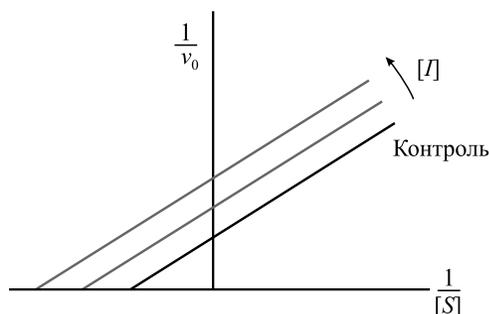


Рис. 5.14. График Лайнуивера – Берка для бесконкурентного ингибирования

Бесконкурентный ингибитор в одинаковой степени снижает  $K_M$  и  $V_{max}$ . Бесконкурентный тип ингибирования часто встречается в сложных полисубстратных реакциях.

Типы ингибирования, рассмотренные выше, являются предельными случаями в широком спектре возможных эффектов. Для многих ферментативных реакций (например, двусубстратных) при определенной концентрации ингибитора часто можно наблюдать ингибирование смешанного типа. При этом константа диссоциации комплекса  $EI$  ( $K_I$ ) не равна константе диссоциации комплекса  $EIS$  ( $K_I'$ ) и изменяются как константа Михаэлиса, так и максимальная скорость, но не в одинаковой степени.

В общем случае уравнение скорости для смешанного типа ингибирования имеет вид

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left( 1 + \frac{[I]}{K_I'} \right) + K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_I} \right)}. \quad (5.39)$$

Уравнение Лайнуивера – Берка для данной формулы скорости представляет собой следующее выражение:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\left( 1 + \frac{[I]}{K_I'} \right)}{V_{max}} + \left( \frac{\left( 1 + \frac{[I]}{K_I'} \right) K_M}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]}. \quad (5.40)$$

Графическое представление этого уравнения дает прямую с наклоном  $(1 + [I]/K_I')$   $K_M/V_{max}$ , точка пересечения с осью  $Y$  –  $(1 + [I]/K_I')/V_{max}$  (рис. 5.15).

Графики, полученные для разных концентраций ингибитора, различаются по наклону, не имеют общей точки пересечения на оси ординат (см. рис. 5.15).

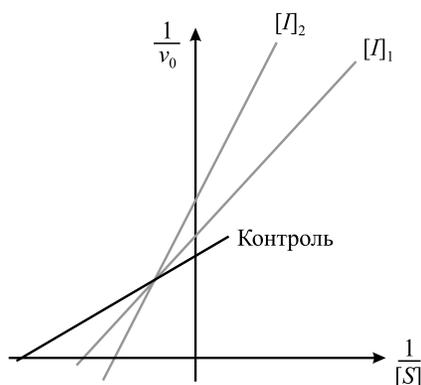


Рис. 5.15. График Лайнуивера – Берга для смешанного типа ингибирования

Отрезок, отсекаемый на оси ординат, для ингибированного фермента больше, чем для неингибированного, что указывает на снижение  $V_{\max}$  в присутствии ингибитора, действующего по смешанному типу. При пересечении с осью абсцисс в области отрицательных величин прямые дают различные отрезки:  $-\alpha'/\alpha K_M$ .

В случае смешанного конкурентно-неконкурентного ингибирования  $K_I'$  и  $K_I$  сродство фермента к субстрату в присутствии ингибитора данного типа увеличивается, а максимальная скорость ферментативной реакции снижается. Для смешанного неконкурентно-бесконкурентного ингибирования  $K_I > K_I'$  снижаются и константа Михаэлиса, и максимальная скорость реакции.

**Субстратное ингибирование.** Для многих ферментативных реакций при увеличении концентрации субстрата начальная скорость ферментативной реакции проходит через экстремумы, что вызвано субстратным ингибированием. Субстратным ингибированием называется торможение ферментативной реакции, вызванное избытком субстрата. Такое ингибирование происходит вследствие образования фермент-субстратного комплекса, неспособного подвергнуться дальнейшим каталитическим превращениям, что делает молекулу фермента неактивной. Действие субстратного ингибитора снимается путем уменьшения концентрации субстрата.

Подобного рода зависимость можно описать исходя из предположения об образовании в процессе реакции непродуктивного тройного комплекса «фермент – субстрат – субстрат». В этом случае кинетическая схема ферментативной реакции будет выглядеть аналогично схеме бесконкурентного ингибирования.

### 5.2.3. Методы определения констант ингибирования

Величины констант ингибирования ( $K_I$ ) можно определить различными методами, как экспериментально, так и при помощи расчетов. Если известна только одна концентрация ингибитора, то константу ингибирования можно определить, используя метод линеаризации Лайнуивера – Берка. Находят кажущиеся и истинные значения константы Михаэлиса и максимальной скорости для двух графиков (в отсутствии и присутствии ингибитора) и, подставив эти значения в соответствующие уравнения, рассчитывают константу ингибирования.

Для определения константы ингибирования используют также *метод Диксона* (М. Dixon, 1953). Этот простой графический метод позволяет определять константу  $K_I$  из графиков зависимости  $1/v_0$  от  $[I]$ , построенных при различных значениях  $[S]$ , для разных типов ингибирования. В данном случае для определения константы ингибирования достаточно определить скорость реакции всего для двух концентраций субстрата. Зависимость  $1/v_0$  от  $[I]$  графически изображается прямой.

Прямые линии, полученные для различных концентраций субстрата, пересекаются в точке на оси абсцисс  $[I] = -K_I = K'_I$  для неконкурентного ингибитора (рис. 5.16). Если построены две подобные зависимости при разных значениях  $[S]$ , то абсциссу точки пересечения можно найти, приняв два выражения для  $1/v_0$ .

Прямые линии, полученные для различных концентраций субстрата, пересекаются в точке с абсциссой  $[I] = -K_I$  и ординатой  $1/V_{\max}$  (для конкурентного ингибитора) или  $(1 - K_I/K'_I)/V_{\max}$  (для смешанного типа ингибирования) (см. рис. 5.16). Из этого следует, что недостаток метода Диксона заключается в невозможности однозначно различать константу ингибирования для конкурентного и смешанного типов ингибирования.

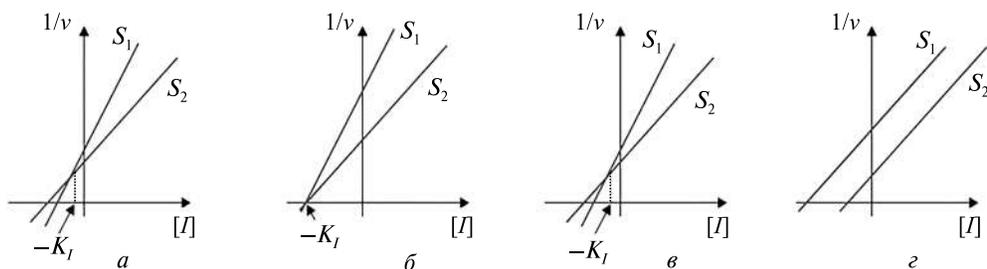


Рис. 5.16. График Диксона для обратимого ингибирования:

*a* – конкурентное; *б* – неконкурентное; *в* – смешанное; *г* – бесконкурентное ( $S_2 > S_1$ )

Ограничения метода Диксона состоят также в том, что он не позволяет определить константу ингибирования  $K'_I$ , т. е. константу диссоциации комплекса  $EIS$ . В случае бесконкурентного типа ингибирования зависимости  $1/v_0$  от  $[I]$ , полученные по методу Диксона для различных концентраций субстрата ( $K_I \rightarrow \infty$ ), представляют серию параллельных прямых линий.

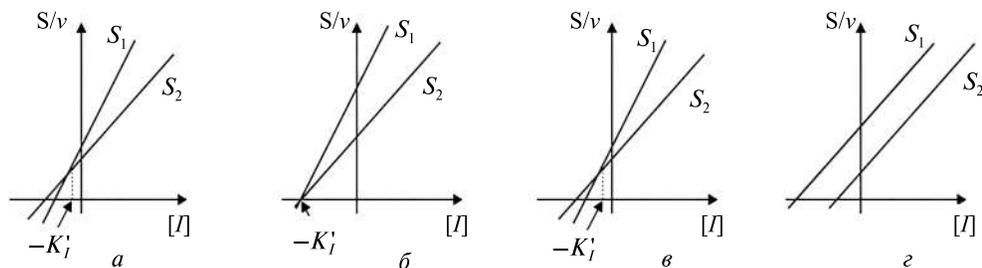


Рис. 5.17. График Корниш-Боудена для обратимого ингибирования:

*a* – бесконкурентное; *б* – неконкурентное; *в* – смешанное; *г* – конкурентное ( $S_1 > S_2$ )

Константу  $K_I'$  можно найти, построив зависимость  $[S]/v_0$  от  $[I]$  для ряда значений  $[I]$  по методу, предложенному Э. Корниш-Бовденом (А. Cornish-Bowden, 1974). В этом случае для бесконкурентного ингибирования получается серия прямых линий, пересекающихся в точке с абсциссой  $[I] = -K_I'$  и ординатой  $K_M/V_{\max}$  (рис. 5.17). Однако данный метод не позволяет однозначно различать бесконкурентное и смешанное ингибирование. В случае смешанного типа ингибирования прямые пересекутся в точке с абсциссой  $[I] = -K_I$  и ординатой  $K_M[1-(K_I'/K_I)]/V_{\max}$ . Метод не подходит для определения константы ингибирования при конкурентном типе ингибирования ( $K_I \rightarrow \infty$ ), так как дает набор параллельных прямых. В случае неконкурентного ингибирования прямые линии, полученные для различных концентраций субстрата, пересекаются в точке на оси абсцисс  $[I] = -K_I' = K_I$ .

### 5.3. Факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры, значения рН и ионной силы среды, состава буфера, концентрации субстрата и фермента, присутствия ферментных эффекторов. Варьирование условий реакции обуславливает изменение константы скорости реакции или ее механизма. Для определения активности фермента значения  $T$  и рН раствора, а также состав буфера поддерживают постоянным.

Связь начальной скорости и концентрации субстрата и фермента выражается через уравнение Михаэлиса – Ментен. Основные особенности ферментативной реакции следующие. При заданной (фиксированной) начальной концентрации субстрата ( $[S]_0$ ) начальная скорость образования продукта пропорциональна общей концентрации фермента ( $[E]_0$ ). При заданной концентрации фермента  $[E]_0$  и низком значении  $[S]_0$  начальная скорость образования продукта пропорциональна концентрации субстрата  $[S]_0$ . При заданной концентрации фермента  $[E]_0$  и высоком значении  $[S]_0$  начальная скорость образования продукта не зависит от концентрации субстрата  $[S]_0$  и достигает предельного значения – максимальной скорости.

*Температура* влияет на активность фермента по большей части так же, как на протекание других химических реакций. Особенности в первую очередь связаны с многостадийностью ферментативных превращений.

Зависимость термодинамической константы равновесия реакции ( $K$ ) от температуры ( $T$ ) выражает уравнение Вант-Гоффа:

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}.$$

График зависимости  $\ln K$  от  $(1/T)$  имеет вид прямой с тангенсом угла наклона, равным  $-\Delta H/R$ . Зная величину энтальпии  $\Delta H$  равновесного процесса и свободную стандартную энергию процесса при данной  $T$  с учетом, что  $\Delta G^0 = -RT \ln K$ , можно найти величину энтропии процесса.

Однако следует иметь в виду, что большинство определяемых в ферментативной кинетике констант равновесия являются эффективными величинами, а не истинными.

Зависимость константы скорости реакции ( $k$ ) от температуры определяется уравнением Аррениуса:

$$k = Ae^{-E_A/RT},$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT},$$

где  $E_A$  – энергия активации реакции;  $R$  – универсальная газовая постоянная (8,31 Дж/мольК);  $A$  – предэкспоненциальный фактор.

График зависимости  $\ln k$  от ( $1/T$ ) представляет собой прямую с тангенсом угла наклона ( $-E_A/R$ ), которая отсекает на оси ординат отрезок  $\ln A$ .

На практике анализ зависимостей констант скоростей ферментативных реакций от температуры проводится аналогично анализу температурных зависимостей неферментативных реакций. Однако зачастую для реакций, катализируемых ферментами, аррениусовская зависимость ( $\ln k$ ,  $1/T$ ) имеет вид линии с изломом. Это можно объяснить как сменой лимитирующей стадии реакции при изменении температуры, так и переходом активного центра молекулы фермента в узком температурном интервале в другое конформационное состояние со сменой активационных параметров реакции.

Повышение температуры на один градус увеличивает скорость ферментативной реакции примерно на 4–8 %. Однако при высокой температуре может наступить денатурация белка, что приведет к снижению выхода продукта ферментативной реакции.

Для скоростей ферментативных реакций характерно наличие интервала температуры, в котором скорость максимальная. Уменьшение температуры вызывает снижение скорости химической реакции за счет уменьшения числа молекул фермента и субстрата с высокой энергией, что соответствует обычной химической кинетике. Поскольку ферменты являются белковыми молекулами, увеличение температуры приводит к их «плавлению», а затем и к денатурации. Поэтому увеличение температуры больше определенных значений обычно вызывает уменьшение скорости ферментативной реакции.

Наибольшую активность тот или иной фермент проявляет при оптимальной температуре. Значение температуры, при котором достигается максимальная скорость катализируемой реакции, называют температурным оптимумом фермента. Для ферментов животного организма в зависимости от его вида это значение находится в пределах от 30 до 40 °С (+37,0 ... +39,0 °С); для растительных ферментов – 60–70 °С, а у термофильных бактерий этот диапазон может быть еще выше. При понижении температуры замедляется броуновское движение, уменьшается скорость диффузии и, следовательно, замедляется процесс образования комплекса между ферментом и компонентами реакции (субстратами).

Активность ферментов на практике определяют при фиксированной температуре, как правило, при 25, 30 или 37 °С, допустимы колебания лишь в  $\pm 0,1$  °С. К примеру, при 37 °С активность фермента альдолазы в 2,4 раза выше, чем при 25 °С.

Ферментативная активность зависит от *pH среды*. Макромолекулы белка содержат ионогенные группы, то же относится и к большинству субстратов, модификаторов и коферментов. Изменение pH может трансформировать состояние

ионогенных групп в активном центре фермента или соседствующих с ним. Изменение водородного показателя также может влиять на состояние неферментативных компонент системы и на структуру белковой глобулы локально или целиком. Таким образом, сдвиг рН может оказать сильное влияние на скорость ферментативной реакции. Для большинства ферментов существует определенное оптимальное значение рН, при котором их активность максимальна. Значение рН, при котором достигается максимальная скорость катализируемой реакции, называют рН-оптимумом фермента. У разных ферментов он может существенно отличаться. К примеру, рН-оптимум пепсина составляет 1,5, а щелочной фосфатазы – 9–10, хотя для большинства внутриклеточных ферментов он лежит в интервале 6–8 ед. рН. Очевидно, что среда, в которой проводят ферментативную реакцию и тем более определение активности фермента, должна иметь рН, близкий к рН-оптимуму данного фермента.

Поскольку в клетке содержатся сотни ферментов, и для каждого из них существуют свои пределы оптимального значения рН, то изменение рН – это один из важных факторов регуляции ферментативной активности. Например, в результате химической реакции, катализируемой ферментом с рН-оптимумом в пределах 7,0–7,2, образуется продукт, который является кислотой. После образования кислого продукта значение рН смещается в область рН 5,5–6,0. Активность фермента резко снижается, скорость образования продукта замедляется, но при этом активизируется другой фермент, для которого эти значения рН оптимальны, и продукт первой реакции подвергается дальнейшему химическому превращению.

*Ионная сила среды (I)* и химический состав буферного раствора также влияют на скорость ферментативной реакции. Влияние ионной силы на активность ферментов неоднозначно, так как она действует при различных концентрациях соли в растворе. Некоторые ферменты максимально активны при очень низких значениях *I*, в то время как другие требуют значительного количества соли. Большинство теряет свою активность при высокой *I* ( $> 0,5$  моль/л). Для многих ферментов активность варьируется с изменением *I*, поэтому значение ионной силы при проведении анализа должно точно фиксироваться. Физиологическое значение ионной силы обычно находится в интервале от 0,15 до 0,2 моль/л.

Буфер должен обладать достаточной емкостью и по возможности поддерживать низкой ионную силу раствора. Обычно концентрации буферных растворов варьируют от 0,01 до 0,10 моль/л. Природа буфера также часто важна, например щелочная фосфатаза при одинаковых субстратах и значениях рН в буфере на базе диэтанолamina в 2–4 раза активнее, чем в буфере на основе 2-амино-2-метилпропана.

На практике при работе с ферментами нужно соблюдать определенные правила. Необходимо учитывать, что в разбавленных растворах ферменты часто нестабильны и склонны к денатурации и диссоциации, кроме того, на них могут оказывать влияние кислород и ионы тяжелых металлов. Некоторые ферменты адсорбируются на стенках стекла, тогда раствор готовится в присутствии большого избытка (100 раз) инертного белка (альбумин) для поддержания активности. Коммерческие ферменты часто представляют собой суспензию в сульфате аммония, в водном растворе глицерина или являются лиофилизированными препаратами. Рабочие растворы ферментов готовятся в буфере. Разбавление ферментов осуществляется с помощью воды или буфера. При высоком разведении суспензия предварительно разбавляется 3,2 М раствором сульфата аммония, глицериновый раствор фермента – 50 % раствором глицерина максимально до соотношения 1 : 10. Разбав-

ление раствора пробы допускается только буфером. Нужно помнить, что многие биохимические буферы — отличная среда для роста бактерий.

Для предотвращения денатурации ферментов нужно избегать температуры выше 40 °С, значений рН больше девяти или меньше пяти, присутствия органических растворителей, детергентов и следов металлов.

## 5.4. Активность, каталитическая константа и эффективность ферментов

Концентрацию ферментов можно выражать так же, как и для некаталитических веществ в общепринятых единицах (М и масса/объем). Однако концентрация ферментов редко представляется в классических единицах, потому что они не дают информации о каталитической силе приготовленного раствора или очень трудно найти концентрацию фермента в пробе, так как он присутствует в очень низких количествах. Обычно концентрацию раствора фермента выражают через активность. Активность ферментов определяют в самых различных образцах (почва, биожидкость, продукты питания, технологические ферментные препараты и др.).

*Каталитическая активность* фермента — мера мощности (производительности) фермента. Каталитическая активность фермента выражается через скорость, с которой протекает катализируемая реакция. Активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях (рН и  $T$ ) на начальном линейном участке кинетической кривой. Она определяется посредством измерения либо расхода субстрата, либо приращения продукта за единицу времени. Активность фермента определяют в условиях насыщения фермента субстратом. Для этого концентрация субстрата должна в десять раз превышать константу  $K_M$  для данной реакции (то же верно и для косубстрата), кроме того, должно соблюдаться условие  $[E]_0 < 0,001[S]_0$ .

Скорость ферментативной реакции, а значит, и активность фермента зависит от природы субстрата и с различными субстратами для одного и того же фермента может отличаться в несколько раз.

Активность ферментов выражают разными способами. Международная единица активности (МЕ, U, E, Ед) (с 1961 г.) — количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин при заданной температуре и рН в условиях насыщения субстратом.

Катал (кат) (с 1972 г.) — количество катализатора (фермента), способное превращать 1 моль субстрата за 1 с. Катал является системной единицей ( $1 \text{ кат} = 6 \cdot 10^7 \text{ МЕ}$ ).

Удельная активность — число единиц активности (любых из вышеперечисленных) в исследуемом образце к общей массе фермента в этом образце (при заданных  $T$  и рН). Другое понятие, используемое в англоязычной литературе, — удельная активность — число МЕ на единицу веса твердого фермента, как правило, МЕ/мг. Удельная активность рассматривается как мера чистоты фермента: чем выше удельная активность фермента, тем больше его чистота.

В медицине концентрацию ферментов в биологических жидкостях принято выражать в объемных единицах активности. Эта концентрация представляет со-

бой число единиц активности в исследуемом образце к объему образца (МЕ/л или кат/л). Часто в медицинской практике понятия «активность» и «объемная активность» используют как синонимы для выражения концентрации, что неправильно.

*Каталитическая константа* ( $k_{\text{cat}}$ ) является фундаментальной характеристикой фермента. Константа  $k_{\text{cat}}$  — это число молекул субстрата, которое превращает молекула фермента в единицу времени в условиях субстратного насыщения, т. е. когда весь фермент находится только в форме комплекса  $E \cdot S$ . Каталитическую константу называют числом оборотов фермента, т. е. числом реакционных циклов, которые каждый активный центр фермента катализирует в единицу времени. Каталитическая константа отображает максимальную скорость, при которой может быть расходован субстрат, и обычно единицами ее измерения служат обратные секунды ( $\text{с}^{-1}$ ), т. е. единицы измерения константы скорости реакции первого порядка. Если константа  $k_{\text{cat}}$  — это число молей субстрата, конвертированных за секунду, то величина, обратная ей ( $1/k_{\text{cat}}$ ), указывает время, необходимое для одиночного акта катализа. Максимальная скорость реакции наступает при высокой концентрации субстрата, а именно когда фермент насыщен полностью субстратом, т. е. находится в форме фермент-субстратного комплекса. Каталитическую константу можно выразить как

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_{\text{общ}}}$$

Каталитическая константа специфична для используемого фермента и варьируется от фермента к ферменту, ее значение можно найти в справочных таблицах. К примеру, каталаза имеет  $k_{\text{cat}}$  порядка  $10^7$ , супероксиддисмутаза —  $10^6$ , папаин — 10, лизим —  $0,5 \text{ с}^{-1}$ . Чем большие значения принимает константа, тем быстрее и эффективнее превращается субстрат в активном центре фермента в ходе каталитического процесса.

В рамках кинетической модели Михаэлиса — Ментен для простого односубстратного фермента каталитическая константа равна константе скорости реакции распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта ( $k_{\text{cat}} = k_2$ ). Тогда скорость можно выразить через уравнение

$$v_0 = V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_{\text{общ}}$$

В случае ферментов со сложным механизмом  $k_{\text{cat}}$  является функцией нескольких констант скорости.

Если известен молекулярный вес фермента и если его чистота может быть принята за 100 %, тогда удельная активность может быть использована для оценки  $k_{\text{cat}}$ .

*Мерой каталитической эффективности* фермента служит соотношение каталитической константы и константы Михаэлиса ( $\epsilon = k_{\text{cat}}/K_M$ ,  $\text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$ ), которую еще называют константой специфичности (англ. the specificity constant). Чем больше величина  $\epsilon$ , тем эффективнее действует фермент, по сути, это коэффициент полезного действия фермента. Константа  $k_{\text{cat}}$  показывает, как быстро фермент-субстратный комплекс производит продукт, а константа  $K_M$  — как легко формируется фермент-субстратный комплекс. Константу  $\epsilon$  используют в качестве меры эффективности при сравнении различных ферментов либо для оценки относительной эффективности фермента для разных субстратов. Данную константу можно применять для сравнения скоростей реакций альтернативных, конкурирующих субстратов,

катализируемых одним и тем же ферментом. Однако не совсем корректно с помощью данной константы сравнивать действие различных ферментов на один и тот же субстрат, так как отношение скоростей двух реакций не постоянно, а будет зависеть от значения  $[S]/K_M$  (исключая случай, когда два фермента имеют одинаковые константы  $K_M$ ).

Смысл параметра ( $k_{cat}/K_M$ ) становится понятным, если рассмотреть скорость ферментативной реакции при условии, что  $[S] \ll K_M$  и комплекс  $E \bullet S$  образуется в очень малых количествах ( $[E \bullet S] \approx 0$ ). Тогда действительно допущение, что весь фермент представлен в свободном виде ( $[E] \approx [E]_{общ}$ ) и уравнение начальной скорости примет следующий вид:

$$v_0 \approx \frac{k_2 [E]_{общ} [S]}{K_M}.$$

Учитывая, что в модели Михаэлиса – Ментен для односубстратного фермента  $k_{cat} = k_2$ , получим выражение скорости второго порядка:

$$v_0 \approx \frac{k_2 [E]_{общ} [S]}{K_M} \approx \frac{k_{cat} [E] [S]}{K_M}.$$

Из последнего уравнения следует, что отношение ( $k_{cat}/K_M$ ) является константой скорости второго порядка, которая указывает, что скорость ферментативной реакции варьируется прямо пропорционально с частотой столкновения фермента и субстрата в растворе. Поэтому величина ( $k_{cat}/K_M$ ) выступает мерой каталитической эффективности фермента.

Многие ферменты – оптимальные катализаторы. Имеется ли верхняя граница каталитической активности? Учитывая выражение (5.17) для константы Михаэлиса, получим выражение

$$\frac{k_{cat}}{K_M} \approx \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} \approx k_1.$$

Соотношение  $k_{cat}/K_M$  наибольшее, если  $k_2 \gg k_{-1}$ , это значит, что образование продукта из комплекса  $E \bullet S$  следует быстрее, чем обратный распад на субстрат и фермент. При этих условиях  $k_{cat}/K_M = k_1$  (константа скорости второго порядка). Поскольку  $k_1$  является константой скорости образования комплекса  $E \bullet S$  из двух единиц, которые диффундируют через раствор, то максимальная эффективность зависит от максимальной скорости диффузии фермента и субстрата. Для такого рода диффузионно-контролируемых реакций  $k_1$  лежит в области  $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ . Поэтому теоретический верхний предел значения  $k_{cat}/K_M$  составляет  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  и определяется скоростью диффузии молекул фермента и субстрата в растворе. Ферменты с подобным значением  $k_{cat}/K_M$  должны каждый раз при встрече с молекулой субстрата катализировать реакцию с образованием продукта. Такие ферменты, как каталаза ( $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), ацетилхолинэстераза ( $1,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ), кротоназа ( $2,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) и др., обладают подобными замечательными свойствами. Активный центр фермента охватывает, однако, только маленькую часть общей площади поверхности молекулы. Каким же образом может фермент катализировать реакцию каждый раз, когда встречает молекулу субстрата? Возможно, это реализуется через периферические места связывания субстрата, поэтому каждый раз связанный субстрат следует к активным центрам через двунаправленную диффузию.

## 5.5. Методы определения субстратов и ферментов

### 5.5.1. Методы определения активности ферментов

Определять абсолютное содержание ферментов в биологических пробах целесообразно, так как существующие методы трудоемки, требуют много времени и не имеют приемлемых аналитических характеристик. Поэтому определяют активность ферментов, которая отражает абсолютное содержание фермента в пробе.

Мерой каталитической активности ферментов является скорость, с которой они катализируют ту или иную реакцию. Скорость ферментативной реакции определяют по накоплению конечных продуктов или по убыли субстрата. Для определения активности ферментов используют только кинетические методы анализа, а именно *метод начальных скоростей*, т. е. метод изучения скорости реакции в начальный момент времени. Предполагается, что за этот короткий интервал времени концентрация реагентов или продуктов меняется незначительно и скорость реакции также не изменяется (почти постоянна), поэтому количество вещества, образующегося в единицу времени, служит мерой начальной скорости реакции. В начале реакции скорость увеличивается пропорционально времени и имеет прямолинейную зависимость, но постепенно снижается вследствие уменьшения концентрации субстрата и увеличения концентрации продукта.

Активность фермента численно равна скорости ферментативной реакции в оптимальных условиях на начальном линейном участке кинетической кривой при насыщающей концентрации субстрата. Другими словами, данный метод применим для определения активности фермента, если начальная концентрация субстрата больше  $10 K_M$ , когда фермент насыщен субстратом. При этих условиях начальная скорость не зависит от концентрации субстрата и прямо пропорциональна концентрации фермента.

На скорость ферментативной реакции влияют температура, pH среды, ионная сила раствора, присутствие в реакционной среде эффекторов, поэтому при проведении анализа должны строго соблюдаться оптимальные условия. Активность фермента определяют в строго определенных условиях (вид субстрата,  $[E]$ ,  $[S]$ , T, pH, состав буфера), оптимальных для конкретного фермента.

Аналитические методы измерения активности фермента могут быть непрерывными (англ. continuous assay) или дискретными, т. е. измерения снимаются за фиксированный интервал времени (англ. fixed-time assay).

Все измерения должны быть выполнены с соответствующим контролем, который содержит все те же компоненты, как и анализируемая проба, исключая тестируемый субстрат (определение фермента) или тестируемый фермент (определение субстрата). Изменения в экспериментальных параметрах в контроле без тестируемого фермента позволяют оценить все неферментативные реакции в пробе, в то время как изменения в контроле без тестируемого субстрата – все неспецифические фоновые превращения в присутствии фермента. Реакционную смесь сначала инкубируют по меньшей мере 2 мин при заданной температуре до начала старта реакции путем добавления фермента или субстрата.

*Метод фиксированного времени* заключается в том, что производят одно измерение количества субстрата (или продукта), расходовавшегося (образовавшегося)

гося) за фиксированный промежуток времени. Метод пригоден для измерений внутри любого временного интервала  $\Delta t$ , для которого  $t_1 = 0$ , при условии, что момент измерений не слишком далеко отстоит от начала реакции. Существуют различные варианты (техники или процедуры) данного метода, одним из которых является стоп-тест.

*Стоп-тест* заключается в том, что после фиксированного времени инкубацию реакционной смеси прерывают определенным способом и измеряют уменьшение концентрации субстрата или увеличение концентрации продукта. Способы остановки реакции включают деструктивные методы, т. е. денатурацию фермента. Это выполняется с помощью подходящего реагента (сильная кислота или щелочь, детергент, необратимый ингибитор) или термически (можно нагреть на водной бане или охладить на льду). Ошибки при выполнении данной методики возникают, если не достигается полная остановка реакции. Очень важно предварительно проверить действие стоп-реагента при различных промежутках времени инкубации, чтобы убедиться в том, что за выбранное фиксированное время для скорости сохраняется линейная зависимость. Стоп-тест часто используют при наличии множества проб и отсутствии автоматизации измерений.

Для детектирования субстрата или продукта могут быть использованы как химические, так и биохимические методы анализа, что определяется свойствами веществ. К примеру, фосфат-анион, образующийся из фосфорных эфиров под действием фосфатаз, можно определить с помощью молибдата аммония. Применение селективных методов анализа позволяет не выполнять процедуру разделения субстрата от продукта. В противном случае необходимо прибегать к методам разделения веществ, например различным видам хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ). С помощью контроля устанавливают, образуется ли продукт без присутствия фермента (нулевое время) или таковой уже имелся в пробе. Эти значения отнимаются от измеренной величины для исследуемой пробы.

Альтернативой стоп-тесту является *метод непрерывного измерения* («снятие кинетик»), когда непрерывно следят за развитием реакции, т. е. происходит мониторинг изменения концентрации продукта (или субстрата) во времени. Данный способ наиболее удобный, так как позволяет сразу увидеть результат и установить отклонение скорости реакции от линейности. Простейший непрерывный анализ заключается в том, что действие фермента оценивают по изменению значения рН среды, вязкости, оптического поглощения, флуоресценции или другого возможного физического параметра. Например, во многих методах определения гидролаз используют синтетические субстраты, которые продуцируют окрашенные или флуоресцирующие продукты. Однако большинство ферментов, проявляя свою активность, не продуцирует каких-либо изменений в физических параметрах, которые можно было бы реально измерить. В таких случаях используют непрерывные методы измерения, базирующиеся на сопряженных реакциях. Начальную скорость расхода субстрата (или накопления продукта) рассчитывают путем определения тангенса угла наклона касательной к полученной кривой «сигнал – время», результат параллельно проведенного контрольного теста отнимается. Затем определяют количество фермента в единицах активности – объемной (в кат/л) или удельной (кат/г).

Для определения начальной скорости ферментативной реакции строят график зависимости накопления продукта реакции от времени. Прямолинейная

зависимость накопления продукта реакции от времени соответствует начальной скорости реакции.

На практике для простоты начальную скорость чаще, чем по методу тангенсов, определяют экспериментально на базе единичных измерений количества израсходованного субстрата (или образовавшегося продукта). Такой подход обоснован только для короткого промежутка времени, когда реакция эффективно протекает с постоянной скоростью. Этот линейный участок кинетической кривой охватывает примерно 10 % от общего возможного изменения в ходе реакции, и ошибка тем меньше, чем раньше выполнены измерения. В таких случаях скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата, израсходованной за фиксированное время. Поскольку корректное определение начальной скорости реакции указывает на то, что изменения в концентрации субстрата или продукта малы, то по существу лучше измерять увеличение количества продукта. Это обусловлено тем, что относительное увеличение концентрации продукта значительно больше, чем соответствующее снижение в концентрации субстрата. Для расчета активности фермента используют калибровочную кривую «начальная скорость – концентрация фермента».

На практике из инструментальных методов в ферментативном анализе (выбор определяют свойства веществ) наибольшее распространение нашли спектрофотометрические методы, а именно фотометрия в УФ и видимом диапазоне. Распространенную процедуру определения активности фермента методом начальных скоростей можно рассмотреть на примере фотометрического определения продукта. При определении активности фермента оптическая плотность реакционной смеси должна линейно зависеть от концентрации продукта (субстрата), т. е. подчиняться закону Бугера – Ламберта – Бера. Таким образом, чтобы измерить скорость ферментативной реакции, надо измерить изменение оптической плотности ( $A$ ) в единицу времени (мин), что соответствует скорости накопления продукта. Проводят два (двухточечная кинетика) или несколько (многоточечная кинетика) измерений оптической плотности через четко фиксированный (с помощью секундомера) интервал времени  $t$  (например, через 2 мин или через 1–5 мин). Для определения начальной скорости ферментативной реакции строят график зависимости оптической плотности от времени. Рассчитывают изменение оптической плотности по формуле  $\Delta A/\text{мин} = (A_2 - A_1)/t$  (двухточечная кинетика) или  $\Delta A/\text{мин} = \Delta \bar{A}/\Delta t$  (многоточечная кинетика). Фермент должен работать равномерно, т. е. разница  $\Delta A$  должна быть одинаковой для разных интервалов времени. Фотометрирование проводят только на линейном участке кинетической кривой. Если при снятии показаний получают нелинейную зависимость, то нужно проверить все условия эксперимента и определить мешающий фактор. Измерения всегда проводятся при избытке субстрата (но очень большая концентрация будет замедлять работу фермента).

Ферментативную активность рассчитывают по стандарту (калибратор), коэффициенту экстинкции продукта или калибровочному графику, который строят в координатах  $\{X = [E]\}$ ,  $\{Y = \Delta A/\text{мин}\}$  (или  $Y = \Delta A/\text{время реакции}$ ,  $\Delta A = A_{\text{проб}} - A_{\text{хол}}$ ). Расчет по коэффициенту экстинкции продукта проводят, используя формулу Бугера – Ламберта – Бера:

$$E = \Delta A / \text{мин} \frac{1000V}{\epsilon l v},$$

где  $E$  – активность фермента, МЕ/л;  $\Delta A/\text{мин}$  – изменение оптической плотности реакционной смеси за 1 мин;  $V$  – объем реакционной смеси, мл;  $\epsilon$  – коэффици-

ент экстинкции, л/моль·см;  $l$  — длина оптического пути, см;  $v$  — объем пробы, мл; 1000 — коэффициент пересчета активности, мкмоль/мин.

Ферментативный анализ широко используют в клинической диагностике, фармацевтике. Поскольку на активность ферментов существенно влияют условия реакции (природа и концентрация субстрата, буфера, pH, активаторы и т. д.), для различения используемых методов и стандартизации измерения активности ферментов в разных лабораториях и странах предложено следовать рекомендациям Международного общества клинической химии, Европейского общества клинической химии, Скандинавского общества клинической химии, Французского общества клинической биологии, Немецкого общества клинической химии и некоторых других. Как правило, в коммерческих наборах указано, рекомендациям какого общества соответствует набор.

### 5.5.2. Методы определения субстратов

Ферментативные методы определения субстратов высокоселективны, что позволяет выявлять различные вещества непосредственно в составе сложных объектов (биомассы, биожидкости, технологические растворы и др.). Чувствительность определения при этом обусловлена инструментальным методом, выбранным для контроля за скоростью процессов (спектроскопические, электрохимические, радиохимические, биолюминесцентные и др.). В целом чувствительность определения ферментов, коферментов и эффекторов выше, чем субстратов. Методы выявления эффекторов ферментов высокочувствительны, но не всегда селективны. Однако чувствительность определения многих веществ ферментативными методами часто более высокая, чем чувствительность определения этих же компонентов любыми другими методами. В настоящее время в большинстве клинических лабораторий более двух третей так называемых рутинных аналитов определяют с использованием ферментов.

Субстраты (белок, липид, сахара и др.), которые необходимо определить в пробе, должны претерпевать превращения под действием фермента, т. е. фермент выступает в качестве специфического реагента. Для ферментативного выявления субстратов используют методы анализа, основанные на определении конечного количества продуктов реакции или измерении начальной скорости реакции.

*Метод конечной точки* (англ. end-point method) основан на том, что реакция, катализируемая ферментом, протекает до установления равновесия (до конца). С помощью данного метода после полного превращения субстрата, т. е. полного завершения ферментативной реакции, в пробе определяют количество образовавшегося продукта или регистрируют изменение в концентрации кореагентов. Этот метод используют только для выявления субстратов.

Для того чтобы реакция за короткое время достигла своего конечного пункта, необходимо использовать ферменты с высокой активностью, но с низким значением  $K_M$ . На практике активность фермента можно оценить по соотношению  $V_{\max}/K_M$ . Для концентрации субстрата ниже  $K_M$  отношение  $V_{\max}/K_M$  должно равняться единице. При таких условиях в течение 3 мин будет достигнуто 99 % превращения субстрата.

Во многих случаях состояние термодинамического равновесия не позволяет достигнуть полного превращения субстрата. Сдвинуть равновесие в сторону продукта можно либо использованием высокой концентрации косубстрата, либо изменением значения рН. Очень часто этого не требуется, поскольку сместить равновесие в сторону полного превращения субстрата можно путем удаления продукта с помощью химической или ферментативной реакции. В случае когда продукт нельзя определить прямым способом, используют сопряженные реакции.

Оценка образовавшегося продукта производится путем установления разницы в показаниях прибора для холостой (англ. blank) и анализируемой проб (рис. 5.18). Концентрацию рассчитывают по калибровочной кривой ( $\Delta A - [\text{субстрат}]$ ).

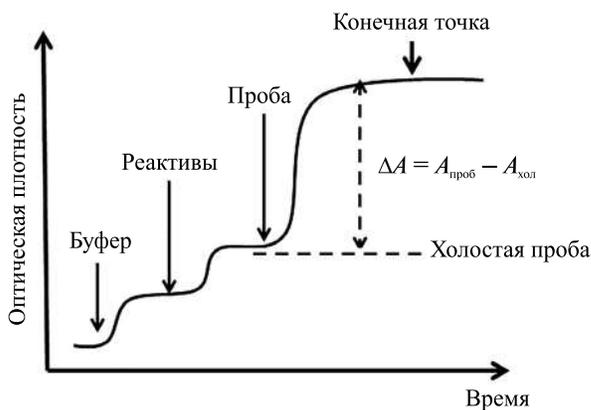


Рис. 5.18. Фотометрическое определение субстрата в пробе методом конечной точки

В качестве примера можно рассмотреть определение мочевой кислоты с помощью фермента уриказы. В основе метода лежит реакция расщепления мочевой кислоты под действием уриказы до аллantoина, углекислоты и гидропероксида. В итоге можно измерить количество образовавшегося гидропероксида либо определить расход мочевой кислоты, которая имеет максимум поглощения света при 290 нм. Первым шагом является измерение с помощью спектрофотометра поглощения пробы, содержащей мочевую кислоту. Если в пробу до введения фермента добавляют поочередно несколько реактивов, то первое показание снимают при достижении стабильного уровня сигнала после внесения всех реагентов. Затем в пробу добавляют уриказу. В результате ферментативной реакции кислота расходуется, что можно наблюдать по снижению поглощения при 290 нм. Через некоторый период времени величина поглощения снизится до определенного стабильного уровня, т. е. больше не изменится. Это указывает на то, что реакция достигла определенного конечного состояния, так называемой конечной точки, поэтому производят второе измерение. Разница между конечным и начальным значениями измеренного сигнала прибора соответствует концентрации мочевой кислоты в пробе.

Количество субстрата также можно определить *методом начальных скоростей*. Отказ от полного превращения сокращает время анализа. Кинетические методы в отличие от метода конечной точки менее зависимы от помех (мутность раствора, его собственная окраска), что позволяет использовать их в автоматизированных системах. Они более чувствительны, чем метод конечной точки.

Применение метода начальных скоростей для определения субстрата базируется на том, что если скорость, с которой происходит расход субстрата мала по сравнению со значением  $K_M$  фермента, то она пропорциональна его концентрации. Ферментативные реакции в этой области протекают по механизму псевдопервого порядка, кривая («время – превращение») получается изогнутой. Во избежание погрешностей в определении показания прибора снимают до тех пор, пока не вырисовывается достаточная кривая (как указывалось выше). Измерения проводят только на линейном участке кинетической кривой. При низкой начальной концентрации субстрата ( $< 0,1 K_M$ ) начальная скорость прямо пропорциональна начальной концентрации субстрата.

Для определения концентрации субстрата методом начальных скоростей выбирают ферменты с высоким  $K_M$ , чтобы измерять относительно высокие концентрации субстратов, а если таковых нет, то значение  $K_M$  можно повысить, используя конкурентные ингибиторы.

По сути, верхняя граница определяемых содержаний субстрата лимитируется величиной  $K_M$ . Предел обнаружения и нижняя граница анализируемых содержаний субстрата определяются обычно той величиной начальной скорости ( $v_0$ ), которая может быть зафиксирована выбранным инструментальным методом. Чем меньше величина  $v_0$  и чем выше каталитическая константа и концентрация фермента, тем ниже предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний субстрата. Для двусубстратных реакций при определении субстрата  $S_1$  субстрат  $S_2$  берется в насыщенных концентрациях, так двусубстратная реакция сводится к односубстратной.

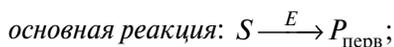
Для расчета можно использовать калибровочную кривую, представляющую собой зависимость начальной скорости от концентрации субстрата.

С помощью ферментов определяют не только концентрации субстратов, но и ингибиторов, замедляющих скорость ферментативной реакции (например, пестициды, лекарства, наркотики и т. п.), либо ускоряющих эту реакцию активаторов. В случае обратимого неконкурентного ингибирования фермента ингибиторы, взаимодействуя с ферментом, образуют каталитически неактивные комплексы. Для ингибиторов этого типа верхняя граница определяемых содержаний лимитируется величиной константы ингибирования ( $K_I$ ). Предел обнаружения зависит также и от концентрации фермента. В случае необратимого ингибирования ферментативных реакций нижняя граница определяемых содержаний ингибитора зависит от времени ингибирования. Если значение константы скорости этого процесса ( $k_{ин}$ ) невелико, относительное уменьшение активности фермента зависит от длительности процесса ингибирования. При достаточно больших величинах  $k_{ин}$  временной зависимостью можно пренебречь, тогда относительное уменьшение активности фермента пропорционально концентрации ингибитора.

## 5.6. Сопряженные ферментативные реакции

Многие ферменты зачастую катализируют реакцию с образованием продуктов, трудно определяемых прямым способом или образуемых в количестве, которое сложно измерить. В таких случаях продукт превращается в сопряженной (индика-

торной) реакции в соединение, которое возможно определить. Индикаторная реакция может быть химическая или ферментативная. В результате нее продукт первичной ферментативной реакции количественно превращается в реально измеряемый вторичный (индикаторный) продукт:



Последовательное сопряжение реакций — это цепь реакций, включающая анализируемую и индикаторную, кроме того, может быть еще несколько вспомогательных реакций. Первичный продукт в ходе вспомогательных реакций превращается в промежуточный метаболит, который в индикаторной реакции трансформируется в индикаторный продукт.

Главное требование к индикаторной реакции заключается в том, что превращение первичного продукта должно происходить быстро и количественно. Использование сопряженных реакций позволяет повысить чувствительность определения того или иного соединения и при необходимости изменить способ детекции. При использовании сопряженных систем нужно, чтобы компоненты индикаторной реакции не активировали и не ингибировали действие первичного фермента.

Примером применения химической индикаторной реакции служит определение аденозина. Под действием аденозиндезаминазы происходит дезаминирование аденозина (первичная реакция). Аммиак (первичный продукт) реагирует с нингидрином (индикаторная реакция) с образованием продукта, который поглощает свет в видимой области спектра (при  $\lambda = 546$  нм) и легко может быть определен.

На практике в качестве индикаторных реакций часто используют ферментативные реакции. В случае системы из двух реакций продукты первой ферментативной реакции являются субстратами для второй ферментативной реакции (индикаторной). Предел обнаружения, нижняя и верхняя границы определяемых содержаний компонентов зависят от кинетических характеристик используемой индикаторной ферментативной реакции, прежде всего от каталитической активности фермента.

Условия анализа активности ферментов с использованием сопряженных ферментативных реакций сопоставимы с таковыми для одной реакции, однако нужно учитывать некоторые аспекты. Большинство реакций с участием последовательно работающих ферментов контролируются первым ферментом цепи. Кинетическое поведение сопряженных систем определяется кинетическими характеристиками анализируемого фермента в большей степени, чем индикаторного. Для получения достоверных результатов с помощью сопряженных ферментов индикаторный фермент не должен становиться скоростью-лимитирующим, а измеряемая скорость должна всегда определяться активностью анализируемого фермента. Обычно на опыте нужно удостовериться, что измеряемая скорость не возрастает с увеличением концентрации индикаторного фермента, а пропорциональна количеству анализируемого фермента как для высоких, так и для низких концентраций субстрата при всех условиях, выбранных для анализа.

В идеальном случае индикаторный фермент независимо от концентрации первичного субстрата должен мгновенно превращать каждую молекулу первичного продукта в индикаторный, т. е. необходимо соблюдение условий квазистационар-

ного состояния. Таким образом, скорость образования индикаторного продукта будет отражать величину начальной скорости анализируемой реакции. Установление стационарного состояния, при котором концентрация промежуточного метаболита постоянна и практически не меняется во времени, возможно, если максимальная скорость индикаторной реакции больше скорости первой. Однако во многих сопряженных системах существует фаза задержки (или лаг-фаза, от англ. lag-phase) перед достижением стационарного состояния, или «время сопряжения», что будет мешать точному определению скорости анализируемой реакции. Для получения достоверных значений активности анализируемого фермента нужно выбрать такие условия анализа, которые бы свели лаг-фазу к минимуму. На практике этого достигают, варьируя концентрацию индикаторного фермента, обычно его используют в большом избытке (в 100 раз и более в единицах активности), в то время как количество первого фермента должно быть низким, но достаточным для эффективного катализа. Ферментативные препараты должны быть чистыми, не содержать никаких примесей, что в случае индикаторного фермента, который берется в избытке, может привести к существенному искажению результатов.

На практике наиболее применимы следующие индикаторные ферменты: дегидрогеназы (например, лактатдегидрогеназа), пероксидазы, каталаза, люцифераза, пируваткиназа, глюкозооксидаза, щелочная фосфатаза.

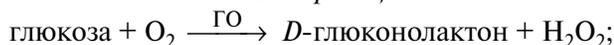
*Пероксидазу* в качестве индикаторного фермента используют, если в первичной реакции образуется гидропероксид, прямое определение которого методом спектрофотометрии невозможно. Фермент катализирует восстановление  $H_2O_2$  с помощью бесцветного в восстановленной форме красителя (2,4-дихлорфенол, малахитовый зеленый, бензидин и др.), в результате краситель окисляется и его можно легко определить методом фотоколориметрии:



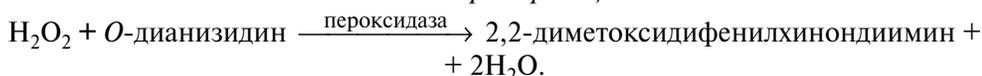
Интенсивность окраски красителей пропорциональна содержанию субстрата в исследуемом образце.

Индикаторная реакция с пероксидазой лежит в основе коммерческого теста на определение глюкозы в крови. Глюкоза под действием глюкозооксидазы (ГО) — первичного фермента — окисляется кислородом воздуха в *D*-глюконолактон и гидропероксид. Количество  $H_2O_2$  определяют по его способности в присутствии пероксидазы окислять диамины с образованием окрашенных продуктов (например, *O*-дианизидин до фиолетового 2,2-диметоксидифенилхинондиимина, 450 нм,  $\epsilon = 8,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ):

*основная реакция:*



*индикаторная реакция:*



Пероксидазная реакция, предложенная П. Триндером, лежит в основе количественного определения холестерина и триглицеридов. Определение концен-

трации общего холестерина основано на проведении сопряженных реакций, катализируемых холестеролэстеразой, холестеролоксидазой и пероксидазой (метод конечной точки).

При определении холестерина его эфиры гидролизуются холестеролэстеразой до свободных жирных кислот и холестерина, который под воздействием холестеролоксидазы окисляется кислородом воздуха до 4-холестен-3-она. Образующийся при этом гидропероксид при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490–520) нм. Раствор заданной концентрации холестерина используется для построения калибровочной кривой.

Реакцию азосочетания широко применяют для определения многих низкомолекулярных соединений и активности ряда ферментов. Обязательным условием для ее протекания является использование в качестве основных ферментов высокоочищенных препаратов оксидаз, при действии которых в инкубационной среде образуется эквимольное окисленному субстрату количество пероксида водорода.

С помощью *дегидрогеназы*, кофактором (коферментом) которой является никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), можно регистрировать образующиеся в результате первичной реакции восстановленные субстраты. Дегидрогеназа окисляет эти первичные продукты, при этом НАДФ восстанавливается до НАД(Ф)Н, который легко определяется спектрофотометрически:

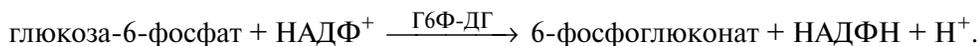


Реакции с участием НАД или его фосфата (НАДФ) часто используют в ферментативном анализе. Данные соединения могут образовываться в ферментативной реакции или выступать в качестве коферментов различных дегидрогеназ. Применение НАД и НАДФ обусловлено их оптическими свойствами, которые различаются для их окисленной и восстановленной форм. Обе формы, содержащие остаток аденина, сильно поглощают свет в УФ-области с максимумом при 260 нм, однако восстановленная форма благодаря наличию хиноидной структуры поглощает также и при 340 нм ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ). Окисленная и восстановленные формы НАД(Ф) различаются и по флуоресцентным свойствам, что используют в аналитической практике. Надо отметить, что чувствительность флуоресцентных методов ( $10^{-9} \text{ M}$ ) выше, чем спектрофотометрических ( $10^{-6} - 10^{-7} \text{ M}$ ).

Различия спектров поглощения света восстановленной и окисленной формами кофермента НАД(Ф) лежат в основе оптического теста Варбурга (УФ-тест), который положил начало широкому использованию ферментов как аналитических реагентов. Тест был разработан О. Варбургом (Нобелевская премия, 1931) в конце 1930-х гг. для определения активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ. За ходом ферментативной реакции можно следить по увеличению или уменьшению величины оптической плотности при 340 нм, т. е. по увеличению или уменьшению содержания НАД(Ф)Н в анализируемом образце. Оптический тест Варбурга широко используют для определения как содержания низкомолекулярных компонентов, так и активности многих ферментов. Данный тест позволяет количественно определить все вещества, являющиеся субстратами дегидрогеназ (спирты, альде-

гиды, амины, дикарбоновые и кетокислоты), или аденозинтрифосфат (АТФ), детектировать который прямым спектрофотометрическим методом невозможно.

Один из коммерческих тестов определения глюкозы основан на сопряжении гексокиназы (ГК) как первичного фермента и *глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы* (Г6Ф-ДГ) – как индикаторного. Гексокиназа, косубстратом которой является АТФ, катализирует фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата. Последний окисляется глюкоза-6-фосфатдегидрогеназой до 6-фосфоглюконовой кислоты при одновременном восстановлении  $\text{НАДФ}^+$  в  $\text{НАДФН}$ :



В данном случае можно определить не только глюкозу, но и глюкоза-6-фосфат, если в реакционную смесь сначала добавить Г6Ф-ДГ, а затем ГК (рис. 5.19).

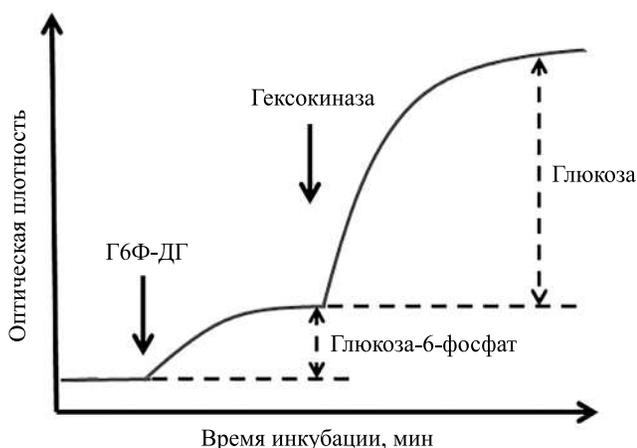
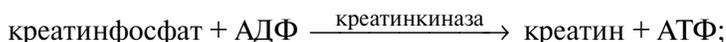


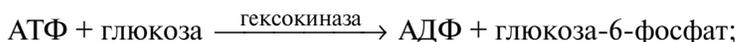
Рис. 5.19. Определение глюкозы, основанное на сопряжении гексокиназы как первичного фермента и глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (Г6Ф-ДГ) – как индикаторного (метод конечной точки)

Коммерческий тест на креатинкиназу в сыворотке использует кинетический анализ для определения активности фермента. Данный метод базируется на сопряжении трех ферментов:

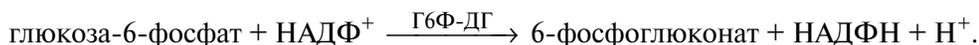
*основная реакция:*



*вспомогательная реакция:*



*индикаторная реакция:*



В этом тесте разбавленная проба (сыворотка) преинкубируется с глюкозой, гексокиназой, НАДФ<sup>+</sup> и Г6Ф-дегидрогеназой, чтобы некоторые количества креатинфосфата и АДФ, имеющиеся первоначально в образце, расходовались. Когда поглощение при 340 нм становится постоянным, то к реакционной смеси добавляют креатинфосфат и АДФ. Далее поглощение при 340 нм отслеживается как функция времени. Наклон начального участка кинетической кривой прямо пропорционален активности первичного фермента (рис. 5.20).

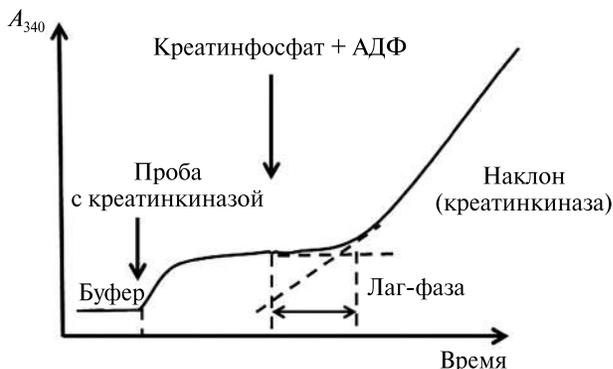
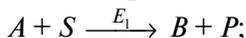


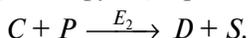
Рис. 5.20. Определение креатинкиназы, основанное на сопряжении креатинкиназы (первичный фермент), гексокиназы (вспомогательный) и Г6Ф-дегидрогеназы (индикаторный) (метод начальных скоростей)

*Циклические* ферментативные процессы, которые представляют вариант сопряженных систем, используют для определения очень низких концентраций субстрата (например, клеточных метаболитов). Принцип ферментативного цикла базируется на том, что концентрация измеряемого субстрата ( $S$ ) поддерживается постоянной благодаря регенерирующей ферментативной (рециклирующей) реакции:

*основная реакция:*



*рециклирующая реакция:*



Для рециклизации определяемого субстрата его концентрация должна быть ниже значения константы Михаэлиса первого фермента ( $K_{ME1}$ ), а продукта — ниже  $K_{ME2}$  второго фермента, что легко соблюдать вследствие изначально очень низкой концентрации субстрата. При таких условиях достигается постоянная скорость превращения продукта и вместе с этим его квазилинейное накопление во времени. Низкая концентрация субстрата ( $10^{-8}$ – $10^{-9}$  М) благодаря рециклизации увеличивается в такой степени, что продукты реакции могут быть измерены либо методом конечной точки, либо кинетическим методом. Сопряжение со вторым ферментативным циклом позволяет получить еще большее увеличение концентрации субстрата.

Способность циклической сопряженной системы эффективно работать в течение оптимального временного интервала характеризуется фактором усиления. Фак-

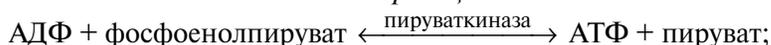
тор усиления — это число циклов, которое устанавливается в соответствии с условиями проводимого испытания и определяется как соотношение количества продукта к количеству циклического субстрата.

При проведении анализа данным методом важно соблюдать рациональное соотношение активностей обоих ферментов. Обычно выбирается такая активность, чтобы величины  $V_{\max}/K_M$  для обоих ферментов были примерно одинаковыми. Только в случае неустойчивости одного из ферментов или других мешающих факторов (например, наличие эффекторов) такой фермент нужно брать в сравнение с другим в большом избытке.

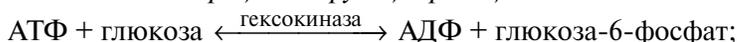
Концентрацию анализируемого субстрата рассчитывают по стандарту, анализ со стандартом проводят параллельно. Калибровку, произведенную в другое время, не используют. В ходе выполнения анализа необходимо проверять, как долго сохраняется линейная зависимость накопления продукта во времени.

Примером циклической сопряженной системы может служить определение АДФ с помощью пируваткиназы:

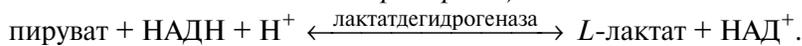
*основная реакция:*



*рециклизирующая реакция:*



*индикаторная реакция:*



Ферментативные методы анализа позволяют определять такие биологически активные субстраты, как глюкоза, мочевины и мочевая кислота, различные аминокислоты, липиды, холестерин, антибиотики, этанол,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  и др. Разработаны чрезвычайно чувствительные методы определения многих ферментов — пероксидазы в крови, креатинфосфокиназы в крови при диагностике инсульта и инфаркта миокарда и др. — и коферментов — НАД, флавиномононуклеотида, АТФ и т. д. Предложены методики чувствительного определения большого числа эффекторов ферментов (фосфорсодержащие пестициды, наркотики и др.). Чрезвычайно чувствительны и селективны методы определения некоторых ионов металлов ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) и анионов ( $\text{CN}^-$ ) на основе реактивации апоферментов. Цинк, например, определяют практически специфически в количестве пикограмм по реактивации иммобилизованной пируватоксидазы, дезактивированной рядом комплексонов.

На основе использования ферментов созданы различные экспресс-тесты, многие из них чрезвычайно просты. Например, тест-система для определения токсичных фосфорсодержащих пестицидов в продуктах питания представляет собой бумажную полоску, один конец которой пропитан раствором хромогенного субстрата, а второй содержит иммобилизованную холинэстеразу. При анализе концы полоски совмещают и обмакивают в воду, выжатый из фруктов или овощей сок и т. д. Появление окраски бумажки свидетельствует об отсутствии пестицидов в пробе. Поскольку пестициды в больших, чем ПДК, количествах ин-

гибируют холинэстеразу, то отсутствие окраски свидетельствует о превышении ПДК пестицидов. Аналогичные бумажные тесты предложены для определения глюкозы в моче и крови, ртути в воде и т. д.

## **5.7. Инструментальные методы регистрации аналитического сигнала в ферментативном анализе**

Для качественного и количественного определения ферментов и их субстратов имеется большое разнообразие различных инструментальных методов. В инструментальных методах используют физико-химические и физические свойства веществ, которые фиксируются приборами (инструментами). Часто инструментальные методы называют физическими или физико-химическими методами анализа. В ферментативном анализе применяют оптические (спектрофотометрия, флуориметрия, хемилюминометрия, нефелометрия, турбидиметрия), электрохимические (амперометрия, потенциометрия, кондуктометрия), радиохимические и калориметрические методы. Выбор метода детектирования субстрата или продукта ферментативной реакции зависит в первую очередь от физико-химических свойств соединения, концентрацию которого нужно измерить.

### **5.7.1. Оптические методы**

Оптические методы анализа базируются на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом в оптической (ультрафиолетовая, видимая, инфракрасная) области. В основе всех оптических методов лежит один и тот же основной принцип: электромагнитное излучение определенной длины волны и интенсивности взаимодействует с анализируемым веществом. Это взаимодействие приводит к различным энергетическим переходам, которые регистрируются экспериментально в виде поглощения, отражения, рассеяния или испускания электромагнитного излучения.

**Фотометрические методы.** К ним относятся спектрофотометрия (анализ по поглощению монохроматического излучения) и фотоколориметрия (анализ по поглощению немонохроматического излучения), которые нашли наиболее широкое практическое применение в ферментативном анализе. Фотометрический анализ относится к абсорбционным методам, т. е. основан на измерении поглощения света раствором вещества.

В одном фотометрическом измерении нужно оценить параметры (интенсивность, длина волны или угол распределения светового потока относительно направления распространения падающего излучения) прошедшего через слой вещества электромагнитного излучения, сравнивая их с параметрами исходного излучения.

Многие соединения, являющиеся субстратами или продуктами ферментативных реакций, поглощают свет в УФ-спектре или видимой его области или с помощью определенных реагентов могут быть трансформированы в окрашенные соединения. Молекулы анализируемого вещества поглощают свет избирательно,

т. е. каждое вещество поглощает излучение с определенными длинами волн, характерными только для него. На этом основан качественный анализ веществ по светопоглощению. В основе количественного анализа лежит закон Бугера – Ламберта – Бера, который связывает величину светопоглощения и концентрацию вещества в растворе:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C,$$

где  $A$  – оптическая плотность;  $I_0, I$  – интенсивность потока света, направленного на исследуемый раствор и прошедшего через него соответственно;  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения,  $M^{-1} \text{ см}^{-1}$  или  $\text{лсм}^{-1} \text{ моль}^{-1}$ ;  $l$  – толщина светопоглощающего слоя, см;  $C$  – концентрация вещества, моль/л.

Закон Бугера – Ламберта – Бера справедлив только для монохроматического света, т. е. величины  $I_0, I, \epsilon$ , и поэтому  $A$  зависят от длины волны. Графическое выражение величины поглощения света как функции длины волны дает спектр поглощения вещества. Положение максимума спектра поглощения является важной оптической характеристикой вещества, а характер и вид спектра поглощения характеризуют его качественную индивидуальность. Группа в молекуле, ответственная за поглощение света, называется хромофором. К такой группе относится, например, карбонильная группа  $>C=O$ , присутствующая у всех аминокислот. Другими хромофорами являются пептидная группа полипептидных цепей, ароматические кольца в составе аминокислот и т. д.

Оптическая плотность – величина безразмерная и на практике определяется в пределах от 0 до 2. Поглощение электромагнитного излучения веществом зависит от природы вещества, температуры, растворителя и длины волны света. Предел обнаружения метода, базирующегося на фотометрическом детектировании, зависит от величины коэффициента поглощения соединения: чем выше значение  $\epsilon$ , тем меньшую концентрацию вещества можно определить. Например, есть два метода определения глюкозы с помощью сопряженных систем. Первый базируется на индикаторной реакции, в которой гидропероксид под действием пероксидазы окисляет краситель, имеющий  $\epsilon = 8600 M^{-1} \text{ см}^{-1}$  при 450 нм. Во втором методе в индикаторной реакции дегидрогеназа катализирует образование НАДФН, у которого  $\epsilon = 6200 M^{-1} \text{ см}^{-1}$  при 340 нм. Предел обнаружения пероксидазного метода выше примерно в 1,4 раза ( $8600/6200$ ) в сравнении с дегидрогеназным. В общем, предел обнаружения фотометрических методов лежит в микромолярном концентрационном диапазоне.

Фотометрические методы определения основаны на сравнении оптических плотностей исследуемых и стандартных растворов. В качестве стандартных используют растворы анализируемого вещества известных концентраций. Измерение оптической плотности стандартного и исследуемого растворов всегда производят по отношению к раствору сравнения (контрольная проба содержит все реагенты, кроме субстрата или фермента, что определяется целью исследования). Для определения содержания вещества методом калибровочного графика готовят серию из 5–8 стандартных растворов разных концентраций, измеряют их оптические плотности и строят график зависимости  $A = f(C)$ . Полученная калибровочная кривая в координатах  $A$  (ось  $Y$ ) –  $C$  (ось  $X$ ) (метод конечной точки) или  $\Delta A/\Delta t$  –  $C$  (кинетический метод) имеет вид прямой.

При спектрофотометрическом детектировании субстрата (продукта) (метод конечной точки), зная его коэффициент поглощения  $\epsilon_\lambda$ , концентрацию в растворе можно рассчитать по формуле

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon l},$$

где  $\Delta A$  – разность величин оптических плотностей анализируемой и контрольной проб.

Активность фермента также можно рассчитать с помощью коэффициента поглощения  $\epsilon$  продукта (субстрата), так как скорость изменения оптической плотности в единицу времени  $\Delta A/\Delta t$  по закону Бугера – Ламберта – Бера пропорциональна скорости реакции  $\Delta c/\Delta t$  (метод начальных скоростей). Активность фермента, например в объеме, определяют по формуле

$$\text{активность} = \frac{\Delta AV}{\Delta t \epsilon l v},$$

где  $V$  – объем теста, мл;  $v$  – объем анализируемой пробы, мл;  $t$  – время, мин.

В биоанализе, в том числе и для определения продуктов ферментативной реакции, широкое применение нашли люминесцентные методы, базирующиеся на способности веществ излучать свет под действием различного рода возбуждений. Разновидности люминесценции отличаются друг от друга по типу источника энергии возбуждения. В биохимической практике наиболее часто используют фотолюминесценцию, к которой относится флуориметрия и хемилюминометрия.

**Флуориметрические методы анализа.** Данные методы основаны на измерении интенсивности флуоресценции веществ, возбуждаемой ультрафиолетовым, видимым или инфракрасным светом.

Вещества, которые способны флуоресцировать, т. е. испускать свет, называют *флуорофорами*. Молекулы флуорофоров могут поглощать кванты электромагнитного излучения определенной энергии. При поглощении фотона молекула ( $10^{-14}$ – $10^{-15}$  с), находящаяся в основном состоянии  $S_0$ , переходит в одно из возбужденных состояний, имеющих большую энергию ( $S_n, n > 0$ ), при сохранении мультиплетности. Система остается в возбужденном состоянии только доли наносекунд и релаксирует в основное состояние, испуская при этом излучение ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$ ), которое имеет большую длину волны (меньшую энергию), чем поглощенное излучение (правило Стокса). К примеру, вещество может абсорбировать энергию УФ-излучения и испускать свет в видимой области, это придает окраску его раствору при УФ-облучении. В соответствии с правилом Каша излучение фотона происходит только с низшего возбужденного электронного состояния  $S_1$ . Переход из возбужденного состояния  $S_n$  в  $S_1$  происходит в результате процессов безызлучательной дезактивации (в соответствии с принципом Франка – Кондона). Время жизни молекул в возбужденном состоянии составляет  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  с. Квантовым выходом люминесценции называется отношение числа испускаемых при люминесценции квантов к числу поглощенных квантов возбуждающего света. Эта величина может принимать значения от нуля до единицы.

Флуоресцировать способны многие органические вещества, как правило, ароматические и гетероциклические соединения с электронодонорными и/или электроакцепторными заместителями. Наиболее сильная флуоресценция наблюда-

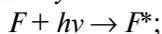
ется тогда, когда 5- и 6-членные гетероциклы включены в развитую систему сопряженных связей. Существенную роль играет жесткость молекулы, исключая возможность безызлучательной затраты энергии возбуждения на колебания и вращение отдельных фрагментов системы. Электронодонорные заместители в большинстве случаев повышают, а электроноакцепторные (особенно  $\text{NO}_2$ ) – понижают интенсивность свечения. Наиболее известными флуорофорами являются ксантены (флуоресцеин, родамины, эозины и т. д.), карбоцианины ( $\text{Cys3}$ ,  $\text{Cys5}$  и др.), акридиновые и тиазоловые красители, белки семейства зеленого флуоресцентного белка (англ. green fluorescent protein (GFP)) и др.

Флуорофоры характеризуются специфическими спектрами флуоресценции: спектром возбуждения и спектром испускания (эмиссии). *Спектр испускания* представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны при фиксированной длине волны возбуждающего света. *Спектр возбуждения* – это зависимость интенсивности испускания при фиксированной длине волны эмиссии от длины волны возбуждающего света. Спектр возбуждения флуорофора в разбавленных растворах совпадает (по форме) с его спектром поглощения. Спектр возбуждения не является спектром поглощения в классическом смысле, он дает информацию о том, насколько хорошо возбуждающий свет способен продуцировать флуоресценцию.

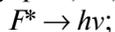
Форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, поскольку испускание практически всегда происходит с нижнего колебательно-подуровня возбужденного состояния. Если вид спектра флуоресценции меняется с изменением длины волны возбуждающего света, это может быть следствием того, что в смеси содержится несколько флуоресцирующих компонентов. Используя очень высокие интенсивности возбуждающего света, можно определить достаточно низкие концентрации флуоресцирующего вещества (до  $10^{-10}$  М).

По сравнению со спектрами поглощения воспроизводимость спектров люминесценции зависит от гораздо большего числа факторов, которые необходимо фиксировать. Флуоресценция веществ чувствительна к условиям окружающей среды, она зависит от температуры, рН раствора, полярности растворителя, а также состава среды. Некоторые вещества (тушители, гасители), например  $\text{O}_2$ , ионы  $\text{Mn}^{2+}$ , нитроксильные радикалы, могут снижать интенсивность флуоресценции определяемого вещества. Любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества, называют *тушением флуоресценции*.

*Возбуждение:*



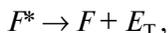
*флуоресценция:*



*тушение:*



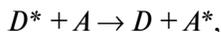
*термическая дезактивация:*



где  $F$  – флуорофор;  $Q$  – тушитель;  $E_T$  – тепловая энергия.

К тушению может приводить множество процессов, в том числе реакции в возбужденном состоянии, образование нефлуоресцирующего комплекса тушителя с флуорофором в невозбужденном состоянии (т. е. до поглощения возбуждающего флуоресценцию фотона) (статическое тушение), тушение при столкновении флуорофора и тушителя (динамическое тушение). В случае динамического тушения тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения последнего в возбужденном состоянии. В результате контакта возбужденное состояние флуорофора разрушается тушителем, и флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона.

Тушение люминесценции другими веществами может также осуществляться за счет резонансного переноса энергии флуоресценции от люминесцирующего вещества (донора,  $D$ ) к веществу-тушителю (акцептору,  $A$ ) (*ферстеровский резонансный перенос энергии* (ФРПЭ); англ. Förster resonance energy transfer (FRET)). Механизм ФРПЭ заключается в том, что перенос энергии возбуждения от донора к акцептору происходит без промежуточного испускания фотонов, т. е. безызлучательно, в результате диполь-дипольного взаимодействия. Молекула донора  $D^*$  переходит из возбужденного состояния в основное, одновременно передавая свою энергию молекуле акцептора  $A$ , которая при этом переходит в возбужденное состояние:



Перенос энергии происходит эффективно, если энергия возбужденного состояния  $A^*$  меньше энергии  $D^*$ . Безызлучательный перенос происходит перед процессом испускания кванта света молекулой донора, который должен иметь высокий выход флуоресценции. Резонансное взаимодействие происходит на большей дистанции, чем межатомное расстояние, без каких-либо молекулярных столкновений. Пару молекул, для которых возможен резонансный перенос энергии, обычно называют донорно-акцепторной или ФРПЭ-парой. Перенос энергии приводит к снижению интенсивности флуоресценции донора и времени жизни донора в возбужденном состоянии.

В тех случаях, когда акцептор является флуорофором, в результате миграции на него энергии возбуждения возникает его сенсibilизированная флуоресценция (рис. 5.21). Таким образом, возбуждение системы при длине волны, характерной

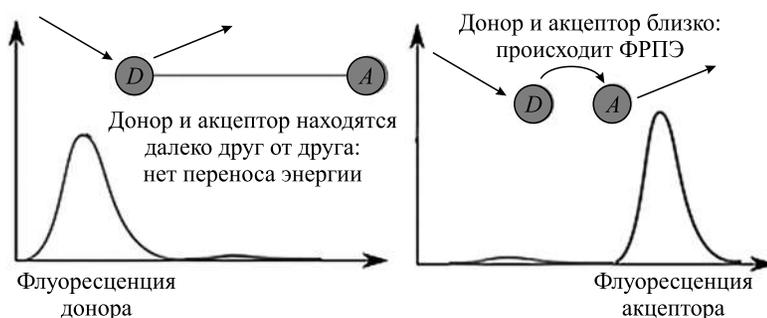


Рис. 5.21. Механизм ФРПЭ в случае, если акцептор является флуорофором

для донора, сопровождается не соответствующей донору флуоресценцией, а эмиссией (более длинноволновой), отвечающей именно акцептору. При этом важно выбирать условия фотометрирования так, чтобы селективно происходило возбуждение донора и минимизировалось прямое возбуждение акцептора.

Поскольку не все акцепторы обладают люминесцентной способностью, то они могут быть использованы в качестве средств тушения флуоресценции донора. В подобных случаях взаимодействие донора и акцептора по механизму ФРПЭ регистрируется в потере сигнала флуоресценции донора, при этом энергия акцептора трансформируется в тепло. И наоборот, удаление акцептора от донора сопровождается увеличением флуоресценции последнего.

Важным является то, что ФРПЭ происходит на расстояниях, соизмеримых с размерами биологических объектов, таких как белковые глобулы или мембраны клеток. Если две биомолекулы, меченные ФРПЭ-парой, находятся на большом расстоянии, при возбуждении донора будет наблюдаться только его собственная флуоресценция  $D^*$ . В случае когда молекулы сближены в пространстве, при возбуждении донора будет наблюдаться эмиссия акцептора  $A^*$ .

Безызлучательный перенос энергии не зависит от типа сольватной оболочки вокруг молекул донора и акцептора, а в первую очередь определяется расстоянием между ними. Ферстер определил, что эффективность переноса энергии с донора на акцептор обратно пропорциональна шестой степени расстояния между молекулами. Донор и акцептор должны находиться друг от друга на близком расстоянии, обычно 1–10 нм (рис. 5.22).

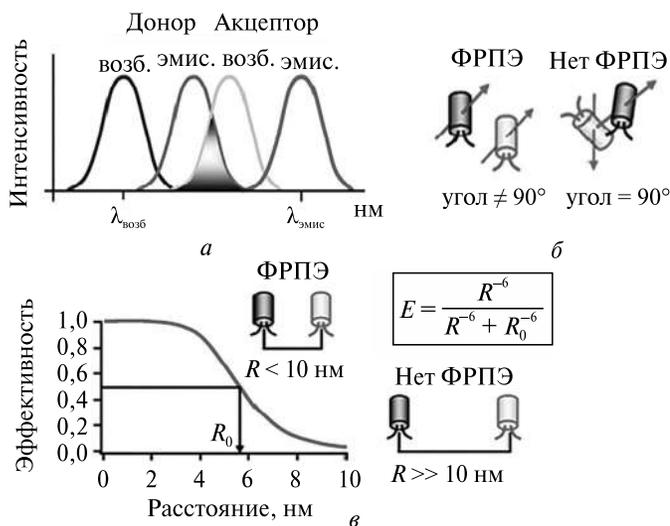


Рис. 5.22. Условия для реализации ФРПЭ: *a* – перекрытие спектров эмиссии донора ( $D$ ) и возбуждения акцептора ( $A$ ); *б* – параллельная ориентация диполей  $D$  и  $A$ ; *в* – расстояние между  $D$  и  $A < 10$  нм

При этом миграция энергии будет тем значительнее, чем сильнее перекрываются между собой спектры флуоресценции донора со спектрами поглощения тушителя (т. е. акцептор поглощает на длине эмиссии донора). Дипольные моменты донора и акцептора должны иметь определенное расположение в пространстве.

Максимальный эффект наблюдают при их параллельной ориентации, минимальный – при перпендикулярном расположении.

Главным достоинством флуориметрических методов является их высокая чувствительность ( $10^{-9}$ – $10^{-10}$  М). Предел обнаружения на несколько порядков выше, чем те, которые достигаются при спектрофотометрии. Это происходит потому, что в фотометрических методах для определения неизвестной концентрации анализируемого вещества в образце измеряется разность в поглощении между раствором, содержащим нулевую концентрацию этого вещества, и анализируемым образцом. При сильно разбавленных образцах незначительные отклонения в процессе измерения могут привести к большим относительным ошибкам в результатах. В случае флуориметрии осуществляется прямое измерение флуоресценции образца.

Интенсивность флуоресценции при низких оптических плотностях растворов ( $A \leq 0,1$ – $0,2$ ) пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества:

$$I_{\text{флуор}} \approx I_0 2,3 K \varphi \epsilon l C,$$

где  $I_{\text{флуор}}$  – интенсивность флуоресценции;  $I_0$  – интенсивность возбуждающего света;  $\varphi$  – квантовый выход флуоресценции;  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения,  $\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ ;  $K$  – коэффициент пропорциональности (зависит от параметров прибора);  $l$  – толщина светопоглощающего слоя, см;  $C$  – концентрация вещества, моль/л.

На этом основан *количественный флуоресцентный анализ*. Концентрацию вещества в исследуемом образце в зависимости от интенсивности флуоресценции определяют с помощью калибровочного графика, полученного для серии стандартных растворов (справедливо только для низких концентраций флуорофоров). Чтобы проверить, при достаточно ли малых концентрациях проводятся измерения, можно разбавить исследуемый раствор вдвое и убедиться, что интенсивность люминесценции уменьшилась также в два раза. Для более концентрированных растворов необходимо применять метод разбавлений или производить измерения в тонких слоях.

Измерения флуоресценции более селективны, чем детекция абсорбции, так как может быть задана длина волны возбуждения и эмиссии. В случае фотометрического измерения в рабочей полосе частот, помимо поглощения анализируемого вещества, может наблюдаться абсорбция и поглощение других. В то же время лишь небольшое число веществ обладают способностью к флуоресценции. Многие вещества, мешающие друг другу при одновременном присутствии в фотометрическом измерении, уже не препятствуют друг другу при измерении флуоресценции. Кроме того, вещества, имеющие сходные спектры возбуждения, могут иметь различные спектры испускания, и наоборот.

К примеру, действие фермента дегидрогеназы в биопробах можно контролировать по накоплению НАДФН, поглощающего в отличие от его окисленной формы при 340 нм. Однако кофермент НАДФ является флуорофором и при поглощении света при 340 нм способен эмитировать при 460 нм. Определение НАДФН по его флуоресценции является более селективным, так как исключает влияние примесей, способных, как восстановленный никотинамид, поглощать при 340 нм.

*Методики, базирующиеся на явлении флуоресценции*, для определения субстратов и ферментов могут быть самыми разными.

Для определения активности ферментов используют методики, основанные не только на прямом измерении флуоресценции веществ, но также на различных механизмах тушения флуоресценции. Распространенным вариантом является использование субстратов или ингибиторов, меченных одним или двумя флуорофорами, т. е. к молекуле субстрата (ингибитора) ковалентно присоединяют молекулу органического соединения, способного флуоресцировать. Активность фермента можно контролировать по измерению флуоресценции меченого субстрата, при этом величина сигнала будет прямо пропорциональна количеству оставшегося после реакции субстрата. В другом варианте меченый субстрат под действием фермента трансформируется во флуоресцирующий продукт.

*Принцип гашения флуоресценции* успешно применяют для анализа активности, например протеаз, которые расщепляют полипептиды до олигопептидов или аминокислот. В анализе протеаз в качестве субстрата используют белок трансферрин, меченный изотиоцианатом, испускающим свет при 525 нм при длине волны поглощения, равной 495 нм. Трансферрин прочно связывает ионы железа  $Fe^{3+}$ . В меченом белке координированный атом железа действует как эффективный тушитель эмиссии изотиоцианата, поэтому приготовленный субстрат имеет низкую интенсивность эмиссии при 525 нм. После обработки протеазой трансферрин расщепляется, что приводит к высвобождению меченых аминокислот. Вследствие того что флуорофор и тушитель (атом железа) уже не фиксируются на близком расстоянии, эмиссия изотиоцианата возрастает. Таким образом, увеличение в интенсивности эмиссии при 525 нм свидетельствует о наличии протеаз в пробе.

Для определения ферментов *по механизму ФРПЭ* получают синтетические субстраты, меченные двумя флуорофорами, т. е. содержащими как донор, так и акцептор (рис. 5.23). Олигопептиды, меченные ФРПЭ-парой, используют в качестве субстратов при определении протеаз. В отсутствие протеазы при возбуждении эмиссии донора наблюдают только флуоресценцию акцептора, так как происходит перенос возбуждения энергии от донора к акцептору по механизму ФРПЭ. В присутствии протеазы происходит разрыв связей в субстрате и высвобождение акцептора, в результате можно наблюдать эмиссию донора. При этом важно помнить, что возбуждение системы имеет место только при длине волны возбуждения донора.

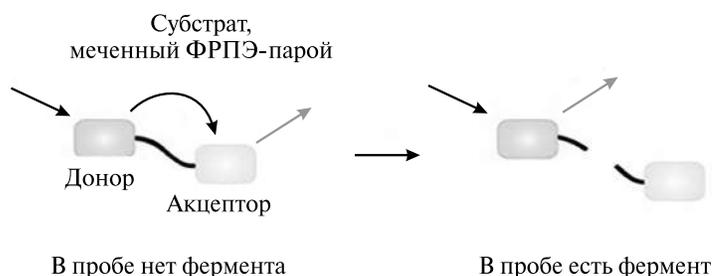


Рис. 5.23. Определение фермента с использованием субстрата, меченого ФРПЭ-парой

Для определения, например, карбоксипептидазы по механизму ФРПЭ используют синтетический субстрат — пептид глутамил-триптофан, в котором по N-концевой группе присоединен дансилхлорид. Он взаимодействует с первичными аминогруппами алифатических и ароматических аминов, образуя при этом стабильные флуо-

ресцентные сульфониламидные производные синего или сине-зеленого цвета. Нативная аминокислота триптофан испускает свет при 360 нм при длине возбуждения 285 нм. Однако в синтетическом субстрате происходит перенос энергии от аминокислоты (донор) к дансильной группе (акцептор) и наблюдается только флуоресценция акцептора. После гидролиза дипептида с помощью карбоксипептидазы сигнал флуоресценции триптофана усиливается в 100 раз.

В качестве доноров и акцепторов в ФРПЭ-парах широко используют органические красители. Их недостатком является короткое время жизни люминесценции, обычно не превышающее нескольких наносекунд, что сужает динамический диапазон изменений времени жизни в процессе анализа. Поэтому в качестве ФРПЭ-доноров часто применяют лантанидные комплексы, обладающие существенно большими временами жизни (порядка 10–3000 мкс). При этом в качестве акцепторов могут выступать органические люминесцентные или нелюминесцентные красители, обладающие высокими молярными коэффициентами поглощения, что позволяет увеличить детектируемые расстояния между донором и акцептором. Для увеличения расстояний, детектируемых методом ФРПЭ, необходим тщательный подбор доноров и акцепторов, чтобы достичь наиболее высоких значений эффективности переноса энергии. Поэтому подбор эффективной донорно-акцепторной пары с лантанидным донором сводится к выбору органического красителя, спектр поглощения которого наилучшим образом перекрывается со спектром люминесценции лантанидного комплекса.

**Флуоресценция с разрешением во времени.** Чувствительность флуоресцентных методов в значительной степени зависит от помех, вызванных неспецифической флуоресценцией исследуемого биологического образца (обусловленной, например, остатками тирозина и триптофана в белках). Кроме того, на точность таких методов влияет малое различие в длинах волн света возбуждения и эмиссии (сдвиг Стокса) флуорофора, так как в этом случае свет возбуждения примешивается к регистрируемому свету эмиссии.

Определенные трудности при детектировании флуоресценции флуорофора-маркера связаны с эффектом тушения и наличием внутренних фильтров. Многие вещества, которые поглощают испускания флуорофора вблизи длины волны, могут гасить эмиссионный свет и сокращать его интенсивность. К примеру, простетические группы белков – флавины, геммы и координированные ионы металлов – способны эффективно гасить эмиссию в определенных областях видимого спектра. Сокращение интенсивности эмиссии флуорофора также происходит, если в пробе есть соединения, поглощающие при выбранной длине волны возбуждения.

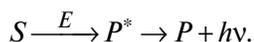
Помехи при детектировании флуоресценции можно уменьшить, используя временную задержку (разрешение во времени) при ее регистрации. Это значит, что флуоресценцию возбуждают короткими импульсами света, а измеряют через некоторое время, когда возбуждающий импульс уже угас. Разумеется, технически это осуществимо только при условии, что время флуоресценции флуорофора велико. На этом основан метод флуориметрии с временным разрешением (ФВР; англ. time-resolved fluorometry (TRF))<sup>1</sup>. Применяя ФВР, удается создать флуоресцентные метки с чувствительностью и избирательностью намного более высокими, чем у органических красителей. Такие метки по чувствительности приближаются к радио-

<sup>1</sup> Данный метод более детально изложен в гл. 6.

активным. В качестве флуорофоров используют комплексы лантанидов. Лантаниды — редкоземельные элементы (№ 58–71 по таблице Менделеева) самарий (Sm), европий (Eu), тербий (Tb) и др. Для них характерно значительное разнесение полос возбуждения и эмиссии, т. е. сдвиг Стокса измеряется сотнями нанометров, а время флуоресценции — сотнями микросекунд, что в несколько раз больше, чем у обычных флуорофоров. К тому же лантаниды имеют широкий спектр возбуждения и узкие полосы испускания (около 14 нм). Измеряя флуоресценцию на разных длинах волн и через разные промежутки времени после освещения импульсом возбуждающего света, можно одновременно количественно определять несколько флуорофоров этой группы.

**Хемилюминометрия.** Хемилюминесценцией называют свечение, сопровождающее химические реакции. Наличие такого свечения означает, что энергия, которая выделяется на одной из стадий химического процесса, оказывается достаточной для образования одного из продуктов реакции в электронно-возбужденном состоянии (эмиттер). Переход возбужденных молекул эмиттера в основное состояние сопровождается эмиссией «холодного» света.

Тип хемилюминесценции, которую наблюдают в живых организмах, называют биолюминесценцией (420–710 нм), она присуща многим организмам: бактериям, светлячкам, некоторым рыбам, грибам и простейшим. При биолюминесценции образование продуктов в возбужденном состоянии ( $P^*$ ) происходит в реакциях, катализируемых ферментами ( $E$ ):



Квантовые выходы биолюминесценции (отношение числа молекул, отдавших энергию в виде излучения, к общему числу возбужденных молекул) в отличие от большинства хемилюминесцентных реакций очень высоки и достигают значений 0,1–1. Такие квантовые выходы для реакций, протекающих в водных растворах при нейтральных значениях рН, необычны для хемилюминесцентных процессов. Они обусловлены специфичной ферментативной природой окислительных реакций биолюминесценции. В качестве ферментов, катализирующих такие биохимические реакции, могут выступать, например, люциферазные комплексы.

В *биолюминометрии* в отличие от флуориметрии сигнал имеет более низкую интенсивность ( $I$ , число фотонов, излучаемых из единицы объема реагирующей смеси за единицу времени). Однако для него характерно более высокое отношение полезного сигнала к фоновым шумам. Это обусловлено различиями в механизмах процессов флуоресценции и биолюминесценции. Так, для получения флуоресценции в систему вводят значительное число фотонов в сравнении с тем, что будет эмитировано (фотодатчик прибора должен фиксировать разницу между возбуждающими и эмитированными фотонами), кроме того, в биопробах могут присутствовать другие мешающие флуорофоры. В совокупности это создает достаточно высокий фон в случае флуоресценции.

Преимуществом биолюминометрии является ее высокая чувствительность (вплоть до  $10^{-20}$  М), которая превышает флуориметрию в 10–1000 раз, а также простота выполнения.

Биолюминесцентные реакции протекают в течение нескольких секунд, так что время анализа составляет 1–30 мин. Поскольку фотоны — продукт реакции, то они образуются в стехиометрической пропорции к количеству расходуемого субстрата.

Интенсивность света люминесценции пропорциональна концентрации субстрата (продукта). Концентрацию определяют по калибровочной кривой, полученной для стандартного вещества. Биоломинесцентные ферментативные системы хорошо совместимы с биологическими образцами, к тому же эмитирующие субстраты изолированы в пределах структуры фермента (связаны в комплекс с ферментом), что способствует защите процесса переноса энергии и поддерживает оптимальный квантовый выход.

Важнейшими биоломинесцентными системами в области ферментативного анализа являются люциферин/люцифераза и люминол/пероксидаза. Под действием люциферазы светлячков происходит окисление люциферина кислородом воздуха в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), образуется оксилуциферин и излучается свет при 562 нм. При отсутствии АТФ биоломинесценции не наблюдается, на чем и основан один из самых чувствительных методов анализа АТФ в различных объектах. Для определения содержания АТФ в исследуемую пробу добавляют смесь люциферина и люциферазы и измеряют люминесценцию. Предел обнаружения АТФ составляет  $10^{-10}$ – $10^{-16}$  моль/л. В настоящее время преимущественно используют препараты иммобилизованной люциферазы (молекулы фермента химически связаны с полимерной пленкой), стабильность которой выше и которую можно использовать многократно.

Бактериальная люцифераза катализирует сопряженное окисление восстановленного флавиномононуклеотида (ФМН-Н<sub>2</sub>) кислородом воздуха до окисленной формы ФМН (рибофлавин-5'-фосфат; англ. flavin mononucleotide (FMN)) и одновременно длинноцепочечного алифатического альдегида (RCHO) до жирной кислоты (RCOOH) с испусканием кванта света в видимой сине-зеленой области спектра (490 нм). Очищенная бактериальная люцифераза обладает способностью индуцировать излучение света в присутствии всех субстратов: кислорода, ФМН-Н<sub>2</sub> и длинноцепочечного альдегида (с длиной цепи не менее восьми атомов углерода). Добавив к изолированной бактериальной люциферазе восстановленный ФМН-Н<sub>2</sub>, получают высокочувствительную систему для определения алифатических альдегидов (к числу которых, например, принадлежат феромоны, их концентрация у насекомых составляет  $10^{-14}$  М).

Широкое практическое применение в биоанализе нашли системы, состоящие из двух ферментов: бактериальной люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Такая сопряженная система позволяет определить ФМН (без его предварительного восстановления). Оксидоредуктаза в присутствии НАДН катализирует восстановление ФМН до ФМН-Н<sub>2</sub>, который является, как сказано выше, субстратом люциферазы. Если в реакционную смесь, содержащую люциферазу и оксидоредуктазу, добавить НАДН и алифатический альдегид, можно определить ФМН.

Наоборот, если к смеси люциферазы и оксидоредуктазы добавить альдегид и ФМН, то такая смесь может использоваться как биоломинесцентная тест-система для количественного определения НАДН в биопробах. Предел обнаружения НАДН составляет  $10^{-10}$ – $10^{-16}$  моль/л. Биоломинесцентный метод определения НАДН обладает в 25 000 раз большей чувствительностью, чем спектрофотометрический.

Новые аналитические возможности таких систем можно получить, если удлинить цепочку вспомогательных биохимических стадий, предшествующих биоломинесценции. Ферментативные процессы, в ходе которых происходит наработка субстратов или продуктов биферментной системы люцифераза/оксидоредуктаза, могут

быть определены биолуциметрией. Так, можно выявить активность ферментов дегидрогеназ или концентрации субстратов этих ферментов, например определить активность лактатдегидрогеназы, катализирующей превращение лактата в пируват в присутствии НАД<sup>+</sup>. Последний при этом восстанавливается до НАДН, являющегося косубстратом оксидоредуктазы.

В ходе многих ферментативно-катализируемых реакций образуется пероксид водорода. Первичная реакция, где образуется H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, может быть проанализирована с помощью люминол-пероксидазной индикаторной реакции, в которой происходит окисление люминола до 3-аминофталата. Окисленная форма люминола образуется в возбужденном состоянии, испускаемый ею свет измеряют через 4 мин при 430 нм. Чувствительность индикаторной реакции зависит от вида используемой пероксидазы. Наиболее часто используют пероксидазу хрена, однако бактериальная пероксидаза способствует повышению чувствительности анализа, например глюкозы в 28 раз, а холестерина – в 134 раза.

Биолуминесцентные ферментативные технологии широко применяют для экспресс-тестирования воды и физиологических жидкостей на наличие загрязняющих веществ.

**Нефелометрия.** Данный метод используют для мониторинга ферментативных реакций, если мутность реакционной среды изменяется в течение реакции. Нефелометрия (греч. *nephelē* – облако) – это метод анализа вещества, основанный на измерении интенсивности светового потока, рассеянного взвешенными частицами данного вещества в растворе. Рассеяние света характерно для неэлектропроводных, оптически однородных и прозрачных частиц. Концентрация частиц должна быть незначительна.

Прямая связь между мутностью раствора и концентрацией суспендированного вещества осложняется взаимодействием излучения со взвешенными частицами. Это взаимодействие зависит от таких факторов, как концентрация рассеивающих частиц, распределение частиц по размерам, форма и ориентация частиц, показатели преломления рассеивающих частиц и среды, длина волны источника света.

Интенсивность и направление светового потока, рассеянного взвесью частиц, зависят от размера частиц. Если длина волны падающего света  $\lambda$  намного больше размера коллоидных частиц, то свет проходит через систему, не меняя направления. Если размер частиц меньше одной десятой длины волны ( $\lambda/10$ ), наблюдают симметричное рассеяние вокруг частицы (рэлеевское рассеяние). Длина волны видимого света лежит в пределах 380–760 нм, следовательно, размер частиц, способных к рэлеевскому рассеянию, не превышает 76 нм. Например, размер белковых молекул и надмолекулярных белковых комплексов находится в диапазоне от 1 до 1000 нм. Особенностью рэлеевского рассеяния является равенство частот падающего и рассеянного света.

Рассеяние большими частицами сильное, но неравномерное. Когда размер частиц приблизительно равен длине волны светового потока, то частицы рассеивают свет неравномерно – вперед по направлению потока рассеивается больше света, чем в обратном направлении (рассеяние Ми).

Для очень больших частиц преобладает отражение света. В этом случае рассеяние не зависит от длины волны. Оно зависит от геометрии частиц, коэффициента поглощения, концентрации и распределения по размерам, а иногда даже от типа измеряемой аппаратуры. Измерения рассеяния для таких систем очень зависят

от экспериментальных условий, поэтому одновременно нужно проводить измерения для стандартного образца.

При низкой мутности (разбавленные растворы) интенсивность рассеянного света частицами вещества пропорциональна его количеству. Определяя интенсивность светорассеяния данной системой, можно определять размер частиц или концентрацию дисперсной фазы.

В основе нефелометрии лежит зависимость, выражаемая уравнением Рэлея:

$$I_p = \frac{NV^2}{d^2\lambda^4} \left( \frac{n_1^2 - n^2}{n_1^2 + 2n^2} \right)^2 I_0(1 + \cos^2 \theta),$$

где  $I_0$  и  $I_p$  – интенсивность падающего и рассеянного света соответственно;  $\lambda$  – длина волны падающего света;  $\theta$  – угол между падающим и рассеянным светом;  $N$  – общее количество светорассеивающих частиц/см<sup>3</sup>;  $V$  – объем одной частицы, см<sup>3</sup> (для шарообразной частицы он равен  $4\pi r^3/3$ ,  $r$  – радиус частиц);  $d$  – расстояние до приемника рассеянного света;  $n_1$  и  $n$  – коэффициент преломления дисперсной фазы и дисперсионной среды соответственно.

В соответствии с уравнением Рэлея интенсивность рассеянного света при прочих равных условиях зависит от размеров частиц и их концентрации. Интенсивность рассеянного света обратно пропорциональна длине волны в четвертой степени ( $1/\lambda^4$ ), поэтому свет с короткими длинами волн рассеивается сильнее. Если показатели преломления среды и дисперсной фазы равны, то рассеяния не происходит. Рассеянный свет обычно поляризован.

В условиях нефелометрического определения ряд величин ( $V$ ,  $n_1$ ,  $n$ ,  $\lambda$ ,  $d$ ,  $\theta$ ) постоянен для исследуемого вещества, а величина  $N = Cl$ , где  $C$  – концентрация вещества;  $l$  – толщина раствора (также известная величина). Поэтому для определенного угла  $\theta$  уравнение Рэлея примет нижеследующий вид, в котором все известные параметры объединены в коэффициент  $K$ :

$$\frac{I_p}{I_0} = KC.$$

Уравнение показывает, что отношение интенсивности рассеянного света к интенсивности падающего пропорционально концентрации взвешенных частиц. Калибровочный график в координатах ( $I_p/I_0$ ;  $C$ ) будет линейен.

Серьезное затруднение в практике нефелометрии состоит в том, что интенсивность рассеянного света зависит от объема частиц. Большое значение в связи с этим приобретает унификация методики приготовления взвеси – строгое соблюдение концентрационных и температурных условий, порядка и скорости смешения растворов и т. д. При соблюдении этих условий объемы частиц суспензии получаются примерно одинаковые, и их размер вполне удовлетворительно воспроизводится от опыта к опыту. Условия приготовления суспензий стандартных и анализируемых растворов должны быть одинаковыми.

Стандартные нефелометры (специализированные спектрофотометры) используют для измерения света, рассеянного перпендикулярно или под углом  $45^\circ$  к падающему пучку лучей. Максимальная интенсивность рассеянного света наблюдается в том случае, когда он направлен перпендикулярно падающему свету. Длины волн,

используемые в большинстве нефелометров, находятся в диапазоне 340–650 нм. Принцип действия нефелометров основан на уравнивании интенсивностей рассеянного света исследуемой дисперсной системы и эталонного образца.

Нефелометрию используют, например, для определения липидов с помощью фермента липазы. Этот фермент катализирует гидролиз липидов с образованием жирных кислот, которые больше растворимы в водной среде, чем липиды. Мутность пробы уменьшается в течение реакции. Интенсивность рассеянного света исследуемым раствором сравнивают с таковой стандартного раствора (состав и размер частиц стандартной и исследуемой систем должны быть одинаковы).

Нефелометрия пригодна для определения концентрации веществ в области  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М.

**Турбидиметрия.** Метод исследования светорассеивающих растворов по прошедшему через них свету. Пробу освещают потоком света с интенсивностью  $I_0$ , а затем, так же как и в фотоколориметрии, измеряют интенсивность прошедшего излучения  $I_T$ . Метод турбидиметрии (лат. turbidus – мутный) применим к достаточно мутным средам, в которых рассеивающиеся частицы относительно большие (например, сточные воды).

Определение количества вещества в турбидиметрии основывается на следующем уравнении:

$$S = \lg \frac{I_0}{I_T} = kbC,$$

где  $S$  – мутность;  $b$  – длина пути в дисперсной фазе;  $C$  – концентрация рассеивающих частиц;  $k$  – коэффициент пропорциональности, иногда называемый молярным коэффициентом мутности (если  $C$  выражено в моль/л, а  $b$  – в см).

Уравнение используется в турбидиметрическом анализе точно таким же образом, как уравнение, выражающее закон Бугера – Ламберта – Бера в спектрофотометрии. В турбидиметрии, как и в абсорбционной спектрофотометрии, количество проходящего через раствор света уменьшается с повышением концентрации частиц. Концентрацию вещества находят по калибровочному графику, который строят в координатах ( $\lg(I_0/I_T)$ ;  $C$ ).

Нефелометрия более чувствительна, чем турбидиметрия, так как небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию сигнала при незначительном фоне. Преимущество турбидиметрического анализа заключается в том, что измерения могут быть выполнены практически на любом фотоколориметре или спектрофотометре. Если растворитель и рассеивающие частицы бесцветны, максимальная чувствительность достигается при использовании излучения голубой или ближней ультрафиолетовой области. Для окрашенных систем оптимальную длину волны необходимо подбирать экспериментально.

## 5.7.2. Электрохимические методы

В ферментативном анализе широкое применение нашли электрохимические методы, в основе которых лежит использование процессов, протекающих на поверхности электрода или в межэлектродном пространстве. Измеряемым электрическим параметром (аналитическим сигналом), интенсивность которого функ-

ционально связана с концентрацией определяемого вещества в анализируемом растворе, может быть разность потенциалов, сила тока, количество электричества, омическое сопротивление.

Для выполнения электрохимических определений нужна электрическая цепь или электрохимическая ячейка, составной частью которой является анализируемый раствор. Электрохимическая ячейка в простейшем варианте представляет собой пару электродов в растворе электролита, в ней химическая реакция является источником электрической энергии. Один из электродов электрохимической ячейки должен обратимо реагировать на изменение состава анализируемого раствора, чтобы по наличию (или отсутствию) аналитического сигнала и его интенсивности можно было судить о том, существует ли в растворе интересующий нас компонент и каково его количество. Этот электрод, являющийся как бы зондом, называют индикаторным (рабочим). Индикаторный электрод не должен реагировать с компонентами раствора. Поэтому для их изготовления применяют химически инертные токопроводящие материалы: благородные металлы (золото, платина, ртуть), углеродные материалы (графит, стеклоуглерод).

Различают прямые и косвенные электрохимические методы. В прямых методах используют функциональную зависимость силы тока (потенциал и т. д.) от концентрации определяемого компонента. В косвенных методах силу тока (потенциал и т. д.) измеряют в целях нахождения конечной точки титрования определяемого компонента подходящим титрантом, т. е. используют функциональную зависимость измеряемого параметра от объема титранта.

Электрохимические методы характеризуются высокой чувствительностью, селективностью, экспрессностью и позволяют проводить измерения с достаточно высокой точностью (от 0,05 до 10 %) и воспроизводимостью в широком интервале концентраций (от  $10^{-9}$  до 1 моль/дм<sup>3</sup>).

Электрохимические методы анализа можно классифицировать в зависимости от процессов, происходящих на электродах: методы, не связанные с электродной реакцией – измеряемый сигнал является откликом на изменения электрохимических свойств в объеме раствора (кондуктометрия); методы, основанные на электродной реакции, в результате которой ток через границу раздела не протекает, а на границе раздела фаз устанавливается равновесный потенциал, величина которого зависит от активности (концентрации) компонентов, участвующих в электродной реакции (потенциометрия); методы, базирующиеся на реакции между электродом и приэлектродной частью раствора, в ходе которой электроны или ионы переходят через границу раздела фаз, обуславливая возникновение тока (вольтамперометрия, амперометрия, кулонометрия, электрогравиметрия).

Для проведения электрохимического анализа ферментативных процессов используют рабочие электроды, покрытые слоем фермента (ферментные электроды). В простейшем варианте растворимый фермент помещают между двумя полупроницаемыми мембранами, одна из которых отделяет раствор фермента от электродного датчика, другая – от анализируемого раствора. Однако чаще ферменты иммобилизуют, включая их в полимерные или гелевые пленки (из альбумина, желатина, агар-агара, коллагена) или ковалентно присоединяя к поверхности стеклянных дисков или полупроницаемых (целлюлозных, поликарбонатных) мембран. Пленку с иммобилизованным ферментом прикрепляют к поверхности электрода. Часто такую пленку (мембрану) готовят непосредственно на поверхности электрода.

Субстрат диффундирует через слой, содержащий фермент, образуя электрохимически активное вещество, детектируемое при помощи, например, потенциометрического или амперометрического датчика.

*Ферментные электроды* — это датчики, позволяющие определить концентрацию веществ, участвующих в ферментативном процессе. Фермент катализирует превращение субстратов с образованием веществ (молекул, ионов), на которые реагирует (отклик) электрод. Ферментные электроды сочетают селективность и чувствительность энзимных методов анализа со скоростью и простотой измерений электрохимических методов.

В качестве электрохимических датчиков при создании потенциометрических ферментных электродов часто используют стеклянный рН-электрод,  $\text{NH}_4^+$ -специфичный электрод, газовые электроды для  $\text{CO}_2$  и  $\text{NH}_3$ . При создании амперометрических ферментативных электродов используют  $\text{O}_2$ - или  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительные электроды. Ферментные электроды позволяют определить концентрацию не только субстратов, но и веществ, являющихся ингибиторами или активаторами ферментативных реакций.

Первый ферментный электрод, чувствительный к глюкозе, был разработан в 1962 г. Л. Кларком, который поместил между мембранами электрода глюкооксидазу. Образующийся в результате ферментативной реакции гидропероксид определяли амперометрически. Позднее Дж. Гилболт предложил электрод потенциометрического типа для определения мочевины, реакция разложения которой до иона аммония катализируется уреазой, иммобилизованной в объеме полимера на поверхности стеклянного электрода, чувствительного к однозарядным ионам.

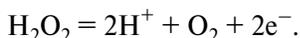
*Амперометрия* относится к методам электрохимического анализа, в которых приложенное к ячейке напряжение поддерживается постоянным, а протекающий через ячейку ток является функцией концентрации определяемого вещества. Амперометрический метод основан на измерении силы тока, возникающего в результате электрохимической реакции, протекающей на рабочем электроде, к которому приложен постоянный потенциал. Наиболее часто для изготовления рабочих электродов используют платину, золото, углерод, ртуть и серебро. В соответствии с потенциалом рабочего электрода определяемые вещества могут окисляться (положительный потенциал) или восстанавливаться (отрицательный потенциал); в первом случае рабочий электрод служит акцептором, во втором — донором электронов. Величина измеренного тока прямо пропорциональна количеству превращенного вещества.

Амперометрический ферментный анализ позволяет определить образование окисленных или восстановленных соединений в ферментативно-катализируемой реакции. Для амперометрического детектирования продуктов ферментативной реакции особенно подходят ферменты из класса оксиредуктаз (например, каталазы, пероксидазы), катализирующих реакции окисления субстратов кислородом, т. е. реакции с переносом электрона или атома водорода. Такой перенос следует сначала на простетическую группу фермента. Прямой перенос электрона от простетической группы к поверхности электрода возможен только в очень редких случаях. Поэтому большинство амперометрических измерений базируется на детектировании косубстратов, которые принимают заряд от простетической группы и концентрация которых изменяется в ходе ферментативной реакции. Типичным примером такого переноса заряда на косубстрат является восстано-

ление в ходе ферментативной реакции, катализируемой оксиредуктазами, растворенного кислорода до гидропероксида, или перенос гидрид-иона на НАДФ<sup>+</sup>.

Многие ферментативные реакции протекают с выделением или потреблением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или O<sub>2</sub>, поэтому для анализа ферментов и субстратов используют амперометрические ферментные электроды.

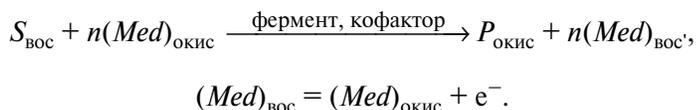
Гидропероксид может быть окислен на платиновом электроде при постоянном потенциале +600 мВ с образованием кислорода:



Образующиеся при этом электроны измеряются в виде тока, который прямо пропорционален концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и, следовательно, концентрации первичного субстрата.

С другой стороны, с помощью амперометрического кислородного электрода можно контролировать расход кислорода во время ферментативной реакции.

В добавление к пероксидобразующим реакциям амперометрия может применяться в соединении с различными оксидазами и дегидрогеназами, которые используют низкомолекулярные медиаторы (*Med*) в качестве акцепторов электронов (феррицианиды, производные хинонов). Вследствие ферментативной реакции медиаторы восстанавливаются в растворе, а далее реокисляются на рабочем электроде, образуя измеряемый ток:



С помощью амперометрических ферментных электродов (флавинадениндинуклеотидзависимые оксидазы) определяют глюкозу, холестерин, аминокислоты. Например, для определения глюкозы применяют реакцию ее окисления кислородом воздуха до глюконовой кислоты и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, катализируемую глюкозооксидазой. Минимальное содержание глюкозы, которое можно определить этим способом, составляет 0,01–0,03 мМ.

В основе *потенциометрических* измерений лежит зависимость равновесного потенциала электрода от активности (концентрации) определяемого иона практически в отсутствие тока между индикаторным электродом и электродом сравнения (гальванический элемент), погруженными в анализируемый раствор, при замыкании гальванической цепи.

Потенциометрические методы анализа основаны на измерении электродвижущей силы (ЭДС) электрохимической ячейки в отсутствие тока. Роль электрохимической ячейки в потенциометрии выполняет гальванический элемент. При этом один из электродов ячейки должен быть неполяризуемым индикаторным электродом, потенциал которого зависит от активности определяемого иона. Зависимость равновесного потенциала индикаторного электрода от состава и активности определяемого вещества описывается уравнением Нернста (25 °С):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}},$$

где  $E^0$  – стандартный электродный потенциал данной редокс-системы, В;  $R$  – универсальная газовая постоянная, равная 8,31 Дж/(мольК);  $T$  – абсолютная темпера-

тура;  $F$  – постоянная Фарадея (96 500 Кл/моль);  $n$  – число электронов, принимающих участие в электродной реакции;  $a_{ox}$ ,  $a_{red}$  – термодинамические активности окисленной и восстановленной форм потенциалопределяющих ионов соответственно. Для практических целей активности компонентов в уравнении заменяют на их концентрации, что справедливо для бесконечно разбавленных растворов, когда коэффициенты активности компонентов равны единице.

Второй электрод выполняет функцию электрода сравнения. Его потенциал должен быть постоянен, известен и не зависеть от состава изучаемого раствора. Величина ЭДС-цепи равна разности потенциалов между электродами электрохимической ячейки.

При взаимодействии фермента с анализируемым веществом продукт реакции изменяет окислительно-восстановительный потенциал, что является индикатором содержания исследуемого вещества в среде.

В практике ферментативного анализа наибольшее распространение нашли ферментные ионоселективные электроды с обменной функцией по определяемому иону. В основе действия таких электродов лежат катализируемые ферментами реакции, которые превращают неионное вещество (субстрат) в ион, определяемый соответствующим ионоселективным электродом. Потенциал ионоселективного электрода линейно зависит от логарифма активности анализируемого иона в растворе. Стеклообразные электроды для измерения рН, обладающие обменной функцией по иону водорода, используют для определения ферментативных реакций, в которых образуются или расходуются протоны. В одной из конструкций ферментного электрода для определения глюкозы в качестве чувствительного элемента применяют стеклянный рН-электрод, регистрирующий изменение концентрации глюконовой кислоты, образующейся в результате ферментативной реакции.  $\text{NH}_4^+$ -Селективный стеклянный электрод, на который иммобилизована уреазы, используют для определения мочевины, подвергающейся гидролизу под действием уреазы с образованием иона аммония  $\text{NH}_4^+$ :



Ионоселективные электроды используются для определения пенициллина, так как пенициллиназа может быть опосредована ионами  $\text{I}^-$  или  $\text{CN}^-$ . Потенциометрические ферментные электроды применяют для определения аминокислот, мочевины, глюкозы, нитрит- и нитрат-ионов. Для ионоселективных электродов активности (концентрации) ионов определяют, как правило, с помощью градуировочного графика или методом добавок.

В других потенциометрических методах применяют газочувствительные электроды для детектирования аммиака (определение диаминазы) и  $\text{CO}_2$  (определение декарбоксилазы). С помощью газового  $\text{NH}_3$ -чувствительного электрода определяют аммиак, получающийся при гидролизе мочевины в присутствии уреазы. Подобный же электрод использовали при измерении количества мочевины в сточных водах, а также в водных растворах и сыворотке крови автоматизированным методом в потоке.

*Кондуктометрический метод анализа* основан на использовании зависимости электропроводности растворов от их концентрации. Электропроводностью называют способность вещества проводить электрический ток под действием внешнего

электрического поля. Электропроводность – аддитивная величина, определяемая всеми ионами, присутствующими в растворе. Кондуктометрия позволяет определять содержание индивидуального вещества в растворе простым измерением электропроводности раствора. Кондуктометрический анализ основан на изменении концентрации вещества или химического состава среды в межэлектродном пространстве, он не связан с потенциалом электрода, который обычно близок к равновесному значению.

Для измерения электропроводности в кондуктометрии используется электрохимическая ячейка, представляющая собой стеклянный сосуд с двумя впаянными в него идентичными инертными электродами, между которыми находится анализируемый раствор. Через раствор пропускают переменный ток, чтобы избежать поляризации электродов и предотвратить возможность электролиза в приэлектродном пространстве.

При измерении электропроводности прохождение тока вызывает химические реакции (электролиз), которые способны приводить к изменению состава раствора у электрода и вызывать поляризацию электродов, что может являться источником погрешностей при измерениях. Во избежание этого электропроводность измеряют при переменном токе. Незначительная поляризация постоянно нивелируется при перемене направления тока.

Для оценки концентрации аналитов используют калибровочную кривую зависимости электропроводности от концентрации вещества.

Электрическая проводимость раствора определяется величиной его ионной силы. Кондуктометрия хорошо подходит для анализа ферментативных процессов, ведущих к образованию большого числа ионов. Например, уреазы катализирует гидролиз мочевины с образованием четырех ионов из одной незаряженной молекулы субстрата, что приводит к значительному повышению ионной силы анализируемого раствора. При кондуктометрическом детектировании достигается хорошее соотношение  $S/N$  (от англ. signal – сигнал, noise – шум), если начальная ионная сила (концентрация буфера) измеряемой среды низкая (5–10 мМ).

#### **5.7.4. Методы с применением радиоактивной метки**

Методы с применением радиоактивной метки базируются на использовании в анализе соединений, в состав которых включен радиоактивный изотоп (радиоактивная метка), и определении меченого соединения путем детектирования испускаемого им ионизирующего излучения. Свойство радиоактивности атомов используют как средство информации об их количественном содержании.

В основе метода меченых атомов лежат следующие принципы. Химические свойства различных изотопов одного и того же элемента идентичны, и, как следствие этого, изотопный состав остается неизменным при физико-химических превращениях. Наличие радиоактивного изотопа какого-то элемента в составе вещества не изменяет его химических свойств, но позволяет проследить за его поведением в исследуемом процессе. Метод впервые предложен в 1913 г. венгерским радиохимиком Д. Хевеши и немецким химиком Ф. Панетом для изучения химических реакций.

Измерение радиоактивности образцов является прямым методом. Благодаря возможности определять радиоактивную метку в очень малых количествах можно детектировать очень малые количества вещества, которые содержат радиоизотоп. Поэтому преимуществами метода являются низкие пределы обнаружения, специфичность и точность определения, простота и доступность измерительной аппаратуры. Рутинные методы с использованием радиоактивных меток позволяют выявить количества в  $10^5$  раз меньшие, чем это нужно для химического анализа. Благодаря такой высокой чувствительности можно детектировать вещества в очень низких количествах даже в тех случаях, когда это нельзя сделать другими методами.

Метод с применением радиоактивной метки позволяет определять как концентрацию субстратов, так и активность ферментов. Радиоактивную метку вводят в состав субстрата. Затем после предварительной стадии отделения продукта от субстрата (например, методом ТСХ, ионно-обменной или аффинной хроматографии) определяют радиоактивность оставшегося субстрата или образовавшегося продукта. Высокая чувствительность метода дает возможность определять концентрацию продукта  $10^{-6}$  М в очень малых количествах образца (порядка мкг).

В качестве радиоактивных меток используют различные изотопы:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{65}\text{Zn}$  и др. Выбор изотопа определяется главным образом периодом его полураспада, типом и энергией излучения. Радиоактивные изотопы, например  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{35}\text{S}$  (дочерний изотоп  $^{35}\text{Cl}$ ), спонтанно распадаются с испусканием  $\beta$ -излучения, энергия которых составляет 18, 156 и 167 кэВ соответственно:



Соединения, меченные тритием и углеродом-14, устойчивы, поскольку период полураспада изотопа  $^3\text{H}$  составляет 12,3 лет, а  $^{14}\text{C}$  – 5730 лет, в то время как период полураспада изотопа  $^{35}\text{S}$  – 87 дней.

Для определения соединения, содержащего радиоизотоп, используют понятие специфической (удельной) активности, которая дает соотношение общей радиоактивности пробы к количеству молей меченого соединения в этой пробе и измеряется в единицах СИ Бк/моль.

Детектирование радиоактивности меченых соединений основано на взаимодействии излучения с веществом. В биоанализе наибольшее применение нашли сцинтилляционные и автордиографические методы.

В основе *сцинтилляционных* методов лежит способность ряда материалов превращать энергию ядерных излучений в энергию фотонов светового излучения. При использовании изотопов  $^{14}\text{C}$  и  $^3\text{H}$  в качестве радиоактивных меток измерение радиоактивности проводят на сцинтилляционном счетчике – радиометрическом приборе, в котором детектором излучения является сцинтиллятор.

В основе работы сцинтилляционного детектора лежит способность некоторых материалов – сцинтилляторов – преобразовывать энергию ядерных излучений ( $\gamma$ -квантов,  $\beta$ -электронов,  $\alpha$ -частиц) в фотоны – кванты видимого или ультрафиолетового светового излучения. Отдельная вспышка света, вызванная прохождением через сцинтиллятор ядерной частицы или  $\gamma$ -кванта, получила название *сцинтилляции* (вспышка света). Действие сцинтилляционных счетчиков основано на том, что

излучение при прохождении через вещество вызывает возбуждение его молекул, которые, возвращаясь в нормальное состояние, испускают свет.

Сцинтилляторы различаются по таким важным характеристикам, как степень превращения энергии ионизирующей частицы в фотоны; степень реабсорбции; длительность периода высвечивания; спектральный состав светового излучения, составляющего сцинтилляцию. Чем меньше длительность высвечивания сцинтиллятора, тем меньше разрешающее время сцинтилляционного счетчика. У наиболее распространенных сцинтилляторов время высвечивания составляет от  $10^{-9}$  до  $10^{-5}$  с. Материал сцинтиллятора должен быть прозрачен к собственному излучению. Виды сцинтилляторов:

1) неорганические: ZnS(Ag), NaI(Tl), CsI(Tl) и др. (в скобках после формул указан активатор);

2) кристаллические органические: антрацен, транс-стильбен, нафталин и др.;

3) жидкие органические: растворы паратерфенила в ксилоле или диоксане, раствор паратерфенила в ксилоле, содержащий добавку дифенилгексатриена, и др.;

4) пластмассовые сцинтилляторы в виде твердых растворов; обычно изготавливаются на основе полистирола, в который перед полимеризацией вводят 1,4-дифенилбензол или некоторые другие ароматические соединения;

5) газообразные: ксенон и другие инертные газы.

В сцинтилляционном детекторе фотоны светового излучения, испускаемые сцинтиллятором, собираются на фотоприемнике (фотокатод фотоэлектронного умножителя, фотодиоды или другие фотоприемники), преобразуются в импульс тока, усиливаются и записываются той или иной регистрирующей системой. Для детектирования  $\beta$ -электронов используют жидкие сцинтилляционные счетчики, а для  $\gamma$ -излучения – твердотельные.

*Авторадиография* (авторадиография, радиоавтография; от лат. radio – излучаю и греч. grapho – пишу) – это простейший прямой способ детектирования ионизирующего излучения, основанный на его фотохимическом действии. Ионизирующее излучение, как и свет, может вызывать потемнение фотоэмульсии или пленки со светочувствительным слоем (рентгеновская пленка, фотопленка, поляроидные слайды), соответствующее интенсивности излучения. Содержащиеся в объекте радиоактивные изотопы как бы сами себя фотографируют (отсюда и название).

Для обнаружения радиоактивных изотопов фотографическая эмульсия приводится в соприкосновение с исследуемым материалом, в результате чего  $\alpha$ - или  $\beta$ -частицы вызывают почернение фотоэмульсии в виде линий (треков) по ходу пробега частицы. Фотографические изображения, получаемые этим методом, называют авторадиограммами. Степень потемнения пленки (или изменения цвета) регистрируется оптически (при использовании сканеров или микроскопа) и оценивается с помощью стандартной кривой. Авторадиография в принципе подходит для детектирования почти всех радиоизотопов.

Механизм образования изображения на пленке под действием радиоактивного излучения в основных чертах такой же, как и при действии на фотоэмульсию квантов видимого света. Пленки для авторадиографии или фотоэмульсии содержат галогениды серебра (AgBr, AgCl или AgI), инкапсулированные в желатин. Принцип химической реакции при авторадиографии сводится к реакции восстановления, например бромистого серебра светочувствительного слоя до металлического серебра под воздействием ионизирующего излучения. Зерна металлического серебра

образуются по ходу движения элементарных частиц в эмульсии и становятся заметными после ее проявления в виде темных пятен.

Характер следов (треков), которые остаются на автордиограммах после прохождения отдельных частиц или  $\gamma$ -квантов через эмульсию, зависит от типа излучения и в меньшей степени от его энергии. При взаимодействии с электронными оболочками атомов  $\beta$ -частицы многократно изменяют направление своего движения, и к тому же их ионизирующее действие относительно невелико. Вследствие этих причин следы  $\beta$ -частиц на автордиограммах представляют собой цепочки из отдельных проявленных зерен, расположенных вдоль линий сложной конфигурации. Появление изображения при регистрации  $\gamma$ -квантов автордиографическим методом связано с различными эффектами взаимодействия  $\gamma$ -квантов с веществом фотоэмульсии. Поскольку вероятность протекания таких взаимодействий на единицу пути  $\gamma$ -кванта мала, то и эффективность их регистрации автордиографическим методом значительно ниже, чем эффективность регистрации  $\beta$ -частиц.

В настоящее время методы с использованием радиоактивных меток остаются актуальными, хотя постепенно вытесняются методами, которые не требуют специальных приспособлений и оборудования.

Анализ с использованием субстратов, маркированных радиоактивной меткой, применяют для определения гуанозин-5'-трифосфата (ГТФ), который участвует в процессах регуляции гормонов и синтеза белков. В качестве фермента используют фосфоенолпируваткарбоксикиназу (ФЕПКК), катализирующую превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват (ФЕП). Для данной реакции требуется ко-субстрат – высокоэнергетический фосфат, а именно ГТФ, трансформирующийся в гуанозин-5'-дифосфат (ГДФ):



В ходе анализа все реагенты в избытке добавляют к пробе, содержащей ГТФ, и оставляют на ночь. Образующееся количество ФЕП( $^{14}\text{C}$ ) определяется концентрацией присутствующего в образце ГТФ и константой равновесия реакции. Меченый ФЕП( $^{14}\text{C}$ ) отделяют с помощью ИОХ и детектируют сцинтилляционным счетчиком.

### 5.7.5. Манометрические и калориметрические методы

**Манометрические методы.** Позволяют анализировать реакции, протекающие с выделением или поглощением газов. Манометрия основана на законе об идеальном газе, в соответствии с которым объем, занимаемый газом, прямо пропорционален числу его молей при постоянных температуре и давлении. Автоматические манометры (измеряют давление относительно атмосферного давления) могут быть использованы для измерений в кинетических методах, т. е. для измерения объема газа за единицу времени. Манометрию можно использовать для определения общего количества газов, образующихся в ферментативных реакциях (например,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ). Однако манометрию вытесняют более селективные методы анализа.

**Калориметрия** – это совокупность методов и средств измерения тепловых эффектов, сопровождающих различные физические, химические и биологические процессы. Большинство ферментативных реакций являются экзотермическими

и сопровождаются выделением тепла на уровне 5–100 кДж/моль (типичное изменение температуры при этом порядка  $10^{-2}$  °C).

**Изотермическая титрационная калориметрия (ИТК).** Позволяет проводить прямые измерения теплоты, выделенной или поглощенной в ходе химической реакции, и таким образом получать информацию о механизме химического процесса. В настоящее время ИТК широко используют для определения термодинамических параметров взаимодействий молекул в растворе, например лекарств с белками, липидов с белками и т. п., а также для измерения скорости и определения термодинамических параметров ( $k_{cat}$ ,  $K_M$ ,  $\Delta H$ ) ферментативных реакций. Поскольку теплота произвольно выделяется в ходе ферментативной реакции, то ИТК не требует какой-то модификации взаимодействующих молекул во время анализа и может быть выполнена в растворе. Кроме того, для измерений необходимо очень малое количество пробы (фермента) (1–25 мкл). Контроль химического процесса происходит в реальном времени.

Чувствительность метода ИТК определяется величиной молярной энтальпии реакции (хорошо подходит для экзо- или эндотермических реакций).

Метод ИТК базируется на измерении скорости генерирования теплоты ( $dQ/dt$ ) в ходе превращения субстрата в продукт, что позволяет определить скорость ферментативной реакции ( $v_0$ ). Измеряемая теплота ( $Q$ ) как функция времени ( $t$ ) определяется как тепловая мощность:

$$\text{тепловая мощность} = \frac{dQ}{dt}.$$

Количество теплоты, связанное с конвертацией числа  $n$  молей субстрата в продукт, можно выразить как

$$Q = n\Delta H_{app} = [P]V\Delta H_{app},$$

где  $V$  – объем раствора в рабочей ячейке;  $[P]$  – молярная концентрация продукта реакции;  $\Delta H_{app}$  – экспериментально определяемая молярная энтальпия реакции.

Так, измеряемая тепловая мощность, генерированная ферментативной реакцией, даст информацию о скорости реакции:

$$\text{тепловая мощность} = \frac{dQ}{dt} = \frac{dn}{dt}\Delta H_{app} = \frac{dP}{dt}V\Delta H_{app}.$$

В результате перегруппировки получим

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \left( \frac{dQ}{dt} \right) \left( \frac{1}{V\Delta H_{app}} \right).$$

Изотермический титрационный калориметр состоит из двух одинаковых ячеек (эталонной и рабочей), поддерживаемых строго при одинаковой температуре (за счет постоянного добавления теплоты). Ячейки изготовлены из высокотермопроводных и химически инертных материалов (например, золото в адиабатической изоляции). Рабочая ячейка содержит исследуемые образцы макромолекул (например, раствор фермента). Эталонная ячейка заполнена водой или буфером (для буфера нужно выбирать соли, теплота образования ионов из которых равна

нулю, например, фосфатный). Раствор макромолекул (фермента) в рабочей ячейке титруется точным количеством лигандов (раствор субстрата или эффектора).

Чувствительные термодатчики позволяют определять разницу в температуре между рабочей и эталонной ячейками. До введения лиганда к эталонной камере прикладывают определенную постоянную мощность ( $< 1$  мВт), что приводит к активации нагревателя в рабочей ячейке (вследствие существования обратной связи между ячейками). В ходе анализа проба титруется точным количеством лиганда. При взаимодействии молекул в рабочей ячейке выделяется (потребляется) теплота (это зависит от природы реакции), что в результате приводит к повышению (снижению) температуры. Разница в температуре между ячейками измеряется, и определенный уровень термальной теплоты подводится к рабочей ячейке для сведения температурного перепада к нулю (обратная связь), т. е. ячейки снова имеют одинаковую температуру. Таким образом, исходный измеряемый сигнал — это теплота, подведенная к рабочей ячейке. Ее количество равно теплоте, выделенной (расходованной) в реакции до достижения равновесия. Измеренное количество теплоты прямо пропорционально количеству связанных молекул. В ходе анализа осуществляют серию добавлений лиганда в ячейку, т. е. ввод раствора лиганда (например, 10 мкл) повторяют через равные промежутки времени (например, 60 с). С увеличением числа добавлений лиганда регистрируемый сигнал снижается (стремится к нулю) и становится постоянным. Это происходит вследствие насыщения макромолекул (например, фермента) лигандом (субстратом).

Калориметр позволяет получить термограмму  $Q = f(t)$ , представляющую собой зависимость тепловой мощности от времени, т. е. на оси  $Y$  откладывают величину  $Q$  (количество теплоты, получаемое или теряемое калориметром в единицу времени, мккал/с), а на оси  $X$  — время (с).

Скорость ферментативной реакции определяют путем измерения изменения тепловой мощности, подводимой к рабочей ячейке после добавления субстрата (фермента).

Анализ полученной термограммы позволяет получить энтальпию ( $\Delta H$ ), т. е. количество теплоты, выделенной на моль связанного лиганда. Зависимость теплоты реакции от соотношения концентрации лиганда к концентрации макромолекулы позволит определить термодинамические параметры их взаимодействия (константу диссоциации, число молей). Термограмма реакции может быть преобразована в зависимость концентрации субстрата ( $[S]$ ) от времени ( $t$ ).

## 5.8. Имобилизованные ферменты

Растворы ферментов широко используют в различных методах для определения субстратов и ферментативной активности. Однако аналитическое использование растворов ферментов сопряжено с определенными недостатками. Растворенные ферменты не возвращаются в оборот повторно, при том что в большинстве случаев ферменты являются весьма дорогостоящими препаратами, выделяемыми из дефицитного растительного или животного сырья. Кроме того, функциональная активность и стабильность ферментов в растворе существенно снижаются с течением времени. Растворенные ферменты очень чувствительны

к действию различных примесей, которые могут содержаться в анализируемых пробах. По этим причинам широкое распространение получили иммобилизованные ферменты, которые искусственно связаны с нерастворимым носителем. При иммобилизации (лат. *immobilis* – неподвижный) водорастворимый фермент переходит в нерастворимую форму, превращаясь таким образом из гомогенного катализатора в гетерогенный, благодаря чему удается удалять их из реакционной смеси (отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Иммобилизация существенно повышает стабильность ферментов, делает их значительно устойчивыми к окружающим условиям. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60 % полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом.

Ферменты обычно инкорпорируются в стационарную фазу, помещенную в колонку, при этом субстрат находится в мобильной фазе, его превращение в продукт происходит при течении мобильной фазы через колонку с иммобилизованным ферментом. Такой ферментативный реактор может использоваться в течение нескольких месяцев.

Первой целенаправленной работой по созданию системы «носитель – связанный фермент» была работа Д. Кэмпбелла (1951) по ковалентной иммобилизации ферментов на целлюлозу. В 1965 г. Дж. Гилболт для обнаружения фосфорорганических пестицидов в воздухе использовал холинэстеразу, включенную в крахмальный гель, нанесенный на полиуретановую пластину. В 1966 г. Г. Хикс и С. Апдайк впервые применили аналитические колоночные реакторы с ферментами, включенными в полиакриламидный гель, с помощью глюкозооксидазы определяли глюкозу, а лактатдегидрогеназы – молочную кислоту.

Применение иммобилизованных ферментов расширило возможности ферментативного анализа. Более высокая стабильность и возможность многократного использования иммобилизованных ферментов позволили снизить стоимость анализов, повысить экспрессность, проводить химический анализ в потоке и автоматизировать ферментативные методы. Число биохимических анализов, выполняемых с применением ферментов, например в медицинских учреждениях, уже значительно превышает число всех анализов, выполняемых на промышленных предприятиях каким бы то ни было методом. Иммобилизованные ферменты, несмотря на их многочисленные достоинства, также могут обладать определенными недостатками. Некоторые иммобилизованные ферменты имеют более низкую активность и большую стоимость в сравнении с их растворимыми формами. Отдельные методы иммобилизации влияют на кинетические параметры ферментов.

*Методы иммобилизации* ферментов подразделяются на физические и химические. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями, при этом нативный состав фермента остается неизменным. Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой доступной для него является лишь ограниченная часть общего объема. Физические методы иммобилизации можно разделить на следующие группы: адсорбция на нерастворимых носителях; захват либо включение в пористую матрицу (например, гель); капсулирование (пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полу-

проницаемой перегородки (например, мембраны); включение в двухфазную среду, когда фермент может находиться только в одной из фаз (рис. 5.24).

Химические методы базируются на образовании ковалентных связей между функциональными группами поддерживающего материала (матрицей или носителем) и функциональными группами фермента. Химические способы можно подразделить на неполимерные методы и методы, основанные на образовании поперечно-сшитых молекул (поперечных межмолекулярных связей). В первом случае ковалентные связи образуются только между матрицей и ферментом (ковалентная сшивка), но не между индивидуальными молекулами фермента. В другом случае связи образуются как между ферментом и матрицей, так и между молекулами фермента (поперечная сшивка) либо только между молекулами фермента без использования матрицы (см. рис. 5.24).

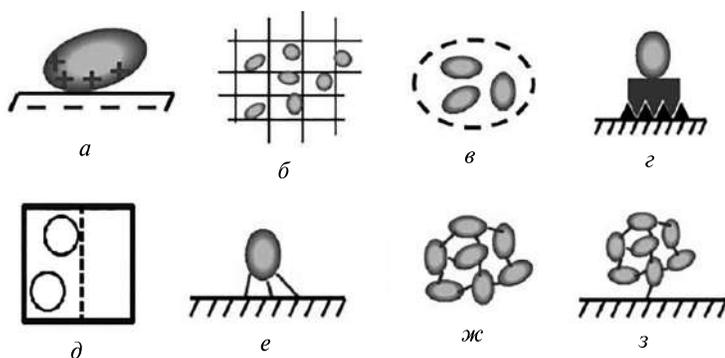


Рис. 5.24. Методы иммобилизации ферментов: *a* – адсорбция на нерастворимых носителях; *б* – захват либо включение в пористую матрицу; *в* – капсулирование; *г* – аффинная иммобилизация; *д* – включение в двухфазную среду; *е* – ковалентная сшивка; *ж*, *з* – поперечная сшивка

Кроме того, существует иммобилизация фермента, основанная на биоспецифических взаимодействиях, – аффинная (нековалентная рецептор-опосредованная) иммобилизация. В этих случаях носитель содержит аффинные лиганды, способные взаимодействовать с ферментами (нековалентные взаимодействия) (см. рис. 5.24).

**Носители (матрицы) для иммобилизации ферментов.** К настоящему времени создано огромное число разнообразных *носителей* (иногда называют матрицей) *для иммобилизации ферментов*. По Дж. Порату (1974), идеальные материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими свойствами: нерастворимостью, высокой химической и биологической стойкостью, значительной гидрофильностью (минимизация взаимодействия матрицы с молекулой белка), достаточной проницаемостью как для субстратов (должны быть минимальные диффузионные затруднения для достижения *S* активного центра *E*), так и для продуктов реакции.

Важной характеристикой носителя является наличие функциональных групп, их плотность и распределение на поверхности, что, с одной стороны, дает возможность легко активировать носитель, а с другой – определяет максимальную производительность связывания фермента с носителем. На прочность иммобилизации фермента влияет число потенциальных для связывания функциональных групп

в его молекуле, а также полярность (т. е. гидрофильно-гидрофобный баланс) и распределение электростатического заряда на поверхности как белковой глобулы, так и носителя. Природа носителя имеет существенное влияние на активность фермента и кинетические параметры реакции. Такие механические свойства материалов, как прочность, форма и размер, пористость и плотность, также играют важную роль в процессе иммобилизации. Носитель должен иметь высокую емкость по ферменту, т. е. обладать высокой внутренней поверхностью и проницаемостью для фермента в процессе иммобилизации. Материалы носителя часто встречаются в виде мелких гранул, пористых шариков, трубочек и пластин.

В зависимости от природы носители могут быть органическими и неорганическими. Органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических – полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные носители.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам – высокую стоимость. Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Для придания химической устойчивости их линейные цепи поперечно сшивают эпихлоргидрином и в полученные сетчатые структуры вводят различные ионогенные группы. Из природных аминокислот в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру. Среди белков практическое применение в качестве носителей получили кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатин. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в больших количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Такие белки способны к биодegradации, что нужно учитывать при конструировании иммобилизованных ферментов для биотехнологических целей.

Синтетические полимерные носители включают полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта, а также полиамидные и полиуретановые полимеры. Их преимуществом является механическая прочность, возможность варьирования в широких пределах величины пор и введения различных функциональных групп.

Носители неорганической природы представляют собой материалы, изготовленные из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, а также силиконы и оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основным преимуществом неорганических носителей является легкость их регенерирования. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получить их с любой степенью пористости.

Для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном технологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

## 5.8.1. Физические методы иммобилизации ферментов

**Адсорбция на нерастворимых носителях.** Данный способ иммобилизации ферментов является одним из широко распространенных в промышленности и не потерял своего значения, хотя был предложен еще в 1916 г. (Дж. Нельсон, Э. Гриффин).

Адсорбцией называют процесс самопроизвольного увеличения концентрации вещества на границе раздела фаз «поверхность твердого материала – раствор». Адсорбционное равновесие определяется двумя процессами: притяжением молекул к поверхности под действием межмолекулярных сил и тепловым движением, стремящимся восстановить равенство концентраций в поверхностном слое и объеме фазы. Количественно адсорбцию характеризуют числом молей или массой вещества, накапливающегося на границе раздела фаз, в расчете на единицу площади поверхности раздела.

Физическая адсорбция базируется на взаимодействии молекул или ионов адсорбата (растворенного вещества) с поверхностью адсорбента за счет нековалентных взаимодействий. Поверхность твердых тел, как и жидкостей, обладает избыточной энергией Гиббса. Тенденция к уменьшению избыточной поверхностной энергии Гиббса проявляется у твердых тел в способности удерживать на поверхности молекулы газа или растворенного вещества. Физическая адсорбция – обратимый экзотермический процесс. Когда частица адсорбируется на поверхности, ее поступательное движение ограничивается, поэтому процесс сопровождается уменьшением энтропии. При повышении температуры адсорбция уменьшается, а десорбция увеличивается. Теплота адсорбции ( $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$ ) всегда отрицательна, так как  $\Delta G$  и  $\Delta S$  отрицательны при самопроизвольной адсорбции. Значение энтальпии физической адсорбции невелико и обычно находится в диапазоне от  $-10$  до  $-30$  кДж/моль.

Процесс адсорбционной иммобилизации достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. Данный метод широко используется в промышленности и характеризуется высоким выходом иммобилизованных молекул фермента (примерно 1 г фермента на 1 г матрицы). Раствор фермента инкубируют с адсорбентом несколько часов, потом адсорбент отделяется и промывается буфером. После отмывки неадсорбированного белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических вандерваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий, водородных связей между носителем и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента.

Преимуществом метода адсорбционной иммобилизации является простота применяемых методик, а также доступность и сравнительно небольшая стоимость сорбентов, выступающих в роли носителей. Сорбентам можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. Однако прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода. Правильный подбор условий иммобилизации и выбор наиболее подходящей матрицы позволяют минимизировать десорбцию.

В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации могут быть использованы как неорганические, так и органические материалы. Протекание процесса

адсорбции и прочность связывания фермента с носителем в значительной степени зависят от условий проведения иммобилизации. Оптимальные условия адсорбции подбирают эмпирически, варьированием значения рН и ионной силы раствора фермента, количества фермента и адсорбента, температуры и времени адсорбции. Значение рН среды имеет наибольшее влияние на физическую адсорбцию, если сорбция осуществляется главным образом за счет электростатических взаимодействий. Это связано с тем, что при изменении рН меняется состояние функциональных групп носителя и белка, ответственных за связывание. Например, процент связывания инвертазы с анионообменником при рН 7,0 составляет 100 %, а на катионообменнике – только 34 %. При использовании носителей, не являющихся ионообменниками, максимальная сорбция достигается при значении рН, равном изоэлектрической точке белка.

Важным фактором является удельная поверхность и пористость носителя. Сорбционная емкость носителя пропорциональна его общей удельной поверхности. При иммобилизации ферментов нужно учитывать, как диаметр пор соотносится с размером молекулы фермента. Если поры малы и не могут вместить молекулу фермента, то для белка оказывается доступной только часть общей поверхности, т. е. сорбционная емкость носителя по отношению к ферменту небольшая, несмотря на очень большую общую удельную поверхность.

**Иммобилизация ферментов путем включения (захвата) в полимерный гель.** Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор. По сути, размер молекул фермента предотвращает их вымывание из пор геля посредством диффузии. Удерживание фермента в сетке геля осуществляется физически (механическое обездвиживание). Дополнительный вклад в удерживание белка могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Малые молекулы вещества (субстраты и продукты) свободно диффундируют через полимерную сетку. Для метода характерен высокий выход иммобилизованных молекул фермента (примерно 1 г фермента на 1 г геля).

Захват фермента в поперечно-сшитый полимер происходит во время реакции полимеризации, протекающей в присутствии фермента. Для этих целей часто используют полиакриламидный гель, полученный полимеризацией водных растворов мономеров в присутствии фермента. В результате образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. При включении ферментов в ПААГ важно правильно выбирать соотношение количества мономера (акриламида) к количеству сшивающего агента (бис-акриламида), определяющее размер пор, в которые захватывается фермент. Суммарное количество мономера и поперечных сшивков определяет механические свойства геля – стабильность и жесткость. К примеру, холинэстераза может быть захвачена в ПААГ, получаемый из 5 % сшивающего агента и 15 % мономера в водном растворе. В этих условиях сохраняется 56 % от общей активности фермента. Высокое суммарное количество мономера и сшивающего агента может привести к тому, что фермент денатурирует, а повышенное содержа-

ние сшивающего агента (снижение размера пор) приводит к захвату меньшего количества фермента.

Другой способ включения фермента в гель состоит в том, что фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Этот способ обычно используют для таких гелей, как агар-агар, агароза и альгинат.

Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя. Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время такая матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата. Поэтому для ферментов, катализирующих превращение высокомолекулярных субстратов, данный метод иммобилизации неприменим вообще.

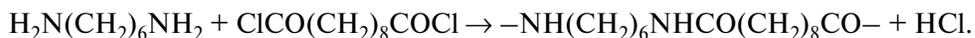
**Капсулирование.** Это способ иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых мембран. Он заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной. Через такую мембрану могут легко диффундировать небольшие молекулы субстрата и продукта, но не крупные молекулы фермента. Капсулирование происходит в области высокой концентрации фермента. В качестве материала мембран используют нейлон, целлюлозу, полиакрилаты и полисульфоны.

Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). Микрокапсулирование дает аналитические пригодные системы из-за их механической стабильности. В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется в диапазоне от микрометров до миллиметров, толщина мембраны составляет сотые и десятые доли микрометра, а диаметр пор – порядка нанометров.

Одним из способов получения микрокапсул является диспергирование при энергичном перемешивании водного раствора фермента в диэтиловом эфире, содержащем ПАВ, которые выступают в роли эмульгатора. К полученной эмульсии, не прекращая перемешивания, добавляют эфирный раствор полимера (обычно цитрат целлюлозы). При соприкосновении с поверхностью эмульсионных капель нерастворимый в воде полимер образует тонкую оболочку – микрокапсулу.

Другой способ микрокапсулирования заключается в образовании мембраны на поверхности водных микрокапель за счет реакции межфазной поликонденсации двух компонентов, один из которых растворен в водных каплях эмульсии, а другой – в объеме органической фазы. Например, нейлоновые микрокапсулы образуются в результате полимеризации гексаметилендиамина и хлорида себакола на границе поверхностей двух фаз. Первый изначально присутствует в водном растворе фермента, а второй добавляют в смесь растворителей гексан-хлороформ

(соотношение 4 : 1, об/об). Нейлоновая мембрана образуется вокруг эмульгированных микрокапель на поверхности «вода – органика»:



Микрокапсулы переносят в водный раствор, содержащий ПАВ для предотвращения агрегации. Этот метод требует высокой концентрации фермента в водной фазе (10 мг/мл), что обеспечивает высокое осмотическое давление, предотвращающее коллапс микрокапсул, и таким образом действует как эмульгатор. Для стабилизации фермента и поддержания необходимого внутреннего давления в микрокапсулах в водный раствор фермента, используемый для приготовления микрокапсул, может быть добавлен инертный белок (концентрация ~10 %), например гемоглобин.

Один из способов капсулирования – это двойное эмульгирование. Сначала готовят эмульсию водного раствора фермента в растворе полимера в органическом растворителе. Полученную эмульсию вновь диспергируют, но уже в воде. В результате получается водная эмульсия из капель раствора полимера в органическом растворителе, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время в органическом растворителе образуются сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. Если вместо отверждающего полимера используются жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называется иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны.

К модификациям метода иммобилизации ферментов с применением полупроницаемых материалов относится также иммобилизация в волокна. При этом вместо сферических микрокапсул, в состав которых входят ферменты, получают нити из волокнообразующего полимера. Эти волокна представляют собой пористые полимерные гели, содержащие гомогенную дисперсию небольших капель водного раствора фермента размером около 1 мкм. Ферментсодержащие волокна обладают высокой механической прочностью.

Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента (1 000 000 : 1, Е/полимер). Метод достаточно универсален, т. е. применим как для ферментов, так и для клеток, а также их фрагментов. Иммобилизованные таким способом ферменты в значительной степени сохраняют свою каталитическую активность, а их стабильность существенно возрастает. Кроме того, в капсулу может быть одновременно заключено несколько ферментов. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны возможно минимизировать значительные диффузионные ограничения скорости ферментативных реакций. Так, отношение  $S/V$  для микрокапсул с диаметром 20 мкм составляет 2500 см<sup>2</sup>/мл. Основным недостатком мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

**Включение в двухфазную среду.** При иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативной реакции распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее про-

дукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативный катализ макромолекулярных субстратов, что затруднительно или невозможно при использовании жестких носителей с ограниченным размером пор.

**Аффинная (нековалентная рецептор-опосредованная) иммобилизация.** Данный метод основан на биоаффинных взаимодействиях и требует предварительной модификации фермента. В молекулу фермента вводят биоспецифические группы, которые обладают высоким сродством по отношению к группам носителя и поэтому легко и прочно связываются с ним. Например, по N- или C-терминальным концам молекулы фермента присоединяют пептидные цепи. В результате высокоспецифичных биохимических взаимодействий фермент присоединится посредством полипептидных цепей к соответствующей мембране или антителу, закрепленному на матрице.

Распространенным способом аффинной иммобилизации является использование биотин- или стрептавидин-модифицированных носителей. Белок стрептавидин взаимодействует с молекулой биотина с высокой константой аффинности ( $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), причем одна субъединица белка присоединяет четыре молекулы биотина. Присоединение к молекуле фермента молекулы биотина позволяет ферменту закрепиться на носителе, модифицированном стрептавидином. Данный метод является высокоэффективным и дает устойчивые комплексы, которые зачастую являются необратимыми (рис. 5.25).

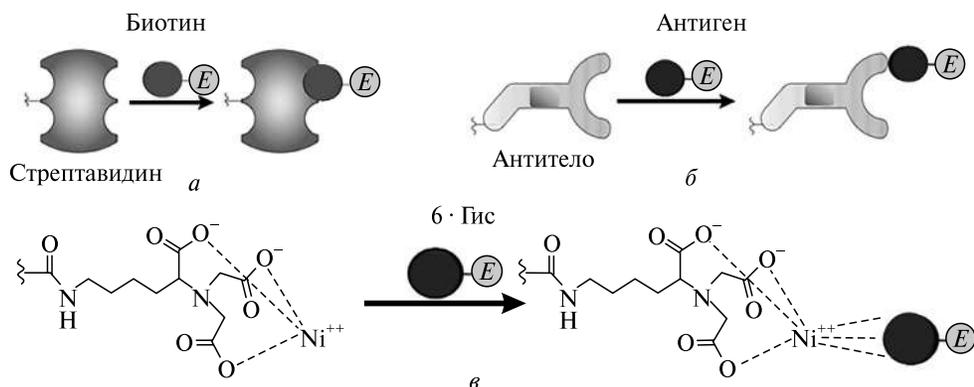


Рис. 5.25. Аффинная иммобилизация ферментов, основанная на высокоспецифических связях: а — стрептавидин-биотин; б — антитело-антиген; в — хелат- $\text{Ni}^{2+}$ -гистидин

Взаимодействие антител с соответствующими им антигенами является высокоспецифичным и также используется для аффинной иммобилизации ферментов. К ферменту присоединяют антиген, а на носителе закрепляют антитело, иммобилизация фермента происходит вследствие взаимодействия антигена с антителом (см. рис. 5.25).

Для аффинной иммобилизации ферментов также применяют средство аминокислот к ионам переходных металлов, например взаимодействие гистидина и ионов  $\text{Ni}^{2+}$ . К N- или C-терминальным концам молекулы фермента присоединяют пептид-

ные цепи, состоящие из шести или десяти остатков гистидина. Носитель представляет собой сорбент, на котором ковалентно присоединены лиганды (иминодиацетат, нитрилтриацетат), хелатирующие ионы  $Ni^{2+}$ . При этом свободные орбитали атома металла способны участвовать в координационном взаимодействии с неподеленными электронными парами атомов азота гистидина (см. рис. 5.25). Имобилизация фермента базируется на связи хелат- $Ni^{2+}$ -гистидиннесущий рецептор фермента.

### 5.8.2. Методы химической иммобилизации ферментов

**Неполимерная ковалентная иммобилизация (ковалентная сшивка).** В результате химической иммобилизации создается ковалентная связь между матрицей и ферментом, что обеспечивает высокую прочность образуемого конъюгата. При таком методе иммобилизации фермент не десорбируется с носителя при изменяющихся условиях реакции (рН, температура), что повышает стабильность его работы и не загрязняет продукты катализируемой им реакции. Это особенно важно для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Однако химическая иммобилизация является дорогим методом, при этом могут быть иммобилизованы только небольшие количества фермента, примерно 0,02 г фермента на 1 г матрицы, хотя некоторые способы позволяют получить 0,3 г/1 г матрицы.

Условия иммобилизации посредством ковалентного связывания более сложные, чем в случае физической адсорбции. Ковалентное связывание может изменить конформацию активного центра фермента, что приведет к изменению активности фермента и его субстратной специфичности. Поэтому важно соблюдать мягкие условия ( $T$ , рН, ионная сила) иммобилизации для сохранения активности белка. Ковалентное присоединение к матрице может происходить только посредством тех функциональных групп фермента, которые не вовлекаются в процесс катализа. Для сохранения высокой активности фермента необходимо перед иммобилизацией защитить функциональные группы активного центра. Для этого существуют различные способы: ковалентное присоединение фермента в присутствии конкурентного ингибитора (рис. 5.26) или субстрата, химическая модификация фермента. Ковалентная иммобилизация таких ферментов к матрице будет осуществляться посредством новых инкорпорированных групп. Так, в боковую цепь фермента может быть введен цистеин, что позволит осуществить иммобилизацию за счет образования дисульфидной связи между тиольной группой цистеина фермента и тиол-активной поверхностью матрицы.



Рис. 5.26. Иммобилизация фермента в присутствии ингибитора

При химической иммобилизации важным является выбор материала матрицы, так как это определяет тип химической реакции при иммобилизации и стабильность связи «фермент – матрица». Ковалентное присоединение фермента к матрице может происходить непосредственно за счет взаимодействия функциональных групп белка с функциональными группами, находящимися на поверхности матрицы. Для химической иммобилизации *в качестве матрицы* используют полисахариды, содержащие функциональные НО-группы (производные целлюлозы, декстраны, агарозу), полиакриламид (CONH<sub>2</sub>-группы), нейлон (NH<sub>2</sub>-группы), полимеры на основе акриловой или глутаминовой кислот (COOH-группы). Матрица может быть также подвергнута химической обработке модифицирующими агентами или активаторами. Матрица активируется в жестких условиях для превращения относительно неактивных групп в активные, которые могут реагировать с ферментом в мягких условиях.

Разработано большое количество химических реакций для активации матриц в зависимости от типа их функциональных групп. Процесс активации в основном заключается в получении на поверхности матрицы электрофильных групп, обладающих высокой реакционной способностью по отношению к нуклеофильным группам ферментов. Для активации НО-групп полисахаридов используют такие реагенты, как производные 1,3,5-триамина, бромциан (CNBr), эпихлоргидрин (1-хлор-2,3-эпоксипропан), бис-эпоксиды (например, 1,4-бис(2,3-эпокси-пропокси)бутан), глутаровый альдегид, N-гидроксисукцинимид, глицидол (1,2-эпоксипропанол). Для активации матрицы, содержащей карбоксильные группы, могут быть использованы карбодиимиды (RN=C=NR'), а аминогруппы – производные изотиоцианатов (R–N=C=S) и 1,3,5-триамина, глутаровый альдегид.

Для эффективного катализа с помощью иммобилизованного фермента зачастую необходимо минимизировать тесный контакт фермента с матрицей, так как это может вызвать неблагоприятное изменение микросреды фермента, стерические и диффузионные ограничения взаимодействия субстрата с ферментом. Для этого нужно отдалить молекулу иммобилизованного фермента от поверхности матрицы на некоторое расстояние. Поэтому для активации матрицы применяют сшивающие реагенты различной длины – спейсеры (вставка, ножка). В качестве спейсеров могут быть использованы как простые бифункциональные (т. е. с двумя одинаковыми или различными по химической природе реакционноспособными группами), так и сложные полифункциональные реагенты.

Независимо от числа и химической природы компонентов, вовлеченных в процесс иммобилизации, числа и сложности отдельных стадий этого процесса, различают три элемента-блока химических конструкций: собственно молекула фермента, матрица и сшивающий спейсер. Таким образом, ковалентная иммобилизация ферментов подразумевает создание конструкций из связанных химическими связями трех элементов (матрица – спейсер – фермент) или двух (матрица – фермент или спейсер – фермент). Принципы конструирования соответствующих конъюгатов обозначают терминами «пришивка» или «сшивка».

Группы аминокислотных остатков полипептидных цепей ферментов, которые имеют гидрофильный характер и находятся в доступной зоне на границе раздела с водой, являются теми группами, с которыми ковалентно связываются функциональные группы носителя. Группы-мишени фермента не должны существенно

влиять на его каталитические функции. Они должны быть высокореакционноспособными, чтобы по возможности обеспечить избирательность реакции присоединения к матрице, а также ее протекание в мягких неденатурирующих условиях. Таких групп в молекуле фермента должно быть достаточно много, чтобы обеспечить широкие возможности для введения новых химических связей в молекулу и снизить таким образом вероятность модификации активного центра.

К *функциональным группам фермента* относятся: амино- (остатка лизина и N-концевая), гидроксильные (алифатические – серина и треонина, ароматические – тирозина), карбоксильные (аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также C-концевые), тиольные (цистеина), имидазольные (гистидина) группы. Из этих групп группы  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  наиболее часто используются для иммобилизации белков.

Ковалентное присоединение фермента к матрице происходит вследствие образования амидных ( $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ), простых и сложноэфирных ( $-\text{O}-$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ), тиоэфирных ( $-\text{S}-$ ) или карбаматных ( $-\text{HNC}(\text{O})\text{O}-$ ) связей (рис. 5.27).

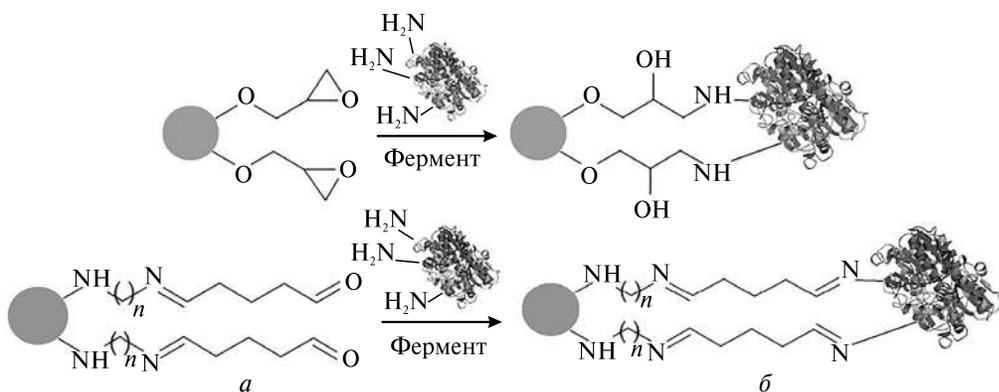


Рис. 5.27. Иммобилизация фермента на матрицу, активированную бис-эпоксидом (а), глутаровым альдегидом (б)

**Иммобилизация с образованием поперечно-сшитых молекул (поперечные сшивки с бифункциональными группами).** Данный метод основан на том, что при введении в раствор фермента бифункционального сшивающего агента отдельные молекулы фермента сшиваются друг с другом и образуют более или менее сложные агрегаты сетчатой структуры, в которой узлами служат молекулы фермента. В зависимости от природы и количества сшивающего агента можно получить как водорастворимые, так и нерастворимые препараты. Другим вариантом поперечной сшивки является ковалентное связывание такой ферментной сетки с нерастворимой матрицей.

Сшивающие реагенты имеют две функциональные группы, разделенные в пространстве – одинаковые (гомобифункциональное поперечное сшивание) или разные (гетеробифункциональное поперечное сшивание). Например, глутаровый альдегид, селективно реагирующий с первичными аминами, образует имидные связи, которые могут быть восстановлены до вторичных аминов в реакции с боргидридом; диазобензидин селективно взаимодействует с остатками тирозина; гексамителенбис (йодацетамид) селективен по отношению к аминогруппам лизина. Гетеробифункциональные сшивающие реагенты используются реже, но они обладают повышенной селективностью.

Поперечная сшивка обычно приводит к большому количеству иммобилизованного белка. Это распространенный метод, так как методика иммобилизации простая. Однако иммобилизация ферментов таким методом приводит к высокой потере его активности, изменению третичной структуры молекулы и замедленной диффузии продукта и субстрата.

Положительной стороной иммобилизации является то, что внутримолекулярная сшивка бифункциональными реагентами способствует созданию «жесткой» структуры белка, что препятствует конформационным изменениям молекулы. Это в определенных условиях может способствовать стабилизации фермента.

В таблице приведены сравнительные характеристики отдельных методов иммобилизации ферментов.

**Сравнительная характеристика методов иммобилизации ферментов**

Характеристика	Адсорбция	Ковалентное связывание	Включение в гель	Капсулирование
Процесс иммобилизации	Простой	Сложный	Сложный	Простой
Цена	Низкая	Высокая	Средняя	Высокая
Сила связывания	Варьируется	Сильная	Слабая	Сильная
Утечка фермента	Да	Нет	Да	Нет
Применимость	Широко	Избирательно	Широко	Очень широко
Эффект матрицы	Да	Да	Да	Нет
Большие диффузионные ограничения	Нет	Нет	Да	Да
Бактериальная защита	Нет	Нет	Да	Да

### 5.8.3. Свойства иммобилизованных ферментов

Свойства и поведение иммобилизованных ферментов отличаются от таковых в растворе, что в целом определяется множеством факторов. К иммобилизованным относятся: число связей фермента с носителем, локализация и природа этих связей; ориентация молекул; микроокружение, в котором локализован фермент; физические и химические свойства матрицы; свойства (размер, длина, наличие заряда, гидрофильность/гидрофобность) спейсера, связывающего носитель и фермент; условия процесса иммобилизации.

Микроокружение ферментов после иммобилизации может сильно отличаться от существующего в растворе, что зависит от физических и химических свойств матрицы, а также от взаимодействия субстратов/продуктов с матрицей. К примеру, гидрофильная матрица стабилизирует фермент в отличие от гидрофобной. Размер частиц с иммобилизованными ферментами имеет также влияние на процесс катализа. Каталитические свойства более мелких частиц в большей степени приближены к свойствам растворимых ферментов. Эластичность (гибкость) полимерной матрицы также оказывает влияние на транспортные свойства субстрата и продукта.

Иммобилизация изменяет активность, селективность, стабильность, рН оптимум, кинетические параметры ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ) ферментов. Активность фермента в процессе иммобилизации согласно большому числу накопленных данных может не только снижаться, но и увеличиваться в сравнении с их активностью в растворе, что определяется суммой вышеуказанных факторов в каждом отдельном случае. Так, поперечно-сшитый субтилизин (катализирует гидролиз белков, пептидов, эфиров аминокислот) проявляет в 27 раз меньшую активность, чем в растворе. Фермент трипсин в растворе гидролизует 15 пептидных связей в белке пепсиногене, а в иммобилизованной форме – только 10. С другой стороны, активность иммобилизованной липопроотеинлипазы, катализирующей гидролиз триглицеридного ядра липопротеинов, оказывается в 40 раз выше, чем у свободного фермента. Процесс иммобилизации в некоторых случаях может даже превращать неселективный фермент в стереоселективный, что в целом определяется способом и условиями иммобилизации.

Снижение активности ферментов может быть обусловлено конформационными изменениями молекулы белка в процессе иммобилизации. Активная сторона иммобилизованного фермента становится менее доступной для субстрата вследствие стерических факторов. Кроме того, существуют диффузионные ограничения в скорости ферментативной реакции.

Увеличение скорости реакции, катализируемой иммобилизованными ферментами, может быть обусловлено влиянием микроокружения на свойства фермента и на распределение субстратов у активного центра иммобилизованного фермента.

**Конформационные свойства иммобилизованных ферментов.** В результате иммобилизации пространственная структура фермента либо остается неизменной (что наблюдается чаще всего), либо изменяется. Изменение конформации иммобилизованного фермента в сравнении с нативным может происходить вследствие следующих причин. Во-первых, конформационные различия могут быть обусловлены химической модификацией групп белка, важных для поддержания пространственной структуры. Во-вторых, причина искажения структуры фермента может заключаться в неспецифических взаимодействиях (гидрофобные, водородные, электростатические) между ферментом и носителем, приводящих к денатурации белка. В-третьих, причиной конформационных изменений может стать большое количество связей между ферментом и носителем.

Кроме того, иногда реализуется такая ситуация, когда в результате иммобилизации фермента его конформация практически не изменяется, но нарушается динамика конформационных изменений в белке. Так, у белков, связанных с носителем, могут замедляться необходимые для катализа конформационные переходы, уменьшаться число конформационных стадий и глубина их протекания. Причиной этого являются неспецифические взаимодействия функциональных групп белка с носителем.

Для сохранения структуры фермента в процессе его иммобилизации используют различные приемы, позволяющие сохранить функциональность важных для катализа групп. Такие методы, как захват и капсулирование, вызывают менее критичные изменения в каталитической активности фермента, чем химическая или адсорбционная иммобилизация. В процессе захвата и капсулирования фермент остается по существу в своей нативной конформации. Как указывалось выше, для защиты от инактивации ковалентную иммобилизацию часто проводят в присутствии насыщенных концентраций субстрата или другого специфического лиганда. Для предотвращения неспецифических взаимодействий фермента с матрицей, что может вызывать искажение структуры фермента, необходимо тщательно подбирать

материал носителя и выбирать наиболее инертный по отношению к белку. Такими инертными свойствами обладают полисахариды и полиакриламиды. Если матрицу нельзя заменить, то используют спейсеры для присоединения фермента к носителю, но надо учитывать, что неправильно подобранный спейсер может сам взаимодействовать с ферментом или субстратом.

Для минимизации структурных изменений в молекуле фермента иногда целенаправленно стремятся зафиксировать его «напряженное» состояние, т. е. с помощью иммобилизации «закрепить» конформацию. В таком случае молекулы фермента в присутствии насыщенных концентраций субстрата или другого специфического лиганда (т. е. активный центр защищен субстратом или лигандом) сшивают бифункциональными реагентами или присоединяют к предварительно активированному носителю. После удаления лиганда фермент остается зафиксированным в «напряженной» конформации. Это возможно реализовать путем иммобилизации поперечной сшивкой.

**Стерические ограничения в катализе иммобилизованными ферментами.** Закрепление фермента на подложке приводит к тому, что молекулы субстрата должны через массу раствора диффундировать к ферменту (тоже для продуктов, но наоборот). В результате может возникнуть стерическое отталкивание субстрата и продукта, так как система «фермент – носитель» представляет собой переполненное молекулярное окружение. Пространственная сетка матрицы, в которой иммобилизован фермент, может препятствовать продвижению молекул субстрата, например в силу чисто механических причин. Вследствие этого активные центры часть молекул фермента оказываются недоступными для субстрата. Фактически это означает снижение концентрации активного фермента и приводит к уменьшению наблюдаемой скорости ферментативной реакции. Следовательно, хотя истинные каталитические параметры и не изменились, фермент не способен полностью проявить свою потенциальную активность. Уменьшение каталитической активности фермента за счет стерических факторов проявляется особенно часто в случае высокомолекулярных субстратов (белки, нуклеиновые кислоты и др.).

**Эффект распределения субстрата.** В системе с иммобилизованным на носителе ферментом субстрат может неравномерно распределяться вблизи (или внутри) носителя и в удалении от него. Эффект распределения обусловлен тем, что растворенный субстрат способен взаимодействовать с материалом носителя (ионные силы, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и т. п.).

В условиях равновесного распределения субстрата между раствором и фермент-содержащей матрицей константа Михаэлиса для иммобилизованного фермента ( $K_{M, \text{ каж}}$ ) определяется следующим выражением:

$$K_{M, \text{ каж}} = PK_M,$$

где  $K_M$  – значение константы Михаэлиса реакции, катализируемой свободным ферментом;  $P$  – коэффициент распределения субстрата, который задается ниже-следующим выражением:

$$P = \frac{[S]_p}{[S]_n},$$

где  $[S]_p$  и  $[S]_n$  – концентрация субстрата в растворе и вблизи (или внутри) носителя соответственно.

Из вышеприведенных уравнений следует, что при высоких концентрациях субстрата ( $[S] \gg K_{M, \text{ каж}}$ ) эффект распределения не играет существенной роли, поскольку в этом случае скорость ферментативной реакции не зависит от концентрации субстрата. Если же концентрация субстрата невелика ( $[S] \ll K_{M, \text{ каж}}$ ), то концентрирование субстрата на поверхности матрицы (или в матрице) – вблизи от активного центра фермента ( $P < 1$ ) – приводит к уменьшению значения  $K_{M, \text{ каж}}$ , т. е. к возрастанию скорости ферментативной реакции. В тех же случаях, когда  $P > 1$ , скорость реакции падает вследствие возрастания  $K_{M, \text{ каж}}$ .

На слой раствора порядка несколько молекулярных диаметров (10 нм) от поверхности иммобилизованного фермента будет влиять как заряд, так и гидрофильность/гидрофобность матрицы. Если поверхность носителя преимущественно гидрофобная, то гидрофобные молекулы субстрата будут локализоваться в микроокружении фермента, а гидрофильные будут распределяться в массе раствора. Обратное верно для гидрофильной матрицы. Например, значение  $K_{M, \text{ каж}}$  алкогольдегидрогеназы, иммобилизованной на матрице из полиакриамида, составляет для бутанола 0,1 мМ, а в случае иммобилизации на более гидрофобном сополимере метакрилата с акриламидом – 0,025 мМ. Для данного фермента не наблюдается различий в значениях  $K_{M, \text{ каж}}$ , если субстратом является более гидрофильный этанол.

В случае заряженной матрицы, если знак субстрата противоположен заряду матрицы, то концентрирование субстрата у ее поверхности в результате электростатических взаимодействий приводит к снижению значения константы Михаэлиса более чем на один порядок.

Другие специфические эффекты распределения связаны с особыми носителями для иммобилизации. Так, величина  $K_{M, \text{ каж}}$  глюкоамилазы для мальтозы значительно снижается, если фермент иммобилизован на носителе, покрытом окисью титана, поскольку такие носители имеют специфическое сродство к отдельным многоатомным спиртам. Некоторые полифенольные смолы, используемые в качестве носителя, обнаруживают специфическое сродство по отношению к полисахаридам, что влияет на их распределение в микроокружении фермента.

**Диффузионные ограничения в катализе иммобилизованными ферментами.** Иммобилизация ферментов приводит к значительному ограничению в подвижности фермента, что также влияет на подвижность растворенных субстратов. Различные феномены, наблюдаемые для иммобилизованных ферментов и связанные с переносом масс (в том числе за счет диффузии) в процессе катализа, могут привести к снижению скорости ферментативной реакции, т. е. сократить активность фермента в сравнении с растворенным.

Снижение скорости ферментативной реакции может быть результатом диффузионных ограничений. Иммобилизованный на поверхности фермент, суспендированный в водной среде, имеет вокруг себя неперемешиваемый слой растворителя (слой Нернста или диффузионный), внутри которого жидкость считается неподвижной и перенос массы вещества к поверхности твердых частиц осуществляется только за счет молекулярной диффузии. До начала реакции субстрат должен продиффундировать из массы раствора к поверхности ферментсодержащей частицы (иммобилизация на поверхности непористой матрицы) или внутрь нее

(иммобилизация внутри пористой матрицы). Движущей силой диффузии является градиент концентрации (реагенты движутся в направлении от большей концентрации к меньшей). Чем больше разница концентрации субстрата в растворе и у поверхности ферментсодержащей частицы, тем больше будет градиент концентраций и, следовательно, скорость диффузии субстрата. Перенос масс за счет диффузии маскирует истинное кинетическое поведение фермента.

В зависимости от того, как соотносятся скорости диффузионных стадий и непосредственно ферментативной реакции, может наблюдаться одна из трех ситуаций: процесс контролируется внешней диффузией, процесс контролируется внутренней диффузией, кинетический режим (скорость реакции определяется активностью фермента). При низкой концентрации субстрата в растворе и высокой активности фермента скорость ферментативно-катализируемой реакции в целом зависит от диффузии реагентов.

**Внешнедиффузионный режим.** Если фермент локализован на поверхности носителя и сам носитель непроницаем для субстрата, могут возникнуть условия, в которых скорость каталитического превращения будет зависеть от массопереноса вещества из жидкости к поверхности частицы. Предполагается, что поверхность носителя является однородной, равнодоступной и инертной. Если ферментативная реакция в поверхностных слоях ферментсодержащей частицы протекает быстрее, чем субстрат диффундирует из раствора сквозь диффузионный слой к ее поверхности, то через непродолжительное время вокруг частицы образуется зона, обедненная субстратом. Субстрат превращается в продукт, как только достигает поверхности, поэтому его поверхностная концентрация близка к нулю. В результате наблюдаемая скорость ферментативной реакции будет определяться скоростью массопереноса субстрата к частице. Скорость массопереноса зависит от концентрации субстрата в растворе: чем больше градиент концентраций, тем больше скорость. Вследствие градиента концентраций насыщение фермента субстратом происходит при более высокой концентрации субстрата в растворе, чем это нужно для растворимого фермента. Кажущееся значение  $K_{M, \text{ каж}}$  для иммобилизованного фермента будет больше, чем полученное  $K_M$  для нативного фермента в растворе, и, следовательно, значение  $V_{\text{max}}$  станет снижаться.

Усилению влияния диффузии реагентов на скорость реакции, катализируемой иммобилизованным на поверхности ферментом, способствуют различные факторы. К ним относятся: высокая концентрация фермента на поверхности; низкая концентрация субстрата в растворе; низкая скорость диффузии субстрата, низкое значение  $K_M$  и высокая специфичность фермента; низкая скорость перемешивания раствора; плоская поверхность частиц носителя (большой средний диаметр частиц).

В режиме, контролируемом диффузией, на скорость процесса должны оказывать влияние факторы, изменяющие толщину диффузионного слоя. Толщина может быть уменьшена при увеличении скорости потока жидкости вокруг частицы, т. е. путем увеличения скорости перемешивания раствора. При низких скоростях с увеличением толщины диффузионного слоя эффективная константа Михаэлиса реакции растет. Увеличение скорости перемешивания молекул субстрата в растворе выводит систему на кинетический режим. Кроме того, снижение размера частиц носителя

и повышение концентрации субстрата в растворе также будет способствовать ослаблению диффузионных ограничений. Тогда величина  $K_{M, \text{ каж}}$  будет приближаться к таковой для растворимого фермента. Необходимо помнить, что электростатические и стерические факторы также могут воздействовать на  $K_{M, \text{ каж}}$ , если они приводят к локальной концентрации, отличной от концентрации в толще раствора.

Скорость реакции, контролируемой внешней диффузией, не должна изменяться при возрастании удельной концентрации иммобилизованного фермента. Кроме того, она не должна зависеть от таких факторов, как изменение рН, ионной силы, добавление ингибиторов и активаторов, которые оказывают специфическое влияние исключительно на ферментативные стадии (что легко проследить в случае нативного фермента). Установление того, как указанные факторы влияют на скорость ферментативной реакции, позволяет определить роль внешней диффузии в регулировании скорости ферментативной реакции. Следует, однако, учитывать, что для одного и того же препарата иммобилизованного фермента реакция со специфическим (высокореакционноспособным) субстратом может быть диффузионно-контролируемой, а с неспецифическим субстратом (менее реакционноспособным) протекать в кинетической области.

**Внутридиффузионный режим.** Если молекула фермента находится внутри пор частиц носителя, то для протекания ферментативной реакции необходимо, чтобы молекулы субстрата достигли поверхности частицы и продиффундировали внутрь нее, а продукты реакции были удалены из пор или с поверхности катализатора. Специфические взаимодействия между субстратом и пористым носителем отсутствуют. Если размер частицы носителя велик, а фермент очень активен (или велика его плотность внутри частицы), то практически весь субстрат израсходуется уже в приповерхностных слоях носителя, а глубинные области будут обеднены субстратом. При этом увеличивается  $K_{M, \text{ каж}}$ , реальная скорость реакции становится меньше потенциально возможной.

Один из наиболее распространенных способов иммобилизации ферментов — включение их в гели различной полимерной природы. При катализе ферментами, включенными в такие гели, сопротивление массообмену между окружающим раствором и внутренними областями геля обусловлено диффузией через неподвижную жидкость, заполняющую поры геля.

В случае внутридиффузионного режима скорость реакции пропорциональна концентрации фермента, «чувствительна» к действию ингибиторов, значению рН-среды. Это является отличием от внешнедиффузионного режима, когда скорость реакции не зависит от каталитических свойств фермента.

Рассмотрим протекание реакций в *кинетическом режиме*. При высокой концентрации субстрата в растворе скорость ферментативной реакции (т. е. общая скорость превращения субстрата) определяется в большей степени ферментативной кинетикой, чем транспортом масс, так что поверхностная концентрация субстрата не отличается значительно от таковой в растворе. Чем выше концентрация субстрата и чем ниже исходная активность фермента, тем больше вероятность того, что ферментативная реакция будет протекать в кинетическом режиме.

**Влияние иммобилизации на рН-оптимум фермента.** Из ферментативной кинетики известно, что скорости реакций с участием ферментов в гомогенном раство-

ре сильно зависят от значения рН. Это обусловлено тем, что в катализе участвуют функциональные группы белка, способные протонироваться или депротонироваться в зависимости от величины рН раствора, а реакционноспособной является, как правило, только одна форма.

Величина рН-оптимума иммобилизованного фермента может сместиться на три единицы, что обуславливается как химической модификацией фермента, так и зарядом носителя. Ионные группы матрицы способны локально воздействовать на рН микроокружения фермента. Последнее может значительно отличаться от рН раствора, если ионы  $\text{H}^+$  (или  $\text{HO}^-$ ) неравномерно распределены между массой раствора и поверхностью носителя. Связывание субстрата и активность иммобилизованного фермента зависят от рН локального микроокружения, в то время как значение рН, измеряемое рН-метром, всегда отражает рН массы раствора.

Например, рН-оптимум свободного фермента в растворе наблюдается при рН 7,0. Но для фермента, иммобилизованного на полиэлектролитном носителе, значение будет другим. Если в качестве матрицы выбран полианионный носитель, то рН-оптимум фермента будет наблюдаться при рН 8,5. Это связано с тем, что отрицательно заряженные группы матрицы притягивают к себе ионы  $\text{H}^+$  из массы раствора, и, следовательно, значение рН у поверхности матрицы снижается в сравнении с внешним раствором. Если в качестве матрицы выбран поликатионный носитель, то рН-оптимум фермента будет наблюдаться при рН 6. Это обусловлено тем, что положительно заряженные группы матрицы притягивают к себе ионы  $\text{HO}^-$  из массы раствора, и, следовательно, значение рН у поверхности матрицы повышается в сравнении с внешним раствором. Таким образом, если для иммобилизованного фермента во внешнем растворе зададим значение рН, равное 7, то фермент будет работать не с полной эффективностью. Это объясняется тем, что реальное значение рН у полиэлектролитной поверхности носителя из-за распределения протонов не будет соответствовать этому значению.

Сдвиг рН-оптимумов иммобилизованных ферментов наблюдается только в разбавленных растворах с низкой ионной силой. Добавление в систему с иммобилизованным ферментом высококонцентрированных растворов солей или буферных систем вызывает экранирование зарядов групп носителя и уменьшение сдвигов рН-оптимумов активности.

В то же время влияние эффекта поверхностного распределения ионов  $\text{H}^+$  является простым способом изменить рН-оптимум фермента на 1–2 ед. рН, если это необходимо для улучшения технологического процесса ферментативного катализа. К примеру, значение рН наблюдаемого рН-оптимума для иммобилизованного фермента может быть более подходящим для растворимости или стабильности реагентов и продуктов.

**Стабильность иммобилизованных ферментов.** Иммобилизация повышает стабильность ферментов с позиции длительности хранения и устойчивости против тепловой денатурации. Операционная стабильность ферментов характеризуется временем полуинактивации ( $t^{1/2}$ ). Так, если стабильность фермента в растворе составляет 70 дней, то при его иммобилизации она может увеличиться в 10 раз.

Инактивация ферментов под действием тепла или денатурирующих агентов, таких как мочевины или гуанидилхлорид, связана с разрушением в белке многих

внутримолекулярных связей. Это приводит к разворачиванию белковых молекул и увеличению их объема. Очевидно, что белки можно стабилизировать, если жестко закрепить нативную структуру дополнительными внутримолекулярными связями или связями белка с носителем.

Иммобилизация ферментов не является приемом, всегда приводящим к стабилизации фермента. На стабильность того или иного фермента влияют многие факторы, и методы стабилизации, как правило, связаны с поиском условий и проведением большого числа экспериментов.



## 6.1. Характерные особенности метода

Иммунный анализ основывается на высокоспецифическом взаимодействии антитела (Ат) с антигеном (Аг) с образованием продукта Ат • Аг. В сущности, иммуноанализ является разновидностью лигандсвязывающего анализа, базирующегося на способности лиганда избирательно связывать молекулу аналита с образованием стабильного комплекса. Иммуноанализ охватывает большое разнообразие различных методов. Прямые методы основаны на феномене реакции преципитации (реакции агглютинации), в результате которой образуется нерастворимый иммунный комплекс Ат • Аг. К другой группе относятся методы, для которых характерно детектирование растворимого иммунокомплекса с помощью меток (иммуноферментный, иммунофлуоресцентный и др.).

Генетически чужеродные вещества, попадая в организм высших животных и человека, способны вызывать в них ряд специфических процессов, направленных на их удаление из организма. Система организма, выполняющая эту функцию, называется иммунной системой, а сами процессы — иммунологическими. К важнейшим из них следует отнести образование специфических белков крови — антител (термин ввел П. Эрлих в 1891 г.). Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, получили название антигенов. К таким веществам относятся белки и полисахариды как в очищенном виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (клетки, ткани, вирусы и т. д.).

В 1920—50-е гг. благодаря фундаментальным исследованиям К. Ландштейнера (Нобелевская премия за открытие групп крови человека, 1930), М. Гейдельбергера (М. Heidelberger), Дж. Маррака и других ученых были заложены основы современной иммунохимии (термин ввел С. А. Аррениус), получены важные данные по химии природных и синтетических антигенов, определена иммуноглобулиновая природа антител и разработаны препаративные методы их выделения в чистом виде. Концептуальной работой в развитии иммуноанализа стало обнаружение К. Ландштейнером антигенной природы низкомолекулярных соединений ( $M < 2000$  Да). Австрийский ученый установил, что малые органические молекулы при связывании с макромолекулами (белками) вызывают продуцирование специфических антител, которые могут быть использованы для обнаружения данных молекул в свободном виде. Такие низкомолекулярные вещества, к которым относятся многие биологически важные соединения (пептидные, стероидные гормоны и др.), лекарства, пестициды и т. д., К. Ландштейнер назвал гаптенами (греч. hapto — схватывать, привязывать, прикреплять). Принцип иммуногенности гаптенов был применен Р. С. Ялоу и С. Берсоном при разработке иммунохимического метода для определения инсулина (1958—1959).

В 1978 г. за разработку этого метода американской исследовательнице Р. С. Ялоу присуждена Нобелевская премия.

Антитела в биоанализе зарекомендовали себя как идеальные реагенты, так как для доказательства и идентификации различных белков и других веществ в образцах необходимо только осуществление реакции антитела с антигеном, которую выработала природа для иммунной защиты организма.

Иммуноанализ используется либо для определения антигенов с применением специфических антител, либо, наоборот, для детекции антител определенной специфичности с помощью соответствующих антигенов. Иммуноанализ имеет широкий спектр применения в фундаментальных биохимических исследованиях, биотехнологии, медицинской и ветеринарной практике, сельском хозяйстве, пищевой и косметической промышленности, различных областях токсикологии, фармацевтике, а также для оценки состояния окружающей среды. Например, итальянские виноделы для осветления вина марки «Мерло» используют пшеничную муку. Полученный винный продукт может содержать пшеничный глютен, опасный для больных целиакией. Иммуноанализ позволяет выявить присутствие глютена в вине и забраковать такое вино.

Иммуноанализ используют для исследования комплексных систем (биожидкости, пробы окружающей среды, продукты питания, косметические средства и др.). Высокие специфичность и чувствительность (пико- и атомомоль область) методов иммуноанализа позволяют определять аналиты в присутствии даже сотен тысяч других веществ. Иммуноанализ является надежным, высокоэкспрессным. Для его проведения не требуется дорогая и деструктивная подготовка проб. Все вещества, против которых возможно получение антител, выявляются этими методами.

Преимуществом иммуноанализа является то, что на его основе можно разрабатывать тест-методы, позволяющие проводить определения аналитов вне лаборатории, на месте отбора проб. В соответствии с определением, принятым в аналитической химии, тест-методами (тестами) называются экспрессные, простые в реализации способы оценки присутствия и/или содержания определенного вещества в пробе. Экспрессность и простота означают, что тест-методы позволяют проводить идентификацию и определение содержания аналита за минимальное время на месте отбора проб без трудоемкой предварительной пробоподготовки. При этом проведение всех стадий анализа и регистрации результатов не требует использования стационарного оборудования, в целом анализ экономит время и средства на получение результатов и принятие основывающихся на них решений.

К недостаткам иммуноанализа относятся перекрестная реактивность специфических антител со структурными аналогами аналита, низкая доступность реагентов, более длительное время для разработки метода в сравнении с некоторыми классическими аналитическими методами, а также необходимость большого количества различных образцов для подтверждения и разработки нового метода анализа.

Иммуноанализ, конечно, не является лучшим аналитическим методом для анализа всех аналитов. К примеру, ГЖХ остается методом выбора для определения летучих соединений. Однако в сравнении с другими аналитическими методами иммунохимические могут быть использованы для количественного определения целевых аналитов с большей селективностью, чувствительностью, аккуратностью и точностью.

## 6.2. Структура и функциональные свойства антител

Антитела – глобулярные гликопротеины (иммуноглобулины), которые синтезируются в организме позвоночных животных в ответ на попадание в него чужеродного вещества (антигена) и обладают способностью очень избирательно связываться с такими веществами. Антитела присутствуют на поверхности В-лимфоцитов в виде мембраносвязанных рецепторов, а также в сыворотке крови и тканевой жидкости как растворенные молекулы.

По своим эффекторным свойствам и структурным особенностям иммуноглобулины (Ig) подразделяются на пять основных классов: иммуноглобулины А, D, Е, G и М (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно), встречающиеся у одного отдельного индивидуума и поэтому называемые изотипами. Состав иммуноглобулинов в плазме, экзосекретах и тканях различен, Ig разных классов генерируются в зависимости от вида иммунизации и места образования в организме.

Несмотря на огромное разнообразие антител и их гетерогенность, все они обладают некоторыми общими структурными элементами, обеспечивающими выполнение их основных функций. Общей структурной единицей всех иммуноглобулинов является комплекс из четырех полипептидных цепей: двух идентичных длинных тяжелых цепей (H-цепи, англ. heavy) (M ~ 50 кДа) и двух идентичных коротких легких цепей (L-цепи, англ. light) (M ~ 25 кДа) (рис. 6.1). В 1959 г. английский ученый Р. Портер установил молекулярную структуру антител. За исследования в данной области Р. Портеру и американскому ученому Д. Эдельману в 1972 г. присуждена Нобелевская премия.

Каждая из легких цепей прочно соединена с NH<sub>2</sub>-концевыми участками тяжелых цепей благодаря наличию межцепочечных дисульфидных связей и множеству

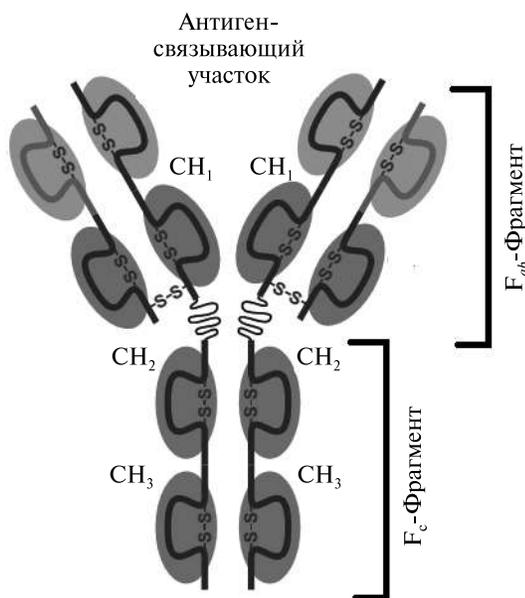


Рис. 6.1. Структура антитела

слабых нековалентных взаимодействий (водородных, гидрофобных, вандерваальсовых). Аналогичные связи существуют и между свободными участками тяжелых цепей, к которым ковалентно присоединены олигосахариды. В целом структура такого комплекса напоминает латинскую букву «Y» с вертикальной осью симметрии и характерна для иммуноглобулинов классов IgG, IgD, IgE. Две половины иммуноглобулинов полностью идентичны.

Полипептидные комплексы антитела можно разделить с помощью ферментов по фермент-чувствительным связям на отдельные фрагменты, свойства и функции которых можно исследовать отдельно. При помощи протеазы папаина антитело можно расщепить на различные фрагменты: два  $F_{ab}$  (вверх Y-структуры) и один  $F_c$ . Каждый  $F_{ab}$ -фрагмент (англ. fragment antigen binding) содержит варибельную часть антитела, т. е. N-терминальные домены тяжелой и легкой цепей.  $F_{ab}$ -Фрагмент связывает и распознает антигены, т. е. отвечает за специфичность и аффинность антител при распознавании и связывании чужеродных веществ. Антигенсвязывающую область одного  $F_{ab}$ -фрагмента называют паратопом (антидетерминанта). Вклад H-цепи в специфичность паратопа составляет около 70 %, а L-цепи – 30 %, так что изолированная тяжелая цепь сохраняет свою активность в большей степени, чем легкая.  $F_c$ -Фрагмент (англ. fragment crystallizable), константная область Ат, представляют собой легкокристаллизуемый гликопротеин, который обладает постоянными функциями и не способен связывать антигены. Данный фрагмент определяет класс иммуноглобулина. Он способен связывать антивидовые иммуноглобулины (вторичные антитела) и другие белки (например, белки А и G). Это свойство антител используют для детектирования иммунокомплекса в различных модификациях иммунохимического анализа.

В целом антитела выполняют две функции: антигенсвязывающую и эффекторную (вызывают тот или иной иммунный ответ, например запускают классическую схему активации комплемента). Одна область молекулы антител ( $F_{ab}$ ) определяет ее антигенную специфичность, а другая ( $F_c$ ) – осуществляет эффекторные функции.

Имуноглобулины разных классов различаются между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей и по выполняемым эффекторным функциям. Антитела различных классов могут иметь одинаковые антигенсвязывающие свойства, но различаться по функциональным свойствам.

IgG-Антитела (150 кДа) – основные иммуноглобулины плазмы и межклеточной жидкости здорового человека, они составляют 70–75 % всей фракции иммуноглобулинов. IgG являются основными реагентами в иммунохимической аналитике. Существует четыре изоформа IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>). Каждый изотип определяется последовательностью аминокислот константной области тяжелой цепи. Изоформы IgG различным образом связываются с бактериальными  $F_c$ -рецепторами, например белком А из *Staphylococcus aureus*. Белок А широко используется в различных методах иммуноанализа. IgG-Антитела хорошо растворяются в воде и остаются активными при низком содержании соли. IgG реагируют в pH-области 4–9,5. Они могут оставаться активными в стерильной сыворотке при 4 °С до года. Функциональная активность IgG в сыворотке при шоковой заморозке (в смеси сухой лед/спирт или в жидком азоте) составляет несколько десятилетий при температуре –20 или –80 °С.

IgM-Антитела (900 кДа) представляют собой пентамер из четырех единиц, соединенных между собой соседними  $F_c$ -фрагментами. Данные иммуноглобулины составляют примерно 7 % фракции иммуноглобулинов в плазме. Из-за своего раз-

мера IgM слабо растворимы в воде и уже при десятикратном разбавлении сыворотки водой выпадают в осадок. Для IgM вследствие структуры характерна адсорбция на всевозможные поверхности, что приводит к неспецифическому связыванию и ограничивает их применение в иммуноанализе.

IgA-Антитела в качестве реагентов в биоанализе используются редко. Они встречаются в слизистых поверхностях пищеварительного тракта, легких, секретах эндокринных желез, а также в плазме (15 % от всей фракции иммуноглобулинов) и в общем труднодоступны. Антитела IgA гетерогенны по своему размеру, могут находиться в форме мономера (160 кДа), димера (390 кДа) или полимера.

Антитела IgD (180 кДа) и IgE (190 кДа) располагаются прежде всего на мембранной поверхности лимфоцитов, в плазме они представлены в следовых количествах (0,5 и 0,002 % соответственно). Данные антитела не имеют никакого значения как аналитические реагенты. IgE обуславливает многие аллергические реакции и поэтому играет центральную роль при аллергиях.

Антитела обладают различной способностью к одновременному взаимодействию с определенным количеством одинаковых антигенов, т. е. *валентностью*. Один паратоп антитела ( $F_{ab}$ -фрагмент) связывает один эпитоп антигена, т. е. является одновалентным. Белок IgG имеет два одинаковых паратопа, связывающих одинаковые антигены, поэтому он дивалентен. Антитела IgA могут быть тетравалентными, IgM являются декавалентными.

Паратоп состоит из отдельных функциональных частей (единиц), одна из которых может быть *иммунодоминантной*. При блокировании данной части паратопа (т. е. при связывании с этим регионом низкомолекулярного соединения) реакция между антителом и антигеном становится невозможной.

Антитела получают *путем иммунизации* животных соответствующим антигеном. В лабораториях это мыши, крысы, морские свинки, кролики, для получения больших количеств антител на производстве — козы, овцы, свиньи, лошади, куры (антитела выделяют из желтков яиц). Антитела являются чрезвычайно вариabельными (в организме одного человека может существовать до  $10^8$  вариантов Ат). Все разнообразие антител проистекает из вариabельности как тяжелых, так и легких цепей  $F_{ab}$ -фрагментов. Иммунная система организма эшелонирована: существует несколько линий защиты от внедрения антигена. Антитела образуются в сыворотке крови в разных клетках (клонах) В-лимфоцитов не против всей молекулы антигена, а против его эпитопов (антигенная детерминанта). Единственная клетка или один клон производит идентичные (гомогенные) антитела, специфичные к определенному эпитопу. Часть сыворотки крови животного, содержащую антитела, называют антисывороткой. Из антисыворотки получают смесь *поликлональных* антител (гетерогенные антитела), т. е. смесь антител, различающихся по структуре и функциональному предназначению.

Поликлональные антитела представляют собой разные изотипы иммуноглобулинов с различной аффинностью к разным эпитопам, т. е. они связываются с различными антигенными детерминантами молекулы-мишени (антигена). Обычно антиген, используемый для иммунизации, содержит не один, а несколько эпитопов, поэтому поликлональная антисыворотка включает большое количество разных антител. В очень упрощенном виде это работает так: если одна молекула антигена содержит пять разных эпитопов, то против нее будут выработаны пять анти-

тел, различающихся паратопами. Для очистки и стандартизации поликлональных антител используют аффинную хроматографию.

Состав поликлональной антисыворотки, полученной при иммунизации животного, непостоянен и зависит от вида животного, его генетических особенностей и физиологического состояния. Использование поликлональных антител имеет два недостатка, существенных для некоторых методов анализа. Во-первых, содержание отдельных антител в поликлональном препарате может варьировать от одной партии к другой (это зависит от индивидуального статуса животного). Во-вторых, поликлональные антитела нельзя применять, если необходимо достоверно различить два подобных антигена, отличающихся одной детерминантой. С другой стороны, поликлональная антисыворотка распознает антиген почти во всех конформациях, даже если произошла денатурация или фрагментация молекулы, так как во многих случаях для связывания достаточно только антигенной детерминанты.

Для выполнения анализа антигенов по одной определенной детерминанте необходимы антитела, специфичные только к этой детерминанте. В 1975 г. исследователями Г. Кёлером и Ц. Мильштейном был разработан принципиально новый метод получения антител (Нобелевская премия, 1984), основанный на слиянии (гибридизации) лимфоцитов иммунизированного животного с миеломными (раковыми) клетками с образованием новых клеток — *гибридом*. Особенностью таких клеток является их способность размножаться и продуцировать антитела в искусственных условиях вне организма. С помощью специальных методов клонирования можно выделить одну гибридную клетку, которая, размножаясь, будет секретировать в неограниченных количествах антитела только одного вида — *моноклональные* антитела, которые являются гомогенными как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам. Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава, низкой вероятностью реакций с «чужими» антигенами. Недостатком моноклональных препаратов может быть низкая аффинность.

Техника гибридом революционизировала иммунный анализ, так как стало возможным получить антитела с определенной химической структурой и функциями в потенциально неограниченном количестве. Моноклональные антитела представляют собой идеальные реагенты для автоматизации анализа и существенно расширяют область иммунного анализа. Путем подбора соответствующих антител можно создавать довольно сложные иммунохимические системы, позволяющие идентифицировать соединения самого разнообразного круга.

В настоящее время в иммунохимическом анализе широко используют *рекомбинантные* антитела, которые получают с применением подходов генной инженерии. Использование генно-инженерных методов дает возможность изменять биохимические и иммунохимические свойства антител, в том числе повышать их аффинность. Рекомбинантные технологии позволяют создавать не только полноценные антитела, но и их фрагменты. Несомненным достоинством генно-инженерных технологий является то, что с их помощью можно не только получать рекомбинантные аналоги уже существующих антител, но и создавать антитела, специфичные к различным антигенам, *de novo*.

Развитие методов генной инженерии позволило получить миниантитела, представляющие собой соединенные вместе переменные области легких и тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина, так как для образования комплекса с антигеном достаточно одного антигенсвязывающего сайта ( $F_{ab}$ -фрагмента). Для создания

таких конструкций используют рекомбинантные технологии, которые позволяют получать и бивалентные антитела, представляющие собой два одноцепочечных  $F_{ab}$ -фрагмента, соединенных вместе. Для повышения специфичности связывания предложено применение биспецифических антител, в которых два  $F_{ab}$ -фрагмента взаимодействуют с разными участками на поверхности одной молекулы антигена или даже различных молекул.

В последние годы интенсивно ведутся исследования по разработке и использованию так называемых *синтетических антител* — молекулярно-импринтированных полимеров (МИП, англ. imprinting — печатание, запечатление), получаемых методом молекулярных отпечатков.

## 6.3. Свойства антигенов

### 6.3.1. Иммуногены

В иммунологии понятие «антиген» определяется не через химическую структуру соединения, а по тому, существует ли антитело, которое с определенным сродством связывается с данным веществом. Вещества, вызываемые при попадании в организм иммунную реакцию, т. е. образование антител, называют антигенами — *иммуногенами*. Эффективными антигенами являются высокомолекулярные соединения или клетки микроорганизмов, вирусы. Чем больше молекулярная масса соединения, тем сильнее иммунная реакция. Для индукции иммунного ответа молекулярная масса должна быть не менее 10 кДа. Наиболее иммуногенны белки, менее — полисахариды, гликопротеины, фосфолипиды. Молекулы малого размера в организме не вызывают образования антител.

На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные фрагменты, обуславливающие антигенную специфичность, называемые *антигенными детерминантами* или *эпитопами*. Понятие «антигенная детерминанта» включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. Эпитоп антигена комплементарен антигенсвязывающей стороне антитела — паратопу. Число эпитопов на поверхности сложной молекулы определяет *валентность* антигена, т. е. его способность связать определенное число молекул антител. Природные антигены в большинстве случаев мультивалентные, т. е. содержат несколько антигенных детерминант.

Эпитоп белкового антигена имеет примерный размер  $0,7 \times 1,2 \times 3,5$  нм, который эквивалентен примерно 5–7 аминокислотным остаткам. В одном белке может быть несколько (5–15 и более) разных детерминант, поэтому к такому белку может образовываться целое семейство различных по специфичности антител. Даже к одной детерминанте может сформироваться спектр антител, различных по структуре, степени специфичности и прочности связывания. Например, инсулин, димерный белок, состоящий из 51 аминокислоты, на своей поверхности имеет как минимум 115 эпитопов.

Антигенные детерминанты белков бывают трех типов — *секвенциальные* (линейные), представляющие собой последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи; *конформационные* (дискретные), образованные амино-

кислотными остатками из различных частей белковой глобулы, т. е. обусловленные пространственной организацией; *скрытыми*, которые обнаруживаются в результате денатурации молекулы и разрыва дисульфидных мостиков или проявляются после ферментативного расщепления молекулы (*неоантигены*) (рис. 6.2). Во многих случаях единичная замена аминокислоты в структуре антигенной детерминанты или изменение конформации белковой глобулы являются достаточным для изменений антигенной специфичности макромолекулы. Если два антигена имеют только часть одинаковых антигенных детерминант, их называют *перекрестно реагирующими* антигенами.

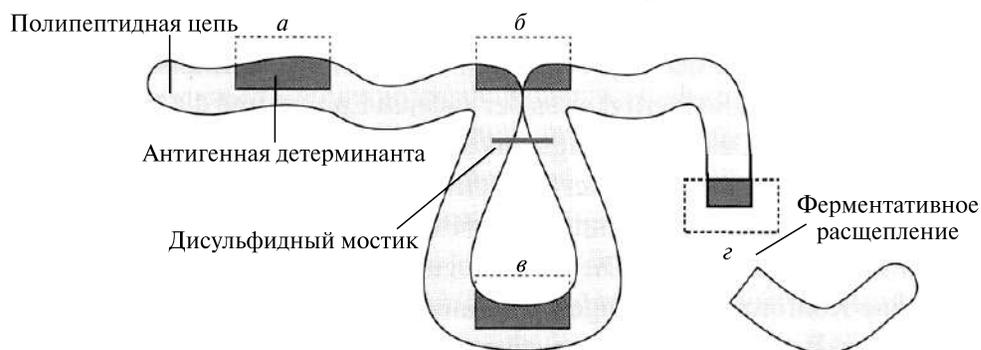


Рис. 6.2. Антигенные детерминанты:  
*а* – секвенциальные; *б* – конформационные; *в*, *г* – скрытые

Эпитоп состоит из фрагментов, которые различаются друг от друга по физико-химическим свойствам. Эти фрагменты взаимодействуют с соответствующими регионами паратопа антитела. Отдельные фрагменты эпитопа вносят разный вклад в общую способность эпитопа связываться с паратопом. Наиболее связывающийся фрагмент обозначают как *иммунодоминантный*, а слабосвязывающийся – *иммунсилентный*, все остальные занимают среднее между ними положение. Антиген называется гомологичным, если эпитоп полностью комплементарен паратопу антитела; в случае частичного соответствия это – гетерологичный антиген.

Антигены могут быть классифицированы в соответствии с их связывающей характеристикой по валентности (общее число сторон связывания) и их детерминированностью (число различных типов сторон) по четырем типам:

- 1) однодетерминантные и одновалентные антигены: только один эпитоп на поверхности, который способен связываться с антителом;
- 2) однодетерминантные и мультивалентные: два или более эпитопа одного вида на молекуле антигена;
- 3) мультидетерминантные и одновалентные: несколько эпитопов различного вида, но только по одному каждого вида на антигенной молекуле (большинство белковых антигенов попадают в эту категорию);
- 4) мультидетерминантные и мультивалентные: несколько эпитопов разных видов и более одного каждого вида на молекулу (протеины, содержащие множественные субъединицы, а также целые клетки).

На схемах антигены обозначают обычно в виде фигур (круг, овал и т. п.), на которых одинаковые эпитопы имеют одну и ту же геометрическую форму, а разные – различную (рис. 6.3).

*Картирование антигенных детерминант* (англ. epitope mapping) представляет собой поиск и установление эпитопов антигена. Установление эпитопов, например поверхностных протеинов бактерий или оболочек вирусов, позволяет синтезировать идентичные эпитопу пептиды, которые в форме иммуногенов можно сделать доступными иммунной системе. Таким образом возможна разработка синтетических вакцин без применения патогенных возбудителей. Исследования сыворотки крови с помощью пептидов, содержащих известные эпитопы, позволяют сделать заключение о присутствии антител в крови и диагностировать наличие инфекции. В области иммунохимических исследований знание эпитопов делает возможным изучение молекулярных механизмов иммунного ответа. Картирование эпитопов используют для характеристики моноклональных антител.

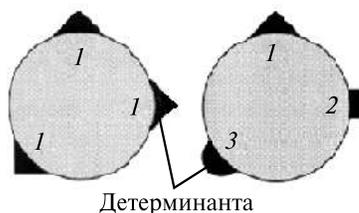


Рис. 6.3. Антигены: одностерминантный (1) и трехвалентный, трехдетерминантный (1, 2, 3) и одновалентный

В настоящее время применяются две стратегии для анализа эпитопов белков. С помощью прогнозных методов (компьютерное моделирование) можно определить вероятностную эпитопную область белка, далее синтезировать пептиды из этой области и протестировать их на антигенные свойства. С другой стороны, посредством синтеза многочисленных пептидов можно охватить общую первичную последовательность белка и идентифицировать эпитопную область биологическим тестом. Знание антигенной специфичности является исключительно важным условием для создания диагностических иммунохимических наборов, так как позволяет проводить определение данного вещества в присутствии близкородственных соединений.

Зачастую выделить и очистить в требуемых для создания диагностикума количествах антиген, например вирусный белок, бывает очень трудно. В подобных случаях для синтеза антигена могут быть использованы генно-инженерные (трансгенные) бактерии, или дрожжи, либо методы химического синтеза пептидов. В зависимости от того, что является источником антигенов, их можно подразделить на лизатные (смесь нативных антигенов, полученных в результате лизиса клеток); рекомбинантные (полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определенных белковых антигенов возбудителя); пептидные (химически синтезированные фрагменты белков).

Имунохимические свойства антигенов, а также их гомогенность оцениваются методами иммунодиффузии, иммуноэлектрофореза, иммуноблоттинга и иммуно-

химического микроанализа с последующей иммунохимической идентификацией с помощью стандартизированных антител или образцов — международных стандартов ВОЗ.

В роли антигенов могут выступать и сами иммуноглобулины (антитела). В этом случае организм вырабатывает антитела, которые часто называют вторичными. Например, при иммунизации кролика иммуноглобулинами другого вида животного вырабатываются вторичные (антивидовые) антитела. Вторичные антитела широко применяются в методах иммуноанализа с использованием меченых иммунореагентов.

В иммунохимии концентрацию антигенов или антител принято выражать посредством *титра*. Титр в иммунохимическом анализе отличается от классического аналитического понимания данного термина. Титр обозначает максимальное или оптимальное разведение исходных проб антигенов или антител, при котором еще возможна регистрация положительной реакции между антигенами и антителами. Определение титра позволяет быстро оценить активность иммунных сывороток. Установление титра происходит следующим образом. Исходную пробу, содержащую антитело или антиген, последовательно разбавляют буфером. В результате получают серию разбавлений 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32, 1 : 64 и т. д. Например, 200 мкл пробы смешивают с 200 мкл буфера и получают раствор с титром 1 : 2; далее 200 мкл раствора (1 : 2) смешивают с 200 мкл буфера и получают раствор с титром 1 : 4 и т. д. Если сравнить различные пробы с титрами, например 1 : 4 и 1 : 32, то вторая содержит большую концентрацию антител.

### 6.3.2. Гаптены

Антигены, которые вызывают иммунный ответ в организме (т. е. образование антител), являются комплектными антигенами, или иммуногенами. К некомплектным антигенам (*гаптенам*) относятся вещества, не способные сами вызывать образование антител, но приобретающие иммуногенные свойства после конъюгирования с высокомолекулярными соединениями, например транспортными протеинами. Гаптены в конъюгатах с белком выступают в роли иммунодоминантной группы и поэтому в дальнейшем могут взаимодействовать с антителами независимо от белка носителя.

В качестве гаптенов выступают самые разнообразные вещества: пептидные и стероидные гормоны, лекарственные препараты, антибиотики, витамины, олигосахариды, пестициды, наркотики, витамины и т. д. Обычно принято считать, что гаптены — это низкомолекулярные соединения (< 2000 Да), однако это не совсем верно. К гаптенам могут также относиться полисахариды, полипептиды *D*-аминокислот, нуклеиновые кислоты, имеющие высокую молекулярную массу.

Чтобы получить антитела к низкомолекулярным соединениям, необходимо связать их прочной ковалентной связью с молекулой-носителем, причем сила и стабильность этой связи являются критериями для иммуногенности образующегося комплекса. Простая ковалентная связь обеспечивает эту стабильность. Белок-носитель должен быть высокомолекулярным (> 20 кДа) и филогенетически не связанным с видом животных, которые будут использованы для иммунизации. В качестве носителя чаще всего применяют различные белки, например альбумин, сывороточный или яичный (овальбумин), гамма-глобулин, тиреоглобулин, гемоцианин, а также синтетические полипептиды (поли-*L*-лизин, полиглутаминовая кислота). Белки со-

держат различные функциональные группы, которые могут быть использованы для ковалентного связывания гаптена, —  $\alpha$ -аминогруппа ( $\epsilon$ -лизина или N-концевая), гидроксильная (алифатическая остатков серина и треонина, ароматическая — тирозина), сульфгидрильная (цистеина), карбоксильная (C-концевая), гетероцикл имидазола (гистидина)). Молекула носителя влияет на иммунологическую специфичность и связывающую способность антител. Реакции ковалентного связывания гаптенных с белками проводят в водных растворах при пониженной температуре и нейтральных значениях pH раствора, т. е. в условиях, которые позволяют избежать денатурации белков.

Гаптены чаще всего содержат одну или несколько функциональных групп, которые можно использовать для ковалентного связывания с реакционноспособными группами носителя. Характер, размер и положение ковалентной связи между гаптенем и носителем существенно влияют на специфичность индуцируемых антител. Кроме того, имеет значение количество присоединившихся молекул гаптена к молекуле носителя (здесь речь идет не о молярном соотношении, а о плотности упаковки гаптена на молекуле носителя). Этот фактор сильно влияет на титры и специфичность полученных антител и определяется эмпирическим путем. Для различных белков-носителей может быть свое оптимальное соотношение. Так, для конъюгата «гаптен — альбумин» (бычий сывороточный, 64 кДа, 60 первичных аминогрупп для связывания гаптена) оно может быть от 5 : 1 до 30 : 1. Такой большой белок, как тиреоглобулин (680 кДа), в сравнении с альбумином может иметь в 10 раз большее соотношение гаптенных: носитель при получении одинаковой плотности упаковки.

На специфичность антител, продуцируемых к гаптенной детерминанте (эпитопу), могут влиять различные факторы. Один из таких факторов — способ пришивки гаптена к белку-носителю. Важно, какая функциональная группа гаптена была использована для конъюгирования. Один и тот же гаптен можно связать с белковой молекулой различными способами. Часто при получении конъюгатов для иммунизации гаптены пришивают не непосредственно к молекуле белка-носителя, а через пространственную «ножку» (мостик), содержащую обычно 4–6 углеродных атомов. В этом случае сама «ножка» в комплексе с гаптенем выступает в качестве составной антигенной детерминанты и образующиеся антитела могут обладать меньшей эффективностью связывания с нативным гаптенем, чем с таким связанным через «ножку» гаптенем. Существенным фактором для специфичности является химическая структура «ножки», в частности ее длина и ближайшее окружение гаптена.

Антигенная специфичность гаптенных сильно зависит от их химической структуры. Так, введение дополнительных групп может очень исказить «антигенный портрет» того или иного соединения. Например, тироксин и трииодтиронин отличаются только тем, что последний в своей структуре содержит на один атом иода меньше. Этого вполне достаточно, чтобы антитела к этим гормонам сильно различались перекрестной реактивностью. Нужно учитывать, что многие физиологически активные соединения претерпевают различные биохимические превращения в организме, в результате чего образуется группа близкородственных метаболитов. Важным моментом является стереоспецифичность гаптенных. К примеру, антитела к олигопептидам из *D*-аминокислот не реагируют с олигопептидами из *L*-аминокислот.

На антигенную специфичность гаптенных сильное влияние оказывают аминокислотный остаток белка носителя, к которому пришит гаптен, а также молекулярные размеры гаптена. Так, в длинных олигопептидных гаптенных замена аминокислот-

ных остатков, которые расположены близко к белку-носителю, оказывает меньшее влияние, чем в коротких. Напротив, замены в удаленных от носителя аминокислотных остатках оказываются драматическими для антигенной структуры независимо от размеров гаптена. Аналогичные закономерности наблюдаются в случае гаптенных на основе олигосахаридов.

Так, антигенная специфичность гаптенных определяется целым рядом факторов. Важную роль в иммуногенности конъюгата «гаптен – носитель» играют:

- структура и стереохимия гаптена;
- соотношение «гаптен – носитель»;
- тип и длина мостика между носителем и гаптенном;
- природа и свойства носителя;
- способ химического присоединения гаптена к молекуле носителя;
- способ и продолжительность периода иммунизации.

Все эти моменты крайне важно учитывать при разработке методов иммунохимического анализа гаптенных.

Что касается характера иммунизации, то здесь установлена определенная корреляция между количеством вводимого экспериментальным животным антигена, схемой иммунизации и специфичностью вырабатываемых антител. Так, для получения антител, обладающих широким спектром действия по отношению к психотропным средствам, используют в основном внутримышечное введение больших количеств конъюгированного антигена (30–40 мг/кг веса) по кратковременной схеме иммунизации. Специфические антитела, практически не дающие перекрестной реакции с родственными гаптенным соединениями, чаще всего получают с применением длительных схем иммунизации и с использованием малых доз антигена, вводимого совместно с адъювантом (вещество, способствующее усилению иммунного ответа, повышает иммунный потенциал вакцин).

В целом основные стадии в разработке иммунохимического метода анализа гаптенных следующие:

- дизайн и синтез гаптенных;
- конъюгирование гаптена с макромолекулярным носителем;
- иммунизация животного;
- выделение антисыворотки и характеристика антител;
- оптимизация анализа;
- валидация метода.

## **6.4. Физико-химические закономерности взаимодействия «антиген – антитело»**

При разработке иммунохимических тестов и непосредственном проведении анализа нужно учитывать факторы, которые определяют взаимодействие антитела с антигеном. К таким факторам относятся: аффинность и авидность антител, соотношение  $A_t : A_g$ , физическая форма антигена, а также перекрестная реакционная способность антител.

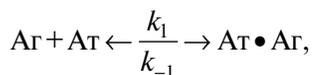
### 6.4.1. Аффинность антител

Аффинность антител представляет собой силу взаимодействия между *одним* паратопом антитела и соответствующим ему участком антигена, т. е. эпитопом. Антитело своим паратопом связывается с эпитопом антигена не ковалентно, а по принципу комплементарности. Чтобы паратоп мог связаться со своим эпитопом, взаимодействующие участки должны обладать структурным и пространственным соответствием, т. е. быть комплементарными (подобно соответствию ключа с замком).

В основе реакции «антиген – антитело» лежит сумма нековалентных сил (водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, электростатические и гидрофобные взаимодействия). Наиболее существенную роль играют силы гидрофобного взаимодействия. неполярное связывание возникает в результате стремления гидрофобных групп в водном растворе к ассоциации друг с другом, что сопровождается стабилизацией всей системы: уменьшением ее свободной энергии при одновременном увеличении энтропии. Меньший вклад в связывание антигена с антителом вносят водородные и ионные взаимодействия. По сравнению с ковалентными связями все эти силы притяжения по отдельности сравнительно слабы, однако в совокупности они обуславливают высокоаффинное взаимодействие. Сила нековалентной связи в первую очередь зависит от расстояния между взаимодействующими группами, т. е. требуется тесное сближение взаимодействующих групп (не менее 3 нм). В то же время при перекрывании электронных оболочек в результате тесного контакта поверхностей молекул могут возникать силы отталкивания. Соотношение сил притяжения и отталкивания играет решающую роль в определении специфичности молекулы антитела и ее способности различать молекулы, схожие по структуре. Площадь контакта антигена и антитела может составлять приблизительно 700 квадратных ангстрем ( $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ м}$ ). Если структуры антигена и активного центра не соответствуют друг другу, то их притяжение будет слабым, а отталкивание сильным. Важным моментом в образовании прочных специфических иммунокомплексов ( $\text{Аг} \bullet \text{Аг}$ ) является наличие множественных контактов, позволяющих, несмотря на слабость отдельных единичных взаимодействий, прочно удерживать антиген в активном центре. Замена отдельных атомов или групп в молекуле антигена или в антигенсвязывающих центрах приводит к ухудшению связывания.

Так, сила взаимодействия между одной антигенной детерминантой и одной антигенсвязывающей областью антитела (*иммунологическая специфичность*) определяется суммой межмолекулярных сил притяжения и отталкивания, действующих между активным центром антитела и специфическим лигандом.

Реакцию взаимодействия антигена с антителом можно рассматривать как частный случай связывания лигандов с макромолекулярными рецепторами. С точки зрения термодинамики в основе первичного взаимодействия лежат общие принципы бимолекулярной реакции. В простейшем случае взаимодействие *одного центра* связывания антитела с моновалентным антигеном (гаптеном) с образованием иммунного комплекса  $\text{Аг} \bullet \text{Аг}$  в соотношении 1 : 1 может быть представлено следующей схемой:



где  $\text{Аг}$  – свободный антиген;  $\text{Ат}$  – свободное антитело;  $\text{Аг} \bullet \text{Аг}$  – иммунокомплекс;  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константа скорости прямой и обратной реакций соответственно.

Иммунная реакция является обратимой и описывается теми же кинетическими и термодинамическими параметрами, что и любой процесс комплексообразования. Кинетически связывание антитела с антигеном характеризуется константами скоростей прямой (ассоциация с образованием иммунного комплекса) и обратной (диссоциация иммунного комплекса) реакций  $k_1$  ( $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ) и  $k_{-1}$  ( $\text{c}^{-1}$ ) соответственно, которые показывают, какая доля молекул вступает в реакцию в единицу времени. Абсолютная скорость, т. е. общее число молекул, реагирующих в единицу времени, будет, очевидно, зависеть от концентрации молекул. Таким образом, когда после добавления Аг к Ат начинается процесс связывания, скорость прямой реакции станет высокой, а скорость обратной — низкой. В процессе реакции концентрации свободных Аг и Ат будут снижаться, и в результате скорость прямой реакции начнет падать. В то же время концентрация комплекса Аг • Ат и скорость обратной реакции будут увеличиваться. В конечном счете наступит состояние равновесия, когда количество свободных молекул Аг и Ат, реагирующих в единицу времени с образованием комплекса Аг • Ат, будет равно количеству молекул иммунного комплекса, которые за это время диссоциируют.

В условиях равновесия с учетом закона действующих масс отношение двух констант скоростей дает константу равновесия, или *константу аффинности* ( $K_A$ ):

$$k_1[\text{Ат}][\text{Аг}] = k_{-1}[\text{Ат} \bullet \text{Аг}];$$

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{Ат} \bullet \text{Аг}]}{[\text{Ат}][\text{Аг}]},$$

где  $[\text{Аг}]$ ,  $[\text{Ат}]$  и  $[\text{Аг} \bullet \text{Ат}]$  — концентрация свободного антигена, свободного антитела и иммунного комплекса соответственно;  $K_A$  — константа равновесия, размерность л/моль или  $\text{M}^{-1}$ .

Константа аффинности характеризует сродство антитела и антигена и представляет собой количественную характеристику взаимодействия антигена с антителом. Константа аффинности зависит от значения рН среды, ионной силы, присутствия детергентов или хаотропных агентов. Значения константы аффинности антител варьируются в пределах  $10^5$ – $10^{12}$   $\text{M}^{-1}$ . Для чувствительного и точного анализа предпочтительны высокоаффинные антитела, имеющие константу, равную  $10^{10}$   $\text{M}^{-1}$ . Если одна и та же популяция антител взаимодействует с двумя различными антигенами Аг<sub>1</sub> и Аг<sub>2</sub> с константами аффинности соответственно  $K_{A1}$  и  $K_{A2}$  ( $K_{A1} \ll K_{A2}$ ), то говорят, что данные антитела являются высокоспецифическими по отношению к антигену Аг<sub>2</sub> и менее специфическими к Аг<sub>1</sub>. Антитела с высокой аффинностью связывают большее количество антигенов за меньший период времени, образующийся при этом комплекс очень стабилен.

Значения констант скорости реакции ассоциации ( $k_1$ ) для большинства антигенов велики и приближаются к диффузионно контролируемому пределу ( $10^8$   $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ ). В случае белковых антигенов их значения варьируются от  $10^5$  до  $5 \cdot 10^6$   $\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$ . Наблюдаемые различия в аффинности антител обусловлены различиями в значениях константы скорости диссоциации ( $10^{-3}$ – $10^{-7}$   $\text{c}^{-1}$ ).

На практике часто используют равновесную константу диссоциации иммунного комплекса  $K_D$  (размерность М), связанную с константой  $K_A$  простым соотноше-

нием  $K_D = 1/K_A$ . Очевидно, что чем меньше  $K_D$  (или больше  $K_A$ ), тем прочнее образующийся иммунокомплекс. Антитела с высокой аффинностью имеют константу диссоциации  $< 10^{-7}$  М. Причина, по которой константа  $K_D$  часто определяется в предпочтении к  $K_A$ , состоит в том, что для определения  $K_A$  необходимо, чтобы реакция достигла состояния равновесия, тогда как величина  $K_D$  может быть получена при условии, что половина присутствующего антигена связана в комплексе с антителом.

С точки зрения термодинамики  $K_A$  является термодинамическим параметром, характеризующим изменение стандартной свободной энергии ( $\Delta G^0 = \Sigma G^0_{\text{прод}} - \Sigma G^0_{\text{реак}}$ ), и выражается формулой

$$\ln K_A = -\frac{\Delta G^0}{RT},$$

где  $R$  – газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура,  $K$ .

Для самопроизвольного протекания реакции изменение свободной энергии должно быть отрицательным, общее изменение энергии при комплексообразовании (в состоянии равновесия  $\Delta G = 0$ ) выражается через две функции состояния системы – изменений энтальпии и энтропии ( $T = \text{const}$ ,  $P = \text{const}$ ):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Величину  $\Delta H$  можно определить экспериментально: либо с помощью прямых calorиметрических изменений, либо из зависимости равновесной константы комплексообразования от температуры, описываемой законом Вант-Гоффа.

Так, общее сродство антитела к антигену в конкретных условиях (растворитель, температура и т. д.) можно выразить в значениях величин константы равновесия или изменения свободной энергии системы при комплексообразовании. Обычный диапазон изменения аффинности антител ( $10^5 - 10^{12}$  М<sup>-1</sup>) соответствует изменению свободной энергии в интервале 40–70 кДж/моль.

Разработка способов иммунохимического определения биологически активных веществ в биосредах или в объектах окружающей среды требует количественной оценки специфичности определений. Прочность образующихся в ходе определения иммунных комплексов является одним из факторов, способствующим, например, селективному извлечению анализируемого соединения из пробы, содержащей смесь различных компонентов. Знание константы связывания антитела и антигена необходимо как на стадии разработки новых вариантов иммуноанализа, так и при практическом их выполнении. Чем выше аффинность  $A_t$  к  $A_g$ , тем более стабильным является комплекс  $A_t \bullet A_g$ , и, следовательно, вероятность его обнаружения возрастает.

*Определение аффинности* антител в составе сыворотки или выделенных в очищенном виде представляет собой сложную экспериментальную и теоретическую задачу. Трудности определения аффинности антител обусловлены следующими причинами: гетерогенностью антител по физико-химическим свойствам, в том числе сродству к антигену; сложностью определения общего количества специфических антител; возможностью образования комплексов сложного состава в случае поливалентных антигенов. Истинные значения констант связывания

важны для определения термодинамических характеристик процесса взаимодействия Аг – Ат. Однако для практических целей, например для разработки различных методов иммуноанализа, достаточно знать эффективные значения, характеризующие суммарные свойства используемых антител. Точные константы можно определить только для моноклональных антител, так как они гомогенны по составу. Этот наиболее простой случай реализуется, например, при связывании гаптена (моновалентный антиген) с  $F_{ab}$ -фрагментом моноклональных антител. Поликлональные антитела гетерогенны, они представляют собой смесь различных антител с разной специфичностью и, следовательно, с различной аффинностью.

Для количественной оценки констант комплексообразования реакции Аг – Ат наиболее часто применяют методы, основанные на измерении равновесных концентраций комплекса Аг • Ат при постоянной концентрации одного из реагентов (как правило, Ат) и варьировании концентрации второго (обычно Аг). Для обработки экспериментальных измерений используют различные математические методы, в частности представление результатов в виде линейной зависимости (линеаризация данных). Наиболее часто для анализа комплексообразования используют метод Скэтчарда, основанный на исследовании зависимости в координатах: отношение равновесной концентрации комплекса к концентрации свободного антигена ( $[Аг • Ат]/[Аг]_{своб}$ ) (ось  $Y$ ) – концентрация комплекса ( $[Аг • Ат]$ ) × × (ось  $X$ ). В координатах Скэтчарда  $[Аг • Ат]/[Аг]_{своб} - [Аг • Ат]$  (англ. a plot of  $B/F$  against  $B$ ;  $B$  – bound,  $F$  – free antigen at equilibrium) получают прямую линию, тангенс угла наклона которой принимают равным величине константы аффинности  $K_A$ . Прямолинейную зависимость графика Скэтчарда наблюдают для моноклональных антител, отклонение от линейности указывает на существование нескольких популяций антител с более низкой и более высокой специфичностью к определяемому антигену.

Для расчетов констант равновесия необходимо знать концентрации свободного и связанного с антителами антигена в условиях равновесия. Все методы, позволяющие определять концентрации свободного и связанного антигенов, можно условно разбить на две большие группы. К *первой* относятся методы, в которых стадия разделения свободного и связанного антигенов осуществляется путем избирательного осаждения (например, сульфатом аммония или вторичными антителами), аффинного связывания или гель-фильтрации. Если реагенты достаточно сильно различаются своими молекулярными массами и размерами, то процедура разделения существенно упрощается. В случае корпускулярных антигенов оставшиеся несвязанные антитела могут быть отделены либо центрифугированием, либо пропусканием смеси через фильтр, задерживающий антиген. Для низкомолекулярных антигенов (гаптенов) используется равновесный диализ.

Метод равновесного диализа основан на различной способности антител и гаптенов проходить через полупроницаемые мембраны. Раствор каждого реагента известной концентрации в одном и том же растворителе с одинаковой ионной силой и значением рН помещают по разные стороны мембраны. Например, раствор антитела помещают в диализный мешочек, который погружают в раствор антигена. Маленькие молекулы гаптена (Н) свободно диффундируют через мембрану в раствор антител (Ат) и связываются с ними в комплекс (Н • Ат). Большие

молекулы антител не проходят сквозь диализную мембрану. Количество гаптена можно определить, если использовать меченые реагенты – интенсивность сигнала метки соответствует концентрации гаптена. При достижении равновесия концентрация свободного гаптена выравнивается по обе стороны мембраны ( $[H]_{\text{своб. внутр}} = [H]_{\text{своб. вне}}$ ). Однако внутри диализного мешочка общая концентрация гаптена складывается из суммы количеств свободного и связанного в иммунокомплекс ( $[H]_{\text{своб}} + [H \cdot At]$ ). Вне мешочка находится только гаптен в свободной форме ( $[H]_{\text{своб}}$ ). По сути, разница между внутренней и внешней концентрациями гаптена и является концентрацией гаптена, связанного в иммунокомплекс. Процедуру диализа повторяют для различных концентраций гаптена, при этом концентрация антител остается постоянной. Концентрацию антител выбирают такой, которая позволяла бы связать половину количества гаптена. Измерив равновесную концентрацию гаптена, можно рассчитать количество гаптена, связанного с антителами, и определить по уравнению константу аффинности. Недостатки метода – относительно большое время достижения равновесия и необходимость учета эффектов, вызываемых присутствием мембраны, в результате чего приходится работать с достаточно высокими концентрациями реагентов, что значительно понижает чувствительность определения константы связывания.

*Вторая группа* включает методы, базирующиеся на изменении физико-химических свойств антигенов (или меток, связанных с антигенами) при комплексообразовании с антителами, например изменении их флуоресцентных свойств (тушение или усиление, изменение степени поляризации флуоресценции, биолюминисценция).

Для изучения специфичности антител и определения  $K_A$  также широко используют аффинный КЭ.

Константа аффинности отражает взаимодействие одного паратопа с одним эпитопом. Однако все природные антитела являются мультивалентными, и поэтому их функциональная аффинность зависит не только от их термодинамической аффинности, но и от числа связывающих сторон (две – для IgG, 10 – для IgM). Связывание моновалентного лиганда (гаптена) с мультивалентным антителом описывается следующим уравнением:

$$K_A = \frac{[At \cdot Ag]}{[At][Ag]} = \frac{r}{c(n-r)},$$

где в условиях равновесия  $c$  – концентрация свободного антигена;  $r$  – отношение концентрации связанного антигена к общей концентрации антитела (представляет собой среднее число молекул антигена, связанных с одной молекулой антитела);  $n$  – максимальное число молекул антигена, которое может связать молекула антитела (т. е. валентность антитела).

Ряд значений  $r$  и  $c$  может быть получен из серии экспериментов, в которых концентрация антитела сохраняется постоянной, а концентрация антигена варьируется (например, с помощью равновесного диализа). В результате строят зависимость в координатах Скэтчарда:  $r/c$  от  $r$ , из которой можно определить константу равновесия  $K_A$  и число  $n$  (т. е. валентность At). Если все антитела имеют одинаковую

аффинность (моноклональные антитела), то зависимость Скэтчарда является линейной и ее наклон дает величину ( $-K_A$ ), причем пересечение с осью абсцисс дает значение  $n$ . Если антитела различаются по аффинности (поликлональные антитела), то зависимость Скэтчарда представляет собой кривую линию, наклон которой постоянно изменяется.

### 6.4.2. Авидность, специфичность и перекрестная реакционная способность антител

*Авидность* антител является характеристикой общей стабильности комплекса  $Ag \bullet Ab$ , т. е. кооперативных взаимодействий антитела с антигеном. Авидность определяется аффинностью и валентностью антитела, а также особенностями пространственной структуры антигена (стерические препятствия для создания иммунного комплекса). Авидность антитела следует отличать от аффинности, так как аффинность – термодинамический параметр, количественно описывающий силу единственного взаимодействия эпитопа антигена и паратопа антитела, в то время как авидность характеризует силу суммарных взаимодействий (рис. 6.4). Если величина константы аффинности для двухвалентного антитела составляет  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , то его константа авидности –  $10^6 \text{ M}^{-1}$ .

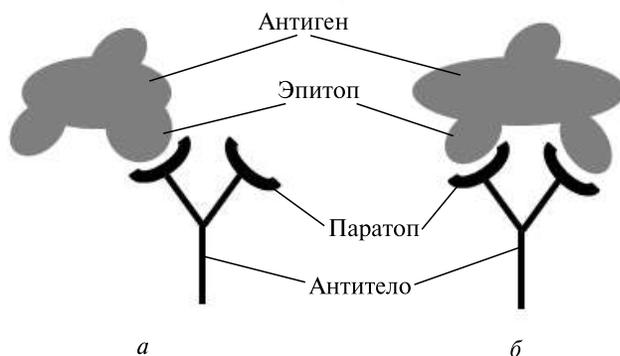


Рис. 6.4. Аффинность (а) и авидность (б) антитела

Авидность мультивалентных антител гораздо больше таковой для двухвалентных антител. Например, авидность IgM может быть высокой даже при низкой аффинности отдельных антигенсвязывающих центров, так как молекула IgM имеет десять таких центров (т. е. декавалентна), в то время как IgG содержит только два центра. Следует отметить, что реакция между мультивалентными антителами и мультивалентными антигенами приводит к образованию стабильных комплексов, которые легче обнаружить в процессе анализа.

*Специфичность.* Для использования антител в качестве реагентов в иммуноанализе большое значение имеет их индивидуальная специфичность. Специфичность отражает степень, с которой антитело дифференцирует (различает) разные антигены. Специфичность индивидуального антитела отражает силу его взаимо-

действия с одной антигенной детерминантой. Специфичность поликлональной антисыворотки суммарно отражает специфичность содержащихся в ней антител по отношению только к одному антигену. Антитело обнаруживает высокую специфичность по отношению к искомому антигену, если связывается с ним более сильно, чем с другими молекулами, схожими по структуре (рис. 6.5). Антитела могут распознавать различия в первичной структуре, изомерные формы антигена, его вторичную и третичную структуру.

*Перекрестная реакционная способность.* Для оценки специфичности антитела важно определить его способность к перекрестным взаимодействиям. Перекрестная реакционная способность (англ. cross-reactivity (CR) – кросс-реактивность) отражает степень, с которой различные антигены кажутся подобными антителу. Кросс-реактивность – это способность антител специфически реагировать с антигеном, схожим, но не идентичным по химической структуре с антигеном, использованным при иммунизации. Степень перекрестной реактивности зависит от того, насколько антиген идентичен иммуногену. В случае если антиген А имеет общие эпитопы с антигеном В, то часть антител, специфичных к А, может реагировать также с В.

При разработке иммунохимических тест-систем для анализа различных гапте-нов (пестициды, наркотики, фармпрепараты и др.) оценка перекрестной реакционной способности является обязательным условием, т. е. нужно выявить, будут ли схожие соединения мешать определению искомого гаптена. Сродство в перекрестных реакциях более низкое, чем в процессе реагирования между абсолютно специфичными антителами и антигенами.

Для количественной оценки перекрестной реакционной способности применяют конкурентные методы (например, конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ), в которых исследуемый антиген конкурирует с меченым антигеном за взаимодействие с моноклональным антителом, концентрация которого постоянна. В качестве исследуемого антигена может быть нативный (гомологичный) или мутированный (гетерологичный) антиген, гаптен или перекрестно реагирующее вещество (т. е. вещество, схожее по структуре с искомым антигеном). Меченый антиген – это исследуемый антиген с присоединенной к нему меткой (например, флуорофор или фермент), по сигналу которой определяют концентрацию антигена. В результате получают кривые ингибирования в ко-

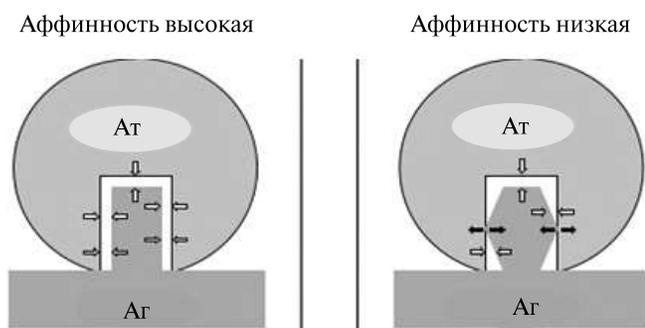


Рис. 6.5. Схема взаимодействия антитела со специфичным и неспецифичным антигеном

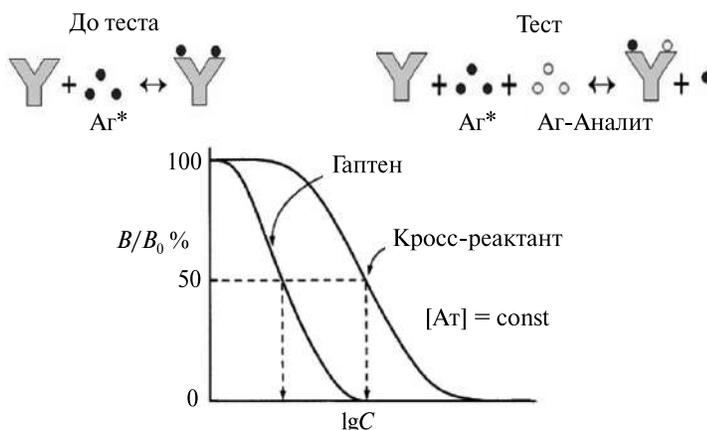


Рис. 6.6. Кривые ингибирования для оценки перекрестной реакционной способности антител:  $Ag^*$  – меченый антиген;  $B_0$  и  $B$  – сигнал метки в отсутствии и присутствии ингибитора соответственно

ординатах: процент связывания меченого антигена с антителом ( $B/B_0$  %, где  $B$  и  $B_0$  – сигнал метки, например оптическое поглощение, в присутствии и отсутствии ингибитора соответственно) – концентрация ингибитора  $lgC$  (например, гаптена или тестируемого кросс-реактанта) (рис. 6.6).

Степень перекрестной реактивности исследуемых соединений характеризуется индексом  $IC_{50}$ , представляющим собой концентрацию исследуемого антигена, достаточную для ингибирования процесса связывания фиксированного количества антител с меченым антигеном на 50 %. По сути, показатель  $IC_{50}$  – концентрация антигена или кросс-реактанта, которая вытесняет 50 % меченого антигена.

Перекрестную реакционную способность ( $CR$ ) антитела в процентах рассчитывают по формуле

$$\%CR = 100 \frac{IC_{50}(\text{гаптен})}{IC_{50}(\text{кросс-реактант})},$$

где  $IC_{50}(\text{гаптен})$  – концентрация гаптена, при которой происходит падение регистрируемого сигнала на 50 % в сравнении с сигналом системы без присутствия гаптена,  $IC_{50}(\text{кросс-реактант})$  – концентрация перекрестно реагирующего вещества, при которой происходит падение сигнала на 50 %.

Низкая величина  $\%CR$  свидетельствует о низкой перекрестной реактивности антител.

### 6.4.3. Реакция иммунопреципитации

В зависимости от соотношения концентраций компонентов растворенные антитела и антигены могут реагировать как с образованием растворимого иммунного комплекса  $Ag \bullet Ag$ , так и нерастворимого, который в результате выпадает в осадок. Процесс агрегации растворенного антигена с растворенным антителом называют иммунопреципитацией. Реакция преципитации впервые была описана Р. Краусом (R. Kraus)

в 1897 г. Иммунопреципитат — высокомолекулярный комплекс, образующийся в результате поперечного сшивания антител с антигенами и представляющий собой трехмерную полимерную структуру. Иммунопреципитат может образоваться только при условии, что антитела являются бивалентными (или выше), а антигены — поливалентными, они должны содержать три или две антигенные детерминанты.

Взаимодействие антитела и антигена происходит в две фазы. Специфическая реакция эпитопа антигена и паратопа антитела (первичное взаимодействие) протекает очень быстро (в миллисекунды). В сравнении с этим образование иммунопреципитата, т. е. вторичное взаимодействие антитела с антигенами (фаза проявления), происходит в течение нескольких минут или часов. Благодаря поливалентной природе антигена и антитела феномен иммунопреципитации связан с образованием при реакции «антиген — антитело» решетчатых структур. Теория «решетки», объясняющая механизм формирования иммуноагрегатов на основе поливалентности антител, впервые наиболее четко сформулирована Дж. Р. Марраком (J. R. Marras) в 1934 г.

Количественная теория реакции иммунопреципитации была предложена в 1930-е гг. М. Гейдельбергером и Ф. Кендаллом. В ее основе лежит обнаружение так называемой зоны эквивалентности — зоны с максимальной преципитацией. Большое количество иммунохимических методов анализа было разработано на фундаментальных принципах этой теории. В соответствии с ней соотношение между концентрацией антигена и количеством иммунопреципитата при постоянной концентрации антител может быть описано кривой иммунопреципитации (кривая Гейдельбергера — Кендалла). На ней различают три зоны: избытка антител, эквивалентности и избытка антигенов (рис. 6.7). При смешивании возрастающих количеств антигена с постоянным объемом антисыворотки количество образующегося иммунопреципитата первоначально возрастает, а затем вновь снижается.

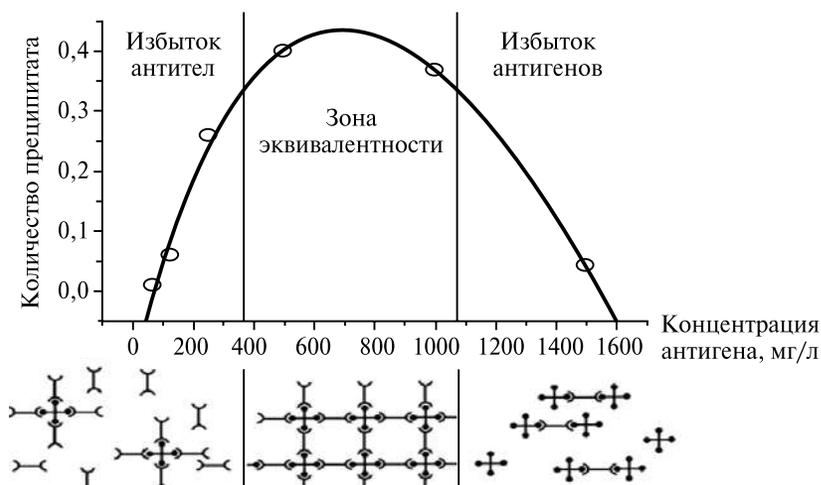


Рис. 6. 7. Кривая иммунопреципитации

*Зона избытка антител:* количество иммунопреципитата возрастает пропорционально с увеличением концентрации антигена. Антитела находятся в избытке и связывают все эпитопы антигена, при этом образуется малый по размерам растворимый комплекс  $At \cdot Ag$ . В растворе отсутствует свободный антиген, но имеются непроре-

агировавшие (свободные) антитела. Условия данной зоны применяют для анализа комплекса  $At \bullet Ag$  методами иммунотурбидиметрии, иммунонефелометрии и неконкурентных методов иммунохимического анализа.

*Зона эквивалентности:* молекулы антитела и антигена поперечно сшиваются с образованием большого нерастворимого иммунокомплекса, который преципитирует. В растворе не детектируются ни свободные (несвязанные) антитела, ни свободный антиген. В данной зоне наблюдается эквивалентность между паратопами и эпитопами, что указывает на их стехиометрическое соотношение. Максимальная преципитация при эквивалентности эпитопов и паратопов для разных антигенных систем различна и зависит как от валентности антигенов, так и от числа паратопов антисыворотки. Точную точку эквивалентности нельзя определить посредством молярности реакционных партнеров. Условия эквивалентности используют в методах иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза.

*Зона избытка антигенов:* количество осадка снижается при возрастании концентрации антигена, большой агрегированный иммунокомплекс распадается. Все паратопы антитела насыщены антигеном, превалирует малый растворимый комплекс. В растворе отсутствуют свободные антитела, но имеется свободный антиген. Избыток антигена необходим при проведении конкурентного иммунохимического анализа.

Следует учитывать, что на вторую фазу реакции антигена с антителом – собственно образование иммунопреципитата – оказывает влияние ряд неспецифических факторов, а именно концентрация в растворе солей, значение рН, температура, объем реагентов. При увеличении концентрации солей в растворе выше физиологического значения (0,15 М) количество образующегося иммунопреципитата уменьшается. Например, в 15 % растворе NaCl иммунопреципитаты, образованные полисахаридными антигенами, диссоциируют. Изменение рН в физиологических пределах (от 6,5 до 8,0) заметно не влияет на формирование осадка. При снижении рН раствора до 5,0 или повышении до 9,0 существенно уменьшается количество образующегося осадка, а при рН ниже 3,0 и выше 11,0 ранее образованные иммунокомплексы диссоциируют. На свойстве иммунопреципитатов диссоциировать в растворах с высокой концентрацией солей и крайними значениями рН основаны методы выделения чистых антител и антигенов из специфических иммунопреципитатов. Наиболее употребляемые диссоциирующие агенты – концентрированные растворы нейтральных солей, разбавленные кислоты и щелочи, полианионы.

## 6.5. Прямые методы иммуноанализа

Реакцию антитела с антигеном можно детектировать различными способами и методами. В зависимости от вида антигенов (корпускулярный или растворенный) используют различные техники осаждения и агглютинации. На реакции иммунопреципитации основаны прямые методы определения комплекса  $At \bullet Ag$ . К таким методам относятся разные техники иммунопреципитации, иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза, а также иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия.

Имунопреципитация базируется на образовании стабильного комплекса  $At \bullet Ag$ , который может быть выделен из раствора посредством связывания с осадителем (преципитирующие реагенты) или поперечным сшиванием при достаточном количестве антитела и антигена.

### 6.5.1. Иммунодиффузия

Метод иммунодиффузии (ИД) основан на реакции иммунопреципитации и спонтанной диффузии молекул вдоль градиента концентрации. Макромолекулы с молярной массой до  $\sim 10^6$  г/моль могут свободно диффундировать в водной фазе. Движущей силой диффузии (лат. *diffusio* – распространение, растекание) макромолекул в соответствии с первым законом Фика является градиент концентрации, скорость их диффузии определяется коэффициентом диффузии. Реакция иммунопреципитации может протекать как в растворе, так и в геле. Иммунопреципитация в растворах – это наиболее простой метод иммунологической диагностики.

На протекании реакции иммунопреципитации в растворе основан *метод кольцепреципитации*, являющийся простейшим вариантом метода иммунодиффузии. Техника кольцепреципитации заключается в том, что на антисыворотку, помещенную в узкую пробирку, наслаивают раствор антигена (рис. 6.8). Диффундирующие антитела и антигены в случае их сродства на границе растворов образуют осадок в виде кольца (точнее, в виде шайбы). При использовании нормальной сыворотки (контроль без антител) образование осадка не наблюдается. Иммунопреципитация происходит только в так называемой эквивалентной области, избыток Аг или Ат приводит к образованию малых растворимых комплексов. Обязательным условием постановки реакции преципитации в жидкой среде является максимальная прозрачность иммунореагентов.

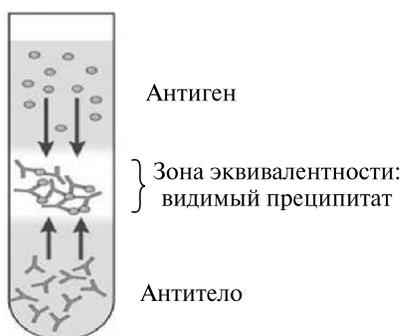


Рис 6.8. Кольцепреципитация в растворе

Метод кольцепреципитации используют в ветеринарной практике для обнаружения возбудителя сибирской язвы, в клинической медицине – при диагностике заболеваний бактериальной, вирусной и грибковой природы: сибирской язвы, чумы, туляремии и т. д., в судебно-медицинской практике – для определения видовой принадлежности белков: крови, слюны и т. д., а также для выявления примесей в мясных, рыбных и мучных изделиях.

Развитие техники иммунодиффузии стало возможным благодаря использованию гелевых носителей. В 1946 г. Ж. Уден (J. Oudin) описал метод простой линейной иммунодиффузии в геле. Молекулы антител имеют большую молярную массу ( $IgG - 1,5 \cdot 10^5$ ,  $IgM - 10^6$  г/моль), поэтому их коэффициент диффузии

очень мал, вследствие чего иммунодиффузия занимает много времени (от 16 до 48 ч). Для стабилизации водной фазы на такой срок используются крупнопористые гелевые матрицы, которые не препятствуют движению макромолекул, но предотвращают неспецифическое перемешивание Ат и Аг или их равномерное распределение. На практике для иммунопреципитации в качестве гелей обычно используют 0,5–2 % агар или агарозу. Желатин, ацетатцеллюлоз и акриламид также пригодны для этих целей.

Техника ИД в геле базируется на принципе, что макромолекулы (антитело или антиген) свободно диффундируют в водную фазу в крупнопористом геле (размер пор — 3–6 нм), пока в зоне эквивалентности антитела и антигена не образуется высокомолекулярный нерастворимый иммунокомплекс, который задерживается в геле и проявляется в виде линий преципитата. Его количество можно оценить визуально или визуализировать посредством окрашивания (например, кумасси). Содержание белка в иммунопреципитате после тщательного промывания охлажденным физиологическим раствором определяют по содержанию в образце общего азота или катим-либо колориметрическим методом.

Имунодиффузия позволяет определить относительную концентрацию Ат (Аг), специфичность антител, получить информацию об идентичности или различиях антигенов (сравнить антигены), выявить перекрестные реакции, установить относительную чистоту препарата антигена и число антигенных детерминант на молекуле антигена. К преимуществам этой техники следует отнести высокую чувствительность метода, воспроизводимость теста с минимальными объемами реагентов. Для одного исследования необходимо всего 10–20 мкл сыворотки.

Различают простую и двойную иммунодиффузии, каждая из которых может быть одно- или двумерной. При постановке метода простой диффузии один из двух реагентов включают в гель (обычно в гель замешивают специфические антисыворотки), в то время как другой реагент диффундирует в нем. При двойной диффузии оба компонента реакции — и антиген, и антитело — диффундируют в геле.

*Простая иммунодиффузия* заключается в том, что антиген диффундирует в гель, в котором гомогенно распределены антитела. Простая ИД может проводиться или в пробирках — одномерная техника Ж. Удена, или на пластинах — двумерная или радиальная техника Дж. Манчини (рис. 6.9).

Техника *простой одномерной ИД* состоит в том, что сначала стеклянные пробирки заполняют жидким гелем — агаром, содержащим антисыворотку (см. рис. 6.9). После застывания геля раствор антигена наслаивают на гель (нисходящая ИД) или же нижний, открытый, конец пробирки с гелем погружают в раствор антигена так, что антигены проникают в столбик геля снизу (восходящая ИД). В результате взаимодействия антитела с антигеном в зоне эквивалентности образуется линия (или несколько линий) преципитата, расстояние которой от линии старта (поверхность геля) можно измерить и с помощью калибровочной кривой оценить концентрацию антигена. Период, в который проявляются линии преципитата, зависит главным образом от концентрации антител и их аффинности. Линии могут быть отчетливо видны уже через несколько часов, а при определенных условиях — через один или более дней.

Если в системе присутствуют различные по сродству антигены и антитела, то образуется несколько линий иммунопреципитата. Каждая система «антиген — антитело» образует свою полосу. Локализация линий преципитата зависит от concentra-

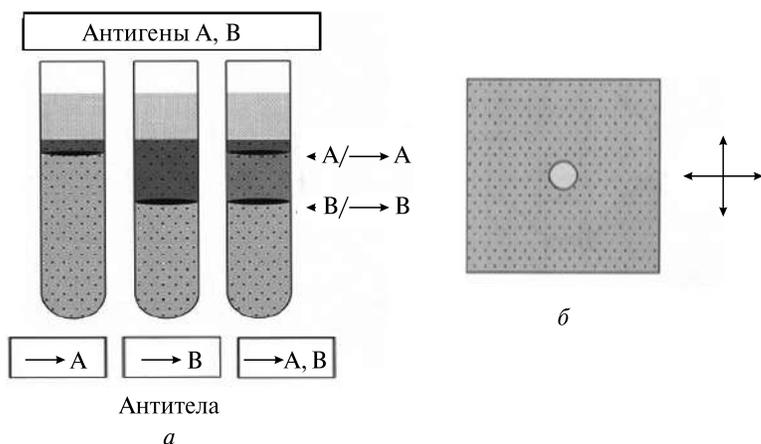


Рис. 6.9. Простая иммунодиффузия:

а – одномерная (→ А, → В, → А, В – антисыворотка, содержащая антитела А, В или их смесь соответственно); б – двумерная

ции, размера молекул и других физико-химических параметров реагентов. Длина пробега полосы преципитации при прочих равных условиях пропорциональна концентрации антигенов. Линии преципитата находятся ближе к тому реагенту, концентрация которого в системе ниже при прочих равных условиях. Метод обычно применяется для определения концентрации иммуноглобулинов. Простая линейная диффузия по Ж. Удену внесла существенный вклад в исследование теоретических основ иммунодиффузии. Впоследствии этот метод был вытеснен более совершенными.

В 1963–1965 гг. Дж. Манчини с соавторами, а позже Д. Л. Фэй и Э. М. Мак-Келви разработали методику *простой двумерной* (радиальной) иммунодиффузии в агаровом геле для количественного определения содержания в крови иммуноглобулинов классов А, G и М. Техника простой двумерной ИД состоит в следующем. На первом этапе тонкий слой геля, содержащего антитела, помещают в чашку Петри или на специальную пластину и с помощью штампа вырезают лунки. Далее в эти лунки помещают раствор антигена, который диффундирует в гель (рис. 6.10). Миграция антигена в геле продолжается до зоны эквивалентности, тогда вокруг лунок образуются кольца нерастворимого иммунокомплекса, диаметр которых пропорционален концентрации антигена. Диаметр кольца зависит от концентрации антигена и может служить количественным показателем реакции. Чем выше концентрация

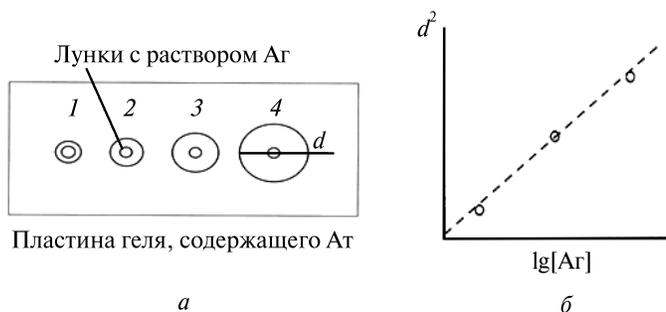


Рис. 6.10. Простая двумерная иммунодиффузия (а) и калибровочная кривая (б)

исследуемого антигена, тем больше диаметр колец. Используя стандартный антиген, можно построить калибровочную кривую и определить концентрацию антигена в пробе.

Для построения графика берут логарифм концентрации антигена и как функцию от него — площадь преципитата, квадрат диаметра зоны преципитации или логарифм ее диаметра. Во всех случаях зависимость носит линейный характер. Снижая уровень антисыворотки в геле, можно последовательно увеличивать диаметр зоны преципитации. Ошибка метода составляет 3–10 %. В пределах своей чувствительности простая радиальная ИД пригодна для определения любых антигенов при условии, что имеются соответствующая моноспецифическая антисыворотка и стандартные антигены для калибровки системы. Обычно данный метод используют для определения белков в биологических жидкостях, таких как сыворотка крови, цереброспинальная жидкость, секреты желез или экстракты различных органов и т. д. Простая радиальная ИД обладает высокой чувствительностью, поскольку позволяет обнаружить антигены с концентрацией до 20 мг/л. Простую радиальную ИД можно выполнять при температуре 4, 20 или 37 °С, ее обычно проводят в холодильнике при 4–6 °С в целях предупреждения роста грибов и бактерий.

В 1948 г. О. Оухтерлони (O. Ouchterlony) в Швеции и независимо от него С. Элек (S. Elek) в Англии опубликовали разработанную ими методику двойной, или встречной, иммунодиффузии, т. е. диффузии антител и антигенов навстречу друг другу в геле.

Одномерную двойную иммунодиффузию в агаре, которую в 1953 г. описали К. Окли (C. L. Oakley) и А. Фулторп (A. J. Fulthorpe), проводят в пробирках. В отличие от метода Ж. Удена в данной технике как антиген, так и антисыворотка диффундируют в слой геля; при избытке антигена линия иммунопреципитата расположена ближе к антисыворотке, и наоборот.

Двойную радиальную ИД (по О. Оухтерлони) используют чаще. Техника метода заключается в следующем (рис. 6.11):

1) в тонком слое геля (0,5–2 % раствор агара без дополнительных включений), помещенном на пластине или в чашке Петри, на противоположных сторонах поверхности вырезают лунки;

2) в лунки вносят растворы антигена и антител;

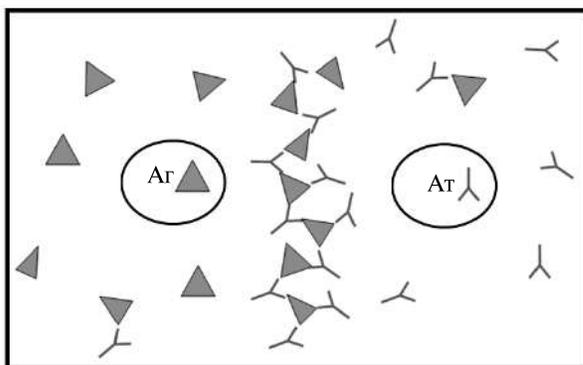


Рис. 6.11. Двойная радиальная диффузия

3) антиген и антитела диффундируют радиально, встречаясь друг с другом; они начинают образовывать иммунные комплексы, которые осаждаются в порах геля и становятся видимыми в виде линий.

Расположение линий зависит от концентрации обоих компонентов и их коэффициентов диффузии. После внесения растворов иммунодиффузию проводят во влажной камере при температуре 4, 20 или 37 °С. Продолжительность диффузии зависит от целей исследования, она должна быть не менее 24 ч и в некоторых случаях может достигать шести-семи дней. Более продолжительная инкубация не приводит к изменениям преципитатов. По окончании иммунодиффузии ее результаты можно оценить сразу непосредственно по влажному препарату. В другом варианте пластины геля высушивают при 25 или 40–50 °С, предварительно отмыв невыпавшие в осадок компоненты (пластины замачивают в 0,15 М растворе NaCl). Далее высушенные пластины геля окрашивают красителем (обычно амидочерным 10 В), после чего оценивают результаты иммунодиффузии.

При оптимальном соотношении между антигенами и антителами после окончания диффузии прямая линия иммунопреципитации располагается примерно по середине между стартовыми лунками (рис. 6.12). Если один из компонентов реакции присутствует в большем количестве, чем другой, то линия преципитации сдвигается в сторону лунки с меньшим содержанием реагента. Высокая концентрация одного из иммунореагентов обуславливает его большую скорость диффузии.

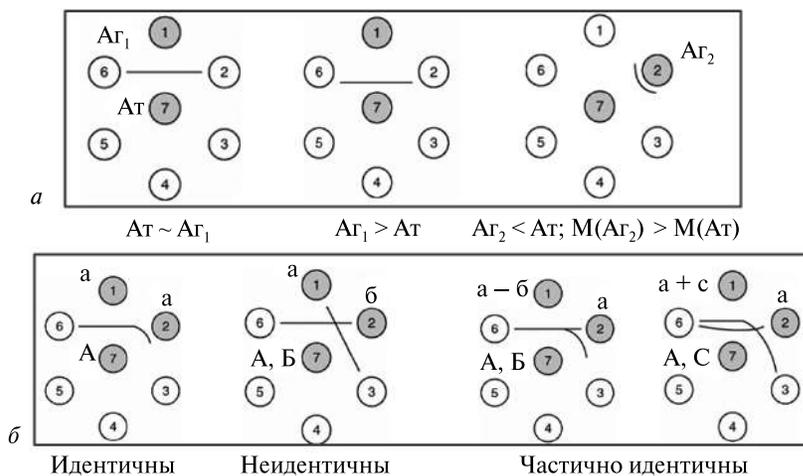


Рис. 6.12. Двойная радиальная иммунодиффузия:  
*a* – оценка количественного соотношения Ag и At; *б* – сравнение степени идентичности антигенов (лунки 1, 2 содержат Ag; лунка 7 – антисыворотку)

Относительная концентрация реагентов в месте первичного выпадения иммунопреципитата может измениться, например, из-за дополнительного поступления одного из них. Это приводит к смещению линии преципитации. Но часть иммунных агрегатов, особенно на стороне избытка антител, остается в прежнем положении. Их можно обнаружить в виде вуали или отдельной зоны преципитации. Возможность возникновения таких процессов обуславливает необходимость ежедневных проверок пластин геля при длительно протекающей иммунодиффузии.

В комплексных системах «антиген – антитело» отдельные компоненты реакции диффундируют с различной скоростью, обусловленной неодинаковым размером молекул и их концентрацией. В связи с этим могут образовываться множественные пространственно разделенные иммунопреципитаты, т. е. создаваться возможность анализа многокомпонентных систем.

По форме и расположению иммунопреципитатов можно судить о диффузионных свойствах и, следовательно, об относительной молекулярной массе антигена или антитела. Линии преципитации вогнуты в сторону реагента с большей молекулярной массой (см. рис. 6.12). Порядок расположения линий по отношению друг к другу позволяет делать выводы о полном или частичном иммунохимическом сходстве, а также об отсутствии такового. Исходя из величины ареала и удаленности от линии старта иммунокомплексов можно проводить их количественное определение.

Особое преимущество метода двойной радиальной ИД состоит в возможности определения степени идентичности компонентов реакции по взаимному расположению линий преципитата (сравнительный анализ). Для выявления полной или частичной идентичности обычно располагают лунки на геле в углах треугольника, в два угла помещают растворы сравниваемых антигенов, в третий – антисыворотку. Принципиально возможны четыре варианта расположения линий преципитации (см. рис. 6.12).

1. Обе линии преципитации полностью плавно сливаются. Это свидетельствует об идентичности обоих антигенов (т. е. они оба имеют идентичные эпитопы «а»).

2. Линии преципитации пересекаются. Это значит, что реагирующие с антисывороткой детерминанты антигенов неидентичны и, следовательно, сами антигены различны (т. е. один антиген содержит эпитоп «а», а другой – «б»).

3. Линия преципитации от второй лунки с антигенами сливается с первой линией, однако одна линия длиннее, продолжается и заходит за другую в виде так называемой шпоры. Шпора часто бывает тоньше основной линии. Это означает, что оба антигена обладают некоторыми общими детерминантами (эпитопы «а») и образуют с соответствующими антителами иммунные комплексы, приводящие к слиянию линий. Кроме того, один из антигенов имеет больше детерминант (помимо эпитопа «а» еще и «б»), чем другой, что при наличии соответствующих антител в антисыворотке приводит к образованию шпоры, которая направлена к лунке, не содержащей дополнительный антиген. Часто говорят, что один антиген «пришпоривает» другой.

4. Линии преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это означает, что в обеих лунках имеются как идентичные (антигены с эпитопами «а»), (см. рис. 6.12), так и различные антигены (антиген с эпитопом «с»).

Двойную радиальную ИД часто используют для полуколичественного определения антигена (титрования). Вокруг центральной лунки с антисывороткой формируют четыре лунки для антигена. Чем выше концентрация антигена, тем ближе к центральной лунке будут расположены полосы преципитации. Путем сравнения со стандартным раствором антигена можно определить неизвестную концентрацию антигена в исследуемой пробе.

Двойную радиальную ИД применяют для определения количества антигена в жидкостях (сыворотка крови, цереброспинальная жидкость, экстракты тканей), проверки чистоты препаратов, при получении антисывороток животных и оцен-

ке эффективности иммунизации. Титрование и полуколичественное определение антигенов расширяет возможности применения данного метода. Определение отдельных антигенов в многокомпонентных растворах требует применения моноспецифических антисывороток. Метод двойной радиальной ИД можно использовать также для анализа труднорастворимых субстанций, таких как фибриллярные белки (кератин, прокератин), с условием предварительной их солюбилизации с помощью детергентов или хаотропных агентов (гуанидинхлорид, мочеви́на). После солюбилизации эти вещества продолжают реагировать с соответствующими антителами в геле агарозы.

Для проведения ИД лучше подходят мультивалентные антисыворотки и мультивалентные антигены. Для осаждения с моноклональными антителами антигены должны иметь несколько идентичных эпитопов так, чтобы моноклональное антитело могло связаться с ними двумя паратопами.

Для проведения ИД требуются относительно высокие концентрации Ат и Аг, чтобы в геле образовался осадок с достаточной плотностью, к тому же нужно использовать Ат с очень высокой аффинностью. В связи с указанными недостатками ИД она вытесняется более чувствительными методами, например иммуноблотом, иммуноферментным анализом.

### 6.5.2. Иммуноагглютинация

Иммуноагглютинация (лат. *agglutinatio* — склеивание) охватывает методы, базирующиеся на способности антител (агглютинины) агрегировать (агглютинировать) корпускулярные антигены (агглютиногены). При взаимодействии в водной среде растворенных антител с гомологичными антигенами, находящимися на поверхности больших легкооседающихся частиц (клетки, бактерии, макромолекулярные агрегаты, искусственные латексные частицы), антитела поперечно сшивают частицы с образованием видимых агрегатов (склеенные комочки, агглютинат). Механизм реакции агглютинации описывает теория «решетки», согласно которой двухвалентное Ат взаимодействует одним паратопом с детерминантой одной молекулы Аг, а другим — с детерминантой второй молекулы Аг, в результате такого взаимодействия образуются агглютинаты.

Реакция агглютинации (РА) по принципу схожа с реакцией иммунопреципитации. Основное различие между реакциями заключается в форме антигена: в первом случае это корпускулярная частица, во втором — растворенные молекулы. При образовании агглютината имеет значение количественное соотношение антигена и антител (феномен оптимума). РА наблюдается при оптимальном соотношении антител и корпускулярных антигенов (зона агглютинации), при избытке (низкий титр, 1 : 4) или недостатке (высокий титр, 1 : 32) антител агглютинация не наблюдается (прозона). РА протекает в присутствии электролитов (например, при добавлении 0,15 М раствора NaCl).

Методы агглютинации более чувствительны, чем методы, основанные на иммунопреципитации, поскольку при равной концентрации антигена объем агглютината больше объема иммунопреципитата. В зависимости от степени проявления агглютинация может быть оценена визуально или с помощью микроскопа.

РА используется в клинической диагностике для определения группы крови, а также выявления инфекций: по заведомо известному антигену определяют нали-

чие антител в сыворотке больного или по известной сыворотке, содержащей антитела к определяемому микроорганизму, устанавливают его вид. Эта реакция позволяет обнаруживать антитела в сыворотке крови при аллергических состояниях.

РА может быть прямой (определение антител в сыворотке) или непрямой (определение антигенов с помощью диагностической антисыворотки), а также развернутой или ориентировочной. Развернутую прямую агглютинацию выполняют, пользуясь пробирками, в которые вносят последовательные разведения диагностической сыворотки и одинаковые количества стандартного антигена. После добавления стандартного антигена пробирки встряхивают и выдерживают при 37° С от 2–4 до 16–18 ч (в зависимости от вида исследуемой сыворотки), а затем при комнатной температуре – 18–24 ч. В качестве контроля используют заведомо положительную сыворотку с антигеном, нормальную сыворотку (не содержит антител) с антигеном, антиген в физиологическом растворе. Для положительной сыворотки должна наблюдаться хорошо выраженная агглютинация, а антиген в нормальной сыворотке и в физиологическом растворе не должен давать спонтанной агглютинации. Реакцию агглютинации оценивают по степени просветления жидкости и характеру образования осадка в «плюсах». Полное просветление жидкости и образование агглютината на дне пробирки в виде зонтика оценивают как РА<sup>++++</sup>, при встряхивании зонтик разбивается на хлопья; при РА<sup>+++</sup> жидкость слегка опалесцирует; при РА<sup>++</sup> жидкость мутноватая, осадок незначительный; при отрицательной РА жидкость мутная, осадка не наблюдается или он собирается в виде таблетки на дне и разбивается в равномерную муть.

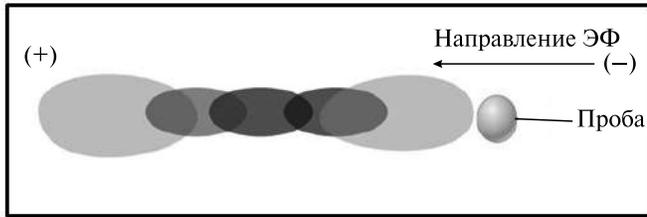
### 6.5.3. Иммуноэлектрофорез

На практике в исследуемой пробе часто содержится комплексная смесь антигенов. Это ведет к тому, что при анализе такой пробы с помощью простой иммунодиффузии образуется много линий иммунопреципитации или они расположены близко друг к другу. Для решения такой проблемы может быть использован иммуноэлектрофорез (ИЭФ), объединяющий электрофоретическое разделение (высокое разрешение) и иммунометрическое детектирование (высокая специфичность). В своей классической форме иммуноэлектрофорез представляет сочетание зонного электрофореза в геле (агаровом или агарозном) и двойной иммунодиффузии в той же среде. Впервые такое сочетание описали П. Грабар (P. Grabar) и К. Уильямс (C. Williams) в 1953 г. ИЭФ применяют при проведении качественного и полуколичественного анализа смесей препаратов, содержащих белки, при контроле за очисткой антигенов и антисывороток, для диагностического исследования сывороток.

На первом этапе ИЭФ антигены (обычно исследуют сывороточные белки) сначала разделяют на гелевой пластине по их электрофоретической подвижности (в соответствии с величиной заряда) (рис. 6.13). Например, при заданном рН в геле альбумины сыворотки мигрируют к аноду, а глобулины – к катоду.

На втором этапе, после завершения электрофореза, в геле параллельно оси электрофореза (т. е. направлению миграции антигенов) с помощью специального штампа вырезают продольную канавку, в которую вносят антисыворотку, специфическую по отношению к анализируемым антигенам. Объем вносимой в канавку антисыворотки составляет обычно 50–70 мкл. Пластинку помещают в горизонтальном положении во влажную камеру и выдерживают при постоянной температуре. Антигены

1 этап: ЭФ



2 этап: ИД

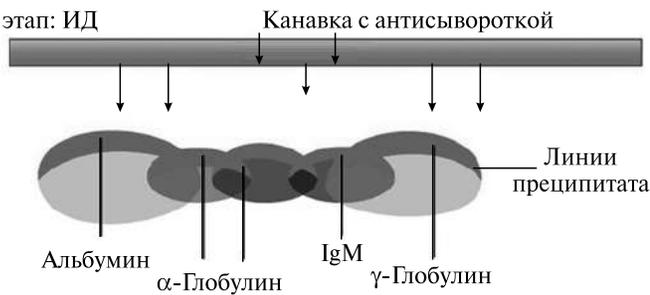


Рис. 6.13. Иммуноэлектрофорез сыворотки крови (классический вариант)

и антитела диффундируют перпендикулярно направлению электрофореза через матрицу. В области геля, где существуют эквивалентные количества Аг и Ат, появляются линии иммунопреципитата разной степени интенсивности соответственно числу комплексов «антиген – антитело». Локализация линий зависит от электрофоретической подвижности компонентов реакции.

При обычном ИЭФ иммунодиффузию осуществляют так, как если бы это была двойная ИД из расположенных под прямым углом канавок или из круглых лунок и канавок. Однако разделенные при электрофорезе зоны не имеют четко очерченной формы, и вещества в них распределены неравномерно. Поэтому линии иммунопреципитации на иммуноэлектрофореграмме представляют собой более или менее удлиненные симметричные или асимметричные дуги. Удлинение дуг наблюдается, в частности, в тех случаях, когда в анализируемом образце содержатся вещества, обладающие одинаковой антигенной активностью, но разной электрофоретической подвижностью (наиболее известным примером подобных антигенов являются нормальные иммуноглобулины). Если антиген удерживается гелем (как в случае микроглобулинов или липопротеионов низкой плотности), то образуются линии преципитации неправильной формы.

После завершения иммунодиффузии иммуноэлектрофореграмму можно сразу же сфотографировать без всякой обработки геля, причем лучше в рассеянном свете (при темнопольном освещении). Кроме того, линии преципитации можно окрасить каким-либо красителем (например, кумасси). Перед окрашиванием непрореагировавшие белки необходимо отмыть солевым раствором. Для этого пластины геля вымачивают в течение 24–48 ч в солевом растворе, который несколько раз меняют. В последний раз гель промывают дистиллированной водой. Линии преципитации можно окрашивать любым красителем, применяемым для окрашивания белков после электрофореза в агарозном геле.

Картина иммунопреципитации, получаемая при ИЭФ, сильно зависит от свойств иммунной сыворотки. Для каждого компонента смеси антигенов существует определенный диапазон концентраций, в котором получают хорошо сформированные четкие линии преципитации (зона эквивалентности). В многокомпонентных смесях концентрация отдельных антигенов может различаться в широких пределах. Концентрация (титр) антител в иммунной сыворотке также варьируется в значительной степени. Поэтому возможна ситуация, когда не будет достигнута зона эквивалентности для отдельных компонентов смеси. В связи с этим ИЭФ многокомпонентных смесей рекомендуется проводить при нескольких относительных концентрациях антиген/антитело, так как при использовании только одной концентрации можно не обнаружить какие-то компоненты.

ИЭФ имеет более низкую чувствительность, чем двойная иммунодиффузия, поскольку в процессе электрофореза происходит разбавление антигенов вследствие расширения разделенных зон.

Результаты ИЭФ зависят от факторов, действующих как во время электрофореза, так и на этапе иммунодиффузии. Повышение разрешающей способности электрофореза приводит к улучшению разделения полос преципитации. На иммунодиффузию влияют специфичность, титр и сродство используемой антисыворотки, концентрация антигенов, а также геометрическое расположение в геле лунок для антигенов и канавок для антител.

Существуют различные модификации метода ИЭФ, к которым относятся перекрестный (двумерный), ракетный и встречный ИЭФ.

**Ракетный иммуноэлектрофорез (электроиммунодиффузия).** Это простой, быстрый и воспроизводимый метод для определения концентрации антигена в исследуемом образце. Данный метод позволяет сравнить пробы с неизвестной концентрацией антигенов с серией растворов антигенов известной концентрации. Суть метода заключается в том, что антигены в процессе электрофореза мигрируют в гель, содержащий антитела, в результате чего происходит реакция преципитации.

Предварительно в гель вводятся антитела, специфические по отношению к искомым антигенам. Величина pH геля составляет 8,6 ед., что близко к значениям изоэлектрических точек большинства иммуноглобулинов, поэтому антитела не движутся в электрическом поле. Как правило, работают с самым большим разведением антисыворотки, при котором еще возможно образование видимого преципитата. Разведение антигена должно быть подобрано соответствующим образом. Если исследуют антигены с молекулярной массой более 200 кДа, то особенно важно разбавлять реагенты до такой степени, чтобы происходила лишь слабая иммунопреципитация. В обратном случае крупные комплексы таких антигенов с антителами могут забивать поры в геле, что приведет к образованию полос неправильной формы.

Пробу с исследуемым антигеном вносят в приготовленную лунку и подвергают электрофоретическому разделению. Во время электрофореза антигены, имеющие, как правило, отрицательный заряд, под действием электрического поля движутся к аноду в соответствии со своей электрофоретической подвижностью. На начальной стадии, когда антигены присутствуют в избытке в сравнении с антителами, видимого иммунопреципитата не образуется. Далее на участке геля, где достигаются эквивалентные количества антитела и антигена, возникают линии преципитации, имеющие форму пиков или ракет. Передний край преципитата перемещается с по-

степенно уменьшающейся скоростью по направлению к электроду до тех пор, пока мигрирующий антиген не перестанет поступать в избытке. Чем больше концентрация антигена, тем дальше антиген движется в Ат-легированной матрице. Высота пика преципитации или площадь под пиком пропорциональна количеству внесенного антигена и обратно пропорциональна концентрации антител в геле. Для получения калибровочной кривой на гель наносят растворы стандартных антигенов с известной концентрацией (рис. 6.14).

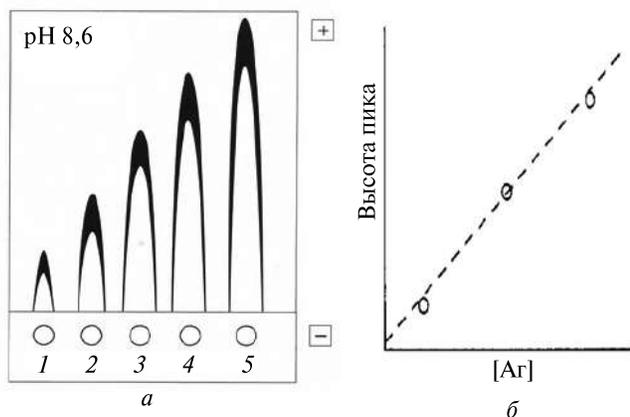


Рис. 6.14. Ракетный иммуноэлектрофорез:

*a* – пластинка геля после электрофоретического разделения антигенов с линиями преципитации в зоне эквивалентности Ат : Аг; *б* – калибровочная кривая

Точность метода зависит от того, насколько близки между собой размеры молекул и величина зарядов исследуемых и стандартных антигенов. Воспроизводимость количественных определений наиболее высока в том случае, когда образуются симметричные пики преципитации с отчетливыми внутренними и внешними границами. Стандартная ошибка может при этом составлять 2–5 %, несколько превышая ошибку, которую дает простая радиальная иммунодиффузия при оптимальных условиях. Данный метод более чувствителен (выявляет до 10 мг/л антигена) и менее продолжителен, чем техника Манчини.

**Перекрестный иммуноэлектрофорез.** Представляет собой сочетание двумерного электрофореза и двойной иммунодиффузии. Данный метод впервые был описан в 1960 г. Н. Ресслером, но впоследствии были предложены различные улучшенные его модификации (С. Лорелл, М. Кларк, Т. Фриман и др.). После проведения электрофореза в первом направлении полученную электрофореграмму разрезают по длине и каждую полоску с разделенными компонентами помещают в канавку соответствующего размера, вырезанную в геле (рН 8,6), содержащем антисыворотку. Далее вновь воспроизводят технику электрофореза, но в направлении, перпендикулярном первому процессу. Антигены, разделенные в первом направлении, образуют линии иммунопреципитации во втором. Площадь пика пропорциональна концентрации антигена. Анализ результатов аналогичен оценке ракетного иммуноэлектрофореза.

Принцип *встречного иммуноэлектрофореза* заключается в том, что антигены и антитела под действием электрического поля одновременно мигрируют в геле

навстречу друг другу. Суть метода заключается в следующем: исследуемые антигены и смесь антител помещают в лунки, расположенные на противоположных концах гелевой пластины; вдоль линии, соединяющей лунки, пропускают постоянный электрический ток; в электрическом поле антитела и антигены быстро перемещаются по направлению друг к другу; в области связывания антигенов с антителами образуются линии преципитации. Встречный электрофорез применяют в тех случаях, когда антигены и антитела обладают разной электрофоретической подвижностью. Наряду с высокой чувствительностью метод не требует значительных затрат времени (получить результаты можно через 0,5–2 ч). Этот метод, позволяющий быстро определить антигены или антитела в исследуемой пробе, применяется в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний.

**Электрофорез с иммунофиксацией.** Иммунофиксация – комбинированный метод, объединяющий электрофоретическое разделение белков с последующей иммунопреципитацией, т. е. детектирование белков (антигенов) происходит посредством специфических антител. По сути, с помощью антисыворотки происходит фиксация в геле электрофоретически разделенных белков. В классическом ЭФ фиксацию белков в геле осуществляют осаждением с помощью ТХУ. При связывании белков с антителами образуются иммунные комплексы, которые можно обнаружить невооруженным глазом либо выявить с помощью окрашивания специфическими реагентами. Кроме того, для фиксации можно использовать антитела, маркированные флуорофорами, ферментами или радиоизотопами, при этом сигнал метки будет пропорционален количеству иммунокомплекса.

Процесс иммунофиксации состоит из четырех этапов: зонный электрофорез белков сыворотки на агарозном геле (белки разделяются на зоны); иммунофиксация разделенных белков (каждая полоса белков на геле обрабатывается специфическими антисыворотками, антитела диффундируют в гель и при взаимодействии с эквивалентным количеством соответствующего белка образуют иммунопреципитат); отмывание всех белков, которые не подверглись осаждению; окрашивание преципитатов. Иммунофиксация – такой же простой и экономичный метод, как иммуноэлектрофорез, однако позволяет получить больше информации. Иммунофиксацию используют для определения моноклональных или олигоклональных иммуноглобулинов. Метод находит широкое применение в судебной медицине и генетических исследованиях.

**Иммуноблоттинг.** Данный метод (вестерн-блоттинг, блот-гибридизация) используют для анализа индивидуальных белков (антигенов) в сложных смесях, например клеточных лизатах. Анализируемая смесь белков разделяется на отдельные зоны с помощью гель-электрофореза (зонного, СДС-ПААГ-ЭФ, ИЭФ, двумерного) в соответствии с их зарядом, размером и формой. Разделенные белки переносят на несущую мембрану (нитроцеллюлозную, нейлоновую, ПВДФ) электрофоретически (электроблоттинг). При адгезии белков на мембране сохраняется то же их расположение, которое было в геле. Белки на полученном блоте идентифицируют с помощью специфических антител (гибридизация с зондом – антителом). Существенное преимущество метода заключается в том, что искомые молекулы концентрируются на поверхности мембраны и поэтому легко определяются. Для иммуноблоттинга обязательно использовать высокоаффинные Ат, так как высокая концентрация Ат на мембране облегчает связывание. Чтобы предотвратить связывание антител с мем-

браной, необходимо заблокировать все незанятые белками места на мембране. Это достигается с помощью иррелевантных (не имеющих значения) белков (например, бычий сывороточный альбумин) перед определением разделенных белков (антигенов) антителами. Мембрана несколько часов инкубируется с раствором блокирующего белка. Чем эффективнее блокировка, тем меньше помех возникает при определении (отношение  $S/N$  низкое).

Критическим пунктом иммуноблота является также денатурация анализируемых белков, в результате которой возможно повреждение мест связывания с антителами. Однако поликлональные антисыворотки содержат антитела, способные связываться и с денатурированными эпитопами. Моноклональные антитела взаимодействуют только с устойчивыми к денатурации эпитопами антигена.

В отдельных случаях распознающие антигенспецифические антитела могут быть маркированы, например, флуорофором или ферментом. В результате образование иммунокомплекса детектируется по сигналу метки. При этом первичные антитела маркируются редко. Как правило, для определения образовавшегося комплекса первичного антитела с антигеном используют вторичные меченые антитела (непрямое детектирование). При этом ценные первичные Ат могут без потерь применяться по назначению. Кроме того, меченые вторичные Ат могут сочетаться с большим количеством первичных Ат одинаковых частиц. Так, для различных видов мышинных моноклональных антител нужен только один вид маркированного антимишиного вторичного антитела, что существенно удешевляет процедуру анализа.

Иммуноблоттинг – относительно чувствительный метод. В большинстве случаев граница обнаружения лежит в пределах около 20 фемтомолей. Это значит, что может быть обнаружено два нанограмма протеина с массой 100 кДа. Лимитирующим фактором для обнаружения антигена является преимущественно эффективность выбранной техники электрофореза. Если концентрация искомого антигена в пробе очень низкая, то предварительно получаемый экстракт из пробы может быть очищен хроматографически.

#### **6.5.4. Иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия**

При смешивании раствора антигена с раствором соответствующего антитела образуются малые агрегаты (иммунопреципитаты), что приводит к возникновению мутного раствора. Образование иммунного комплекса оценивают визуально либо инструментально. Иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия позволяют оценить концентрацию антигенов по изменению мутности раствора при реакции «антиген – антитело».

Турбидиметрия является методом анализа мутных сред, основанным на измерении изменения (ослабления) интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Концентрацию анализируемого вещества в турбидиметрии определяют по градуировочным графикам в координатах  $\lg(I_0/I) - C$  (более детально принцип метода изложен в гл. 5).

Нефелометрия базируется на упругом рассеянии света (равенство частот падающего и рассеянного света) твердыми частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии (суспензия коллоидных частиц). Для этого измеряют

интенсивность рассеянного света ( $I_p$ ) как функцию концентрации светорассеивающих частиц. Концентрацию анализируемого вещества в нефелометрии определяют по градуировочным графикам в координатах  $I_p - C$ .

Измерения в иммунонефелометрии или иммунотурбидиметрии проводят либо кинетическим методом (скорость образования мутности равна скорости образования осадка, что прямо пропорционально концентрации антигена), либо по методу конечной точки (мутность измеряют через фиксированный интервал времени, когда достигнуто равновесное состояние системы).

Применение методов, основанных на измерении рассеяния света, достаточно ограничено, и прежде всего потому, что на измеряемый сигнал сильно влияет размер частиц. Поэтому необходимо строгое соблюдение идентичности условий построения градуировочного графика и анализа исследуемого раствора. Калибровочная кривая строится для каждого индивидуального антигена и измерительного прибора, при любом изменении условий регистрации или периодически по мере проведения исследований. Для построения графика обычно требуется 3–5 стандартных растворов антигена.

Поскольку зависимость концентрации антигена от интенсивности измеряемого сигнала определяется кривой Гейдельбергера – Кендалла (кривая иммунопреципитации), то большое значение имеет наличие оптимального отношения количеств антител и антигенов в реакционной смеси. Для иммунотурбидиметрических и иммунонефелометрических измерений необходимо, чтобы они проводились в зоне избытка антител. Только восходящий участок кривой «доза – эффект», обозначаемой как зона избытка антител, используется в качестве калибровочного графика. Иногда при очень высокой концентрации антигена в определяемой биологической пробе для образования иммунокомплекса бывает недостаточно антител, частицы иммунопреципитата становятся мелкими, и область определения попадает в нисходящую часть кривой иммунопреципитации. При этом, несмотря на увеличение концентрации антигена, интенсивность измеряемого сигнала уменьшается, что приводит к искажению результата (англ. the hook effect – эффект прозоны). Чтобы этого избежать, следует развести образец. Если интенсивность измеряемого сигнала увеличивается, это свидетельствует, что предыдущее определение проводилось в нисходящей части кривой и допущена ошибка. Разведение проводят до такой концентрации антигена, чтобы она располагалась в зоне избытка антител (восходящий отрезок калибровочного графика). Полученный при конечном разведении результат умножают на степень разведения.

Многие современные приборы (турбидиметры и нефелометры) способны определять и отслеживать избыток антигенов автоматически (функция проверки прозоны). Методика основана на регистрации ускорения реакции после добавления дополнительного количества антигена, в качестве которого служит стандартное вещество. Если после дополнительного внесения в реакционную среду антигена реакция ускоряется, то, следовательно, она протекает с избытком антител и измерение проводится верно – на восходящем отрезке кривой «доза – эффект». Если же дополнительное добавление антигена не приводит к ускорению иммунопреципитации, то измерение проводится при избытке антигена на нисходящем отрезке кривой «доза – эффект».

Чувствительность нефелометрии и турбидиметрии может быть увеличена путем иммобилизации антитела или антигена на латексных частицах, которые за счет формирования нерастворимого иммунокомплекса значительно увеличивают светорассеяние проходящего через образец света.

С точки зрения чувствительности метода, в частности при определении концентрации иммуноглобулинов, сравнение нефелометрии и турбидиметрии оказывается в пользу нефелометрии. В мутных средах количество рассеянного света больше, чем проходящего, поэтому нефелометрия обладает большей чувствительностью. Небольшое количество взвешенных частиц приводит к заметному возрастанию интенсивности сигнала при незначительном фоне. Нефелометрия подходит больше для анализа образцов, содержащих низкую концентрацию преципитирующих частиц, т. е. с низкой мутностью.

Использование турбидиметрии является предпочтительным при анализе проб, содержащих высокую концентрацию рассеивающих частиц, т. е. относительно мутных растворов. Если раствор содержит небольшую концентрацию рассеивающих частиц, то интенсивность излучения, прошедшего через слой исследуемого раствора, слабо отличается от интенсивности падающего потока световой энергии. В результате трудно определить небольшую разницу между двумя сигналами. Преимущество турбидиметрического анализа заключается в том, что измерения могут быть выполнены практически на любом колориметре или фотометре.

Другим важным параметром при выборе между турбидиметрией и нефелометрией является размер рассеивающих частиц. Интенсивность света, рассеянного разбавленной дисперсной системой, а также угловое распределение рассеянного света зависят от соотношения длины волны света ( $\lambda$ ) и диаметра частицы. Выделяют два наиболее значимых случая упругого рассеяния света. Рэлеевское, или симметричное, рассеяние (рассеяния во всех направлениях) имеет место, когда размер частиц не превышает 0,1 от длины волны  $\lambda$  (диаметр частиц  $< \lambda/10$ ) (показатель преломления частицы приблизительно равен такому для окружающей среды). В другом случае, когда размер частиц близок к длине волны светового потока, диаграмма направленности рассеяния становится более сложной (рассеяние Ми). Частицы больших размеров рассеивают свет неравномерно: вперед по направлению потока рассеивается больше света, чем в обратном направлении.

В случае нефелометрии, когда измерения проводят под углом  $90^\circ$ , интенсивность рассеянного излучения увеличивается (если частицы малы) и наблюдается рэлеевское рассеяние. Для более крупных частиц интенсивность рассеяния на  $90^\circ$  уменьшается. К таким частицам относятся отдельные белки плазмы класса IgM, агрегированные иммунные комплексы. Некоторые нефелометры в случае рассеяния света крупными частицами позволяют производить измерения под иным углом.

Для турбидиметрии размер рассеивающих частиц менее важен, так как измеряется относительное уменьшение интенсивности падающего излучения. В действительности турбидиметрические измерения еще возможны даже тогда, когда размер рассеивающих частиц приводит к увеличению отражения и преломления падающего света, хотя линейная зависимость между сигналом и концентрацией рассеивающих частиц может уже не наблюдаться.

## 6.6. Иммунохимические методы с использованием меченых иммунореагентов

### 6.6.1. Сущность и принцип методов

В основу любого иммунного метода положена реакция взаимодействия между антигеном и антителом с образованием комплекса «антиген — антитело». Иммунохимическая реакция в растворе между антителами и антигенами протекает в две стадии, первой из которых является обратимое образование комплекса  $Ag \bullet At$  состава 1 : 1. Вследствие наличия в молекуле антител более одного центра связывания для поливалентных антигенов возможно дальнейшее многостадийное образование сложных комплексов с различным соотношением компонентов в нем. Агрегация таких комплексов приводит к образованию иммунопреципитатов (вторая стадия).

Классические методы иммунного анализа для обнаружения бактерий, вирусов или антител против них (серодиагностика) основаны на использовании второй стадии взаимодействия между антигеном и антителом, которое приводит к образованию видимого иммунопреципитата (или агглютината в случае корпускулярных антигенов), для обнаружения которого, как правило, требуются высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции. Результаты такого анализа не всегда можно однозначно интерпретировать, и в большинстве случаев они носят качественный или полуколичественный характер. Для количественной оценки следовых количеств низкомолекулярных одновалентных антигенов (гаптен-ов), к которым относится большинство биологически активных веществ (гормоны, лекарственные средства, витамины, пестициды и др.), эти методы непригодны.

Определение малых количеств иммунного комплекса ( $Ag \bullet At$ ), образовавшегося в растворе, становится возможным, если к одному из исходных компонентов реакционной системы (антиген или антитело) присоединить специальную метку — соединение, которое легко количественно определить соответствующим инструментальным методом. Антитело ( $At^*$ ) или антиген ( $Ag^*$ ), к которому присоединена метка, называется конъюгатом. Меченый гаптен (т. е. конъюгат гаптена с меткой) в англоязычной литературе часто называют трейсером (англ. tracer — индикатор). Метка, по сути, является маркером, позволяющим непосредственно обнаружить образовавшийся комплекс  $Ag \bullet At^*$  или  $Ag^* \bullet At$ .

Использование меченых реагентов иммунохимической реакции позволило создать совершенно новый методологический подход к анализу антигенов и антител. Данные методы анализа, основанные на первичной реакции образования комплекса  $Ag \bullet At$ , отличаются не только высокой специфичностью, точностью, быстротой, но и высокой чувствительностью. Предел обнаружения иммунохимическими методами может составлять  $10^{-15} - 10^{-20}$  моль/л.

Метод обнаружения меченого реагента определяется типом метки, в качестве которой могут быть использованы радионуклиды, ферменты, люминофоры, флуорофоры, магнитные частицы, наночастицы. Меченым может быть не только лиганд (антиген), но и связывающий агент (антитело), тогда такой метод носит название иммунометрического.

Иммуноанализ с использованием меченых компонентов охватывает большую группу различных методик анализа для селективного количественного определе-

ния очень малых концентраций низко- и высокомолекулярных соединений в комплексных биохимических системах. Как правило, в таких методах целевым анализом выступает антиген (гаптен), в то время как определение неизвестных антител часто является задачей клинической диагностики, поэтому в большинстве случаев необходим не точный количественный анализ, а качественное определение.

В настоящее время методы иммунохимического анализа (радиоиммунологический, иммуноферментный, иммунофлуоресцентный и др.) нашли широкое применение не только в областях медицины и биологии, но и в сфере экологии, ветеринарии, фармакологии и т. д.

Иммунохимический анализ, базирующийся на применении меченых реагентов, в англоязычной литературе часто обозначают как количественный иммуноанализ. Это объясняется тем, что методы, основанные на прямом определении иммунокомплекса, часто носят качественный или полуколичественный характер.

Методы с использованием меченых реагентов базируются только на первичном взаимодействии антигена с антителом. В этом случае один эпитоп взаимодействует с одним паратопом в соответствии с их сродством (первая стадия иммунохимического взаимодействия). Второй этап реакции с образованием сложного иммунокомплекса не происходит даже с высокомолекулярными поливалентными антигенами, так как в исследовании всегда используют большой избыток либо антитела, либо антигена. Возможность протекания второго этапа на практике учитывают при разработке нового иммунохимического метода. Поскольку комплекс между определяемым соединением (Аг) и специфическим антителом образуется строго стехиометрично, то экспериментально устанавливаемая концентрация метки, входящей в состав образующегося иммунохимического комплекса, однозначно связана с исходной концентрацией антигена. Уровень меченого иммунокомплекса пропорционален количеству целевого свободного компонента.

В настоящее время существует большое разнообразие методов, основанных на использовании меченых реагентов. *Классификация методов* иммунохимического анализа базируется на следующих критериях: по наличию стадии разделения меченого комплекса  $At^* \bullet Ag$  ( $At \bullet At^*$ ) от свободных реагентов (гомогенный или гетерогенный); по типу используемой метки (например, иммуноферментный); по типу реагентов используемых на первой стадии анализа (неконкурентные или конкурентные). Кроме того, для конкретной схемы анализа определяющим является то, какой из реагентов – антитело или антиген – использован в иммобилизованном виде для разделения иммунохимических комплексов от несвязавшихся компонентов (в случае гетерогенного анализа).

Идеальная метка для методов иммуноанализа обладает следующими свойствами: стабильность, доступная цена, наличие простой методики маркирования, которая заключается в ковалентном присоединении метки. Процесс маркирования должен оказывать минимальный эффект на свойства меченого реагента, т. е. нужно, чтобы меченые и немеченые реагенты вели себя одинаково в реакции взаимодействия антитела с антигеном (введение метки не должно влиять на аффинность). Кроме того, необходимо, чтобы метка легко определялась с помощью недорогих инструментальных методов. Наконец, в случае гомогенного анализа метка должна иметь свойства, которые позволяют дифференцировать свободные и связанные формы иммунореагента без необходимости стадии разделения.

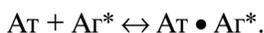
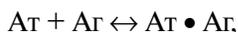
Метка может быть присоединена либо непосредственно к антителам и белковым антигенам в условиях, близких к физиологическим, либо посредством гомо- и гетеробифункциональных реагентов, которые, как правило, включают малеимидную, альдегидную, тиоцианатную ( $-S-C\equiv N$ ) или изотиоцианатную ( $-N=C=S$ ) группы. Так, малеимиды преимущественно реагируют с сульфгидрильными группами цистеиновых остатков белков (рН 6,5–7), и хотя при рН > 8 они могут взаимодействовать с первичными аминами, скорость такой реакции в 1000 раз ниже, чем реакция с  $-SH$ -группами при рН 7. Метка, содержащая первичную аминогруппу, может быть присоединена к антителам в результате серии последовательных реакций. На первой стадии проводится периодатное окисление остатков сахара в молекуле антитела. Образующиеся при этом альдегидные группы взаимодействуют с аминогруппами метки с образованием оснований Шиффа. Последние могут быть восстановлены при мягких условиях борогидридом натрия до вторичных аминов. Для очистки полученных конъюгатов используют диализ, эксклюзионную или аффинную хроматографию.

Меченые гаптены могут получаться и при более жестких условиях. Однако если в качестве метки используют ферменты, то для предотвращения денатурации белка выбирают мягкие условия. Первым критическим шагом в процессе маркировки гаптена является введение в его молекулу активной группы для последующего присоединения метки. К примеру, амино-, гидроксид- и кетогруппы гаптена могут быть трансформированы в карбоксильную, которая далее активируется различными реагентами (изобутилхлорформат, карбодиимид, N-гидроксисукцинимид) для последующего присоединения к нуклеофильным группам метки (например, первичной аминогруппе).

## 6.6.2. Гомогенные и гетерогенные иммунохимические методы

Методы иммуноанализа в зависимости от необходимости разделения связанной и несвязанной фракций меченых реагентов перед количественным определением подразделяются на гомогенные и гетерогенные. Гомогенные методы не требуют стадии разделения реагентов, в гетерогенных происходит отделение иммунного комплекса от исходных продуктов реакции.

Рассмотрим иммунохимическую реакцию, протекающую с избытком антигенов, при наличии в системе немеченых (Аг) и меченых (Аг\*) антигенов:



После установления равновесия реакционная смесь содержит Аг, Аг\*, Аг • Аг и Аг • Аг\*. Поскольку антитело было взято в относительно низких количествах в сравнении с общим количеством меченого и немеченого антигенов, то свободных антител не остается. В данном случае искомым анализом является антиген.

В случае гомогенного анализа разделение свободной и связанной фракций Аг\* не требуется, и регистрируется сигнал метки, пропорциональный концентрации анализа. Количественное определение в гомогенных методах базируется на том, что

для свободного и связанного меченого реагента сигнал метки различается. Иными словами, при связывании меченого антигена с антителом происходит очень сильное изменение сигнала метки.

При проведении анализа гетерогенным методом следующим этапом является разделение связанной ( $At \bullet Ag^*$ ) и свободной фракций меченого антигена ( $Ag^*$ ) для определения степени связывания меченой частицы. В результате может быть выявлено количество свободного или связанного анализата.

Гомогенные методы по совокупности и разнообразию схем на практике представлены в меньшей степени, чем гетерогенные. Однако они обладают рядом преимуществ: реакция антитела с антигеном протекает в растворе (уменьшается время, необходимое для достижения системой равновесия); число дозирования реагентов минимально; исключается вариация сигнала, связанная с неоднородностями иммуносорбента; стабильность и время хранения диагностических наборов определяются только стабильностью антител.

Гетерогенные методы в отличие от гомогенных по совокупности выполнения необходимых операций более сложны и разнообразны. Гетерогенные методы в сравнении с гомогенными обладают преимуществом по таким параметрам, как чувствительность и специфичность, но уступают им по параметрам скорости и адаптируемости.

**Методы отделения реагентов в гетерогенном иммуноанализе.** Для разделения образующихся иммунных комплексов от свободных компонентов используют методы осаждения или иммобилизацию одного из компонентов на твердой фазе.

Во всех методах анализа, где необходима стадия разделения компонентов, эффективность ее проведения может быть лимитирующим фактором в анализе. Независимо от того, какой метод выбран для разделения, процедура его выполнения должна быть аккуратной и воспроизводимой и четко разделять связанные и свободные фракции анализата. Обычно фракции разделяют физическими методами, включая декантацию, центрифугирование или фильтрацию в сочетании со стадиями промывки для удаления несвязанного анализата.

*Методы осаждения* из раствора связанных реагентов (т. е. иммунокомплексов  $At \bullet Ag$  и  $At \bullet Ag^*$ ) из реакционной смеси включают: осаждение реагентами, метод двойных антител, осаждение белком А или G. Некоторые методы осаждения условно можно отнести к гомогенно-гетерогенным, так как на первой стадии анализа образование специфических иммунных комплексов происходит в растворе. Затем в целях разделения используют реагенты, иммобилизованные на твердую фазу (например, на латексных частицах).

Осаждение иммунокомплексов основано на использовании тех же растворителей или солей, которые широко применяют для осаждения белков на преаналитической стадии биоанализа. Для осаждения иммунных комплексов часто используют сульфат аммония, этанол, ацетон или ПЭГ.

*Метод двойных антител* состоит в том, что осаждение первичного комплекса  $At \bullet Ag$  и  $At \bullet Ag^*$  осуществляется с помощью вторичных антител. Вторичные антитела ( $At_2$ ) своими  $F_{ab}$ -фрагментами связываются только с  $F_c$ -фрагментом первичных антител и не взаимодействуют с искомым антигеном. В результате образуются высокомолекулярные комплексы  $At_2-At \bullet Ag$  и  $At_2-At \bullet Ag^*$ , которые легче осаждаются спонтанно. Связанную фракцию можно отделить от свободного меченого реагента с помощью простого центрифугирования или фильтрации. Вторичные

антитела могут быть также иммобилизованы на частицах целлюлозы, полистирола или сефадекса. Использование таких антител ускоряет процесс осаждения иммунокомплекса.

В качестве антивидовых (вторичных) используют антитела, специфичные к иммуноглобулинам тех видов животных или птиц, которых иммунизировали антигеном для получения антисыворотки (первичных антител). Вторичные антитела получают путем иммунизации животного-хозяина (преимущественно кролик, осел, коза) иммуноглобулинами IgG человека или другого животного (кролик, лошадь, баран, крыса, коза, свинья, курица и т. д.). В результате в организме животного-хозяина вырабатываются антитела, специфичные к данным иммуноглобулинам. Например, антимышиные вторичные антитела получают посредством введения мышинных иммуноглобулинов (антител) в тело животного-хозяина, отличного от мыши (например, кролик). Такие кроличьи антимышиные вторичные антитела будут специфично связываться со всеми классами иммуноглобулинов мыши (т. е. с первичной антисывороткой).

Образовавшийся иммунокомплекс  $At \bullet Ag$  и  $At \bullet Ag^*$  может быть осажден с помощью белков A или G, которые обычно связаны с нерастворимой матрицей (например, частицами сефарозы). Протеины A или G являются составной частью клеточной стенки стафилококков или стрептококков определенных штаммов. Данные протеины взаимодействуют с  $F_c$ -фрагментом антител с очень высокой аффинностью. Образующиеся высокомолекулярные комплексы осаждаются спонтанно, осадок отделяют центрифугированием или фильтрацией.

**Иммобилизация иммунореагентов на твердой фазе.** Иммобилизация позволяет предотвратить агрегацию в растворе и осуществить физическое разделение. Возможность прочного связывания на носителе антител или антигенов с сохранением их способности к специфическому образованию иммунных комплексов и разработка на этом принципе твердофазных методов дали мощный импульс для развития новых подходов в иммунохимических методах анализа. Для количественного определения специфических антител обычно используют иммобилизованные на подложке антигены.

Методы гетерогенного анализа, когда один из компонентов (антитело или антиген) иммобилизован на материале твердой фазы, относят к твердофазным (англ. solid phase assay).

При твердофазном анализе все реагенты тест-систем, за исключением иммобилизованных  $At$  ( $Ag$ ), используют в виде растворов. Их добавляют к твердой фазе поочередно, инкубируют, после чего несвязавшиеся реагенты удаляют промывкой твердой фазы. Образовавшийся иммунокомплекс, т. е. результат иммунохимической реакции, остается на твердой фазе и регистрируется количественно. В этом и состоит главное технологическое преимущество твердофазного иммуноанализа.

Наиболее распространенная схема твердофазного анализа включает следующие этапы: «сенсibilизация» лунок антителом, обработка несенсibilизированных участков нейтральными для теста веществами (например, альбумином — для защиты от неспецифического связывания), инкубация исследуемой пробы и меченых  $At^*$  ( $Ag^*$ ) (на твердой фазе образуется иммунокомплекс), измерение

сигнала метки. После каждого этапа следует обязательная процедура отмывки непрореагировавших реагентов.

В качестве твердой фазы используют пластики (полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и др.) в виде стандартно штампованных микроплашек с 96 или 60 лунками (стандартные размеры: ширина – 86 мм, длина – 128 мм, диаметр – 7 мм, объем – 0,3–0,4 мл) или шариков, колпачков и пр. – для постановки единичных проб; а также полупроницаемые мембраны (из нитроцеллюлозы, нейлона) в виде наполнителей в объеме или в виде плоских листов или полосок – стрипов (от англ. strip)). Пористые материалы обладают существенно большей площадью, на которой может сорбироваться один из иммунореагентов, при этом другие диффундируют по порам.

*Иммобилизация иммунореагентов* на твердую фазу может осуществляться за счет пассивной адсорбции, ковалентного связывания, иммунохимического взаимодействия (нековалентное и неадсорбционное присоединение).

Метод пассивной адсорбции заключается в том, что антитела (иммуноглобулины) спонтанно и необратимо сорбируются на некоторых видах пластика и стекле за счет сильных гидрофобных взаимодействий.

Полисахариды и сильногликозилированные белки часто имеют низкую аффинность по отношению к полистиролу. Для их иммобилизации применяют ковалентное присоединение с помощью глутарового альдегида. Ковалентное присоединение эффективно, если в качестве твердой фазы используются бусинки из агарозы или полистирола.

В основе некоторых способов иммунохимической иммобилизации лежит способность лектинов и белков бактерий (например, конканавалин А) прочно связываться с F<sub>c</sub>-фрагментом иммуноглобулинов. На первом этапе происходит обратимая сорбция указанных белков на пластике или других гидрофобных поверхностях. На втором этапе они связывают антитела за счет аффинных взаимодействий. Для иммунохимической иммобилизации антигенов могут использоваться «ловушечные» антитела, которые предварительно адсорбируют на твердой матрице. Антиген, иммобилизованный иммунохимически, в десять раз активнее, чем пассивно адсорбированный антиген.

Свободные участки на поверхности твердой фазы, не связавшиеся с сорбируемым реагентом, могут связывать в ходе теста другие молекулы, в том числе и конъюгаты, что приводит к повышению фонового сигнала. Для предотвращения неспецифического связывания после иммобилизации основных реагентов твердую фазу обрабатывают нейтральными для теста веществами. Наиболее популярные блокирующие агенты – бычий сывороточный альбумин, казеин и др. Выбор блокирующего агента и условия проведения этого этапа зависят от типа твердой фазы, чувствительности системы.

В настоящее время многие коммерческие наборы включают антитела, иммобилизованные на целлюлозные частицы с ядром из оксида железа (III). Эти малые парамагнитные частицы не осаждаются спонтанно и имеют большую площадь поверхности. Отделение комплексов  $At \bullet Ag$  и  $At \bullet Ag^*$  от свободных реагентов в данном случае осуществляется с помощью магнитного поля. Парамагнитные частицы, на которых сформирован иммунокомплекс, удерживаются магнитом в емкости во время этапов декантации и промывки.

### 6.6.3. Неконкурентный формат иммунохимического анализа

Методы иммуноанализа с использованием меченых реагентов можно классифицировать в зависимости от типа реагентов, применяемых на первой стадии анализа, на неконкурентные и конкурентные.

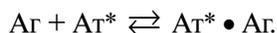
Если на первой стадии анализа в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (т. е. Ag и специфические At), то метод *неконкурентный*. Для неконкурентного анализа типа 1 оптимальным является соотношение компонентов, при котором концентрация центров связывания значительно превышает концентрацию определяемого соединения. Необходимым условием для неконкурентного анализа типа 2 является соблюдение соотношения избытка или сравнимой концентрации определяемого соединения (антигена) и мест специфического связывания, так как в этом случае определяется разность общего числа мест связывания и числа образовавшихся иммунных комплексов.

В случае неконкурентных методов можно выделить следующие форматы: прямой, непрямой, «сэндвич». Неконкурентные методы преимущественно используются в гетерогенном анализе, для которого характерна стадия отмывки реагентов между стадиями анализа.

*Прямые* называют методы, в которых применяют меченые иммунореагенты, вступающие в первичную реакцию «антитело – антиген». Прямой вариант используют как в гомогенных, так и некоторых гетерогенных системах.

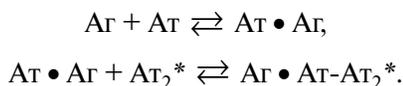
*Непрямые* методы характеризуются тем, что в них для детектирования иммунокомплекса применяют меченые вторичные антитела (At<sub>2</sub>\*). Метку присоединяют не к целевому антигену и не к антителу против целевого антигена, а ко вторичному антителу. Вместо антивидовых вторичных антител для конъюгации с меткой (например, ферментом) может быть использован протеин А стафилококка, который по своей природе с высокой аффинностью связывается с иммуноглобулинами класса G некоторых видов млекопитающих, включая человека. Непрямые варианты иммуноанализа не требуют очистки искомого антигена или антител, чистым должен быть только препарат вторичных антител. Непрямые методики применяют на практике чаще, чем прямые.

*Неконкурентный прямой* анализ протекает по следующей схеме:



К иммобилизованному на твердой фазе искомому антигену добавляют меченые специфичные антитела, в результате иммунохимической реакции образуется комплекс Ag • At\*, который удерживается на твердой фазе. После отмывки реагентов детектируют сигнал метки, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации комплекса Ag • At\* и, следовательно, количеству искомого антигена. При увеличении концентрации анализата интенсивность сигнала метки возрастает. Меченые At\* берутся в избытке.

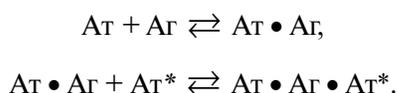
*Неконкурентный непрямой* анализ можно описать следующей схемой:



К иммобилизованному антигену добавляют первичные специфичные антитела, происходит образование комплекса  $Ag \bullet Ag$ , который закреплен на твердой фазе. Данный комплекс визуализируют с помощью вторичных антител, несущих метку ( $At_2^*$ ). Детектируемая интенсивность сигнала метки прямо пропорциональна концентрации комплекса и возрастает при увеличении концентрации анализата.

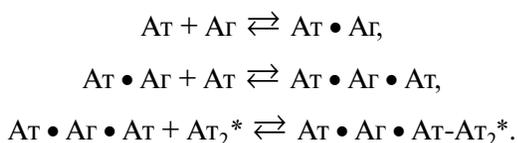
Достоинство данной техники в сравнении с прямым методом заключается в отсутствии необходимости использовать первичные антитела в больших количествах. Меченые вторичные антитела являются коммерчески доступными и более дешевыми. К недостаткам метода можно отнести более длительное время инкубации (две стадии) и большее количество стадий отмывки.

*Неконкурентный прямой двусторонний метод — двухсайтовый*, или «сэндвич»-метод (англ. sandwich), — разработан для анализа антигенов, которые имеют не менее двух эпитопов. К обоим эпитопам получают специфические антитела, служащие в качестве реагентов. Анализ проводят по следующей схеме:



Антитела, специфические к одному из эпитопов, сорбируют на твердой фазе, например на лунках полистирольного планшета. В лунки с сорбированными антителами вносят исследуемый образец, при этом анализируемый антиген вступает в реакцию с антителами и образует иммунокомплекс на поверхности лунок. Планшет отмывают от несвязавшихся компонентов и в избытке добавляют меченые антитела, специфические ко второму эпитопу  $Ag$ . После стадии отмывки (т. е. удаления избытка меченого конъюгата) измеряют интенсивность сигнала метки, который прямо пропорционален концентрации комплекса  $Ag \bullet Ag \bullet At^*$  и, следовательно, начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления иммунокомплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованного и меченого антител, что послужило поводом для широкого распространения в литературе названия «сэндвич»-метода, т. е. двустороннего анализа (англ. two-site assay). Схема может быть использована для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют по крайней мере две расположенные далеко друг от друга антигенные детерминанты. Для определения большого числа моновалентных антигенов метод непригоден. Ввиду того, что анализ (антиген) должен быть относительно большим для одновременного присоединения двух антител, то этот тип анализа подходит только для определения белков и пептидов с длиной цепи более чем 20 аминокислот.

*Неконкурентный непрямой двусторонний метод* протекает по следующей схеме:



Отличием от прямого метода является то, что образующийся на поверхности твердой фазы комплекс определяют с помощью меченых вторичных антител ( $At_2^*$ ).

#### 6.6.4. Конкурентный формат иммунохимического анализа

Если на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализит (антиген) и его аналог (меченый анализит или анализит, иммобилизованный на твердой фазе), конкурирующий с ним за имеющиеся центры специфического связывания, то метод является *конкурентным*. Необходимое условие конкурентного метода – недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога. Меченый и немеченый антигены не должны различаться по их иммунологическим свойствам. Конкурентный анализ используют для анализа низкомолекулярных антигенов.

Конкурентный анализ бывает прямым и ингибиторным. Конкурентные прямые методы можно использовать как в гомогенном, так и гетерогенном анализе. Ингибиторные методы больше характерны для гетерогенного анализа.

Оптимальная чувствительность конкурентных методов достигается в случае соблюдения соотношения  $Ag : Ag^*$ , равного 1 : 1. Кроме того, концентрация меченого антигена находится, как правило, в пределах 0,5–20 нМ, чтобы соотношение «сигнал – фон» составляло 100 : 1.

*Конкурентный прямой* анализ может протекать как в одну, так и в две стадии. *Конкурентный одностадийный* анализ низкомолекулярных антигенов может быть реализован по следующей схеме:



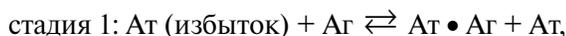
К антителам добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген, и раствор меченого антигена, который аналогичен искомому анализу. Концентрация меченого антигена всегда фиксирована, а концентрация искомого варьируется от пробы к пробе. В твердофазном анализе образующийся иммунокомплекс закреплен на твердом материале, и сигнал метки регистрируют после отмывки несвязавшихся антигенов (свободного и меченого). В случае гомогенного анализа иммунокомплекс образуется в анализируемом растворе, и сигнал метки регистрируют после введения всех реагентов.

В конкурентном анализе интенсивность сигнала метки обратно пропорциональна количеству анализита в пробе, т. е. большее количество анализита приведет к тому, что с антителом свяжется меньшее количество меченого антигена. По сути, концентрация целевого антигена определяется по степени ингибирования образования комплекса  $At \bullet Ag^*$ .

Важным условием анализа является необходимость недостатка центров специфического связывания (т. е. антител) по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога. Антитела берут в количестве, необходимом для связывания 30–40 % меченых антигенов в отсутствие немеченого лиганда. Увеличение концентрации антител снижает чувствительность анализа, и наоборот.

Подходящую концентрацию специфического антитела определяют по кривой титрования, которую получают при инкубации различных разбавлений антитела (титры) с постоянной концентрацией меченого антигена. По полученной кривой в координатах («процент связанного меченого антигена – титр антитела») определяют оптимальное разбавление антитела при ~30 % связывания.

При проведении конкурентного *двустадийного* анализа антитела берут в избытке в сравнении с концентрацией целевых антигенов. Схема анализа такова:



На первой стадии анализа антитела инкубируются с анализируемыми антигенами, на второй стадии вводят меченые антигены. Процесс подчиняется закону действующих масс, поэтому количество связанного с антителами меченого антигена находится в обратной зависимости от количества немеченого антигена. Данный формат анализа имеет чувствительность на несколько порядков выше, чем одностадийный.

В *конкурентном ингибиторном* анализе (англ. antigen down assays) на твердой фазе иммобилизуют стандартный антиген, к которому добавляют раствор, содержащий меченые антитела, и пробу с анализируемым антигеном. Определяемый антиген конкурирует с иммобилизованным антигеном за растворимые меченые антитела, добавляемые в недостатке. В итоге интенсивность сигнала метки обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в пробе.

Конкурентные методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с неконкурентными и требуют препаратов очищенных антигенов, которые могут быть труднодоступны и дороги. Предел обнаружения различных соединений для данных методов ограничен как чувствительностью регистрации метки, так и аффинностью антител, в то время как для неконкурентных методов при отсутствии неспецифических взаимодействий предел обнаружения зависит только от чувствительности определения метки. Поэтому для достижения высокой чувствительности анализа конкурентным методом необходимо использовать высокоаффинные антитела. Для константы аффинности  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  предел обнаружения может составлять  $10^{-14} \text{ M}$ .

Независимо от формата иммуноанализа есть *общие аспекты в его организации и выполнении*, соблюдение которых гарантирует получение надежных результатов. Во-первых, все серии иммуноанализа должны включать холостые пробы (англ. blank), содержащие только рабочие растворы (англ. developing solution) и имеющие очень низкие значения измеряемого показателя (например, оптического поглощения не выше 0,1–0,2). Так устанавливают величину фонового сигнала, т. е. определяют неспецифическое связывание. Это связывание меченого иммунореагента не с соответствующим специфическим сайтом связывания, а с другими реагентами, используемыми в анализе. Нулевая концентрация стандарта в пробе дает величину неспецифического связывания.

Во-вторых, для анализа большого количества образцов одной калибровочной кривой недостаточно, обычно стандартные растворы дублируют. Как правило, исследуемые образцы представляют собой сложные по составу системы (культуральная среда, плазма, сыворотка, клеточный лизат, сложные буферы и т. д.), т. е. аналит находится во многокомпонентной среде, которую называют матрицей. Для определения влияния матрицы образца на анализ стандарты готовят на фоне матрицы, например растворяют его в сыворотке. Для контроля влияния матрицы используют стандарт, растворенный в рабочем буфере.

В-третьих, каждая проба должна иметь два (лучше три) параллельных измерения, а образцы измеряться как минимум в двух разведениях, которые попадают в диапазон калибровочной кривой. Два разведения должны показать хорошую корреляцию в конечных рассчитанных значениях концентрации анализируемого вещества. Если такая корреляция отсутствует, это признак того, что в образцах содержится некий компонент, искажающий анализ, и в таком случае рекомендуется провести очистку образцов. Наконец, аккуратное пипетирование очень малых объемов является критическим в получении достоверных данных.

### 6.6.5. Математическая обработка результатов

Цель иммуноанализа — определение концентрации целевого анализата в анализируемых пробах. Для этого необходимо правильно выбрать способы представления экспериментальных данных и построения калибровочной кривой, а также математические методы расчета концентраций. Методы математической обработки данных играют в иммуноанализе не менее важную роль, чем способ подготовки образцов или точность пипетирования, и могут вносить не меньший вклад в получение ложных результатов, если будут подобраны неверно.

Иммунохимический анализ достаточно прост в исполнении. Однако в его основе лежат сложные биологические и физико-химические процессы, влияющие на характер получаемых данных и накладывающие определенные ограничения на применение методов математической обработки результатов. Зависимость величины регистрируемого сигнала от концентрации анализата при проведении как неконкурентных, так и конкурентных методов практически всегда в той или иной степени носит нелинейный характер. Причины этого кроются в природе анализа.

Для визуального расширения линейной области графика в координатах «концентрация стандартного антигена (ось  $X$ ) — показатель прибора (ось  $Y$ )» и последующего упрощения процедуры построения графика применяют различные *преобразования осей*, которые называются *линеаризующими*. Форму кривой можно модифицировать, меняя масштаб концентраций антигена, откладываемых по оси абсцисс. Масштаб может быть линейным (значения концентраций, например, в пиког/мл, наног/мл или мкг/мл) или логарифмическим (натуральный или десятичный логарифм значений концентраций). Линейный масштаб используют обычно при определении концентрации измеряемого вещества в узком диапазоне. В широком диапазоне при изменении концентрации антигена в калибровочных пробах более чем на один порядок лучше использовать логарифмическую шкалу. В случае неконкурентных методов (например, «сэндвич»-метод) логарифмического преобразования может быть достаточно для линеаризации калибровочной кривой.

По оси ординат также могут откладываться разные величины, а именно непосредственно регистрируемый сигнал (например, оптическая плотность раствора), его логарифм, отношение концентраций  $[Ag_{связ}]/[Ag_{своб}]$  или  $[Ag_{связ}]/[Ag_{общ}]$  в арифметическом или логарифмическом масштабах, результаты специальных сложных преобразований.

Распространенной практикой при оценке результатов конкурентного анализа является построение стандартной кривой, когда на оси абсцисс откладывают концентрацию стандарта (несвязанный антиген) в арифметическом или логарифмическом

ком масштабе, а на оси ординат – процент связывания меченого антигена ( $\%B/B_0$ ), где  $B$  – сигнал метки в присутствии ингибитора (стандарт),  $B_0$  – в отсутствии ингибитора (контроль). Максимум связывания меченого антигена с антителом наблюдается в отсутствии конкуренции с немеченым антигеном (стандарт или исследуемая проба), сигнал метки в данном случае наивысший. Принято считать, что при этом происходит 100 % связывание меченого конъюгата. Предварительно из регистрируемых значений сигнала нужно вычесть среднюю величину фонового сигнала (неспецифического связывания). Такой метод оценки данных позволяет легко сравнивать результаты между анализами, выполненными на различных планшетах или в разные дни. Вместе с тем абсолютные значения регистрируемого сигнала (например, оптическое поглощение) могут отличаться от планшета к планшету или день ото дня, значения  $\%B/B_0$  должны быть достаточно схожими.

Калибровочная кривая в координатах («процент связывания – концентрация антигена») имеет сигмоидальную форму (линейный участок обычно находится в диапазоне 20–80  $\%B/B_0$ ). В настоящее время для линейаризации стандартной кривой используют преобразование, известное под названием «logit», впервые предложенное М. Ротбардом в 1970 г. и получившее с тех пор широкое распространение. Величина logit рассчитывается по формуле

$$\text{logit } y = \ln \left( \frac{y'}{1 - y'} \right),$$

где  $y'$  – величина  $B/B_0$ .

Когда по оси  $Y$  наносится logity, а по оси  $X$  – натуральный логарифм концентрации, построенный график называют преобразованием logit – log. При этом преобразовании калибровочный график часто трансформируется в практически прямую линию. При визуальной оценке качества калибровочной кривой на таком графике погрешности отдельных калибровочных проб обнаруживаются значительно легче. Преобразование logit – log является частным случаем логарифмической логистической модели с четырьмя параметрами (4PL). В алгоритме построения графика методом 4PL кроме интенсивности сигнала для калибровочной пробы с нулевой концентрацией и сигнала для бесконечной дозы («фонового сигнала») учитываются также значения сигнала для всех остальных калибровочных проб.

Следует остановиться на некоторых практических моментах относительно logit-преобразования. При logit-преобразовании часто 10 % начального и конечного участков калибровочной кривой оказываются нелинейными, в связи с чем при расчете или построении преобразованной калибровочной кривой эти участки лучше отбрасывать. Если значения, найденные для анализируемых образцов, лежат выше или ниже указанных пределов, их также следует отбрасывать.

Качество соответствия прямой линии, полученной путем logit-преобразования, часто оценивают по коэффициенту корреляции  $R$ , значение которого составляет не менее 0,95. Более низкие значения  $R$  (вполне приемлемые при статистической обработке биологических данных) означают отклонение от линейности или показывают, что одна из точек явно ошибочна.

Во многих системах logit-преобразование не позволяет получить прямую линию, поэтому его применение не дает преимуществ по сравнению с любым другим способом построения калибровочной кривой. Такая ситуация связана с гетероген-

ностью антисыворотки, т. е. в ее основе лежит та же причина, которая не позволяет анализировать многие системы на основании простого алгебраического выражения закона действующих масс.

На практике оптимальный метод построения калибровочной кривой предлагается разработчиком набора для иммуноанализа. Оптимальный для данной иммунохимической системы метод математического анализа данных должен быть описан в инструкции к нему. В тех случаях, когда инструкция такой информации не содержит, пользователь вынужден самостоятельно выбирать метод расчета концентраций. Однако при подборе следует учитывать, что компьютерные методы обработки данных иммуноанализа, как эмпирические, так и теоретические, могут приводить к неадекватным результатам. Причиной этого может быть некорректная реализация использованных в программе алгоритмов, поэтому полученные тем или иным способом калибровочные графики перед началом рутинного использования выбранного метода обсчета необходимо проверять на адекватность. Методика проверки представляет собой обратный расчет значений калибраторов по их сигналам с использованием уравнения аппроксимирующей калибровочной кривой и сравнение с предварительно заданными значениями этих калибраторов. Чем ближе вычисленные значения калибровочной пробы к заданным производителем концентрациям, тем точнее и адекватнее метод построения калибровочной кривой.

### 6.6.6. Системы усиления сигнала

Для увеличения чувствительности иммунохимических методов часто используют различные системы усиления сигнала. Для этих целей применяют вторичные антитела, маркированные высокочувствительными метками (например, наночастицами золота), либо каскадные системы, т. е. используют множество меченых вторичных антител, которые последовательно соединяются друг с другом, образуя каскад.

Широкое применение для усиления сигнала метки получили системы, базирующиеся на высокоспецифическом взаимодействии авидина или стрептавидина с биотином ( $K_A = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). Одна молекула авидина состоит из четырех идентичных субъединиц и способна взаимодействовать с четырьмя молекулами биотина, что позволяет использовать его как связующую молекулу между биотинсодержащими соединениями. Комплекс «авидин – биотин» устойчив в широком диапазоне рН 2–13. Авидин (рI 10,5) при физиологических значениях рН (7,4) положительно заряжен и может взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами, поэтому его заменяют бактериальным белком стрептавидином (рI 6,8–7,5), который также имеет четыре биотинсвязывающие стороны, но для него менее характерно неспецифическое связывание. Кофермент биотин из-за своей маленькой молекулярной массы (244 Да) легко соединяется с антителами без дезактивации их специфических мест связывания. С одной молекулой антитела могут связаться десятки молекул биотина. Он способен также связываться с соединениями, выступающими в качестве меток, например с ферментами.

Комплекс «антиген – антитело – биотин» можно детектировать с помощью конъюгата «авидин – фермент», который прочно фиксируется на иммунокомплексе. После добавления соответствующего субстрата проводят определение продукта ферментативной реакции. В другой модификации метода используют биотинили-

рованный фермент. В этом случае авидин выполняет функцию мостика, соединяя две молекулы, содержащие остатки биотина. К образовавшемуся комплексу «антиген – антитело – биотин» добавляют свободный авидин, а затем биотинилированный фермент.

Схему неконкурентного непрямого метода с использованием системы «авидин – биотин» можно представить следующим образом (рис. 6.15):

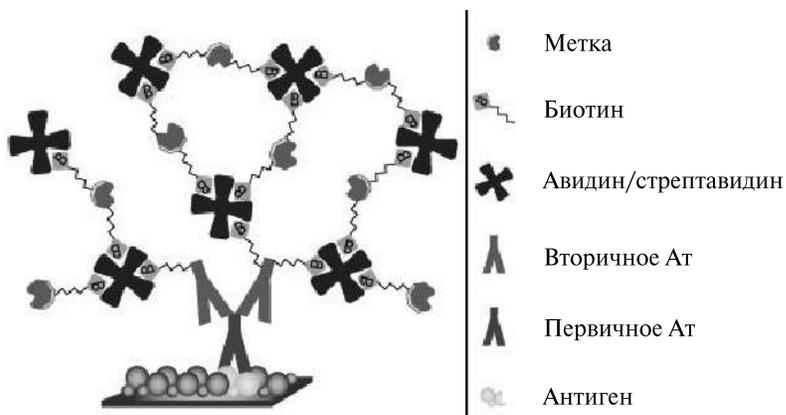
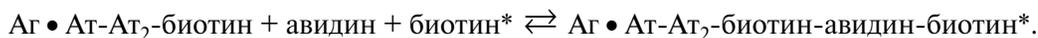
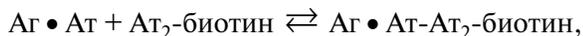
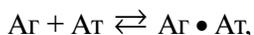


Рис. 6.15. Схема амплификации сигнала системой «авидин – биотин»

Образующийся иммунокомплекс инкубируют со вторичными антителами, соединенными с молекулами биотина ( $At_2$ -биотин), а затем вводят авидин и биотин, маркированный меткой. Поскольку авидин одним сайтом связывает иммунокомплекс через биотин, а тремя оставшимися – три меченые молекулы биотина, то в результате иммунокомплекс визуализируется с помощью большего количества меток. Так могут образовываться сложные каскадные системы, что значительно усиливает сигнал метки.

### 6.6.7. Оценка новых тест-систем для иммунохимического определения

Выделим некоторые аспекты, особенно важные при разработке и оценке новых иммунохимических методик анализа.

В иммунохимическом анализе проба представляет собой комплексную систему, в которой кроме целевого анализата (как правило, гаптена) содержится множество различных компонентов (белки, липиды, ферменты, соли и др.). При разработке тест-системы для иммунохимического определения обязательно нужно учитывать возможное влияние матрицы пробы на определение целевого анализата. По этой причине большинство коммерческих тест-систем включают стандарты, пригото-

ленные не в буфере, а в сыворотке крови человека или животного. В случае если целевые аналиты определяют в других биожидкостях или пробах окружающей среды, то для стандартизации теста используют соответствующие матрицы. Обязательным является контроль для обнаружения неспецифического связывания, т. е. выявление всех взаимодействий, отличных от реакции антитела с антигеном, которые могут исказить величину регистрируемого сигнала. Такой контроль включает все используемые реагенты, кроме антител, которые при этом заменяют нейтральным белком для сохранения состава матрицы. Как правило, подбирают условия анализа таким образом, чтобы сигнал неспецифического связывания был минимальным, а полезный сигнал – максимальным, т. е. находят «окно специфичности». Снижению неспецифического связывания могут способствовать малый объем пробы для анализа, разбавление пробы, усиление сигнала (применение более чувствительной метки), блокирование свободных участков нейтральными веществами (в случае твердофазного анализа).

При оценке метода *стандартная кривая* может быть получена в разных координатах, тогда графики позволят определить различные характеристики. Например, кривая в координатах  $[Ag \cdot At]/[Ag]_{своб} - [At]$  является очень крутой на конце, соответствующем очень низкой концентрации, и может быть использована для расчета предела обнаружения метода. Сигмоидальная кривая в координатах  $[Ag \cdot At]/[Ag]_{общ} - \lg[At]$  отображает область «нечувствительности» метода (концы кривой в области низкой и высокой концентраций), что не может быть таким очевидным при построении стандартной кривой в координатах «logit – log».

В целом для разработки высокоселективного иммунохимического теста важен тщательный *дизайн* (конструирование) всех конъюгатов гаптенов, которые будут использованы, т. е. иммуногенов (конъюгат с белком), меченых гаптенов (конъюгат с маркерным соединением) и конъюгатов (англ. the coating antigen), применяемых для связывания с твердой фазой (в случае твердофазного конкурентного ингибиторного анализа). Ошибку в анализе можно наблюдать, если антитело будет легче распознавать модифицированные гаптены в конъюгатах в сравнении со свободным гаптеном (аналит).

В целях повышения чувствительности иммунохимического метода часто для маркирования и получения иммуногена используют *гетерологичные гаптены*. Выделяют три типа гетерологичности, которые являются существенными для разработки метода с низким пределом обнаружения целевого гаптена. Гетерологичность гаптена проявляется при использовании различных его производных для получения иммуногена и меченого соединения. Так, для иммуноферментного анализа эстрадиола иммуноген получают путем присоединения несущего белка к 3-гидроксигруппе эстрадиола (1,3,5-эстратриен-3,17 $\beta$ -диол) (рис. 6.16), а фермент-меченый гаптен – путем присоединения фермента к 3-гидроксигруппе эстрогена (1,3,5-эстратриен-3-ол-17-он), используя один и тот же связывающий (сшивающий) реагент.

Примером может также служить разработка тест-системы для анализа фосфорсодержащего инсектицида (гаптен-аналит) (рис. 6.17). При получении специфических антител для его определения в качестве иммуногена используют гаптен *A*, а для получения меченого реагента – гаптен *B*.

Гетерологичность гаптенов возникает, если метку и несущий белок присоединяют к одному и тому же гаптену с помощью различных связывающих реагентов. На-

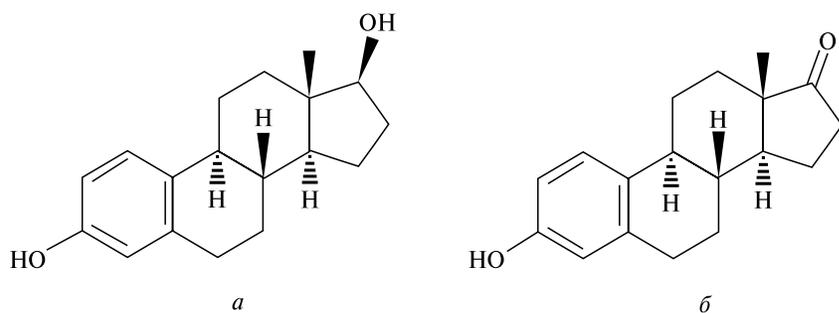


Рис. 6.16. Структурные формулы эстрадиола (а) и эстрона (б)

пример, для иммуногена применяют реагент с сукцинатной группой, а для меченого конъюгата — с альдегидной.

Третий тип гетерологичности проявляется, если используют один и тот же сшивающий реагент, который связывается с различными сторонами гаптена. Так, для получения иммуногена применяют 3-гидроксигруппу, а для меченого конъюгата — 17-гидроксигруппу эстрадиола.

При отсутствии неспецифического связывания гетерологичность иммуногена и меченого гаптена способствует снижению предела обнаружения, иногда в 100 раз в сравнении с отсутствием гетерологичности. Причиной этого является то, что для меченого гаптена гетерологичность снижает его константу аффинности с антителом, поэтому свободный гаптен (целевой аналит, для которого получены антитела) будет вытеснять меченый гаптен легче. Это позволит определить более низкие концентрации аналита.

*Кросс-реактивность* используемых антител является важнейшим параметром при определении целевых аналитов в присутствии очень схожих соединений, по сути, данный параметр — индикатор специфичности метода. Кросс-реактивность зависит от селективности антитела по отношению к соответствующему эпитопу и в определенной степени может контролироваться тщательным дизайном иммуногенов, используемых для получения антител. При разработке тест-системы для обнаружения определенного гаптена (например, пестицида) синтезируются его аналоги, применяемые для получения иммуногенов и последующей иммунизации животных. Выделенные антитела тестируют на кросс-реактивность, используя целевой аналит и его структурные аналоги с различными заместителями. Это позволяет определить структурные детерминанты (специфичные эпитопы) гаптен

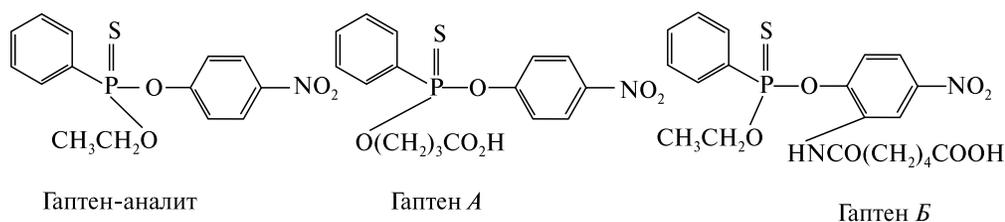


Рис. 6.17. Структурные аналоги фосфорсодержащего инсектицида

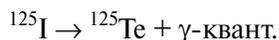
и выявить, как структура иммуногена может изменить селективность разрабатываемой антисыворотки. Результатом может быть получение различных антисывороток, в том числе с широким спектром селективности для очень близких по структуре соединений, что экономически выгодно. Тщательный дизайн иммуногенов и успешный органический синтез аналогов гаптена позволяют создать библиотеку различных, но близких по структуре соединений. Это дает возможность получать антитела с желаемыми характеристиками (специфичные по отношению к определенному соединению, группе или классу).

### 6.6.8. Радиоиммунный анализ

Исторически первым иммунохимическим методом с использованием меченых гаптенных был радиоиммунный анализ (РИА) (англ. radioimmunoassay (RIA), предложенный в конце 1950-х гг. С. Берсоном и Р. Ялоу (S. Berson, R. Yalow). Ученые впервые внедрили в практику метод определения концентрации инсулина в плазме крови человека с использованием радиоактивной метки (изотоп  $^{125}\text{I}$ ). Метод оказался приемлемым для количественного определения и других гормонов. РИА обладает высокой чувствительностью (на уровне пкг/мл). Разработка РИА явилась поворотным моментом в развитии иммунохимических методов анализа, положившим начало целой серии методов с использованием различных меченых соединений.

Характерной особенностью радиоиммунологических методов является использование антигенов (антител), меченных радиоактивной меткой. Радиоизотопы легко детектируются, и процедура маркирования иммунореагентов простая. Как правило, используют радиоактивные изотопы, которые спонтанно распадаются с испусканием  $\gamma$ -излучения ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) или  $\beta$ -частиц ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ). Изотопы, испускающие  $\alpha$ -частицы, в биохимии имеют ограниченное применение. Свойство радиоактивности атомов применяют как средство информации об их количественном содержании. В сущности, можно измерить распад одного атома радиоизотопа с помощью относительно простых приборов. Благодаря возможности определять радиоактивную метку в малых количествах можно выявить низкие концентрации молекул, содержащих радиоизотоп. Для определения соединения, включающего в себя радиоизотоп, используют понятие молярной активности, которая дает соотношение общей радиоактивности пробы к количеству молей меченого соединения в этой пробе и измеряется в единицах Бк/моль (несистемные ед. Ки/моль, 1 Ки (кюри) =  $3,7 \cdot 10^{10}$  Бк). В зарубежной научной литературе используется термин «специфическая активность» (англ. specific activity), являющийся синонимом понятия «молярная активность».

В РИА из  $\gamma$ -радиоактивных изотопов в качестве метки наибольшее применение нашел изотоп иода ( $^{125}\text{I}$ ), характеризующийся низкоэнергетическим  $\gamma$ -излучением ( $E_{\text{max}} = 0,35$  мэВ) с достаточно высоким периодом полураспада (60,1 сут):



Маркирование лигандов изотопом  $^{125}\text{I}$  дает возможность получить соединение с высокой молярной активностью (например, активность иодированных стероидов составляет более 1000 Ки/ммоль), что позволяет определять низкие количества аналитов с высокой чувствительностью. К тому же при использовании  $\gamma$ -радиоактивных

изотопов для детектирования частиц не требуется особая пробоподготовка. Радиоизотопы иода применяют преимущественно для маркирования высокомолекулярных соединений, в частности белков.

Из  $\beta$ -излучающих изотопов для маркирования гаптенов применяют преимущественно тритий ( $^3\text{H}$ ,  $E_{\text{max}} = 0,018$  мэВ). Соединения, меченные тритием, достаточно устойчивы, поскольку период полураспада изотопа  $^3\text{H}$  составляет 12 лет, и идентичны по своему поведению немеченым лигандам. Однако при работе с соединениями, меченными тритием, требуется дополнительная стадия пробоподготовки образцов перед измерением  $\beta$ -излучения на жидкостных сцинтилляционных счетчиках, а низкая удельная активность данных соединений (не более 100 Ки/ммоль) влечет за собой увеличение времени счета в анализе и меньшую чувствительность в сравнении с иодом.

Для определения меченных радиоизотопами антигенов (антител) используют сцинтилляционные детекторы и автордиографию.

Сцинтилляционные детекторы преобразуют энергию ионизирующего излучения ( $\gamma$ -квантов,  $\beta$ -электронов,  $\alpha$ -частиц) в измеряемую вспышку света. Действие сцинтилляционных счетчиков основано на том, что ионизирующее излучение при прохождении через вещество вызывает возбуждение его молекул, которые, возвращаясь в нормальное состояние, испускают (флуоресцируют) видимый свет. Вещества, в которых излучение вызывает заметную световую вспышку, называют сцинтилляторами.

*Автордиография* — это простейший прямой способ детектирования ионизирующего излучения, основанный на его фотохимическом действии. Распределение радиоактивных веществ изучают, сравнивая плотность почернения фотопленки (или изменение цвета) от исследуемого и эталонного образца (макрордиография). Второй метод состоит в подсчете следов (треков), образуемых ионизирующими частицами в фотоэмульсии, с помощью оптического или электронного микроскопа (микрордиография). Последний метод значительно чувствительнее первого. Фотографическое изображение распределения радиоактивных веществ в исследуемом образце, полученное методом автордиографии, называется автордиограммой или радиоавтографом. Для получения макроавтографов применяются диапозитивные и рентгеновские эмульсии, для микроавтографов — специальные мелкозернистые эмульсии. Автордиография в принципе подходит для детектирования почти всех радиоизотопов.

*Маркирование соединения* с помощью радиоизотопа может осуществляться в процессе его синтеза. В настоящее время большое число радиоактивно меченых соединений являются коммерческими продуктами. В случае невозможности приобрести коммерческий реагент маркированные соединения получают различными способами, в процессе которых должна минимально нарушаться структура молекулы и сохраняться ее биологическая и/или иммунологическая активность. Одним из таких способов является метаболическое маркирование. В этом случае радиоактивные аминокислоты встраиваются во вновь синтезированные белки в процессе метаболизма живых клеток. Для этого используются радиоактивные аминокислоты ( $^{35}\text{S}$ -метионин,  $^{35}\text{S}$ -цистеин) и неорганические соли ( $^{35}\text{S}$ -сульфат или  $\text{Na}^{125}\text{I}$ ). Методика метаболического маркирования заключается в следующем. Предварительно клеточная культура выдерживается в  $\text{CO}_2$ -среде (1 ч при  $37^\circ\text{C}$ ), чтобы израсходовался внутриклеточный метионин, потом добавляется радиоактивный метионин, количество которого зависит от условий эксперимента. После инкубации (2–3 ч) с меченой аминокислотой клетки лизируют и выделяют необходимые меченые белки.

В противоположность метаболическому маркированию аминокислотами, при котором маркированию подвергаются все антигенные белки клетки, при иодировании специфически маркируются только молекулы клеточной поверхности.

Для введения  $^{125}\text{I}$  в молекулу иммуноглобулина или другого белка наиболее часто используют химическое и ферментативное окислительное иодирование, в результате которого образуется  $^{125}\text{I}$ , способный атаковать боковые цепи аминокислот белков и включаться в остатки тирозина (в ортоположение по отношению к НО-группе фенольного кольца), фенилаланина, триптофана или гистидина. Полученные меченые белки очищают с помощью хроматографии. Включение  $^{125}\text{I}$  в вещества с низкой молекулярной массой вызывает значительное изменение молекулярной структуры, что значительно влияет на иммуногенность меченого соединения. Поэтому разработка рациональной методики иодирования требует наличия знаний о структуре и свойствах используемых соединений.

РИА может выполняться как в неконкурентном («сэндвич»-метод), так и конкурентном формате анализа. Определение антител с помощью изотопной метки получило название иммунорадиометрического анализа (ИРМА), т. е. в данном виде анализа используют антитела, меченные радиоизотопом.

Основные преимущества радиоиммунологических методов – высокая чувствительность, специфичность и экспрессность. Применение изотопной метки обеспечивают высокий уровень соотношения сигнал/шум и низкое неспецифическое связывание метки. Граница обнаружения РИА составляет  $10^{-15}$ – $10^{-18}$  моль/л.

В целом применение изотопных меток (РИА, ИРМА) сыграло важную роль в становлении иммуноанализа. Именно эти методы впервые раскрыли потенциал иммуноанализа, дали толчок к его разработке и коммерческому применению. Тем не менее недостатки данного подхода (ограниченный срок жизни радиоактивной метки, что вызывает необходимость постоянной замены реактивов; небезопасность; трудности разработки, транспортировки, хранения и утилизации отходов; относительно дорогое специальное оборудование для регистрации радиоактивности и др.) привели к вытеснению методов, основанных на радиоактивной метке, альтернативными (например, иммуноферментный анализ).

## 6.7. Флуоресцентный иммуноанализ

Флуоресцентный иммуноанализ (ФИА) основан на применении иммунореагентов, меченных флуорофорами – красителями, способными абсорбировать свет в определенной области длин волн и через короткий промежуток времени ( $10^{-6}$ – $10^{-9}$  с) испускать свет с более длинной длиной волны. Меченные флуорофорами антитела впервые были использованы для обнаружения клеточных антигенов американским иммунологом А. Кунсом (А. Coons, 1941), дальнейшее развитие метод получил в 1950-е гг.

Флуорофоры, используемые в качестве метки, должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- высокая эффективность поглощения света;
- высокий квантовый выход;
- цвет их флуоресценции должен отличаться от аутофлуоресценции пробы и контрастировать с фоном (предпочтительны длины волн поглощения свыше 350–400 нм и эмиссии ~600 нм);

- время жизни в возбужденном состоянии должно быть достаточно большим;
- фотохимическая стабильность и содержание функциональных групп, благодаря которым можно осуществить связывание с антителами (антигенами) с минимальным снижением спектральных свойств;
- не должны влиять на активные центры связывания иммунореагентов.

На практике используют флуорофоры, имеющие желто-зеленую, желтую и красную люминесценцию. Широкое применение нашли производные флуоресцеина (например, изотиоцианат флуоресцеина), родамина и умбеллиферона. В качестве флуорофорных меток могут быть использованы водорастворимые белки, выделенные из красных водорослей (фикобилипротеины), обладающие высокой молярной абсорбцией (в 10–30 раз выше, чем у флуоресцеина) и высоким квантовым выходом ( $> 0,8$ ).

ФИА можно осуществлять с помощью одного конъюгата (*одноцветное* маркирование) или нескольких, несущих различные флуорофоры (*многоцветное* маркирование). Многоцветное маркирование позволяет одновременно определять в пробе различные антигены (антитела). Для такого маркирования подходят флуорофоры, у которых спектры эмиссии перекрываются незначительно. Кроме того, нужно избегать неспецифического взаимодействия и перекрестных реакций между отдельными антителами и флуорохромными конъюгатами. В случае многоцветного маркирования могут сочетаться прямые и непрямые неконкурентные схемы анализа.

При разработке методов ФИА в качестве *детектируемого сигнала* используют различные свойства флуоресценции, а именно изменение интенсивности, поляризации или характеристического времени флуоресценции, перенос энергии флуоресценции. Существует большое количество как гомогенных, так и гетерогенных разновидностей ФИА.

Для детектирования флуоресценции в пробах могут применяться различные флуориметры, флуоресцентные микроскопы; для анализа клеточных препаратов используют проточную цитометрию.

ФИА является важнейшим методом в иммунологии. В фундаментальных исследованиях ФИА применяют для изучения иммунной системы, характеристики определенных субпопуляций лимфоцитов, дифференцировки клеток, тестирования новых антител. В диагностике – для доказательства инфекционных антигенов (вирусы, бактерии) или опухолевых клеток, в трансплантационной медицине – для типизации тканей, определения иммунного статуса после трансплантации.

ФИА находит широкое применение в разработке экспресс-методик для определения наркотиков, лекарственных средств, пестицидов и др. Используемые при этом приборы недорогие, время анализа занимает менее 10 мин, что очень важно при проведении скрининговых исследований.

### 6.7.1. Гетерогенный ФИА

Применение флуорофоров в качестве меток дает широкие возможности для генерирования полезного сигнала в гетерогенном анализе. Гетерогенный ФИА может быть выполнен как в неконкурентном, так и конкурентном формате.

**Неконкурентный непрямой ФИА.** Данный метод обычно используют для определения антител (например, при обнаружении вирусов гриппа, бешенства). Антигены иммобилизуют на твердую подложку, добавляют исследуемую сыворотку. Если ис-

комое антитело присутствует в сыворотке, то оно связывается с иммобилизованным антигеном, в результате чего образуется иммунокомплекс, закрепленный на подложке. После стадии отмывки иммунокомплекс определяют с помощью меченных флуорофором (например, флуоресцеином) вторичных антител, специфичных к первичному антителу. Например, если в качестве первичных Ат используют мышинные антитела (выделены из сыворотки мыши), то они могут быть определены конъюгатом «коза – антимышь – флуорофор» (вторичные антитела получили путем введения козе иммуноглобулинов мыши). Появление сигнала флуоресценции свидетельствует о наличии антитела в пробе. Преимущество метода заключается в использовании незначительного количества первичных Ат, а высокоспецифичные конъюгаты вторичных антител, меченные флуоресцентными красителями, коммерчески доступны.

**Двусторонний ФИА с резонансным переносом энергии.** Данный модифицированный «сэндвич»-метод базируется на использовании двух антител, меченных различными флуорофорами ( $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ ). Флуорофоры подобраны так, что спектр эмиссии первого  $\Phi_1$  перекрывается со спектром поглощения второго  $\Phi_2$ . При их сближении возможна реализация безызлучательного переноса энергии флуоресценции от донора, находящегося в возбужденном состоянии, на акцептор через диполь-дипольное взаимодействие. Важной чертой резонансного переноса энергии является то, что процесс не зависит от свойств среды. Если флуорофоры  $\Phi_1$  ( $\lambda_{\text{возб}1}$ ,  $\lambda_{\text{эмис}1}$ ) и  $\Phi_2$  ( $\lambda_{\text{возб}2}$ ,  $\lambda_{\text{эмис}2}$ ) находятся на близком расстоянии ( $\leq 10$  нм), то эмиссия донора  $\Phi_1$  тушится в результате абсорбции света акцептором  $\Phi_2$ , который в итоге излучает более длинноволновую флуоресценцию.

Анализ протекает по схеме, изображенной на рис. 6.18:

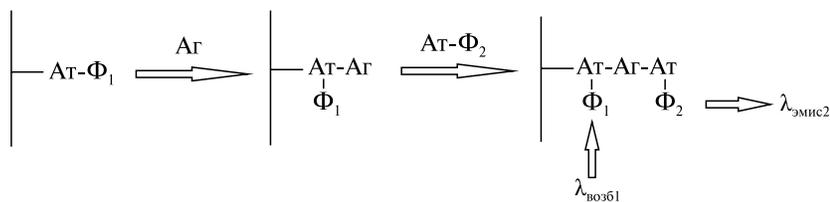


Рис. 6.18. Схема двустороннего ФИА с резонансным переносом энергии

На завершающей стадии анализа возможны два варианта детектирования флуоресценции, причем в обоих случаях возбуждение флуоресценции происходит при длине волны  $\lambda_{\text{возб}1}$ . Если измеряют интенсивность флуоресценции флуорофора  $\Phi_1$  ( $\lambda_{\text{эмис}1}$ ), то при увеличении концентрации искомого антигена она снижается. При измерении флуоресценции флуорофора  $\Phi_2$  ( $\lambda_{\text{эмис}2}$ ) она будет расти с возрастанием количества антигена в пробе.

Данный метод анализа широко применяют для определения дигоксина (кардиотоническое и антиаритмическое лекарственное средство) с использованием фикоэритрина и флуоресцеина в качестве флуорофоров (предел обнаружения составляет 0,5 мкг/мл).

Примерами флуорофоров, которые имеют перекрывающиеся спектры эмиссии и поглощения, являются флуоресцеин ( $\lambda_{\text{возб}}$  495,  $\lambda_{\text{эмис}}$  520 нм), эозин (2,4,5,7-тетрабромфлуоресцеин) ( $\lambda_{\text{возб}}$  520,  $\lambda_{\text{эмис}}$  545 нм) и тетраметилродамин ( $\lambda_{\text{возб}}$  520,  $\lambda_{\text{эмис}}$  550 нм).

Методы, основанные на резонансном переносе энергии, используют также и в гомогенном ФИА для определения различных гаптенов.

**ФИА с временным разрешением.** Потенциальная чувствительность флуоресцентных методов высока, но на практике она лимитируется сигналом фона, который может возникать из-за светорассеяния, свойственного биологическим объектам, или наличия в растворе других флуорофоров. Присутствие фоновой флуоресценции приводит к низкому отношению сигнал/фон, что снижает чувствительность определения сигнала.

При анализе сложных биологических проб методом ФИА могут возникнуть проблемы, обусловленные естественной флуоресценцией биологических молекул. Спектры биологической автофлуоресценции охватывают большую часть видимого диапазона, перекрываясь со спектрами флуоресценции многих органических флуорофоров. Так, белки, содержащие остатки триптофана, фенилаланина и тирозина, флуоресцируют в области 320–350 нм. Времена затухания флуоресценции, например остатков триптофана, лежат в диапазоне 1–6 нс. Определенный вклад в фоновый сигнал вносят производные пиридина. Так, восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) сильно флуоресцирует, максимумы его поглощения и испускания находятся при 340 и 450 нм соответственно, время затухания флуоресценции составляет примерно 0,4 нс. Окисленный НАД не люминесцирует. Рибофлавин, флавиномононуклеотид (FMN) и флавинадениндинуклеотид (FAD) поглощают свет в видимой области при 450 нм и испускают при 515 нм. Типичные времена затухания флуоресценции для FMN и FAD составляют 4,7 и 2,3 нс соответственно. Различные витамины (пиридоксали, фолиевая кислота, ее производные и др.) обладают флуоресценцией в синей и желто-зеленой областях спектра (например, витамин А люминесцирует при 480 нм).

Помимо автофлуоресценции биологических молекул, фоновую флуоресценцию могут усиливать соединения, используемые для предобработки тканей, например формальдегид. Флуоресценция формальдегида, вызываемая формированием ароматических колец в результате реакции конденсации с аминами, имеет максимумы возбуждения в области 355–435 нм и испускания – 420–470 нм, вследствие чего биокомпоненты (например, коллаген, эритроциты и др.) становятся особенно яркими. Кроме того, собственной флуоресценцией обладают некоторые вспомогательные материалы, например, полистирол планшетов – короткоживущей флуоресценцией, нитроцеллюлоза обнаруживает значительный долгоживущий фоновый сигнал.

Для устранения влияния фонового сигнала в анализе был разработан ФИА с временным разрешением, базирующийся на использовании в качестве флуорохромных меток хелатов лантанидов ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ).

Лантаниды (редкоземельные металлы) образуют координационные соединения с легко изменяемыми степенями окисления от +1 до +7 (наиболее характерны для них трехвалентные ионы). Благодаря заполнению электронами внутренней 4*f*-оболочки от La(0) до Lu(14) лантаниды обладают различной способностью к поглощению и излучению света. У элементов этой группы происходит постепенное заполнение 4*f*-орбитали, которая эффективно экранирована от внешних воздействий 5*s*- и 5*p*-орбиталями. Флуоресценция лантанидов происходит благодаря *df*-переходам электронов. Такие переходы являются запрещенными по правилу Лапорта, вследствие чего лантаниды обладают низким коэффициентом экстинкции ( $1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и большим значением времени затухания флуоресценции.

В целом комплексы лантанидов металлов имеют уникальные люминесцентные свойства: значительное разнесение полос возбуждения и флуоресценции (сдвиг Стокса,  $> 100$  нм), широкую полосу возбуждения и узкую полосу эмиссии ( $\sim 14$  нм), длительное время жизни флуоресценции (порядка микро- и миллисекунд). Для иона тербия характерны полосы флуоресценции с максимумами при 490, 545, 585 и 620 нм. Для иона европия наблюдается три полосы испускания флуоресценции с максимумами при 580, 617 и 690 нм. Время жизни иона Tb<sup>3+</sup> составляет 100–1500 мкс, Eu<sup>3+</sup> – 300–1500 мкс.

Временная задержка при регистрации флуоресценции комплексов лантанидов, которая длится микросекунды, позволяет исключить влияние фоновой биологической флуоресценции, находящейся в наносекундном диапазоне. Следствием этого является существенное увеличение отношения сигнал/фон и повышение чувствительности анализа.

Как упоминалось выше, лантаниды обладают очень низким по значению коэффициентом экстинкции ( $1 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), которое в  $10^4$ – $10^5$  раз меньше коэффициента экстинкции традиционно используемых органических флуорофоров. Поэтому для возбуждения флуоресценции лантанидов требуется либо прямое возбуждение лазером, обладающим большой мощностью, либо перенос энергии от сенсibilизатора. В качестве последних могут выступать органические молекулы. Такие свойства лантанидов обусловили разработку и использование в ФИА с временным разрешением трифункциональных меток для маркирования иммунореагентов.

Трифункциональная метка содержит одновременно хелатирующую часть, формирующую стабильный комплекс с ионами лантанида; хромофорную группу, действующую как эффективный сенсibilизатор; активную функциональную группу для ковалентного связывания с антигенами (антителами). Примером такой метки может служить комплексон состава АБТФА–ДТПА–Eu<sup>3+</sup>, в котором диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА) – высокоэффективная хелатирующая часть. А 4-аминобензоилтрифторацетон гидрохлорид (АБТФА) – эффективный сенсibilизатор флуоресценции европия, поглощающий энергию света и передающий ее на ион металла (внутримолекулярная конверсия).

Для регистрации микросекундной флуоресценции лантанидов используют флуоресцентную спектроскопию с временным разрешением, позволяющую регистрировать спектры испускания через определенные времена задержки (200–300 мкс) после возбуждения короткими импульсами света ( $< 1$  нс). Это дает возможность эффективно подавить короткоживущее фоновое излучение и повысить чувствительность регистрации сигнала.

Если смесь коротко- и долгоживущих флуорофоров (например, в биопробу введен меченный лантанидным комплексом гаптен) подвергнуть воздействию коротких импульсов света, возбужденные молекулы испускают флуоресценцию, время жизни которой малое и большое соответственно. В обоих случаях флуоресценция снижается со временем экспоненциально, но короткоживущая флуоресценция падает практически до нуля очень быстро (рис. 6.19). Если измерения эмиссии выполнить через 200 мкс, например между 200 и 600 мкс, то будет измерена только долгоживущая флуоресценция. Таким образом, фоновый сигнал и сигнал рассеянного света исключаются из определяемого значения флуоресценции метки.

Первая работающая система ФИА с использованием комплексов лантанидов была реализована Э. Соини в 1979 г. – диссоциативный усиленный лантанидный иммуноанализ (англ. dissociative enhanced lanthanide fluorescence immunoassay

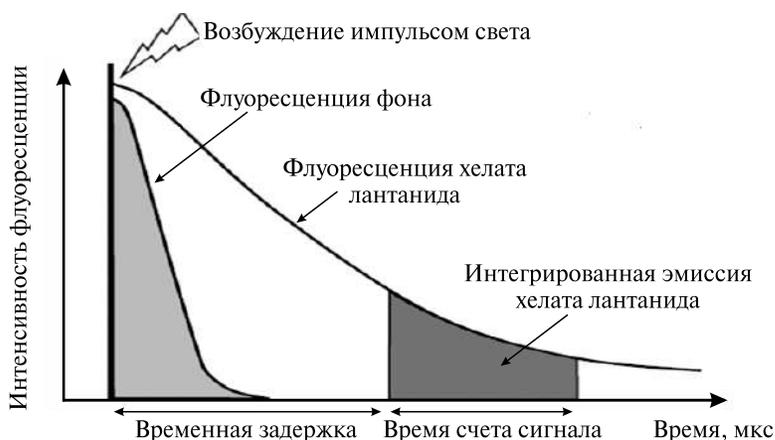


Рис. 6.19. Флуоресценция биопробы, в которую добавлен гаптен, меченный лантанидным комплексом

(DELFLIA)), где в качестве флуоресцентных меток были использованы ионы  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Tb}^{3+}$ . Позднее на основе синтетических лигандов были разработаны другие технологии лантанидного анализа.

В методе DELFLIA ионы лантанидов связываются с белком через производные полиаминополикарбоновых кислот (ПАПК) (например, ЭДТА, ДТПА), содержащих функциональные группы для ковалентного связывания. К таким производным относятся изотиоцианатофенил-ДТПА, циклические диангидриды ДТПА и ЭДТА. Производные ПАПК известны как эффективные хелатирующие агенты лантанидов. Они обладают максимальными константами связывания с лантанидами ( $10^{16} - 10^{22}$ ). Для регистрации флуоресценции используют усиливающую систему, в которой первоначально при кислых значениях pH ( $3 \div 3,3$ ) разрушаются связи с ПАПК. Затем в избытке сенсibilизатора флуоресценции ( $\beta$ -дикетона) и в присутствии ПАВ и синергетических агентов, удаляющих молекулы воды из сольватной оболочки лантанида, формируются флуоресцирующие комплексы (например,  $\beta$ -дикетонат-2-нафтоилтрифторацетон-триоктилфосфиноксиды).

Метод DELFLIA имеет низкий предел обнаружения (в области фемто-г), более чувствителен (по меньшей мере в 10 раз), чем широко используемый колориметрический гетерогенный иммуоферментный анализ. Флуоресцентный сигнал лантанидных меток высокий и стабильный, что дает возможность повторно измерять сигнал проб даже спустя месяцы хранения.

ФИА с временным разрешением может выполняться не только в гетерогенном, но и гомогенном формате.

### 6.7.2. Гомогенный ФИА

Флуорохроммеченые реагенты широко используют для разработки гомогенных методов иммуноанализа, базирующихся на том, что сигнал метки свободного меченого иммунореагента сильно изменяется при его связывании в иммунокомплекс. Для данных методов анализ осуществляется в однофазной системе, не требуется механического разделения образовавшихся иммунокомплексов от остальных реа-

гентов. Быстрота и простота гомогенных методов позволяют использовать их для массового скрининга различных проб, например экологических образцов – воды, почвы, продуктов питания и др.

Существуют различные методики выполнения гомогенного ФИА. Как указывалось выше, для разработки гомогенных методов ФИА могут быть использованы флуоресценция с временным разрешением и флуоресценция с переносом энергии. Ниже приведены методы, базирующиеся на тушении и поляризации флуоресценции.

**Иммуноанализ с непрямым тушением флуоресценции.** Данный метод базируется на использовании меченого флуорохромом антигена ( $Ag-Ф^*$ ) и вторичного антитела, полученного к *флуоресцентной метке* ( $At_Ф$ ). Вторичное антитело с низкой аффинностью реагирует с  $Ag-Ф^*$  с образованием комплекса  $Ag-Ф^*-At_Ф$ . Анализ проводят с применением конкурентного связывания, и специфическое первичное антитело используется в недостатке.

На первой стадии анализа целевой антиген инкубируется с меченым антигеном и специфическим первичным антителом, на второй – в реакционную смесь вводят вторичное антитело (рис. 6.20).

1-я стадия:



2-я стадия:

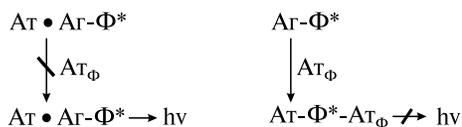


Рис. 6.20. Схема иммуноанализа с непрямым тушением флуоресценции

Вследствие стерических препятствий вторичное антитело может связываться с меченым антигеном только в случае, если последний присутствует в растворе в свободном виде. В результате их связывания в комплекс  $Ag-Ф^*-At_Ф$  флуоресценция метки  $Ag-Ф^*$  тушится. Рост количества целевого антигена в пробе приводит к увеличению концентрации свободного меченого антигена и, следовательно, к снижению сигнала флуоресценции в пробе.

Данный метод используют для определения лактогена плаценты и альбумина плазмы человека. Методика базируется на использовании антигена, меченого флуоресцеином, и вторичного анти-флуоресцеин-антитела.

**Флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА).** Этот метод (англ. fluorescence polarization immuno-assay (FPIA)) основан на конкуренции искомого антигена и антигена, меченого флуорофором, за ограниченное число центров связывания специфических антител и измерении степени поляризации флуоресценции реакционной смеси. Изменение в поляризации флуоресценции флуорофора-метки ( $Ф$ ) отражает ассоциацию или диссоциации между антителом и антигеном. Поляризация флуорофора, связанного со свободным антигеном ( $Ag-Ф$ ), отличается от поляризации флуорофора в комплексе  $At \cdot Ag-Ф$ , когда они подвергнуты воздействию поляризованного света.

Впервые ФПИА был выполнен В. Дандликером и соавторами в 1961 г. Первый автоматический анализатор для ФПИА был разработан Р. Спенсером в 1973 г.

Первым клиническим применением ФПИА было измерение гентамицина (Watson, 1976). В качестве метки использовался флуоресцеин изотиокарбонат.

Электромагнитное излучение представляет собой поперечные колебания электрического и магнитного векторов во взаимно перпендикулярных плоскостях. В обычном деполаризованном свете существует множество хаотично расположенных плоскостей колебания векторов. Поляризованный свет состоит из электромагнитных волн, в которых электрические поля колеблются строго в одном направлении перпендикулярно к направлению распространения света (т. е. колебания электрического вектора  $\vec{E}$  происходят в одной определенной плоскости). Поляризация света связана с ориентацией молекул в растворе. Флуоресцентная молекула при возбуждении поляризованным светом будет излучать флуоресценцию с поляризацией, определяемой главным образом посредством вращательного движения молекулы. Поскольку вращение молекул обратно пропорционально молекулярному объему, то поляризация, в свою очередь, связана с размером молекулы. Степень уменьшения корреляции между поляризацией поглощенного и испускаемого света зависит от соотношения характерных времен изменения пространственной ориентации флуорофора и флуоресценции.

Небольшие флуоресцентные молекулы в водной среде вращаются очень быстро (частота вращения  $10^{-10}$  с), время вращения меньше их времени жизни в возбужденном состоянии ( $10^{-9}$  с). В результате между поглощением поляризованного света и эмиссией малые молекулы равновероятно принимают любую ориентацию, что приводит к полной деполаризации сигнала эмиссии. Деполаризация флуоресценции является следствием того, что в результате вращения молекулы вектор электронного перехода меняет свое направление за время от момента возбуждения до момента испускания молекулой кванта света (т. е. за время жизни возбужденного состояния молекулы). Большие молекулы и при эмиссии частично сохраняют ту же молекулярную ориентацию, которую они имели при поглощении света, поэтому их флуоресценция поляризована. Если малые флуоресцентные молекулы ассоциированы в молекулярный комплекс, например  $At \bullet Ag\text{-}\Phi$ , то степень поляризации флуоресценции возрастает. Таким образом, изменения в поляризации флуоресценции могут отражать ассоциацию или диссоциации между молекулами.

В ФПИА после добавления специфических антител и меченых антигенов в пробу реакцию смесь облучают поляризованным светом. Когда поляризованный свет поглощается небольшой молекулой  $Ag\text{-}\Phi$ , она способна очень быстро вращаться (изменять ориентацию) в растворе до излучения флуоресценции (рис. 6.21). Свет, испускаемый такой молекулой, будет иметь очень низкое значение поляризации. Связывание  $Ag\text{-}\Phi$  с антителами в комплекс  $At \bullet Ag\text{-}\Phi$  препятствует вращению флуорофора в пространстве. Тогда за время, прошедшее между поглощением возбуждающего света и его испусканием, молекула флуорофора не изменяет своего положения в пространстве, и, как следствие, свет флуоресценции будет поляризован.

Поляризация флуоресценции флуорофора в конъюгате невелика и значительно возрастает при образовании иммунокомплекса. Чем выше концентрация определяемого антигена в пробе, тем большее количество меченого антигена будет находиться в свободном состоянии в реакционной смеси. Поэтому поляризация флуоресценции реакционной смеси будет снижаться. И наоборот, чем ниже уровень анализа в пробе, тем выше сигнал (поляризованный свет). Техника ФПИА подходит для анализа низкомолекулярных антигенов ( $\leq 20$  кДа).

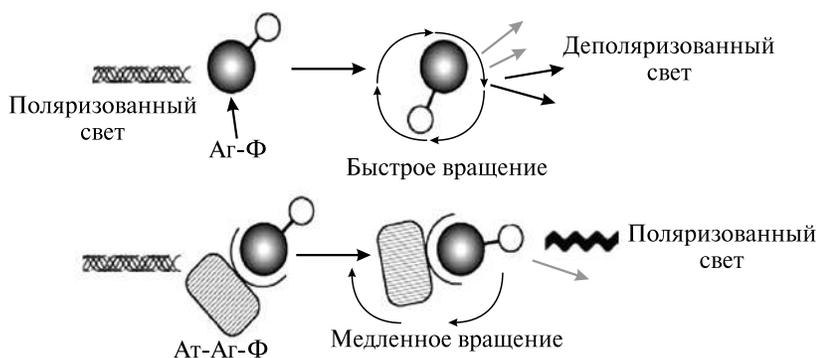


Рис. 6.21. Поляризация флуорофора (Ф), связанного со свободным антигеном (Аг-Ф) и в иммунокомплексе (Ат • Аг-Ф)

Измерение поляризации флуоресценции проводят на специальных автоматизированных ридерах. Флуоресцирующий раствор возбуждают светом, поляризованным в вертикальной плоскости, а эмиссию флуоресценции измеряют в перпендикулярном по отношению к лучу возбуждения направлении с помощью второго поляризатора, у которого плоскость поляризации может быть расположена или вертикально, или горизонтально.

ФПИА широко применяется для контроля за качеством лекарственных средств, продуктов питания и сточных вод. Особенно актуальным ФПИА стал в определении различных пестицидов, при этом предел обнаружения может достигать 1 нг/мл. ФПИА является одним из наиболее чувствительных иммунных методов количественного определения наркотических средств в биожидкостях.

## 6.8. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) появился в середине 1960-х гг. и первоначально был разработан как метод для идентификации антигенов в гистологических препаратах, а также для визуализации линий иммунопреципитации в методах иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза. Он представляет собой анализ, в котором для маркирования иммунореагентов используют молекулы ферментов.

Принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток обусловлена тем, что ферменты являются высокоэффективными катализаторами. Одна молекула фермента способна катализировать превращение большого числа молекул субстрата, следовательно, ферменты в ничтожных количествах могут эффективно осуществлять наработку легкодетектируемого продукта. Это позволяет определять ферментную метку в очень низких концентрациях ( $10^{-12}$  моль/л и ниже до  $10^{-18}$  моль/л). Благодаря таким каталитическим свойствам ферментов ИФА обладает низким пределом обнаружения, сравнимым с РИА.

В ИФА сочетается уникальная специфичность иммунохимического анализа с высокой чувствительностью выявления ферментной метки. В целом чувствительность ИФА и время его проведения определяются несколькими основными факторами: аффинностью антител, соотношением реагентов, активностью фер-

мента и разрешающей способностью метода детекции сигнала. Методы ИФА различаются по своей чувствительности, отдельные варианты позволяют выявлять в образце единичные молекулы. Средняя чувствительность ИФА такова, что позволяет определить вещества в концентрациях  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М или белка в микро- и нанограммах в 1 мл пробы.

Возможность увеличения чувствительности ИФА ограничивается фоном, обусловленным используемыми реактивами, растворителями и компонентами проб, субстратной специфичностью ферментов и аффинностью антител. Ограничению использования ИФА способствует наличие в тестируемых образцах кофакторов, ингибиторов и стимуляторов активности ферментов. Конъюгирование фермента с молекулами иммунореагента также может привести к существенному снижению его каталитической активности.

Для увеличения чувствительности различных вариантов ИФА используют системы усиления сигнала, в основу которых может быть положено взаимодействие «авидин – биотин», хемилюминисцентные реакции, ферментативные каскадные системы.

В ИФА ферментная метка может быть введена как в молекулу антигена, так и в молекулу антитела. Измеряют активность фермента ( $E$ ) в форме свободного меченого конъюгата ( $Ag-E$ ,  $Ag-E$ ) или связанного в иммунокомплекс ( $Ag \bullet Ag-E$ ).

*Ферменты*, используемые в ИФА в качестве маркеров, должны обладать следующими свойствами:

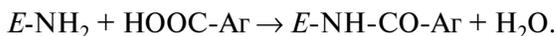
- высокая удельная каталитическая активность (позволяет обнаружить фермент в крайне низких концентрациях);
- стабильность в условиях анализа;
- сохранение каталитической активности после химической модификации при получении конъюгатов;
- простота и чувствительность метода определения продуктов ферментативной реакции;
- возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

*Выбор субстрата* в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом. Ферментные субстраты не должны взаимодействовать с компонентами реакции и изначально отсутствовать в пробе. Субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения. Как правило, при проведении ИФА применяют высокую концентрацию субстрата (фермент насыщен субстратом). Чаще используют хромогенные субстраты, которые, разрушаясь, образуют окрашенное вещество. Перспективным является применение высокоэнергетических субстратов – флуоресцентных, хемилюминесцентных. Это позволяет теоретически повысить чувствительность ИФА на два порядка. Ферментативную активность определяют кинетическими методами (непрерывный или стоп-тест).

В настоящее время в ИФА используют около 15 различных ферментов. Первыми ферментами, которые применили в качестве меток для иммунореагентов, были пероксидаза хрена (S. Avrameas, J. Uriel, 1966; P. K. Nakane, G. B. Pierce, 1967) и щелочная фосфатаза (D. Y. Mason, R. Sammons, 1978). Данные ферменты, а также  $\beta$ -D-галактозидаза наиболее распространены в гетерогенных методах ИФА.

*Конъюгирование* фермента с антителом (или антигеном) может осуществляться химическими, иммунохимическими и генно-инженерными методами. Химичес-

кие методы базируются на ковалентном присоединении фермента. Ковалентное связывание может осуществляться непосредственно при участии реакционно-способных групп молекул ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$ ) либо с помощью сшивающих бифункциональных реагентов (например, глутаровый альдегид, *n*-бензохинон):



При этом могут образовываться конъюгаты различных размеров с пониженной ферментативной активностью (15–60 % от изначальной). Конъюгат больших размеров способен стерически затруднять определение анализируемого вещества.

Функциональные группы ферментов могут быть трансформированы в более реакционно-способные (т. е. активированные) для облегчения сшивки молекул в мягких условиях, необходимых для предотвращения денатурации белков. Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов, основанный на окислении углеводного компонента фермента. Например, гидроксигруппы в углеводном компоненте пероксидазы хрена окисляют с помощью периодата натрия до альдегидных, через которые затем идет присоединение молекул антигена (антитела) при участии их аминогрупп с образованием оснований Шиффа:



При этом связывание пероксидазы в конъюгат достигает 70–90 % от начального количества фермента.

Иммунохимические методы иммобилизации базируются на биоспецифических взаимодействиях. В основе таких методов может лежать реакция витамина биотина с белком авидином. Если ковалентно присоединить биотин к антигену, а авидин – к ферменту (или наоборот), то после смешивания таких реагентов образуется комплекс Ag-биотин-авидин-*E*.

Иммунологические способы получения меченных ферментами иммунореагентов могут основываться на применении антител и их составляющих в качестве сшивающих звеньев. Для сшивки антигена с ферментом используют метод гибридных антител, состоящий из нескольких этапов. Изначально получают специфические антитела к антигену и ферменту. Эту смесь антител обрабатывают с помощью фермента пепсина для отделения двувалентных  $(F_{ab})_2$ -фрагментов. Последние, в свою очередь, разъединяют на два одновалентных  $F_{ab}$ -фрагмента путем восстановления соединяющих их дисульфидных связей меркаптоэтанолом. На втором этапе (после удаления меркаптоэтанола методом диализа) происходит реассоциация одновалентных  $F_{ab}$ -фрагментов с образованием гибридных  $(F_{ab})_2$ -фрагментов, одна часть которых связывает антиген, а вторая – фермент. Таким образом фермент и антиген связываются в единый комплекс, т. е. образуется меченный ферментом антиген.

Генно-инженерный метод получения меченого антигена основан на синтезе гибридных белков с помощью микроорганизмов. Например, с помощью трансгенных *E. coli* были получены белки, содержащие полную аминокислотную последовательность бактериальной β-галактозидазы и специфическую последовательность белка от вируса иммунодефицита человека или вируса гриппа В.

В целом надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами:

- высокий антительный титр и высокая аффинность к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении и таким образом уменьшить неспецифическое связывание;

- достаточная специфичность в рабочем разведении;
- преобладание мономерных форм над полимерными, так как последние имеют тенденцию к неспецифической адгезии на пластике, что приводит к высокому фоновому уровню реакции;
- оптимальное молярное соотношение между ферментом и антителами (около 1 : 1);
- достаточная ферментативная активность конъюгата, что определяется главным образом условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате.

В настоящее время ИФА находит широкое практическое применение в медицине, сельском хозяйстве, промышленной биотехнологии и экологии. ИФА используют в фундаментальных исследованиях в области биохимии, клеточной физиологии и иммунологии, микробиологии, вирусологии и онкологии.

Разнообразие объектов исследования от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, а также необычайно широкий круг задач, связанных с многообразием условий применения ИФА, обусловил разработку чрезвычайно большого количества вариантов этого метода. Однако в целом все методы ИФА подразделяются на гомогенные и гетерогенные.

### 6.8.1. Гетерогенные методы иммуноферментного анализа

Для гетерогенных методов является обязательной стадия отделения фракций связавшегося меченого реагента ( $Ag \bullet At-E$ ,  $At \bullet Ag-E$ ) от несвязавшихся, свободных компонентов ( $At-E$ ,  $Ag-E$ ). Наибольшее распространение среди различных вариантов ИФА получил гетерогенный твердофазный иммунный анализ (англ. enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)). Суть метода заключается в том, что один из иммунореагентов иммобилизован на твердой подложке, в результате образование иммунокомплекса происходит на твердой фазе (фиксация), что упрощает его последующее отделение от остальных реагентов. Начало твердофазному ИФА положили Е. Энгвалл и Р. Пэлман, К. ван Веeman и Э. Шурс (Е. Engvall, Р. Perlmann, 1971; К. van Weemen, А. Schuurs, 1971).

Особую значимость для широкого внедрения твердофазного ИФА в практику имела разработка в качестве носителей для сорбционной иммобилизации иммунореагентов специальных полистирольных плат (планшетов), содержащих 96 лунок. Факт сорбции антител на поверхности полистирола был установлен в середине 1960-х гг. и использован первоначально в методах РИА. Введение в практику ИФА полистирольных планшетов дало возможность значительно увеличить число проводимых анализов и упростить методическую процедуру его выполнения. Были сконструированы специальные приборы, позволяющие автоматизировать стадии добавления реагентов и промывки, а также осуществлять одновременную регистрацию каталитической активности фермента-метки в каждой из лунок планшета.

Кроме полистироловых плат в качестве твердой фазы широко используют планшеты, дно лунок которых покрыто различными мембранами. Иммобилизация антител (антигенов-белков) на таких твердых поверхностях происходит в результате физической адсорбции. Пассивная адсорбция идет по принципу насы-

щения и коррелирует с молекулярной массой адсорбируемого вещества. Адсорбционная поверхность мембран различного типа (нитроцеллюлоза, нейлон и др.) в 100–1000 раз выше, чем у пластика.

Твердофазный ИФА проводят в различных вариантах – неконкурентном и конкурентном. Отличительной особенностью ИФА является то, что после последнего этапа анализа проводится ферментативная реакция. Ферментная метка обеспечивает возникновение соответствующего сигнала, измеряемого каким-либо инструментальным методом (спектрофотометрический, флуориметрический, люминесцентный и т. д.), что позволяет определить скорость расхода субстрата или образования продукта.

Важный этап любого варианта твердофазного анализа – стадия отмытки от несвязавшихся реагентов. Важно не просто сполоснуть фиксированные на твердой фазе компоненты, а удалить реагенты из всей глубины слоя. Это наиболее длительные и трудоемкие этапы анализа. Промывание проб может производиться в автоматическом режиме с помощью специального прибора – вошера – или вручную, многоканальной пипеткой.

В качестве примера *неконкурентного* твердофазного ИФА рассмотрим схему определения поливалентных антигенов (белков) по «сэндвич»-методу. Метод основан на использовании пары антител различной антигенной специфичности, одно из которых иммобилизовано на поверхности твердого носителя (лунки планшета), а второе конъюгировано с ферментной меткой (например, пероксидазой хрена). Анализ проводят следующим образом. Немеченые антитела (моноклональные или аффинно-очищенные поликлональные) сорбируют на стенки лунок полистирольного планшета, избыток антител смывают буферным раствором. Оставшиеся незанятыми участки связывания на поверхности полистирола блокируют добавлением нейтрального белка (пластинка инкубируется с блокирующим буфером 1 ч при 37 °С), поверхность вновь отмывают. Далее в лунки с сорбированными антителами вносят образец (5–100 мкл), содержащий антиген в неизвестной концентрации, и инкубируют определенное время (1–4 ч от 4 до 37 °С). Параллельно ставят положительный контрольный образец, который обязательно включает в себя искомым антиген, и отрицательный контрольный образец, заведомо не содержащий исследуемый антиген, в различных разведениях. Анализируемый антиген вступает в реакцию с иммобилизованными антителами и образует комплекс Ат • Аг на поверхности лунок. Планшет отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют вторые меченные ферментом антитела (Ат-Е), которые связываются с иммунокомплексом с образованием «сэндвича» (Ат • Аг • Ат-Е). После инкубации и удаления избытка конъюгата в лунки добавляют субстрат и определяют ферментативную активность (рис. 6.22).

Преимущество этого метода – большая селективность и высокая чувствительность, превосходящая возможности других схем ИФА. Недостатком метода является то, что по отношению к одному Аг нужна пара специфических Ат.

Если фермент катализирует превращение неокрашенного соединения в окрашенную форму, то количество находящегося в пробе антигена определяют по интенсивности окрашивания лунки. Ферментативную реакцию останавливают при достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем. Учет результатов ведут при помощи ИФА-ридера (считыватель) – специального спектрального прибора, который последовательно фотометрирует все лунки. Ре-

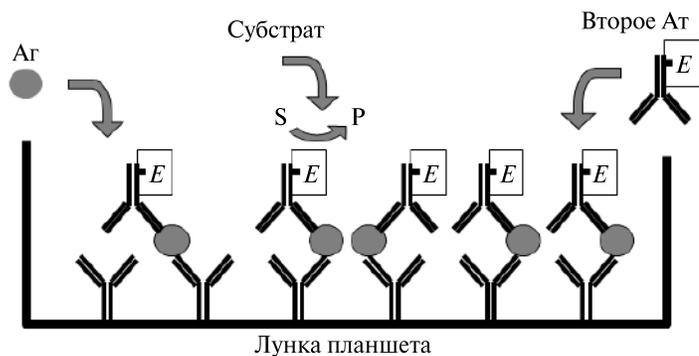


Рис. 6.22. Схема конечной стадии двустороннего твердофазного ИФА

зультаты ферментативной реакции в 96 лунках полистирольного планшета можно измерить за одну минуту.

**Конкурентный** твердофазный анализ низкомолекулярных антигенов может быть реализован по следующей схеме. К моноклональным антителам, иммобилизованным на носителе (лунки планшета), добавляют пробу с анализируемым антигеном и раствор, содержащий фиксированную концентрацию конъюгата  $Ag-E$ . Параллельно в соседних лунках ставят положительный и отрицательный контроль. Для построения калибровки используют стандартный немеченый антиген в различных разведениях. После проведения инкубации носитель отмывают от несвязавшихся свободного и меченого антигенов, на поверхностях лунок остаются иммунные комплексы ( $At \cdot Ag-E$  и  $At \cdot Ag$ ) (рис. 6.23). В лунки добавляют субстрат, инкубируют, останавливают реакцию при развитии оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем. Учет ферментативной реакции производят с помощью ИФА-ридера. В этом случае количество антигена в исследуемом образце обратно пропорционально ферментативной активности на твердой фазе.

Конкурентный метод требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и может быть легко автоматизирован.

В твердофазных методах в качестве ферментной метки наиболее часто используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу и уреазу.

Пероксидаза хрена (40 кДа) катализирует реакцию окисления хромогена (неокрашенная форма красителя) в окрашенную форму с участием гидропероксида.

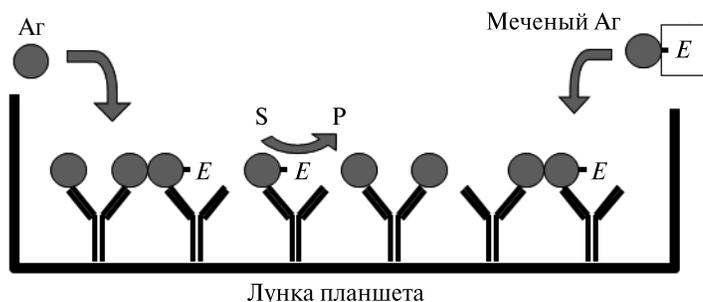


Рис. 6.23. Схема конечной стадии конкурентного твердофазного ИФА

Ферментно-катализируемое окрашивание хромогена (например, *орто*-фенилендиамин, 5-аминосалициловая кислота, пирагаллол) измеряют фотометрически, степень протекания реакции контролируют по изменению интенсивности окраски раствора с использованием калибровочной кривой. Для остановки ферментативной реакции применяют «стоп-реагент», который добавляют во все исследуемые и контрольные пробы в равных количествах. Обычно в качестве «стоп-реагента» применяют серную кислоту.

Относительная неспецифичность пероксидазы ко второму субстрату (красителю) и простота определения продуктов обусловили ее широкое применение. Пероксидаза хрена обладает высокой удельной каталитической активностью (4500 МЕ/мг при 37 °С), доступна и стабильна. К тому же для выявления пероксидазы можно использовать хемилюминесцентные реакции, при этом повышается чувствительность метода и сокращается время проведения анализа. Хемилюминесцентные реакции основаны на способности люминола люминесцировать (при 430 нм) при окислении гидропероксидом. Катализатором этого процесса выступает пероксидаза хрена. Кроме люминола используют люциферин. В этом случае интенсивность люминесценции значительно усиливается (в 10–100 раз). Люминесцентный сигнал очень стабилен, его уровень достигает максимума за 30 с. Чувствительность метода можно повысить, если в качестве субстрата пероксидазы использовать 3-(2-гидроксифенил)-пропановую кислоту, которая превращается в флуоресцирующий продукт. Известно, что чувствительность флуориметрии выше фотометрии.

Щелочная фосфатаза (100 кДа, 1000 МЕ/мг при 37 °С), катализирующая гидролиз моноэфиров *орто*-фосфорной кислоты с образованием спирта и *орто*-фосфата, наряду с пероксидазой нашла широкое применение в твердофазных методах ИФА. Например, *пара*-нитрофенилфосфат в присутствии фосфатазы превращается в пара-нитрофенол, который легко определяется фотометрически при 450 нм. В качестве субстрата может быть использован также 4-метилумбеллиферилфосфат, трансформирующийся под действием фермента в 4-метилумбеллиферон, флуоресцирующий с высоким квантовым выходом при 450 нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 365 \text{ нм}$ ). Это способствует увеличению чувствительности метода.

$\beta$ -*D*-Галактозидаза (540 кДа, 600 МЕ/мг при 37 °С) катализирует гидролиз терминальных невосстановленных остатков  $\beta$ -*D*-галактозидов в  $\beta$ -*D*-галактозу. Для тест-систем используют синтетические субстраты. Так, синтетический субстрат *орто*-нитрофенил- $\beta$ -*D*-галактозид в результате ферментативного гидролиза превращается в галактозу и *орто*-нитрофенол, легко детектируемый фотометрически. Если в качестве субстрата взять 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -*D*-галактозид, при гидролизе образуются галактоза и 4-метилумбеллиферон, регистрируемый флуориметрически.

Для повышения чувствительности твердофазного ИФА используют ферментные каскадные системы. В этом случае первый фермент, связанный с антителами, приводит к образованию восстанавливаемого субстрата для второй ферментной системы. Вторая ферментная система может быть субстрат-циклической. Ферментными метками в этом случае служат фосфоглюкоизомераза, альдолаза и щелочная фосфатаза.

Твердофазный ИФА используют для определения высоко- и низкомолекулярных соединений. Метод нашел широкое применение в различных областях меди-

цины и биологии благодаря относительной простоте и высокой чувствительности. ИФА успешно применяется для массовой диагностики инфекционных заболеваний (ВИЧ, герпес, вирусные гепатиты и др.); определения уровня пептидных и стероидных гормонов, лекарственных препаратов, онкомаркеров в биологических образцах; установления изотипов антител (IgG, IgM и др.) к конкретному антигену; скрининга моноклональных антител и др.

В целом гетерогенный ИФА достаточно продолжителен, его проведение требует 3–4 ч, поскольку на каждом этапе операции должно установиться равновесие, и лишь после этого можно провести отмывку иммуносорбента.

**Метод иммуноферментных пятен.** Твердофазный ИФА может использоваться не только для определения растворимого антигена или антитела, но и клеток, вырабатывающих различные белки. В 1983 г. технологию твердофазного ИФА адаптировали для определения *in vitro* лимфоидных клеток, секретирующих антитела или антигены (например, цитокины). Данный ИФА получил название метод иммуноферментных пятен (англ. enzyme-linked immunospot (ELISPOT)).

В настоящее время в качестве твердой фазы для проведения ELISPOT применяют планшеты для культивирования (чаще всего 96-луночные), дно которых покрыто нитроцеллюлозной мембраной. Техника проведения анализа состоит в следующем. На нитроцеллюлозе сорбируют интересующие антигены, которые служат реагентами-ловушками. Затем в лунки помещают исследуемые лимфоидные клетки и культивируют их в оптимальных для живых клеток условиях (СО<sub>2</sub>-инкубатор, оптимальная плотность посадки клеток, все необходимые метаболические добавки и т. п.), позволяя им выполнить секреторную функцию. Если какие-то клетки секретировали антитела к антигену, сорбированному на дне, то на этом дне фиксируются иммунные комплексы «антиген – антитело». Клетки удаляют из лунок (через несколько часов или суток), используя для этого отмывающий раствор (например, раствор с детергентом). Участки накопления секреторных продуктов проявляют, добавляя антииммуноглобулиновый конъюгат с ферментом и бесцветный субстрат. Фермент катализирует образование цветного продукта. В результате на дне лунок образуются окрашенные пятна в тех точках, где во время культивирования находились антителообразующие клетки. Первоначально пятна подсчитывали под микроскопом. Впоследствии было разработано несложное приборное оборудование, состоящее из миниатюрной видеокамеры, которая фиксирует изображение каждой лунки планшета и в цифровом виде отправляет эту информацию в компьютер.

Метод ELISPOT включен в международные протоколы обязательных исследований при разработках вакцин.

### **6.8.2. Гомогенные методы иммуноферментного анализа**

В 1972 г. К. Е. Рубенштейн с сотрудниками (К. Е. Rubenstein et al.) разработал новый подход, заключающийся в проведении всего иммуноферментного анализа без использования твердой фазы. Метод получил название гомогенного ИФА и был основан на учете различий каталитической активности фермента в свободном конъюгате и связанном в иммунокомплекс. В дальнейшем термин «гомоген-

ный иммуноанализ» стал применяться к любой системе иммуноанализа, в которой специфическая реакция взаимодействия антигена с антителом и определение глубины ее протекания осуществляются в гомогенном растворе.

В гомогенном ИФА все стадии анализа проходят в растворе, между ними нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от несвязавшихся компонентов. Отсутствие стадии разделения привело к сокращению времени проведения анализа до нескольких минут. Данное преимущество гомогенного ИФА дало возможность разработать диагностические иммуноферментные тест-системы для экспресс-определения биологически активных соединений. Такие тесты нашли широкое применение в токсикологии, фармакологии и эндокринологии.

Недостатками гомогенного ИФА являются меньшая чувствительность, чем у гетерогенного анализа, и возможность влияния состава анализируемого образца на результаты анализа.

Гомогенный ИФА используют для анализа низкомолекулярных субстанций (гаптенов), для определения гормонов, лекарственных препаратов, наркотических веществ и пестицидов. Существуют также модификации гомогенного ИФА для определения высокомолекулярных антигенов (альбумин, иммуноглобулины и т. д.).

Гомогенные методы ИФА преимущественно относятся к *конкурентным*, однако есть методики, которые выполняются в неконкурентном формате (например, фермент-ингибиторный гомогенный иммуноанализ).

Благодаря уникальным свойствам и структуре ферментов, а также достижениям в геной инженерии разработано большое число различных методик проведения гомогенного ИФА.

**Ферментно-мультиплицируемый иммунный тест-метод (англ. enzyme multiplied immunoassay technique (ЕМIT)).** Это один из распространенных гомогенных методов ИФА. ЕМIT-анализ основан на изменении активности ферментной метки в конъюгате при образовании иммунокомплекса и выполняется по конкурентному типу.

Существует два варианта ЕМIT-анализа. Первый базируется на том, что при комплексообразовании конъюгата с антителами возникают стерические препятствия для доступности молекул субстрата к активному центру фермента. На этом принципе был основан первый гомогенный метод ИФА, разработанный в 1972 г. Низкомолекулярный антиген связывают ковалентно с ферментом вблизи активного центра. Фермент в конъюгате обнаруживает высокую каталитическую активность, высокомолекулярный субстрат свободно связывается с ферментом и превращается в продукт. Однако если к конъюгату добавить антитело, то оно свяжется с конъюгированным антигеном и возникнут стерические препятствия для доступа субстрата к активному центру фермента (рис. 6.24). В результате интенсивность регистрируемого сигнала снижается. Такую ситуацию наблюдают в контрольных пробах, не содержащих анализируемый антиген. При наличии в пробах искомого антигена антитела будут связываться также и с ним. При увеличении концентрации определяемого антигена количество неактивного комплекса конъюгата с антителами снижается и, следовательно, возрастает интенсивность регистрируемого сигнала ферментативной реакции.

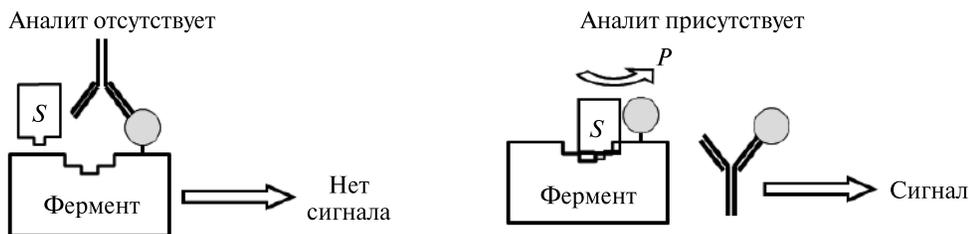


Рис. 6.24. Схема ЕМІТ-анализа

Для данного варианта ЕМІТ-анализа в качестве меток обычно используют глюкоза-6-фосфатдегидрогеназу и лизоцим. Предел обнаружения метода составляет приблизительно 1 нг/мл.

Второй вариант ЕМІТ-анализа базируется на том, что при комплексообразовании конъюгата Аг-Е с антителами в молекуле фермента происходит конформационная перестройка, затрагивающая структуру активного центра, в результате чего активность фермента сильно падает, поэтому возрастает она с увеличением свободного анализируемого антигена в пробе.

Существенным достоинством ЕМІТ-анализа является экспрессность определения, время анализа составляет 1–3 мин. Чувствительность метода достаточно высока, с его помощью можно определить вещество на уровне *пико*-молей.

Внедрение ЕМІТ-анализа в область клинической биохимии содействовало созданию высокочувствительных методов количественного определения гормонов, наркотических и лекарственных веществ в биологических жидкостях, что дало возможность изучить их фармакокинетику и метаболизм в организме.

**Субстрат-меченый ИФА (англ. enzyme-release fluorescence immunoassay).** Данный метод основан на использовании в качестве метки субстрата, превращающегося ферментативно во флуоресцентный продукт. Суть данной техники состоит в следующем. Низкомолекулярный антиген маркируют субстратом-флуорофором (Ф), который не способен флуоресцировать в конъюгате. Его флуоресценция тушится или антигеном, или в результате конъюгации. После инкубации конъюгата Аг-Ф с антителом в реакционную смесь вводят гидролитический фермент (Е), который отщепляет субстрат от конъюгата, если только последний находится в свободном виде. Расщепление связи между субстратом и антигеном не происходит, если конъюгат связался в комплекс с антителом, так как антитело препятствует доступу к активному центру фермента (рис. 6.25). Если в пробе присутствует свободный анализируемый антиген, то он будет конкурировать с конъюгатом за связывание с антителом. В результате количество свободного конъюгата

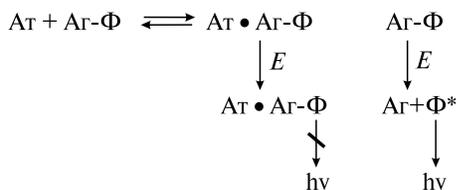


Рис. 6.25. Схема субстрат-меченого гомогенного ИФА

возрастает, следовательно, увеличивается доля ферментативно отщепленного субстрата ( $\Phi^*$ ), способного флуоресцировать в свободном виде. Так, с увеличением концентрации анализируемого антигена интенсивность флуоресцентного сигнала возрастает.

Данный метод используется в некоторых коммерческих тестах для определения фармацевтических препаратов (например, антиастматических средств и антибиотиков). Так, при определении гентамицина (антиген) в качестве метки используют  $\beta$ -галактозилумбеллиферон, который в конъюгате с гентамицином не флуоресцирует.  $\beta$ -D-Галактозидаза расщепляет связь между флуорофором и антигеном в свободном конъюгате, в результате чего образуется флуоресцирующий продукт ( $\lambda_{\text{возб}}$  400 нм,  $\lambda_{\text{эмис}}$  453 нм). Если меченый антиген связан со специфическим антителом, то стерические трудности препятствуют ферментативному отщеплению флуоресцирующего продукта. Тест позволяет определить гентамицин на уровне 1 мкг/мл сыворотки, используя пробу объемом 1 мкл.

**ИФА, основанный на использовании в качестве метки простетической группы.** Метод базируется на свойствах холоферментов, которые состоят из неактивной части (апофермента) и активной (простетической группы, обеспечивающей каталитическую активность фермента). Для маркирования антигена используют простетическую группу – флавинадениндинуклеотид (англ. flavin adenine dinucleotide (FAD)). Такой конъюгат Ag-FAD в свободном состоянии способен взаимодействовать с апоферментом (например, неактивной глюкозооксидазой, лишенной простетической группы), что приводит к образованию каталитически активной нативной формы фермента. Комплексообразование конъюгата с антителом препятствует реконструкции каталитически активного холофермента из-за стерических затруднений (рис. 6.26). Следствие этого – отсутствие регистрируемого сигнала ферментативной реакции. Такую ситуацию можно наблюдать в контрольной пробе, которая не содержит анализируемый антиген.

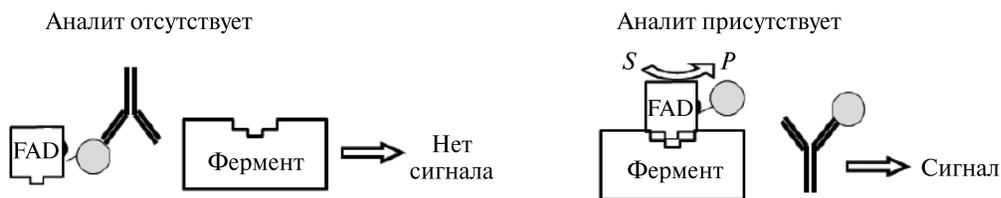


Рис. 6.26. Схема гомогенного ИФА с антигеном, меченым простетической группой

Присутствие аналита в пробе приводит к тому, что антиген-аналит конкурирует с меченым антигеном за связывание с антителом. Это способствует увеличению количества свободного конъюгата Ag-FAD и, следовательно, реконструкции активной формы фермента, которая эффективно трансформирует субстрат в продукт. В результате увеличивается интенсивность регистрируемого сигнала. Например, предел обнаружения теофелина с помощью коммерческой тест-системы, основанной на данном методе, составляет 5 нг/мл.

**ИФА, основанный на использовании клонированных доноров фермента (англ. cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA)).** Метод возник как результат развития

рекомбинантных ДНК-технологий и фундаментального понимания структуры фермента  $\beta$ -галактозидазы. Этот фермент является активным только в своей нативной тетрамерной форме. Отдельные четыре идентичные субъединицы, формирующие тетрамер, неактивны. В настоящее время известно, что отсутствие аминокислот между позициями 10 и 60 N-терминального конца  $\beta$ -галактозидазы делает невозможным образование тетрамера из субъединиц. Исходя из этих данных с помощью рекомбинантных технологий были получены два неактивных фрагмента одной субъединицы бактериальной  $\beta$ -галактозидазы – акцептор (большой фрагмент, 95 %) и донор (маленький) (рис. 6.27).

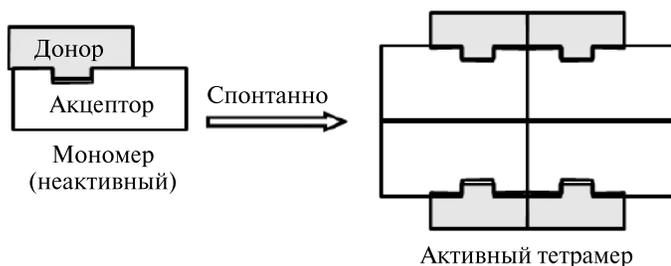


Рис. 6.27. Схема образования  $\beta$ -галактозидазы из субъединиц

Методика CEDIA-анализа состоит в следующем. Ферментный акцептор конъюгирует с антигеном. Если меченый антиген связывается с антителом, то возникают стерические препятствия для присоединения донора к акцептору и формирование активного фермента из потенциальных субъединиц невозможно (рис. 6.28). Если конъюгат остается свободным, то донор соединяется с акцептором с образованием полноценной субъединицы, которая может спонтанно комбинироваться с тремя другими. В результате образуется фермент в своей активной тетрамерной форме, способный катализировать превращение субстрата в продукт. С увеличением в пробе концентрации анализируемого антигена, конкурирующего с меченым антигеном за паратопы антитела, интенсивность регистрируемого сигнала возрастает.

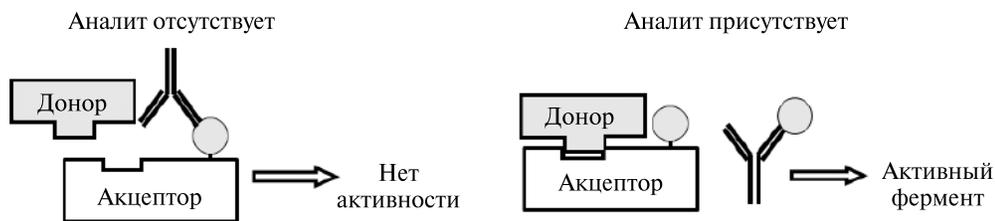


Рис. 6.28. Схема CEDIA-анализа

Коммерческие CEDIA-тест-системы используют для анализа в биожидкостях амфетаминов, барбитуратов, каннабиноидов, ЛСД, метадона, опиатов и др. Предел обнаружения метода составляет порядка 1 нг/мл сыворотки.

**Фермент-ингибиторный иммуноанализ (англ. enzyme inhibition immunoassay, (EIIIA)).** В вышеуказанных методах гомогенного ИФА все схемы анализа имеют конкурентный формат. Данный метод является неконкурентным и в качестве ме-

ченного ферментом иммунореагента используют антитело (Ат-Е). Метод применяется для определения макромолекулярных антигенов (например, ферритина). В коммерческих тестах в качестве ферментов используют  $\alpha$ -амилазу или декстраназу, которые катализируют гидролитические превращения высокомолекулярных субстратов в низкомолекулярные продукты. Метод базируется на том, что при образовании комплекса конъюгата с антигеном (Аг • Ат-Е) фермент утрачивает свою каталитическую активность. Это обусловлено тем, что высокомолекулярный антиген создает стерические препятствия для доступа субстрата к активному центру фермента. Увеличение концентрации анализируемого антигена в пробе сопровождается возрастанием количества иммунокомплекса Аг • Ат-Е и снижением регистрируемого сигнала, характеризующего каталитическую активность фермента. Предел обнаружения ферритина данным методом составляет 5 нг/мл.

## 6.9. Иммунохроматография

Иммунохроматографический анализ (ИХА) является разновидностью твердофазного иммунохимического анализа с использованием меченых иммунореагентов. ИХА проводят на узких полосках из синтетического мелкопористого материала, которые для удобства применения могут быть упакованы в индивидуальные пластиковые кассеты или закреплены на пластиковой подложке. Иммунохроматографические тест-системы (тест-полоски (стрип-тесты), англ. strip – полоса) относятся к гетерогенным аналитическим системам. В англоязычной литературе ИХА получил название lateral flow immunoassays (LFIA).

Первые разработки иммунохроматографических тест-систем появились в конце 1980-х гг. и были ориентированы на клиническую диагностику. Сегодня они широко используются в медицине, ветеринарии, криминалистике, биотехнологии для контроля качества продуктов питания, сельскохозяйственного и экологического мониторинга, а также в таких новых областях, как молекулярная диагностика и тераностика. Тераностика (theranostics, греч. therapeia) – лечение и (diag)nostikos – способный распознавать) – новый подход в медицине, заключающийся в создании препаратов, которые способны одновременно выполнять несколько задач: лечение и раннюю диагностику.

Иммунохроматографические тест-системы – наиболее успешно коммерциализованный класс внелабораторных тестов. Тест-полоски для выявления беременности, контроля употребления психоактивных соединений, диагностики инфекционных заболеваний и другие производятся десятками фирм. Так, в 2006 г. более 200 компаний в мире выпускали различные иммунохроматографические тест-системы в объеме 2,1 млрд долл. (USD).

ИХА базируется на принципах тонкослойной хроматографии и высокой специфичности взаимодействия антигенов с антителами и характеризуется экспрессностью определения веществ. Временной интервал между получением тестируемой пробы и определением в ней аналита не должен превышать 20 мин. Обычно продолжительность иммунохроматографического тестирования длится от 5 до 20 мин. Это позволяет использовать тест-системы для скрининга различных веществ (нар-

котики, фармпрепараты и др.) в биопробах. К другим достоинствам метода можно отнести следующее: методическая простота (возможность проведения анализа сразу после прочтения инструкции, без освоения каких-либо дополнительных навыков и тренировок); некоторые тесты могут длительно храниться без замораживания (один-два года); автономность (не требуются приборы, внешние источники энергии); некоторые тесты по точности сходны с лабораторным анализом. К тому же данные аналитические тест-системы являются портативными.

Недостатки ИХА:

- некоторые тесты дорогие и имеют ограниченный срок годности;
- большинство тестов дают ответ только «да/нет»;
- быстрый тест может быть менее чувствителен или менее точным в сравнении с существующими лабораторными методами.

Пределы обнаружения для иммунохроматографических тест-систем колеблются от наномолярных до микромолярных концентраций в зависимости от свойств иммунореагентов, маркера и способа детектирования. Использование портативных детекторов позволяет в отдельных случаях снизить эти пределы до пикомолярных концентраций. В последние годы активно ведутся разработки по использованию в качестве альтернативных детекторов серийных коммуникационных средств – смартфонов, мобильных телефонов, «Google»-камер.

### 6.9.1. Принцип действия иммунохимических тест-систем

Наборы реагентов для проведения ИХА созданы на основе принципов «сухой химии»: все необходимые для исследования реагенты нанесены, высушены или инкорпорированы на тест-полоски другим способом в условиях промышленного производства.

Тест-полоска представляет собой мультимембранный композит и состоит из различных участков (рис. 6.29), основными из которых являются: участок для нанесения исследуемого образца, где депонированы все необходимые реагенты, в том числе и меченые конъюгаты (зона старта); участок определения результатов исследования, где иммобилизованы специфические антитела или антигены в зависимости от схемы анализа (тестовая зона); участок контроля валидности исследования, где иммобилизованы антивидовые антитела (контрольная зона); участок для сбора всех реагентов (адсорбирующая подушка).

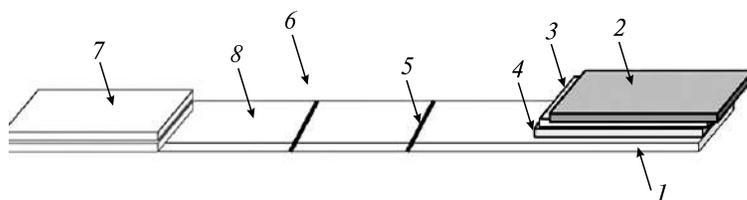


Рис. 6.29. Схема иммунохроматографической тест-полоски:

- 1 – пластиковая подложка; 2 – мембрана для пробы; 3 – мембрана для меченого конъюгата; 4 – мембрана для контроля скорости потока; 5 – тестовая зона со специфическими иммунореагентами; 6 – контрольная зона с антивидовыми антителами; 7 – впитывающая мембрана (адсорбирующая подушка); 8 – рабочая мембрана

Принцип действия иммунохроматографического теста заключается в том, что контакт жидкой пробы с полоской инициирует процессы, дающие результат (окрашивание соответствующих зон или его отсутствие) в течение нескольких минут. Исследуемый образец в жидкой форме наносится на стартовую зону тест-полоски капельным способом либо путем погружения. При этом в зоне старта происходит смачивание материала, растворение реагентов (в том числе меченых конъюгатов), взаимодействие с ними и перемещение продуктов взаимодействия вдоль полоски благодаря капиллярным силам. Здесь реализуется принцип тонкослойной хроматографии, подвижной фазой является жидкость пробы. Если в жидкости пробы присутствует исследуемый антиген, то происходит его связывание с иммунореагентами в соответствующих зонах, что означает иммунохимическое определение.

Наличие или отсутствие аналита выявляется по интенсивности окрашивания, флуоресценции или иной характеристике связанного маркера в тестовой и контрольной зонах. Результаты определяют визуально либо с помощью компьютерной обработки сканированных изображений тест-полосок. Особенностью любого иммунохроматографического теста является обязательное появление окраски в контрольной зоне независимо от присутствия аналита в пробе. Это окрашивание указывает на то, что тест-полоска находится в рабочем состоянии.

Существуют варианты иммунохроматографических тест-систем, в которых принцип «все реагенты предварительно нанесены на тест-полоску» не соблюдается. Для усиления определяемого сигнала могут использоваться дополнительные реагенты, наносимые на тест-полоску после иммунохроматографии. Возможна также предварительная инкубация одного из иммунореагентов с пробой, обеспечивающая большую глубину протекания иммунохимической реакции в гомогенных условиях по сравнению с взаимодействием при движении иммунореагентов в потоке вдоль мембран (гетерогенные условия). Эти и другие подобные им приемы усложняют тестирование, позволяя, однако, получать результаты с достаточно высокой чувствительностью.

Большинство иммунохроматографических тест-систем разработано в форматах конкурентного и прямого «сэндвич»-анализов.

**Метод прямого ИХА.** В схеме прямого двустороннего ИХА («сэндвич»-метод) в качестве меченого реагента используют моноклональные антитела, конъюгат наносят на мембрану для конъюгата (зона старта). На тестовой линии иммобилизованы поликлональные антитела, специфические к данному аналиту, а на контрольной линии – антивидовые антитела, специфические к меченым антителам.

При нанесении образца, содержащего искомым антиген, в зоне старта жидкость пробы растворяет конъюгаты ( $At^*$ ), с которыми связывается исследуемый  $Ag$  (рис. 6.30).

Меченые антитела берутся в избытке в сравнении с общим количеством антигенов. Образовавшийся меченый комплекс  $Ag \bullet At^*$  мигрирует в тест-зону под действием капиллярных сил, где связывается со специфическими антителами, формируя «сэндвич»  $At \bullet Ag \bullet At^*$ . При этом происходит изменение окраски в тест-зоне. Несвязавшиеся меченые  $At^*$  движутся дальше в контрольную зону, где  $F_c$ -фрагментами связываются с антивидовыми антителами. Окраска в контрольной зоне проявляется всегда, независимо от присутствия исследуемого антигена в пробе.

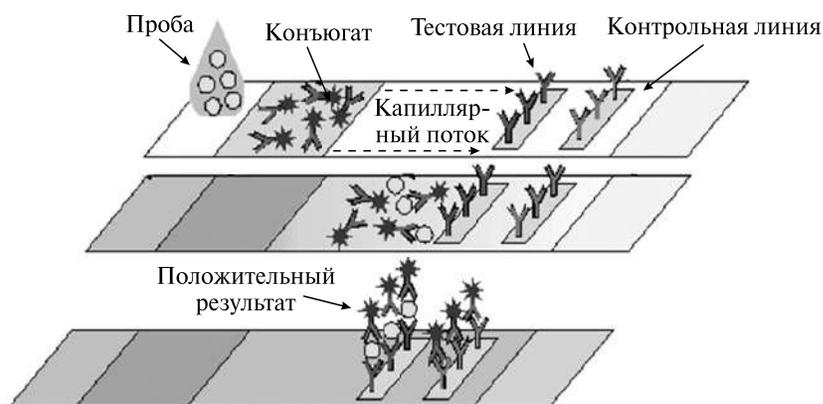


Рис. 6.30. Схема прямого ИХА

Таким образом, выявление двух окрашенных линий на тест-полоске является положительным результатом теста. При отсутствии анализата в пробе конъюгат связывается только с антивидами антителами в контрольной зоне, образуя одну окрашенную линию на тест-полоске. Достоверность тестов составляет 92–99,8 %.

Метод прямого ИХА используют для определения высокомолекулярных антигенов (вирусов, в том числе ВИЧ, гормонов, включая пептидный гормон беременности, возбудителей инфекций и др.).

**Метод конкурентного ИХА.** Метод используют для выявления низкомолекулярных соединений – гаптенных с одной детерминантой. Основан на конкуренции анализируемого и иммобилизованного антигенов за ограниченное количество центров связывания специфических антител, которые в форме конъюгата с меткой (Ат\*) расположены в зоне старта. В отличие от прямого метода конъюгаты Ат\* берутся в недостатке в сравнении с общим количеством антигена.

В схеме конкурентного ИХА на тестовой линии в отличие от прямого метода иммобилизованы антигены. Для иммобилизации низкомолекулярные антигены предварительно связывают с белком-носителем (например, овальбумином), образуя конъюгаты Аг-белок-носитель (Аг-ова). Такие конъюгаты легко адсорбируются на мембране тест-полоски за счет гидрофобных взаимодействий белка-носителя с мембраной. На контрольной линии так же, как в прямом ИХА, иммобилизованы антивидами антитела, специфические к меченым.

Если нанесенная в зоне старта проба содержит анализируемый антиген, то последний связывается с конъюгатом Ат\*. Далее иммунокомплекс Аг • Ат\* проходит тестовую зону, где иммобилизован антиген (например, в виде конъюгата Аг-Ова). Комплекс Аг • Ат\* не может связаться с этим антигеном, так как все меченые Ат заняты анализатом. Затем иммунокомплекс мигрирует в контрольную зону, где удерживается антивидами антителами. В результате отсутствие окрашенной линии в тестовой зоне свидетельствует о наличии анализата в пробе. При отсутствии антигена в пробе конъюгат Ат\* связывается с иммобилизованным антигеном в тестовой зоне. Таким образом, наличие двух окрашенных линий (тестовой и контрольной) является отрицательным результатом анализа. Если линия в контрольной зоне отсутствует, значит, анализ проведен неправильно.

Проба должна содержать избыток свободного антигена в сравнении с количеством меченых антител (Ат\*) в зоне старта, иначе некоторая доля Ат\* свяжется в тест-зоне, давая слабый сигнал и делая результат анализа неоднозначным.

Конкурентный ИХА широко используют для определения наркотиков и их метаболитов в биожидкостях (моча, слюна и др.).

## 6.9.2. Параметры иммунохроматографических тест-полосок

Разработка аналитических систем (иммунохроматографические тест-полоски) состоит из нескольких этапов. При этом важное значение имеют:

- выбор материала для производства тест-полосок;
- подбор оптимальных концентраций иммунореагентов (меченых конъюгатов, конъюгатов «антиген – белок – носитель», антивидовых антител);
- подбор детектирующего реагента, т. е. метки;
- подбор дополнительных реагентов для предобработки компонентов тест-полоски (например, блокирующего буфера), что позволяет улучшить свойства потока и тем самым обеспечить лучшую чувствительность теста.

При создании тест-систем разрабатываются также методики пробоподготовки биологических и небиологических объектов. Создают набор реагентов, который можно использовать в «полевых» условиях, без специального лабораторного оборудования. Подбирают массу (объем) образцов, объем растворителя и буфера в целях получения максимального извлечения аналита из образца и его успешного определения с помощью тест-полосок.

При апробации созданной иммунохроматографической тест-системы проводят параллельное исследование образцов независимым методом (например, ВЭЖХ).

**Мембрана для тест-полосок и ее влияние на кинетику процесса.** Для изготовления тест-полосок используют пористые полимерные мембраны. С одной стороны, мембрана должна обладать способностью связывать реагенты, с другой – обеспечивать скорость потока жидкости вдоль тест-полоски. Важными характеристиками мембраны являются размер пор, пористость и толщина, которые определяют ее поверхностную площадь.

Способность мембраны связывать белки (антитела, белки-носители) по большей части определяется площадью поверхности полимера, доступной для иммобилизации. Поверхностная площадь мембраны обычно нелинейно снижается с увеличением размера пор и нелинейно возрастает с увеличением пористости. Связывание реагентов происходит преимущественно за счет водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий. Для разных зон тест-полоски используют различные виды мембран. Так, для рабочей зоны применяют преимущественно нитроцеллюлозу, обладающую хорошей способностью связывать белки (80 мкг/см<sup>2</sup>). Она может иметь разный размер пор (0,1; 0,2; 0,45 мкм). Для связывания низкомолекулярных белков выбирают мембрану с порами 0,1 и 0,2 мкм. Для стартовой и адсорбирующей зон применяют целлюлозу, у которой более низкая способность связывать белки.

Одним из основных требований к выбору мембраны при изготовлении тест-систем является обеспечение необходимого капиллярного потока жидкости. Ско-

рость потока жидкости влияет на чувствительность, надежность и время анализа. С одной стороны, иммунохроматографический тест должен выполняться за короткое время (т. е. быть экспрессным), что обеспечивает коммерческую выгоду, с другой – нужно достаточно времени для контакта реагентов, чтобы могла произойти иммунохимическая реакция.

Скорость миграции компонентов вдоль тест-полоски определяется скоростью потока жидкости. Мембраны с низкой скоростью потока жидкости используют для понижения предела обнаружения метода. Однако тогда будет увеличиваться время анализа (до 1 ч и более). Увеличение скорости потока приводит к снижению скорости реакции и чувствительности теста, кроме того, увеличивается расход реактива, хотя при этом уменьшается время анализа. ИХА может быть выполнен менее чем за 5 мин, но при этом меченые антитела, быстро двигаясь, могут не успеть связаться с иммобилизованными иммунореагентами. В данном случае интенсивность окрашивания линий в тестовой и контрольной зонах будет недостаточной для точной интерпретации результатов. Скорость потока жидкости, которую обеспечивает мембрана (см/мин), может быть указана производителем.

Важным аспектом является то, что скорость потока жидкости вдоль тест-полоски снижается по экспоненте с увеличением расстояния от зоны старта. Этот факт используют для регулирования скорости потока при разработке тест-систем. Так, при отдалении тестовой линии от стартовой зоны скорость потока жидкости будет снижаться в тест-зоне, следовательно, эффективная концентрация иммунореагента в этой зоне будет выше. В результате чувствительность ИХА повышается.

**Детектирующий реагент в ИХА.** В качестве детектирующего реагента в ИХА, как и в других вариантах твердофазного иммунохимического анализа, служит метка в конъюгатах, т. е. соединение-маркер, которое легко определить визуально или соответствующим инструментальным методом. Иными словами, метка позволяет обнаружить образовавшийся иммунокомплекс  $Ag \bullet At^*$  или  $At \bullet Ag \bullet At^*$ .

При выборе вещества для метки важным параметром является его размер. Это обусловлено тем, что меченые реагенты должны свободно двигаться сквозь поры мембраны. Оптимальный размер конъюгата составляет 1/10 и менее от размера поры полимерной мембраны. Кроме того, метка не должна реагировать с материалом тест-полоски.

В качестве детектируемых соединений наибольшее распространение получили окрашиваемые вещества (например, наночастицы коллоидного золота или углерода, частицы окрашенного латекса), а также ферменты. Ферментативная реакция регистрируется обычно по окрашенному продукту. Использование нескольких различных окрашиваемых меток позволяет проводить мультианализ. Интенсивность цвета тестовой или контрольной линии пропорциональна концентрации аналита. Для визуализации в различных типах проб подбирают оптимальные цвета. Например, для визуализации в целой крови подходят черный или темно-синий цвет, в сыворотке – ярко-красный или ярко-синий, в моче – зеленый, синий, красный или черный, в слюне – любой темный цвет, в мозговой и спинномозговой жидкости – любой темный цвет.

В приборных вариантах ИХА в качестве метки используют люминесцентные или парамагнитные вещества.

**Выбор реагентов.** Антитела, используемые в иммунохроматографических тестах, должны обладать высокой специфичностью: сохранять активность при связывании с меткой и при адсорбции на твердую фазу, а также свою структуру при высушивании и быстро восстанавливать активность при последующей регидратации в жидкости пробы.

*Блокирующий буфер* используют для блокирования поверхности тест-полоски, незанятой иммобилизованными иммунореагентами. Это необходимо для того, чтобы избежать неспецифического связывания с мембраной мигрирующих вдоль полоски белков (антигены, меченые антитела). В некоторых случаях блокирующий буфер добавляют непосредственно в пробу для предотвращения неспецифической адсорбции аналитов в зоне старта. Блокирующий буфер может содержать нейтральные белки (альбумин, казеин) и полимеры (полиэтиленгликоль, поливинилацетат), которые связываются с рабочей нитроцеллюлозной мембраной и препятствуют взаимодействию с ней мигрирующих иммунореагентов. Кроме того, для блокирования применяют формамид и мочевины, образующие водородные связи с мембраной, или твин и тритон (англ. Tween, Triton), адсорбирующиеся за счет гидрофобных взаимодействий.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аналитическая химия : в 3 т. / под ред. Л. Н. Москвина. – М. : Академия, 2008. – 210. – Т. 1. – 299 с.; Т. 2. – 574 с.; Т. 3. – 364 с.
- Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : в 2 т. / под ред. А. А. Ищенко. – М. : Академия, 2012–2014. – Т. 1. – 2012. – 352 с.; Т. 2. – 2014. – 416 с.
- Беккер, Ю.* Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. – М. : Техносфера, 2009. – 473 с.
- Беленький, Б. Г.* Высокоэффективный капиллярный электрофорез / Б. Г. Беленький. – СПб. : Наука, 2009. – 320 с.
- Варфоломеев, С. Д.* Химическая энзимология / С. Д. Варфоломеев. – М. : Академия, 2005. – 480 с.
- Геккелер, К.* Аналитические и препаративные лабораторные методы : пер. с нем. / К. Геккелер, Х. Экштайн. – М. : Химия, 1994. – 416 с.
- Иммобилизованные ферменты / И. В. Березин [и др.]. – М. : Высш. шк., 1987. – 167 с.
- Камышников, В. С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников – М. : МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
- Кулис, Ю. Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов / Ю. Ю. Кулис. – Вильнюс : Мокслас, 1981. – 200 с.
- Левшин, Л. В.* Оптические методы исследования молекулярных систем : в 2 ч. / Л. В. Левшин, А. М. Салецкий. – М. : МГУ, 1994. – Ч. 1 : Молекулярная спектроскопия. – 319 с.
- Михайлов, А. Т.* Методы иммунохимического анализа в биологии развития : практ. рук. / А. Т. Михайлов, В. Н. Мирский. – М. : Наука, 1991. – 288 с.
- Новые методы иммуноанализа : пер. с англ. / М. Тертон [и др.] ; под ред. А. М. Егорова. – М. : Мир, 1991. – 279 с.
- Нолтинг, Б.* Новейшие методы исследования биосистем / Б. Нолтинг. – М. : Техносфера, 2005. – 256 с.
- Основы аналитической химии : в 2 т. / под ред. Ю. А. Золотова. – М. : Академия, 2012. – Т. 1. – 384; Т. 2. – 416 с.
- Остерман, Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М. : МЦНМО, 2002. – 248 с.
- Остерман, Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л. А. Остерман. – М. : Наука, 1983. – 304 с.
- Практикум по биохимии : учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : МГУ, 1989. – 509 с.
- Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А. М. Волощука – М. : Наука, 1996. – 111 с.
- Справочник биохимика : пер. с англ. / Р. Досон [и др.]. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
- Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.] – М. : Высш. шк., 1991. – 228 с.
- Титов, В. Н.* Электрофорез белков сыворотки крови / В. Н. Титов, В. А. Амелюшкина. – М. : Оптимум Пресс, 1994. – 62 с.
- Тривен, М.* Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. – М. : Мир, 1983. – 218 с.

<b>ПРЕДИСЛОВИЕ</b> .....	3
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5

## **ГЛАВА 1 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ**

1.1. Белки .....	8
1.2. Нуклеиновые кислоты .....	14
1.3. Липиды .....	16
1.4. Полисахариды .....	17

## **ГЛАВА 2 ПРЕАНАЛИТИКА**

2.1. Цель и задачи преаналитики .....	19
2.2. Гомогенизация .....	22
2.2.1. Выбор среды гомогенизации .....	22
2.2.2. Механические методы гомогенизации .....	25
2.2.3. Немеханические методы гомогенизации .....	27
2.2.4. Стратегия и методы обработки гомогената .....	30
2.3. Центрифугирование .....	32
2.3.1. Относительное центробежное ускорение. Скорость седиментации частиц .....	32
2.3.2. Методы препаративного центрифугирования .....	36
2.4. Методы осаждения .....	42
2.5. Способы разделения компонентов с помощью мембран .....	46
2.6. Экстракционные методы разделения и концентрирования .....	50
2.6.1. Принцип экстракции .....	50
2.6.2. Экстракция в системе «жидкость – жидкость» .....	53
2.6.3. Экстракция в системе «твердая фаза – жидкость» .....	55
2.6.4. Экстракция в системах «твердая фаза – газ» и «жидкость – газ» .....	62
2.6.5. Экстракция в системе «жидкость – твердая фаза» .....	63
2.7. Препаративная колоночная хроматография .....	67
2.7.1. Принцип хроматографирования, основные понятия .....	67
2.7.2. Методы адсорбционной и распределительной жидкостной хроматографии .....	72

2.7.3. Хроматография гидрофобного взаимодействия.....	76
2.7.4. Эксклюзионная хроматография.....	78
2.7.5. Ионообменная хроматография .....	82
2.7.6. Аффинная хроматография .....	85
2.7.7. Мультидименсиональная жидкостная хроматография .....	93

### **ГЛАВА 3 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

3.1. Принцип метода. Электрофоретическая подвижность частиц .....	96
3.2. Аппаратура, пробоподготовка, гели и условия проведения гель-электрофореза .....	102
3.3. Визуализация разделенных зон и количественное определение веществ .....	111
3.4. Электрофоретические техники .....	119
3.4.1. Зонный электрофорез.....	119
3.4.2. Изотахофорез.....	124
3.4.3. Изоэлектрическое фокусирование .....	128
3.4.4. Двумерный гель-электрофорез .....	134

### **ГЛАВА 4 КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

4.1. Принцип и сущность метода.....	141
4.2. Физические основы метода.....	143
4.3. Капилляры. Ввод пробы. Детектирование .....	149
4.4. Эффективность, разрешение, селективность и чувствительность.....	154
4.4.1. Эффективность.....	154
4.4.2. Факторы, влияющие на эффективность.....	156
4.4.3. Разрешение .....	162
4.4.4. Селективность.....	163
4.4.5. Чувствительность.....	164
4.5. Варианты капиллярного электрофореза .....	167
4.5.1. Капиллярный зонный электрофорез.....	167
4.5.2. Капиллярный изотахофорез и изофокусирование.....	169
4.5.3. Аффинный капиллярный электрофорез .....	172
4.5.4. Мицеллярная электрокинетическая хроматография .....	174
4.5.5. Капиллярная электрохроматография .....	178

### **ГЛАВА 5 ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ АНАЛИЗ**

5.1. Ферменты в качестве аналитических реагентов.....	182
5.1.1. Понятие и сущность метода .....	182
5.1.2. Строение, способ и механизм действия ферментов.....	183

5.1.3. Элементы кинетики ферментативных реакций. Уравнение Михаэлиса – Ментен .....	187
5.1.4. Кинетические параметры уравнения Михаэлиса – Ментен .....	193
5.1.5. Экспериментальное определение параметров уравнения Михаэлиса – Ментен .....	195
5.1.6. Аллостерические эффекты. Многосубстратные реакции .....	197
5.2. Ферментативные эффекторы .....	200
5.2.1. Активаторы и необратимые ингибиторы .....	200
5.2.2. Обратимые ингибиторы .....	202
5.2.3. Методы определения констант ингибирования .....	210
5.3. Факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции .....	212
5.4. Активность, каталитическая константа и эффективность ферментов .....	215
5.5. Методы определения субстратов и ферментов .....	218
5.5.1. Методы определения активности ферментов .....	218
5.5.2. Методы определения субстратов .....	221
5.6. Сопряженные ферментативные реакции .....	223
5.7. Инструментальные методы регистрации аналитического сигнала в ферментативном анализе .....	230
5.7.1. Оптические методы .....	230
5.7.2. Электрохимические методы .....	243
5.7.4. Методы с применением радиоактивной метки .....	248
5.7.5. Манометрические и калориметрические методы .....	251
5.8. Имобилизованные ферменты .....	253
5.8.1. Физические методы иммобилизации ферментов .....	257
5.8.2. Методы химической иммобилизации ферментов .....	262
5.8.3. Свойства иммобилизованных ферментов .....	265

## ГЛАВА 6 ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

6.1. Характерные особенности метода .....	273
6.2. Структура и функциональные свойства антител .....	275
6.3. Свойства антигенов .....	279
6.3.1. Иммуногены .....	279
6.3.2. Гаптены .....	282
6.4. Физико-химические закономерности взаимодействия антиген – антитело .....	284
6.4.1. Аффинность антител .....	285
6.4.2. Авидность, специфичность и перекрестная реакционная способность антител .....	290
6.4.3. Реакция иммунопреципитации .....	292
6.5. Прямые методы иммуноанализа .....	294

6.5.1. Иммунодиффузия .....	295
6.5.2. Иммуноагглютинация .....	301
6.5.3. Иммуноэлектрофорез .....	302
6.5.4. Иммунотурбидиметрия и иммунонефелометрия .....	307
6.6. Иммунохимические методы с использованием меченых иммунореагентов .....	310
6.6.1. Сущность и принцип методов .....	310
6.6.2. Гомогенные и гетерогенные иммунохимические методы .....	312
6.6.3. Неконкурентный формат иммунохимического анализа .....	316
6.6.4. Конкурентный формат иммунохимического анализа .....	318
6.6.5. Математическая обработка результатов .....	320
6.6.6. Системы усиления сигнала .....	322
6.6.7. Оценка новых тест-систем для иммунохимического определения .....	323
6.6.8. Радиоиммунный анализ .....	326
6.7. Флуоресцентный иммуноанализ .....	328
6.7.1. Гетерогенный ФИА .....	329
6.7.2. Гомогенный ФИА .....	333
6.8. Иммуноферментный анализ .....	336
6.8.1. Гетерогенные методы иммуноферментного анализа .....	339
6.8.2. Гомогенные методы иммуноферментного анализа .....	343
6.9. Иммунохроматография .....	348
6.9.1. Принцип действия иммунохимических тест-систем .....	349
6.9.2. Параметры иммунохроматографических тест-полосок .....	352
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>355</b>

Учебное издание

**Юркова Ирина Леонидовна**

## **БИОАНАЛИТИКА**

### **Пособие**

Редактор *Т. А. Беланко*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*

Технический редактор *Т. К. Раманович*

Компьютерная верстка *В. Н. Васиной*

Корректоры *А. В. Лебедько, Е. В. Гордейко*

Подписано в печать 30.11.17. Формат 70×100/16. Бумага офсетная.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 29,92. Уч.-изд. л. 28,12.

Тираж 150 экз. Заказ 746.

Белорусский государственный университет.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.

Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие

«Издательский центр Белорусского государственного университета».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.