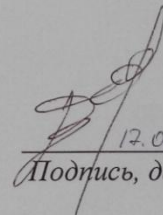
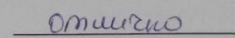


МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт медицины, экологии и физической культуры
Экологический факультет
Кафедра биологии, экологии и природопользования

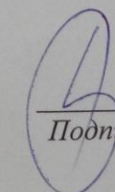
Отчет по учебной практике
по теме
«ТЕХНОЛОГИИ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ (ЭЛЕКТРОФОРЕЗ,
ХРОМАТОГРАФИЯ)»

Выполнил:
студент группы БМ-О-16/1,
направление 06.01.04 Биология (уровень магистратуры)
Белобородов Евгений Алексеевич


17.06.17.
Подпись, дата


Оценка

Руководитель практики:
к.м.н., главный врач ГУЗ УОСПК
Хапман М.Э


18.06.17.
Подпись, дата

Ульяновск, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ	
ВВЕДЕНИЕ	3
Субклеточное фракционирование	4
Гистохимические методы.....	6
Хроматографический анализ.....	7
Метод электрофореза.....	10
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	11
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	13

ВВЕДЕНИЕ

Фракционирование клеток состоит из двух последовательных стадий – гомогенизации и разделения. На стадии гомогенизации структура ткани разрушается и ткань превращается в так называемый гомогенат. На второй стадии – разделии – происходит группирование отдельных компонентов гомогената по принципу общности и физических свойств, таких, как размер и плотность.

При идеальных условиях выделенные внутриклеточные компоненты можно было бы получать в том же виде и количестве, в которых они существуют в интактных клетках, не нарушая таким образом их морфологической структуры и не изменяя их активности. Однако большинство существующих в настоящее время методов фракционирования всем этим требованиям не удовлетворяет, и при выборе того или иного метода часто приходится иметь в виду, что в ходе фракционирования за счет сохранения морфологической структуры клетки может нарушиться ее активность, и наоборот.

Выбор ткани для фракционирования определяется конкретными условиями эксперимента и объектом исследования. Ткани и клетки различных органов различаются по составу, хрупкости и плотности, что в свою очередь определяет выбор того или иного метода выделения. Печень, например, является идеальным объектом для изучения функционирования митохондрий, поскольку именно в клетках печени митохондрии содержатся в особенно больших количествах.

Клетки различных тканей гетерогенны по форме и размерам, подобная гетерогенность точно в такой же степени характерна и для выделяемых гомогенатов тканей субклеточных фракций. Различные органы животных отличаются друг от друга и по содержанию в них крови и соединительной ткани: чем больше соединительной ткани содержится в органе, тем хуже

ткань поддается гомогенизации и тем труднее выделить из нее субклеточные компоненты.

Субклеточное фракционирование

Для глубокого изучения функций любой из органелл необходимо прежде всего получить эти органеллы в относительно чистом виде, так, чтобы их препарат был как можно меньше загрязнён другими органеллами. Процесс, с помощью которого это обычно удаётся достичь, называется субклеточным фракционированием и состоит из трёх этапов: экстракции, гомогенизации, и центрифугирования. Большинство первых работ в этой области выполнено на печени крысы.

А. Экстракция. Первым шагом при выделении специфических органелл (или молекул) является их экстрагирование из клеток, в которых они находятся. Большинство органелл и многие биомолекулы (в частности, белки) весьма лабильны (неустойчивы) и легко утрачивают биологическую активность. Поэтому их нужно экстрагировать в мягких условиях (в водных растворах, избегая экстремальных значений pH , осмотического давления, а также высоких температур). Большая часть операций по выделению органелл производится при $0-4^{\circ}C$ (в холодной комнате или на льду). При комнатной температуре может наблюдаться значительное уменьшение активности, частично вследствие действия различных гидролитических ферментов (протеаз, нуклеаз, и т. д.), высвобождающихся при разрушении клеток. Обычно для экстракции органелл используют $0,25\text{ M}$ раствор сахарозы (изоосмотический раствор), содержащий ионы K^{+} и Mg^{2+} в концентрации, близкой к физиологической; pH раствора доведён до $7,4$ солянокислым трис-буфером (трис [гидроксиметил]-аминометангидрохлорид) в концентрации $0,05\text{ M}$. Этот раствор часто называют СТКМ. Не все растворители обеспечивают столь же мягкие условия экстракции, как СТКМ; например, для экстракции липидов и углеводов используют органические растворители.

Б. Гомогенизация. Для выделения органелл (или биомолекул) из клеток необходимо прежде всего разрушить клетки в мягких условиях. Удобным методом разрушения органов (печени, почки, мозга) и составляющих их клеток является гомогенизация. Для этого измельчённые фрагменты соответствующего органа помещают в стеклянный стаканчик подходящих размеров, заполненный раствором для гомогенизации (например, СТКМ), а затем пестиком (вручную или с помощью моторчика) приводят смесь во вращение. Вращение пестика с контролируемой скоростью создаёт силы вязкого трения, под действием которых клетки разрушаются и их содержимое высвобождается в раствор сахарозы. Полученную суспензию, содержащую многие интактные (неповреждённые) органеллы, называют гомогенатом.

В. Центрифугирование. В результате этой процедуры образуются три типа осадков, которые называются ядерной, митохондриальной и микросомной фракциями.

Значение субклеточного фракционирования для развития биохимии и клеточной биологии невозможно переоценить. Оно составляет одно из главных звеньев общего экспериментального подхода, с помощью которого удалось установить функции органелл, перечисленные ниже. Получение этой информации представляет одно из главных достижений биохимических исследований.

В прокариотических клетках нет отсеков, или компартментов, разделённых внутренними мембранами. Однако и у бактерий обнаруживается известная компартментализация некоторых ферментных систем. Так, большинство ферментов, участвующих в биосинтезе белка, локализуется у них в рибосомах, а некоторые ферменты биосинтеза фосфолипидов сосредоточены в клеточной мембране.

Эукариотические клетки, к которым относятся клетки высших животных и растений, грибов, высших водорослей и простейших,

значительно крупнее прокариотических и гораздо более сложно устроены. Помимо клеточной, или плазматической, мембраны в них имеется ещё и окружённое мембраной ядро, в котором находятся хромосомы. Есть и другие мембранные органеллы, а именно митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, хлоропласты клеток зелёных растений. В эукариотических клетках ферменты тех или иных метаболических путей часто локализуются в особых органеллах или компартментах.

Клеточные органеллы можно выделить из клеток и тканей центрифугированием.

Для этого животные и растительные ткани сначала подвергают щадящей гомогенизации в изотоническом растворе сахарозы. Плазматическая мембрана при таком воздействии разрушается, а различные клеточные органеллы по большей части остаются неповреждёнными. Сахароза удобна тем, что она сравнительно трудно проходит сквозь мембраны и потому не вызывает набухание таких внутриклеточных структур, как митохондрии или хлоропласты. Разные виды органелл, например ядра и митохондрии, различающиеся по своим размерам, а значит и по удельному весу, и оседающие в поле центробежных сил с разной скоростью, могут быть выделены после этого из гомогената дифференциальным центрифугированием. Затем эти ядра, митохондрии и прочие выделенные фракции используют на способность катализировать определённый метаболический процесс.

Гистохимические методы

С помощью этих методов получают информацию о локализации и активности ферментов в тканевых срезах. Ферменты выявляются солями тетразолия, диазония, нафтола и тяжелых металлов. Учитывая, что ферментный спектр лимфоцитов отражает метаболический статус любой

ткани, применяют полуколичественный цитохимический метод выявления активности ферментов крови. Например, при И.Б.С. увеличивается активность гидролитических ферментов лимфоцитов (щелочной фосфатазы) и уменьшается активность окислительно-восстановительных ферментов (СДГ, ГДГ).

Хроматографический анализ

Хроматографический метод разделения веществ, впервые осуществленный М.С. Цветом (1903), является одним из наиболее избирательных методов разделения близких по химической структуре веществ.

Хроматографическим разделением обычно называют процесс, при котором компоненты разделяемой смеси многократно распределяются между двумя несмешивающимися фазами: не-подвижной (стационарной) и подвижной (мобильной). Разделение веществ происходит либо за счет их способности связываться с поверхностью сорбентов, либо за счет распределения между неподвижной фазой, которая может быть твердой или жидкой, и подвижной фазой — жидкой или газовой, либо за счет способности вещества образовывать гетерополярные связи с сорбентами, которые содержат ионы с зарядом, противоположным по знаку заряду иона анализируемого вещества.

Различные виды хроматографии классифицируются на основе природы атомно-молекулярного взаимодействия разделяемых веществ с той либо иной фазой.

Выделяют адсорбционную, ионообменную, распределительную, гель-хроматографию, аффинную хроматографию (нашедшую применение в иммуноферментных методах) и некоторые другие.

В зависимости от физического состояния применяемых фаз различают следующие типы хроматографического анализа

Классификация типов хроматографического анализа

Получивший в последнее время широкое распространение (особенно для фракционирования липидов) метод хроматографии в тонких слоях нельзя полностью отнести ни к одному из описанных способов разделения. Этот метод включает в себя элементы как распределительной, так и адсорбционной хроматографии.

В адсорбционной хроматографии разделение веществ основано на их различной сорбируемости на поверхности твердой фазы. Как правило, при этом адсорбируемость растворителя должна быть значительно меньше таковой анализируемой смеси. Это обеспечивает наиболее полное использование разделяющей способности адсорбента.

Метод ионообменной хроматографии представляет собой аналитический метод определения ионов, основанный на способности некоторых твердых веществ (ионообменников) обменивать ионы при контакте с растворами электролитов. В качестве ионообменников (ионитов) используются нерастворимые высокомолекулярные вещества природного или синтетического происхождения, а также неорганические ионообменники. Они бывают двух типов: анионообменники (аниониты) и катионообменники (катиониты). Ионообменная хроматография используется для разделения органических и неорганических соединений, способных к диссоциации.

Ионообменная хроматография используется в аминокислотных анализаторах для определения отдельных аминокислот.

При распределительной хроматографии разделение происходит вследствие различной растворимости (распределения) растворяемых веществ в двух несмешивающихся фазах. Для осуществления ее необходима система, состоящая из неподвижной фазы (носителя) и подвижной фазы (растворителя). На неподвижную фазу наносится смесь веществ, и через нее пропускается ток растворителя. Чем лучше данное вещество растворимо в

подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя по неподвижной фазе. Менее растворимые вещества распределяются ближе к точке нанесения (соответственно своей растворимости).

Различают следующие виды распределительной хроматографии:

- 1) колоночную;
- 2) бумажную (лист бумаги рассматривают как сплюснутую колонку, где действуют законы и распределения, и адсорбции, и ионообмена);
- 3) тонкослойную — на тонком слое адсорбента: силикагеля, окиси алюминия, ионообменной смолы;
- 4) газовую, газожидкостную (подвижной фазой служит газ, и изучаемое вещество переводится в газообразную форму).

Химическая хроматография. При ней распределение происходит в результате установления прочной связи между разделяемым веществом и неподвижной фазой (комплексобразование, осадочная хроматография). Осадочная хроматография характеризуется многократным повторением процесса образования и растворения осадка, происходящего на поверхности высокодисперсного вещества.

Аффинная хроматография: биоспецифическая хроматография — находит применение в современных методах клинической химии.

Разделение компонентов анализируемой смеси методом газовой хроматографии основано на их многократном распределении между двумя различными фазами. Неподвижной фазой служит твердое вещество или жидкость, а подвижной всегда является газ. Если неподвижная фаза — твердое вещество (тип хроматографии «газ — твердое вещество»), разделение компонентов смеси происходит за счет их различной способности связываться с адсорбентом. Если неподвижной фазой служит нелетучая жидкость (тип хроматографии «газ — жидкость»), компоненты анализируемой смеси разделяются за счет их различной растворимости в неподвижной фазе.

Высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления (ВЭЖХ) — метод разделения веществ с использованием жидкости в качестве подвижной фазы. Разделение обусловлено тем, что одни компоненты разделяемой смеси сорбируются не-подвижной фазой лучше, чем другие. Если компоненты разделяемой смеси лучше растворимы (сорбируются) в неподвижной фазе, то они перемещаются медленнее; если же их растворимость выше в подвижной фазе, они движутся быстрее.

Метод электрофореза

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например, стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом — сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине канала. В настоящее время почти исключительно используются полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять

электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны растворенных макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые макромолекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты выпадают в осадок в том самом месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значение аналитической химии определяется необходимостью общества в аналитических результатах, в установлении качественного и количественного состава веществ, уровнем развития общества, общественной потребностью в результатах анализа, так же и уровнем развития самой аналитической химии.

Цитата из учебника по аналитической химии Н.А.Меншуткина 1897 года выпуска: «Представив весь ход занятий по аналитической химии в виде задач, решение которых предоставлено занимающемуся, мы должны указать на то, что для подобного решения задач аналитическая химия даст строго определенный путь. Эта определенность (систематичность решения задач аналитической химии) имеет большое педагогическое значение. Занимающийся приучается при этом применять свойства соединений к решению вопросов, выводить условия реакций, комбинировать их. Весь этот ряд умственных процессов можно выразить так: аналитическая химия приучает химически думать. Достижение последнего представляется самым важным для практических занятий аналитической химией».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дорохова Е.Н., Прохорова Г.В. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. - М.: Высшая школа, 1991.-256 с.
2. Курко В.И. Хроматографический анализ пищевых продуктов. - М.: Пищевая промышленность, 1965. - 274 с.
3. Лебухов В.И., Окара А.И., Павлюченкова Л.П. Физико-химические свойства и методы контроля качества потребительских товаров. - Хабаровск, 1999. -251 с.
4. Ротаунт М. Анализ пищевых продуктов / пер. с нем. Б.П.Лапина – 1994. -476 с.
5. Рапопорт В.Л., Золотухина Г.Ф. Применение газожидкостной хроматографии для анализа коньяков и коньячного спирта // Формирование и развитие регионального рынка потребительских товаров и услуг. – Хабаровск.: 1998. –с. 168 –169.
6. U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature,1970; V.227, P.680 — 685 - www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/abs/227680a0.html
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.