

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

С.В. Нотова, С.В. Лебедев, Е.А. Сизова, Т.В. Казакова,
О.В. Маршинская

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Учебное пособие

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 06.03.01 Биология

Оренбург 2019

УДК 57.08
ББК 28с
Н85

Рецензенты:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор
С.А. Мирошников,
академик РЭА, доктор медицинских наук, профессор И.В. Радыш

Нотова, С.В.
Н85 Лабораторные методы исследования в биохимии и молекулярной
биологии [Электронный ресурс]: учебное пособие / С.В. Нотова,
С.В. Лебедев, Е.А. Сизова, Т.В. Казакова, О.В. Маршинская;
Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2019.
ISBN 978-5-7410-2352-5

В настоящем учебном пособии кратко изложены сведения об основных современных методах изучения биологических объектов. Рассмотрены такие направления исследования, как центрифугирование, хроматография, электрофорез, физические и иммунохимические методы анализа, а также области их практического применения.

Учебное пособие предназначено для биологов всех специальностей, студентов и преподавателей университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

УДК 57.08
ББК 28с

ISBN 978-5-7410-2352-5

© Нотова С.В.,
Лебедев С.В.
Казакова Т.В.,
Маршинская О.В., 2019
© ОГУ, 2019

Содержание

Введение.....	5
1 Центрифугирование	7
1.1 Классификация центрифуг	8
1.2 Виды центрифугирования	9
1.2.1 Препаративное центрифугирование.....	10
1.2.2 Формирование и извлечение градиентов.....	13
1.2.3 Конструкция роторов для препаративного центрифугирования	14
1.2.4 Аналитическое центрифугирование.....	15
2 Хроматография	17
2.1 Возникновение и развитие хроматографии.....	19
2.2 Аппаратура для хроматографии	20
2.3 Классификации хроматографических методов.....	24
2.3.1 Классификация по агрегатному состоянию фаз	25
2.3.2 Классификация по механизму разделения	31
2.3.3 Классификация по способу проведения процесса хроматографии	33
2.3.4 Классификация по цели проведения хроматографического процесса ..	35
2.3.5 Классификация по способу элюции	36
3 Электрофорез.....	38
3.1 Возникновение и развитие электрофореза	39
3.2 Общие принципы метода	40
3.3 Влияние некоторых факторов на подвижность разделяемых веществ	43
3.4 Приготовление носителей и их свойства.....	46
3.5 Специальные электрофоретические методы.....	49

4 Физические методы анализа	55
4.1 Основные принципы физических методов.....	55
4.2 Классификация физических методов.....	56
4.2.1 Спектроскопические методы	56
4.2.2 Дифракционные методы.....	58
4.2.3 Ионизационные методы	60
4.3 История развития спектральных методов исследований.....	60
4.4 Спектр электромагнитного излучения. Основные характеристики	62
4.5 Энергетический спектр электромагнитного излучения	64
4.6 Классификация спектральных методов исследования.....	65
4.7 Законы поглощения электромагнитного излучения и способы их выражения. Закон Бугера-Ламберта-Бера, закон аддитивности	67
4.8 Атомная спектрометрия	69
4.8.1 Атомно-абсорбционные методы.....	70
4.8.2 Атомно-эмиссионные методы	74
4.9 Молекулярная спектрометрия	77
4.10 Спектрометрия магнитного резонанса.....	79
4.11 Рентгеноструктурный анализ.....	81
5 Методы иммунохимических исследований	87
5.1 Основные принципы метода иммунного анализа.....	90
5.2 Радиоиммунологический анализ	94
5.2.1 Основные компоненты радиоиммунологического анализа.....	96
5.2.2 Основные этапы радиоиммунологического анализа.....	97
5.2.3 Достоинства и недостатки радиоиммунологического анализа	99
5.3 Иммуноферментный анализ.....	100

5.3.1 Этапы иммуноферментного анализа.....	101
5.3.3 Классификация иммуноферментного анализа	103
5.3.4 Компоненты иммуноферментного анализа	104
5.3.5 Иммобилизация антигена или антител на твердой фазе.....	109
5.3.6 Варианты постановки ИФА	110
5.4 Иммуноблоттинг	120
6 Полимеразно-цепная реакция	124
7 Банк тестовых заданий	129
7.1 Тестовые задания по методам хроматографии	129
7.2 Тестовые задания по методам электрофореза.....	133
7.3 Тестовые задания по физическим методам исследования.....	137
7.4 Тестовые задания по иммунохимическим методам исследования.....	142
8 Темы реферативных работ	145
9 Вопросы, выносимые на экзамен	147
Список использованных источников	152

Введение

Биология с самых древних времен являлась экспериментальной наукой. С каждым новым открытием увеличивались требования к методам, которые их доказывали, а, следовательно, возрастал и уровень ответственности экспериментаторов при выборе наиболее оптимального метода исследования, а также умения наиболее точно и безошибочно его проводить.

Научная мысль всегда движется вперед, поэтому появление и дальнейшее развитие таких наук как биохимия, иммунология и молекулярная биология повлекло к возникновению принципиально новых методов анализа. Сегодня постоянно появляются новые способы изучения биологических объектов или улучшенные модификации ранее разработанных методик.

Успех исследования во многом заключается в правильном выборе экспериментального подхода к той или иной проблеме и грамотном использовании выбранных методических приемов. Чтобы адекватно оценивать возможности и предполагаемые результаты эксперимента, необходимо хорошо ориентироваться в современных методах исследования. Важно иметь общие представления о классификации этих методов, понимать общие принципы работы и области их применения.

Данное пособие предлагает обобщенный материал, написанный доступным для понимания языком, позволяющий получить основные знания о методах современных лабораторных исследований. Пособие содержит тот минимум знаний, без которого немислима дальнейшая работа в области биохимии. Рассмотрены такие направления исследования, как центрифугирование, хроматография, электрофорез, разнообразные физические и иммунохимические методы анализа.

1 Центрифугирование

Центрифугирование – это разделение в поле центробежных сил жидких дисперсных систем с частицами размером более 100 нм. Данный метод используют для выделения составляющих фаз из двухкомпонентных (суспензии, эмульсии) и трехкомпонентных (эмульсии, содержащие твердую фазу) систем. Выделяемые фазы могут быть жидкими (фугат или фильтрат) и твердыми (осадок).

Центрифугирование проводят в специальных машинах – центрифугах и жидкостных центробежных сепараторах. Эти аппараты разделяют неоднородные смеси на составные части различной плотности с помощью центробежной силы. Первая центрифуга была сконструирована в 1877 г. в Германии. Принцип работы любой центрифуги заключается в том, что центробежная сила, возникающая при вращении с большой частотой *ротора* (основной рабочий орган аппарата), смещает находящиеся в растворе частицы в направлении от оси вращения при условии, что плотность частиц превышает плотность раствора. Скорость разделения зависит от центробежного ускорения, которое обычно выражается в единицах *g* (гравитационная постоянная, $g=9,81 \text{ м/с}^2$) и называется *относительное центробежное ускорение*. Величины до 10 000 *g* получают с помощью простой настольной центрифуги, высокоскоростные рефрижераторные центрифуги позволяют достигнуть 50 000 *g*, а ультрацентрифуги, работающие с охлаждением и в вакууме до 500 000 *g*.

Центрифугирование применяется в биологии, медицине, технике, химической, пищевой, микробиологической, горнорудной и других отраслях промышленности. Центрифугирование может заменять процессы отстаивания, фильтрования и отжимания, а также играет важную роль в решении экологических проблем (очистка коммунальных и промышленных стоков) в ресурсосберегающих технологиях.

1.1 Классификация центрифуг

В зависимости от различных характеристик выделяют несколько видов центрифуг (рисунок 1).

По принципу действия (по физической сущности) центрифуги делят на осадительные и фильтрующие. В осадительных центрифугах роторы сплошные и при разделении суспензий твёрдые частицы, имеющие больший удельный вес, чем жидкая фаза, под действием центробежной силы осаждаются в виде кольцевого слоя; жидкая фаза также в виде кольцевого слоя располагается ближе к оси вращения. В фильтрующих центрифугах роторы – перфорированные (могут быть покрыты фильтровальной тканью или сеткой) и при разделении суспензий жидкая фаза проходит через фильтрующую перегородку, а твёрдая одновременно откладывается на фильтрующей перегородке в виде кольцевого слоя.



Рисунок 1 – Классификация центрифуг

По расположению ротора центрифуги делятся на вертикальные и горизонтальные.

По режиму работы установки делятся на центрифуги периодического действия и центрифуги непрерывного действия. В центрифугах

периодического действия различные операции центрифугирования – загрузка, разделение, выгрузка исследуемого материала – происходят последовательно и периодически. В центрифугах непрерывного действия все эти операции происходят одновременно и непрерывно.

Одной из разновидностей центрифуг являются центробежные сепараторы. Их роторы снабжены пакетом конических тарелок, установленных по отношению друг к другу с небольшим зазором (от 0,4 мм до 1,5 мм). Высокая степень разделения достигается благодаря его протеканию в тонком слое межтарелочного зазора при *ламинарном режиме* (то есть исследуемое вещество перемещается слоями без перемешивания и пульсаций).

Ультрацентрифуга – прибор для разделения частиц менее 100 нм (коллоиды, субклеточные частицы, макромолекулы белков, нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды, синтетические полимеры и прочее), взвешенных или растворённых в жидкости. Это достигается вращением ротора, создающего центробежное поле с ускорением, которое на много порядков превышает ускорение силы тяжести.

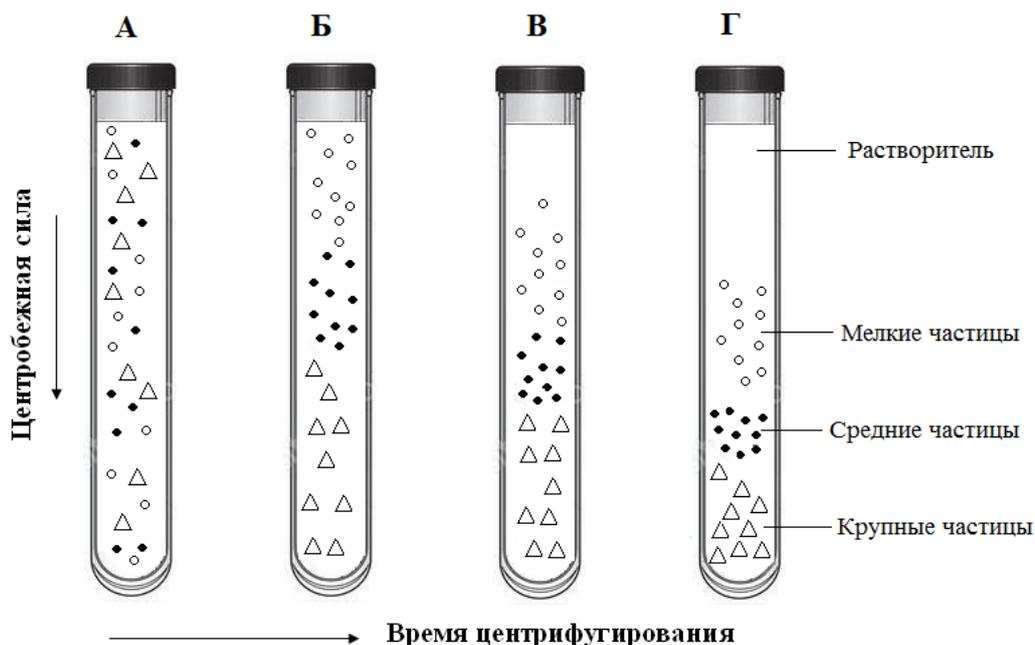
1.2 Виды центрифугирования

Центрифугирование может быть двух видов: *препаративное* (когда выделяют какой-то определенный биологический материал для последующих исследований) и *аналитическое* (изучение чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц).

1.2.1 Препаративное центрифугирование

Существует несколько вариантов препаративного центрифугирования.

1) *Дифференциальное центрифугирование*. Данный метод основан на различиях в скоростях седиментации (осаждения) частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью (рисунок 2).



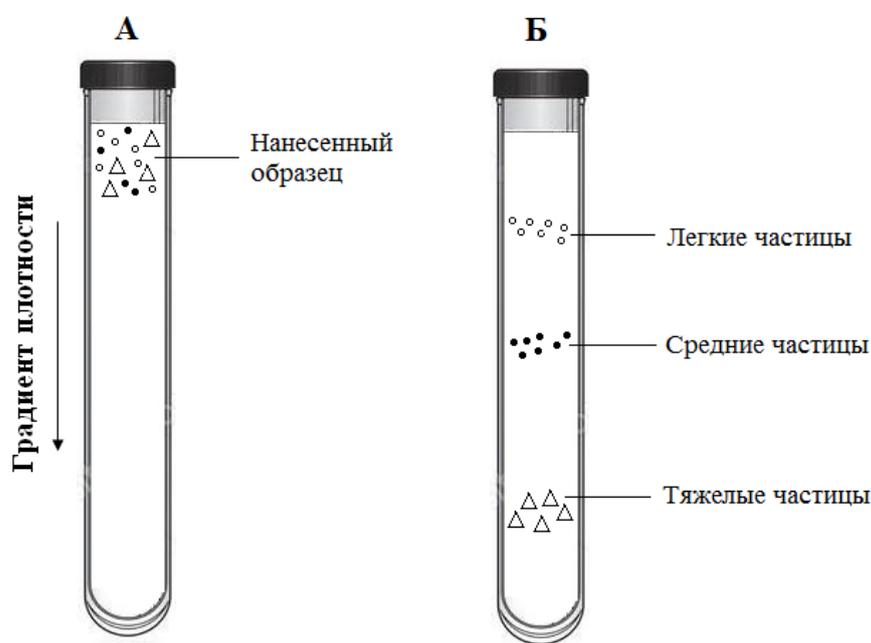
Обозначения: сначала частицы распределены по всему объему центрифужной пробирки равномерно (А); в ходе центрифугирования частицы седиментируются в соответствии с их размерами и формой (Б, В, Г).

Рисунок 2 – Дифференциальное центрифугирование в центробежном поле

Разделяемый материал центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определенная фракция. В конце каждой стадии осадок отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают, чтобы в конечном итоге получить чистую осадочную фракцию. Такое центрифугирование является самым распространенным методом выделения клеточных органелл из гомогенатов тканей и деления тех органелл,

которые значительно отличаются друг от друга по размерам и плотности. К сожалению, в данном методе получить абсолютно чистый (гомогенный) осадок практически невозможно. Еще одним недостатком этого метода является то, что приходится много времени тратить на получение градиента плотности раствора.

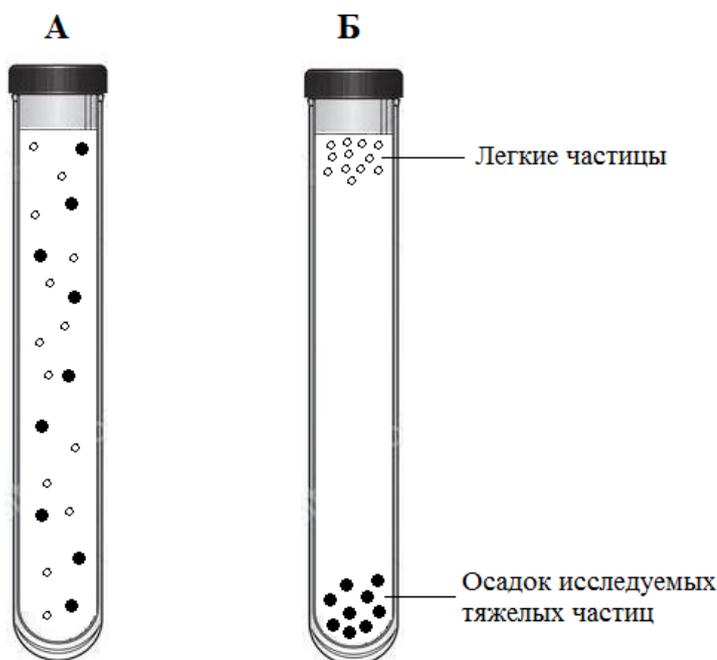
2) *Зонально-скоростное центрифугирование (s-зональное центрифугирование)*. Данный метод заключается в наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности. Затем образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон или полос (рисунок 3). Благодаря созданию градиента плотности удается избежать смешивания зон, возникающего в результате конвекции. Данный метод центрифугирования применяют для разделения гибридов РНК-ДНК, субъединиц рибосом и других клеточных компонентов.



Обозначения: перед началом центрифугирования суспензию частиц наслаивают поверх градиента плотности жидкости (А); центрифугирование продолжают до тех пор, пока все количество исследуемых частиц не достигнет зоны с соответствующей плотностью (Б)

Рисунок 3 – Скоростное разделение частиц в градиенте плотности

3) *Изопикническое центрифугирование.* Данный метод проводят как в градиенте плотности, так и обычным путем. Если центрифугирование проводится не в градиенте плотности, препарат сначала центрифугируют так, чтобы осели частицы, молекулярный вес которых больше, чем у исследуемых частиц. Эти тяжелые частицы отбрасывают, и образец суспендируют в среде, плотность которой такая же, как и у фракции, которую хотят выделить, а затем центрифугируют до тех пор, пока исследуемые частицы не осядут на дно пробирки, а частицы меньшей плотности не всплывут на поверхность жидкости (рисунок 4).



Обозначения: перед центрифугированием частицы распределены по объему пробирки равномерно (А); после центрифугирования более легкие частицы всплывают наверх, а тяжелые оседают на дно пробирки (Б).

Рисунок 4 – Изопикническое разделение без градиента плотности

Другой способ заключается в наслаивании образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности, охватывающим диапазон плотностей всех компонентов смеси. Центрифугирование проводят до тех

пор, пока плавучая плотность частиц не сравняется с плотностью соответствующих зон, то есть пока не произойдет разделение частиц по зонам. Такой вариант получил название зонально-изопикнического, так как основным моментом здесь является плавучая плотность, а не размеры и форма частиц. Таким способом возможно разделение лизосом, митохондрий и пероксисом.

4) *Равновесное центрифугирование в градиенте плотности.* Для создания градиента плотности используют соли тяжелых металлов (рубидия или цезия), а также растворы сахарозы. Образец смешивают, например, с концентрированным раствором хлористого цезия. Растворенное вещество и растворитель сначала распределяются по всему объему равномерно. В ходе центрифугирования устанавливается равновесное распределение концентрации, а, следовательно, и плотности CsCl, так как ионы цезия обладают большой массой. Под действием центробежного ускорения молекулы образца перераспределяются, собираясь в виде отдельной зоны в части пробирки с соответствующей им плотности. Данный метод был использован Мезельсоном и Сталем для изучения механизмов репликации ДНК *E. coli*. Также этим методом можно разделять и изучать липопротеиды плазмы крови человека.

1.2.2 Формирование и извлечение градиентов

Для создания градиентов плотности растворов чаще всего применяются растворы сахарозы и тяжелых металлов, но существует и ряд других веществ. Выбор градиента диктуется конкретными задачами фракционирования.

В центрифужную пробирку вносят при помощи пипетки несколько растворов с последовательно уменьшающейся плотностью. Затем на самый верхний слой (который имеет самую низкую плотность) наслаивают образец,

после чего пробирку центрифугируют. Получить плавные линейные градиенты можно за счет сглаживания ступенчатых градиентов при длительном стоянии раствора. Процесс можно ускорить, осторожно перемешивая содержимое пробирки проволокой или слегка покачивая пробирку, либо с помощью специального устройства.

После завершения процедуры центрифугирования и разделения частиц необходимо извлечь образовавшиеся зоны. Это делают несколькими способами, чаще всего методом вытеснения. Центрифужную пробирку прокалывают у основания и в нижнюю ее часть медленно вводят очень плотную среду (например, сахарозу). Растворы, которые находятся сверху, вытесняются, а фракции отбираются с помощью шприца, пипетки или специального приспособления. В другом способе (если пробирка изготовлена из целлулоида или нитроцеллюлозы) пробирку надрезают специальным лезвием под нужной зоной и отсасывают фракцию шприцом или пипеткой. Сбор фракций также осуществляют с помощью проколов тонкой полый иглой. Капли, которые вытекают из пробирки через иглу, собирают в коллектор для дальнейшего анализа.

1.2.3 Конструкция роторов для препаративного центрифугирования

1) *Угловые роторы и роторы с подвесными стаканами.* В угловых роторах центрифужные пробирки все время находятся под определенным углом к оси вращения. В роторах с подвесными стаканами пробирки устанавливаются вертикально, а при вращении под действием возникающей центробежной силы переходят в горизонтальное положение. Угол наклона к оси вращения у них составляет 90 градусов. Данные виды роторов с успехом используют для разделения частиц, скорость седиментации которых различается довольно сильно. В противном случае (если частицы с близкими

седиментационными свойствами) возникает явление конвекции и эффекты завихрения, которые в значительной степени затрудняют разделение частиц. Для устранения этого недостатка используют пробирки секториальной формы (ячейки Стромайера), а также регулируют скорость вращения ротора. Стоит отметить, что перечисленных выше недостатков лишен метод центрифугирования в градиенте плотности.

2) *Роторы непрерывного действия.* Такие роторы предназначены для скоростного фракционирования относительно небольших количеств твердого материала из суспензий больших объемов, например, для выделения клеток из питательных сред. В ходе центрифугирования суспензию частиц добавляют в ротор непрерывно. Особенность данного ротора состоит в том, что он является изолированной конструкцией, содержимое которого не сообщается с внешней средой (поэтому не загрязняется и не распыляется).

3) *Зональные роторы, или роторы Андерсона.* Зональные роторы делают из алюминиевых или титановых сплавов, которые способны выдерживать весьма значительные центробежные ускорения. Благодаря особой конструкции лопастей конвекция в таком типе ротора сведена до минимума. Зональные роторы применяются для удаления белковых примесей из различных препаратов и для очистки митохондрий, лизосом, полисом и белков.

1.2.4 Аналитическое центрифугирование

В отличие от препаративного центрифугирования, целью которого является разделение веществ и их очистка, аналитическое ультрацентрифугирование применяется в основном для изучения седиментационных свойств биологических макромолекул и других структур. Поэтому в аналитическом центрифугировании применяют роторы и регистрационные системы совершенно особой конструкции, которые позволяют непрерывно наблюдать за седиментацией материала в

центробежном поле. Аналитические ультрацентрифуги могут развивать скорость до $70\,000\text{ об/мин}^{-1}$, создавая при этом центробежное ускорение до $500\,000\text{ g}$.

В биологии аналитическое центрифугирование применяется для определения молекулярных весов макромолекул, проверки чистоты получаемых образцов, а также для исследования конформационных изменений в макромолекулах.

2 Хроматография

Задача, с которой биохимикам постоянно приходится сталкиваться при исследовании биологических соединений – это их выделение и очистка. Одним из наиболее удобных методов разделения является хроматографический метод, с помощью которого можно разделять как большие (несколько граммов), так и малые (пикограммы) количества материала.

Хроматография (от др.-греч. χρῶμα – цвет) – это физико-химический метод разделения и анализа смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ и определения физико-химических свойств индивидуальных веществ, основанный на распределении разделяемых компонентов смесей между двумя фазами: подвижной и неподвижной. *Неподвижная фаза (носитель, сорбент)* может быть твердой, жидкой или представлять собой смесь твердой и жидкой фаз. *Подвижная фаза (растворитель, элюент)* бывает жидкой или газообразной, и она обычно течет по неподвижной фазе или пропускается через нее. Фазы для хроматографического разделения выбирают так, чтобы *коэффициенты распределения* (отношение концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе) компонентов смеси в них были различными.

Важными моментами в хроматографии являются понятия «*сорбции*» (поглощение твердым телом либо жидкостью различных веществ из окружающей среды) и «*десорбции*» (процесс, обратный сорбции, при котором поглощенное вещество покидает поверхность или объем адсорбента). Различают два вида сорбции: *адсорбцию* – поглощение веществ твердой поверхностью и *абсорбцию* – растворение газов и жидкостей в жидких растворителях. При движении подвижной фазы вдоль неподвижной, компоненты смеси сорбируются на неподвижной фазе. Каждый компонент сорбируется в соответствии со сродством к материалу неподвижной фазы

(вследствие адсорбции или других механизмов). Поэтому неподвижную фазу называют также сорбентом. Захваченные сорбентом молекулы могут перейти в подвижную фазу и продвигаться с ней дальше, а затем снова сорбироваться. Выбор того или иного вида хроматографии зависит от природы выделяемого материала. Зачастую для достижения необходимой степени очистки приходится последовательно применять несколько хроматографических методов. Таким образом, *хроматография* – процесс, основанный на многократном повторении актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента. Чем сильнее сродство компонента к неподвижной фазе, тем сильнее он сорбируется и дольше задерживается на сорбенте; тем медленнее его продвижение вместе с подвижной фазой. Поскольку компоненты смеси обладают разным сродством к сорбенту, при перемещении смеси вдоль сорбента произойдет разделение: одни компоненты задержатся в начале пути, другие продвинутся дальше. В хроматографическом процессе сочетаются термодинамические (установление равновесия между фазами) и кинетические (движение компонентов с разной скоростью) аспекты.

Хроматографический метод позволяет производить: а) разделение и анализ состава сложной смеси веществ; б) очистку веществ от ненужных примесей; в) концентрирование веществ; г) идентификацию веществ. Хроматографический метод анализа универсален и применим к разнообразным объектам исследования (нефть, лекарственные препараты, вещества растительного и животного происхождения, биологические жидкости, пищевые продукты и другие). Эффективность метода повышается при его сочетании с другими методами анализа, автоматизацией и компьютеризацией процесса разделения, обнаружения и количественного определения.

2.1 Возникновение и развитие хроматографии

Метод хроматографии был открыт в 1903 году известным русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом в ходе исследования механизма преобразования солнечной энергии в растительных пигментах. Ученый пропускал раствор анализируемых веществ (экстракт хлорофилла) и подвижной фазы (петролейный эфир) через столб адсорбента (мел), находящегося в стеклянной трубке (такой метод получил название *колоночной хроматографии*). С помощью этого метода ему удалось разделить хлорофилл на составляющие окрашенные вещества. Полученные окрашенные зоны он назвал хроматограммой. Дальнейшие ключевые моменты развития хроматографического метода представлены в таблице 1.

Таблица 1 – История развития хроматографии

Дата	Событие
1938	Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер предложили проводить разделение смеси веществ на пластинке, покрытой тонким слоем адсорбента. Таким способом были разделены алкалоиды (экстрагированные из лекарственных растений) на оксиде алюминия, нанесенном на стекло. Так возник метод <i>тонкослойной хроматографии</i> , которая позволяет проводить анализ с микроколичеством вещества.
1941	Бурное развитие методов хроматографии, благодаря работам лауреатов Нобелевской премии англичан Дж. Портера и Р. Синга. Ученые предложили и разработали метод <i>распределительной хроматографии</i> .
1947	Советские ученые Т.Б. Гапон, Е.Н. Гапон и Ф.М. Шемякин в результате обменной реакции между ионами сорбента и ионами, которые содержались в растворе, впервые осуществили хроматографическое разделение смеси ионов. Возник метод <i>ионообменной хроматографии</i> .
1948	Супруги Гапон предложили еще один метод хроматографии на основе идей высказанных еще М.С. Цветом о возможности хроматографического разделения смеси веществ на основе различия в растворимости труднорастворимых осадков. Появилась <i>осадочная хроматография</i> .
1952	Дж. Портер и Л. Джеймс первыми получили результаты в области <i>газожидкостной хроматографии</i> . Эти работы послужили для дальнейшего развития данного метода.

Продолжение таблицы 1

Дата	Событие
1956	Нобелевская премия по химии русского ученого Семенова Н.Н. за теорию цветных реакций.
1957	Ученый из США М. Голей предложил наносить сорбент на внутренние стенки капиллярной трубки, что позволило анализировать микроколичества многокомпонентных смесей. Началось развитие <i>капиллярной хроматографии</i> .
1960	Появилась возможность синтезировать как ионогенные, так и незаряженные гели, которые обладают строго определенными по размерам порами. На основе этого разработали метод, сущность которого заключалась в разделении смеси веществ на их способности проникать в гель. Такой способ позволял разделять смеси веществ, которые обладали различной молекулярной массой. Началось активное развитие <i>гель-хроматографии</i> .
1970	Бурное развитие метода жидкостной хроматографии.

В настоящее время разработана теория протекания хроматографического процесса, а также множество методов хроматографического анализа и их модификаций.

2.2 Аппаратура для хроматографии

Основными блоками хроматографического аппарата являются система насосов (система ввода пробы), хроматографическая колонка и детектор. Схематичное устройство данных блоков представлено на рисунке 5.

1) *Система насосов (система ввода пробы)*. Хроматография, как и любой другой метод анализа, не является абсолютным методом. Качественное определение вещества осуществляется только по времени удерживания. *Удерживание* – это явление замедленного движения исследуемого вещества относительно движения подвижной фазы. Если удерживание веществ различно, то и скорость у них разная. Чем больше разность скоростей, тем лучше будет эффективность разделения. Подвижная

фаза должна прокачиваться через хроматограф с необходимой и постоянной скоростью, чтобы избежать появления пульсаций (это особенно важно при прохождении подвижной фазы через колонку и детектор).

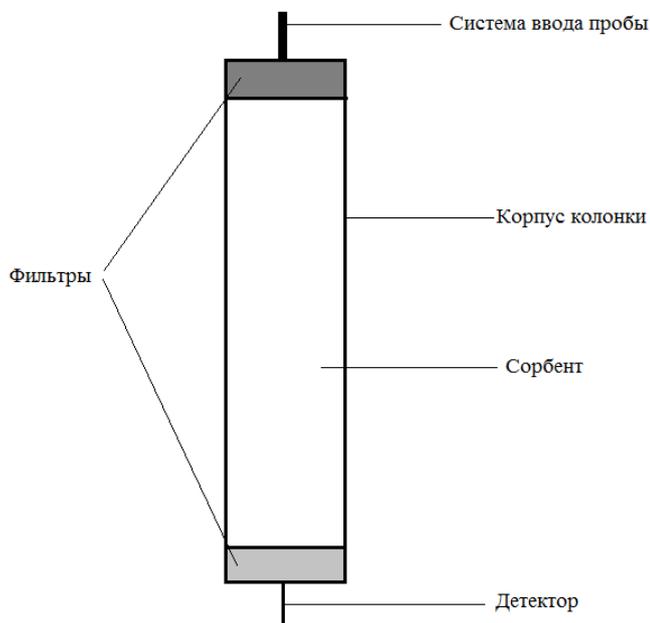


Рисунок 5 – Расположение основных блоков хроматографического аппарата

Важно постоянно проверять хроматографическую систему с помощью смесей с уже известным составом. При каких либо отклонениях необходима повторная калибровка аппарата.

Также очень важен способ введения пробы, так как даже лучшие колонки могут дать плохие результаты разделения, когда ввод пробы не соответствует предъявляемым требованиям. Во время процесса ввода пробы в колонку не должен попасть воздух. Ввод пробы происходит при непрерывном движении подвижной фазы. Следует сохранять постоянное давление и скорость потока на колонке. Для удобства оператора должна быть возможность легкого и быстрого изменения объема пробы.

2) *Хроматографическая колонка.* Колка представляет собой трубку из нержавеющей стали или стекла. Современные колонки не нужно заполнять вручную, так как они имеют гарантировано оптимальное значение

заполнения, что увеличивает разрешение хроматограммы. Для хорошей работы колонки необходимо, чтобы ее внутренняя поверхность была идеально отполирована. Как материал трубки, так и материал наполнения колонки должны быть химически устойчивы к действию подвижной фазы, чтобы избежать вымывания каких-либо продуктов из колонки. Есть две основные причины разрушения колонок – термическая и химическая деструкция. Для удерживания стационарной фазы в колонку с обоих концов помещают металлические фритты или стеклянную (металлическую) вату. При подсоединении начала колонки к системе ввода пробы и конца колонки к детектору необходимо избегать любых ненужных мертвых объемов. *Мертвый объем* – это объем подвижной фазы между точкой ввода пробы и точкой ее обнаружения, включающий в себя свободный объем колонки незанятый сорбентом, объем дозатора и детектора. Колонку характеризуют определенные данные:

- а) длина колонки;
- б) внутренний диаметр колонки;
- в) степень пропитки (это соотношение в процентах массы жидкой фазы к массе носителя, который ею пропитан)
- г) объем задержки газа (это удерживаемый объем инертного вещества, не удерживаемого колонкой)
- д) фазовое отношение (это отношение объема неподвижной фазы к объему, занимаемому подвижной фазой)

3) *Система детектирования*. Детектор – это измерительное устройство, которое должно распознать появление вещества на выходе из колонки. Детектор устанавливает изменение состава подвижной фазы, преобразовывает полученную информацию в электрический сигнал и передает ее на специальное устройство, которое создает и обрабатывает хроматограмму. *Хроматограмма* – это кривая, изображающая зависимость концентраций (С) соединений из колонки от времени (t) с начала разделения (рисунок 6). *Базовой линией* называют промежутку времени, в течение

которого детектор регистрирует сигнал только от подвижной фазы, то есть линия, соответствующая нулевой концентрации анализируемых веществ в элюате. *Хроматографический пик* – участок хроматограммы, соответствующий площади ограниченной функцией хроматограммы в момент выхода вещества из колонки и базовой линии. Описывает постепенное нарастание концентрации на выходе из колонки и последующем ее уменьшении. На рисунке также представлено значение *абсолютного времени удерживания вещества* (t_R) – время пребывания исследуемого вещества в хроматографе; практически время удерживания определяют от момента ввода пробы вещества в хроматограф до момента регистрации максимума соответствующего хроматографического пика.

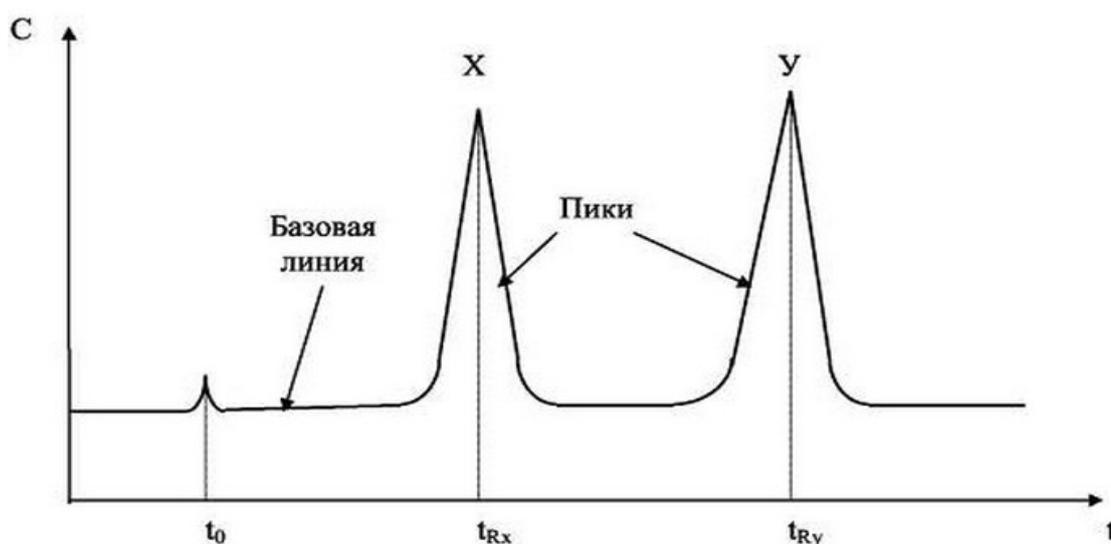


Рисунок 6 – Хроматограмма

Детекторы можно разделить на несколько классов:

- а) универсальные (они реагируют на все, что выходит из колонки);
- б) селективные (элемент- и структурноселективные, могут быть чувствительными к другим свойствам веществ);

в) специфичные (детектируют определенные структуры или элементы с высокой степенью надежности, иногда такие детекторы используют для качественного анализа какого-либо вещества).

Детекторы характеризуются следующими параметрами:

а) селективность (мера отклика детектор на различные соединения);

б) шум (помехи и статистические колебания нулевой линии хроматограммы, которые могут быть вызваны подвижной фазой, примесями, изменениями скорости потока, колебаниями температуры окружающей среды, а также сбоями электрической сети);

в) чувствительность (количество вещества, которое может уловить детектор);

г) дрейф (смещение нулевой линии, которое регистрирует самописец в виде наклонной линии; является нормальным явлением непосредственно после включения хроматографа, но спустя некоторое время после прогрева всего оборудования нулевая линия должна выровняться);

д) линейный диапазон (сигнал детектора пропорциональный соответствующему количеству вещества; если определяемая концентрация находится вне этого диапазона, то нужно либо уменьшить или увеличить количество вводимой пробы, либо разбавить пробу, чтобы вернуться в линейный диапазон детектора);

е) постоянная времени (мера того, как быстро детектор регистрирует пик).

2.3 Классификации хроматографических методов

В основе всех методов хроматографии лежит один принцип: непрерывный поток подвижной фазы с растворенным в ней анализируемым образцом проходит через стационарную (неподвижную) фазу. Последняя, в зависимости от своей природы, по разному взаимодействует с отдельными

компонентами смеси образца. В результате, компоненты вымываются и движутся относительно неподвижной фазы с различными скоростями. Многообразие видоизменений и вариантов метода хроматографии требует их систематизации и классификации. В основу классификации можно положить различные признаки, а именно: агрегатное состояние фаз, механизм разделения, способ проведения процесса, цель проведения процесса, способ элюции (промывания).

2.3.1 Классификация по агрегатному состоянию фаз

В зависимости от агрегатного состояния фаз выделяют следующие виды хроматографии:

- а) газовая;
- б) жидкостная;
- в) сверхкритическая флюидная.

1) *Газовая хроматография.* Это хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы применяется инертный газ (газ-носитель) или пар.

Преимуществами газовой хроматографии являются:

а) высокая разделительная способность (к примеру, с помощью данного метода можно анализировать фракции нефти, состоящие из сотен компонентов, в течение лишь одного часа);

б) универсальность (разделение и анализ самых различных смесей – от низкокипящих газов до смесей жидких и твердых веществ с температурой кипения до 500 °С);

в) высокая чувствительность (детектирующие системы позволяют надежно определять концентрации от 10^{-8} мг/мл до 10^{-9} мг/мл);

г) экспрессность (быстрота разделения, в большинстве случаев от 10 до 15 минут, максимум от 1 до 1,5 часа, но при этом анализируется несколько десятков или сотен компонентов);

- д) легкость аппаратного оформления;
- е) малый размер пробы (иногда достаточно пробы в десятые доли мг);
- ж) высокая точность анализа.

Недостатки данного метода хроматографии: невозможность разделения и анализа смесей нелетучих соединений; осложнения при разделении и анализе термически нестабильных соединений; невозможность разделения и анализа соединений, способных к диссоциации в анализируемых растворах (разделение ионов).

Схематическое устройство газового хроматографа представлено на рисунке 7.

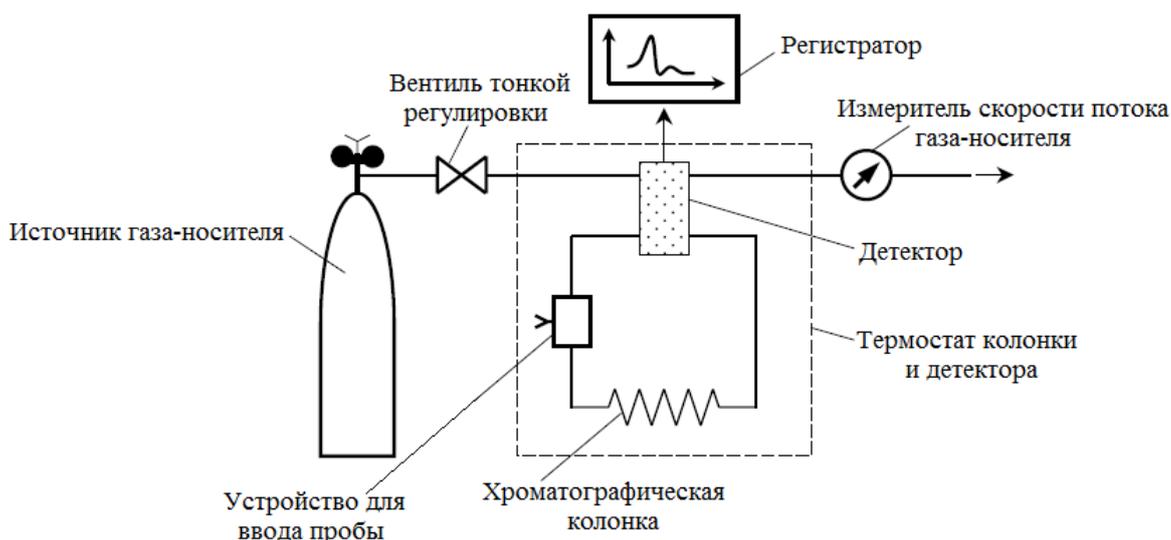


Рисунок 7 – Принципиальное устройство газового хроматографа

Подвижная фаза. Каждый газ-носитель обладает своими преимуществами и недостатками, поэтому подвижная фаза определяется исследователем в зависимости от протокола испытания. Наиболее часто применяемыми газами (или их смесями) являются: азот, гелий, аргон, углекислый газ, воздух. Стоит отметить, что при выборе газа-носителя следует учитывать его природу, так как газ-носитель способен оказывать

влияние как на характеристики разделения компонентов анализируемой смеси в хроматографической колонке, так и на параметры работы детектора.

Существует ряд требований, в которых газ-носитель должен:

- а) способствовать обеспечению оптимального разделения компонентов смеси;
- б) обеспечить максимально высокую чувствительность детектора;
- в) быть химически инертным по отношению к компонентам разделяемой смеси, материалу колонки и ее наполнителю;
- г) иметь высокую степень чистоты;
- д) существенно хуже удерживаться неподвижной фазой по сравнению с любым из разделяемых компонентов (так как только в этом случае выполняются условия элюентного анализа);
- е) иметь небольшую вязкость для поддержания минимального перепада давления в колонке;
- ж) быть взрывобезопасным;
- з) быть достаточно дешевым.

Хроматографическая колонка. Хроматографические колонки в соответствии с их назначением подразделяются на несколько вариантов. Аналитические колонки (установление качественного и количественного состава смеси). Препаративные колонки (получение в чистом виде необходимых количеств тех или иных компонентов, которые присутствовали во вводимой пробе). Предколонки (решают задачу предварительного концентрирования компонентов пробы из достаточно больших объемов для последующего их разделения или извлечения из объема анализируемой пробы мешающих разделению компонентов). Материал колонки не должен быть химически активным или действовать каталитически по отношению к неподвижной фазе и разделяемым компонентам. В основном колонки изготавливают из следующих материалов: нержавеющая сталь, медь, алюминий, стекло, кварц. Также колонки должны выдерживать нагревание до нужной температуры.

Ввод пробы. Газообразные пробы вводят либо с помощью обычного медицинского шприца, либо используя специальные дозирующие устройства. Важно отметить, что при вводе жидких проб устройство должно быть обязательно снабжено испарителем, в котором образец мгновенно испаряется, смешивается с газом-носителем и поступает в хроматографическую колонку.

Детекторы. Выбор детектора – ключ к успешному разделению веществ. Детектор непрерывно фиксирует изменение какого-либо физического свойства газа-носителя при попадании в поток исследуемого вещества. Принцип действия детектора должен быть основан на измерении такого свойства аналитического компонента, которым не обладает подвижная фаза. Выбор детектора принципиально важен для анализа биологических проб. Критериями выбора являются чувствительность и диапазон применения. В настоящее время в практике газовой хроматографии применяются следующие основные виды детекторов: детектор по теплопроводности (катарометр), пламенно-ионизационный детектор, термоионный детектор, детектор электронного захвата, фотоионизационный детектор, детектор хемиллюминесценции, атомно-эмиссионный детектор и спектрофотометрические детекторы.

Существует несколько вариантов проведения газовой хроматографии.

а) Газоадсорбционная хроматография. Особенность метода такого вида хроматографии заключается в том, что в качестве неподвижной фазы применяют адсорбенты с высокой удельной поверхностью (углеродные адсорбенты, силикагель, оксид алюминия, а также органические сорбенты).

б) Газожидкостная хроматография. Метод основан на распределении соединений между жидкой и газовой фазами. Неподвижную фазу из «жидкого» материала закрепляют на инертном гранулированном твердом носителе и помещают в узкую стеклянную или стальную колонку, через которую пропускают инертный газ (подвижная фаза), например аргон или азот. Колонку помещают в термостат с температурой, при которой исследуемое вещество испаряется. В основе разделения анализируемых

соединений (по мере их продвижения по колонке с газом-носителем) лежит различие в коэффициентах распределения испарившихся анализируемых веществ между жидкой и газовой фазами. После выхода из колонки вещества попадают в детектор, связанный через усилитель с самописцем.

Газожидкостная хроматография на практике применяется чаще, чем газоадсорбционная, так как набор веществ, которые могут быть использованы в качестве неподвижных жидких фаз, гораздо шире набора имеющихся активных адсорбентов. Эти неподвижные жидкие фазы имеют более широкий диапазон концентраций с линейной функцией изотермы распределения, что дает возможность работать с большими пробами и, следовательно, обеспечивает более высокую чувствительность анализа, а также позволяет с меньшими усилиями добиваться высокоэффективной и воспроизводимой работы колонок.

2) *Жидкостная хроматография.* Жидкостная хроматография – это способ хроматографического разделения, в котором подвижной фазой является жидкость. По типу неподвижной фазы различают: жидкостно-жидкостную, жидкостную-твердофазную и жидкостно-гелевую хроматографии. В классическом варианте проведения в колонку с сорбентом, заполненную элюентом, вводят анализируемую пробу и на выходе собирают образовавшиеся фракции веществ. Рисунок 8 иллюстрирует принципиальное устройство жидкостного хроматографа.

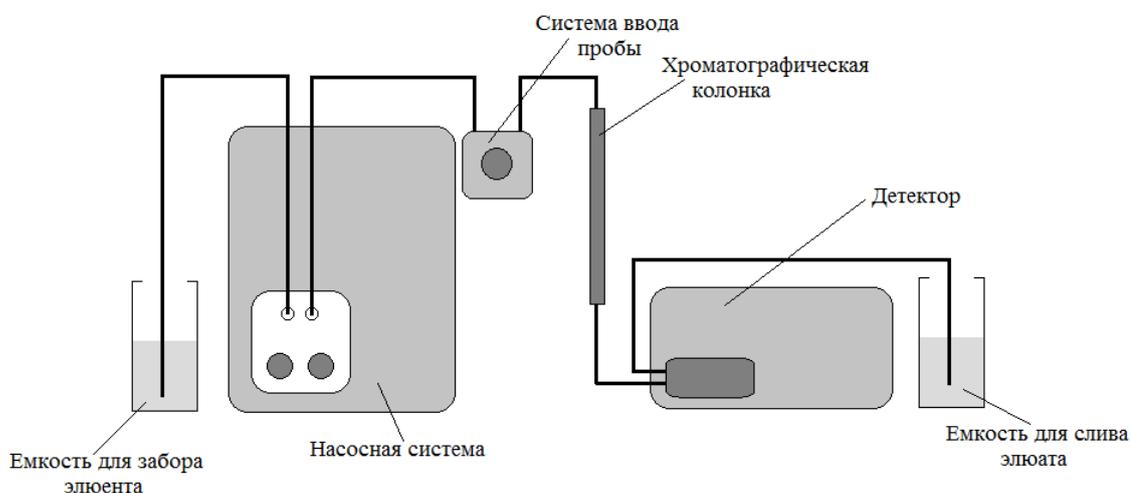


Рисунок 8 – Принципиальное устройство жидкостного хроматографа

Поначалу основным недостатком это метода, по сравнению с газовой хроматографией, была его низкая разрешающая способность, обусловленная несколькими причинами: высокой вязкостью подвижных фаз, и, следовательно, низкой скоростью диффузии; неоднородностью подвижных фаз; ограничения в длине колонки и так далее. Но значительный прогресс в производстве высокоточных приборов (в первую очередь насосов), сорбентов и вычислительной техники привел к появлению метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В таблице 2 приведены основные различия ВЭЖХ от классической жидкостной хроматографии.

Таблица 2 – Сравнение характеристик классической жидкостной хроматографии и ВЭЖХ

Показатель	Жидкостная хроматография	ВЭЖХ
Давление (атм.)	от нескольких долей до 2	>2
Скорость протока (мм/мин ⁻¹)	5-50	600
Продолжительность разделения	от нескольких часов до нескольких суток	от нескольких минут до нескольких часов
Тип разделения	препаративное	аналитическое
Количество исследуемого вещества	от мг до кг	от нанোগраммов до мг

3) *Сверхкритическая флюидная хроматография. Сверхкритический флюид* – состояние вещества, при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой. Любое вещество, находящееся при температуре и давлении выше критической точки является таким веществом. Возможность изменения температуры и давления позволяет влиять на свойства растворителя и маршрут реакции, что делает возможным более высокие выходы целевого продукта. Такой метод хроматографии имеет ряд преимуществ перед жидкостной хроматографией и газовой хроматографией. В ней возможно разделение термически нестабильных и нелетучих веществ. На данный момент, несмотря на все преимущества, не нашла широкого применения (за

исключением некоторых особых областей, таких как разделение энантиомеров и высокомолекулярных углеводов). Несмотря на высокую чистоту получаемых соединений, высокая стоимость оборудования делает сверхкритическую хроматографию применимой только в случае очистки или выделения дорогих веществ. Данный метод очень перспективен, и активно внедряется, например, в медицину.

2.3.2 Классификация по механизму разделения

По механизму разделения смесей выделяют следующие методы хроматографии:

- а) адсорбционная;
- б) ионообменная;
- в) осадочная;
- г) эксклюзионная (молекулярно-ситовая);
- д) адсорбционно-комплексообразовательная;
- е) аффинная;
- ж) распределительная.

1) *Адсорбционная хроматография*. Такой вид хроматографии основан на избирательной адсорбции отдельных компонентов анализируемой смеси соответствующими адсорбентами. Адсорбционная хроматография подразделяется на жидкостную (жидкостно-адсорбционная хроматография) и газовую (газо-адсорбционная хроматография).

2) *Ионообменная хроматография*. Метод, основанный на использовании ионообменных процессов, протекающих между подвижными ионами адсорбента и ионами электролита при пропускании раствора анализируемого вещества через колонку, заполненную ионообменным веществом (*ионитом*). Иониты представляют собой нерастворимые неорганические и органические высокомолекулярные соединения. В качестве

ионитов применяют окись алюминия, пермутит, сульфуголь и разнообразные синтетические органические ионообменные вещества – ионообменные смолы.

3) *Осадочная хроматография.* Хроматография, основанная на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе. Например, при пропускании раствора смеси солей ртути и свинца через колонку с носителем, предварительно пропитанным раствором йодида калия, образуются два окрашенных слоя: верхний, окрашенный в оранжево-красный цвет (HgI_2), и нижний, окрашенный в желтый цвет (PbI_2).

4) *Эксклюзионная (молекулярно-ситовая) хроматография.* Такой метод хроматографии основан на разной проницаемости молекулярных компонентов в неподвижную фазу. Неподвижная фаза представляет собой высокопористый неионогенный гель. Эксклюзионная хроматография подразделяется на гель-проникающую (элюент – неводный растворитель), и гель-фильтрацию (элюент – вода).

5) *Адсорбционно-комплексобразовательная хроматография.* Хроматография, в которой разделение основано на образовании координационных соединений (комплексных соединений) различной прочности в фазе или на поверхности адсорбента.

6) *Аффинная хроматография.* Метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, который ковалентно связан с инертным носителем. Применяют биологически активные вещества (белки, ферменты), вступающие в специфические взаимодействия, такие как антиген/антитело (рисунок 9).

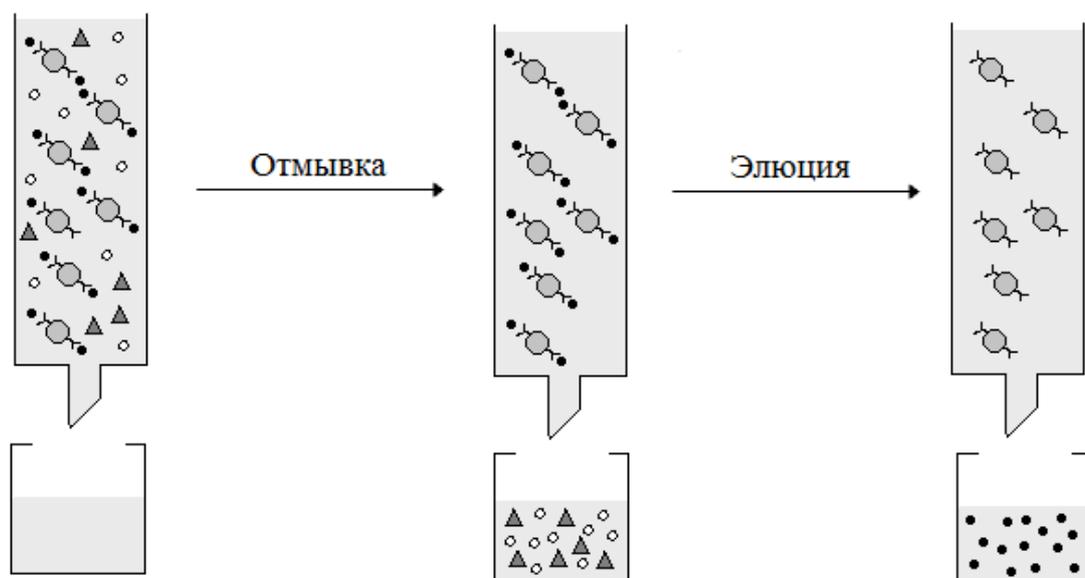


Рисунок 9 – Процесс проведения аффинной хроматографии

7) *Распределительная хроматография.* Хроматографический метод, при котором неподвижная (стационарная) фаза химически связана с поверхностью неподвижного носителя. Подвижной фазой является жидкость или газ. Разделение происходит за счёт различия полярности разделяемых веществ. Распределительная хроматография основана на различии в коэффициентах распределения разделяемых веществ между двумя несмешивающимися фазами – подвижным и неподвижным растворителями. На этом принципе основаны газовая и жидкостная хроматографии.

2.3.3 Классификация по способу проведения процесса хроматографии

По способу проведения процесса хроматографического разделения выделяют следующие виды:

- а) колоночная;
- б) бумажная;

в) тонкослойная;

г) хроматография в толстом слое.

1) *Колоночная хроматография*. Вид хроматографии, в которой в качестве носителя для неподвижного растворителя используют колонку.

2) *Бумажная хроматография*. Вид хроматографии, в которой в качестве носителя для неподвижного растворителя вместо колонки используют полоски или листы фильтровальной бумаги, не содержащей минеральных примесей. В этом случае каплю испытуемого раствора, например смесь растворов солей железа и кобальта, наносят на край полоски бумаги. Бумагу подвешивают в закрытой камере, опустив ее край с нанесенной на него каплей испытуемого раствора в сосуд с подвижным растворителем (например, с *n*-бутиловым спиртом). Подвижный растворитель, перемещаясь по бумаге, смачивает ее. При этом каждое содержащееся в анализируемой смеси вещество с присущей ему скоростью перемещается в том же направлении, что и растворитель. По окончании разделения ионов бумагу высушивают и затем опрыскивают реактивом, в данном случае раствором $K_4[Fe(CN)_6]$, который образует окрашенные соединения с разделяемыми веществами (синее – с ионами железа, зеленое – с ионами кобальта). Образующиеся при этом зоны в виде окрашенных пятен позволяют установить наличие отдельных компонентов.

3) *Тонкослойная хроматография*. Вид хроматографии по своему механизму разделения аналогичный бумажной хроматографии. Различие между ними заключается в том, что вместо листов бумаги разделение проводят на пластинках, покрытых тонким слоем сорбента, изготовленного из порошкообразной окиси алюминия, целлюлозы, цеолитов, силикагеля, кизельгура и тому подобному и удерживающего неподвижный растворитель. Основное достоинство тонкослойной хроматографии заключается в несложности аппаратуры, простоте и большой скорости проведения эксперимента, достаточной четкости разделения смеси веществ и в возможности анализа ультрамикроколичеств вещества.

4) *Хроматография в толстом слое*. Под этим методом понимают хроматографический процесс, который идет в наклонно расположенном, ровном и относительно толстом (несколько миллиметров), открытом с поверхности слое гранул, между которыми жидкость подвижной фазы течет только под действием силы тяжести. Практически этот метод нашел себе применение только для гель-фильтрации.

2.3.4 Классификация по цели проведения хроматографического процесса

В зависимости от цели проведения процесса выделяют следующие виды хроматографии:

- а) аналитическая;
- б) препаративная;
- в) промышленная.

1) *Аналитическая хроматография*. Применяется для определения качественного и количественного состава анализируемых веществ. Ее используют для исследования свойств систем растворов, кинетики химических процессов, свойств катализаторов и адсорбентов. Такой вид хроматографии является универсальным методом анализа смесей веществ, получения веществ в чистом виде, а также методом исследования свойств систем.

2) *Препаративная хроматография*. Вид хроматографии, в котором разделение смеси веществ производится в препаративных целях, то есть для получения более или менее значительных количеств веществ в чистом, свободном от примесей виде. Задачей препаративной хроматографии может быть также концентрирование и последующее выделение из смеси веществ, содержащихся в виде микропримесей к основному веществу.

3) *Промышленная хроматография.* Методы хроматографии, которые используют на предприятиях в промышленных целях.

2.3.5 Классификация по способу элюции

В соответствии с режимом ввода пробы выделяют следующие виды хроматографии:

- а) вытеснительная;
- б) элюентная;
- в) фронтальная.

1) *Вытеснительная хроматография.* При вытеснительном варианте в сорбент вводится разделяемая смесь, а затем поток газа-носителя, содержащего вытеснитель (элюент, обладающий заведомо большим сродством к неподвижной фазе хроматографической системы, чем любой из компонентов смеси), при движении которого, смесь через некоторый период времени разделится на зоны чистых веществ. Таким образом, происходит вытеснение веществ из неподвижной фазы, причем в первую очередь тех, которые обладают меньшим сродством к сорбенту, а затем и всех остальных. Элюент выталкивает все компоненты смеси впереди себя наподобие поршня. Для аналитического фракционирования метод непригоден, но хорош для препаративного или полупромышленного разделения веществ, поскольку емкость колонки здесь используется очень эффективно.

2) *Элюентная хроматография.* Наиболее часто используемый вариант проведения аналитической хроматографии, так как позволяет получать в чистом виде все компоненты пробы. В элюентном режиме через колонку пропускают подвижную фазу (элюент), вводят пробу, затем снова пропускают подвижную фазу. В процессе движения по колонке компоненты смеси разделяются на зоны. Эти зоны поочередно выходят из колонки, разделенные зонами чистого растворителя.

3) *Фронтальный анализ.* При фронтальном варианте в слой сорбента непрерывно вводится разделяемая смесь, состоящая из газа-носителя и разделяемых компонентов, которая сама является подвижной фазой. Через некоторое время после начала процесса наименее сорбируемый компонент опережает остальные и выходит в виде зоны чистого вещества раньше всех, а за ним в порядке сорбируемости последовательно располагаются зоны смесей остальных компонентов. В настоящее время фронтальный анализ почти вышел из употребления и применяется лишь в отдельных случаях.

3 Электрофорез

Под *электрофорезом* понимают направленное перемещение ионов в электропроводящем растворе под действием внешнего электрического поля. Под действием электрического поля заряженные частицы перемещаются в зависимости от знака их суммарного заряда в сторону катода или анода. После начала электрофореза скорость движения компонентов увеличивается, пока не уравнивается силой трения, затем частицы продолжают двигаться с постоянной скоростью. Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смеси веществ в аналитических и препаративных целях. Схематически работа электрофоретической установки представлена на рисунке 10.

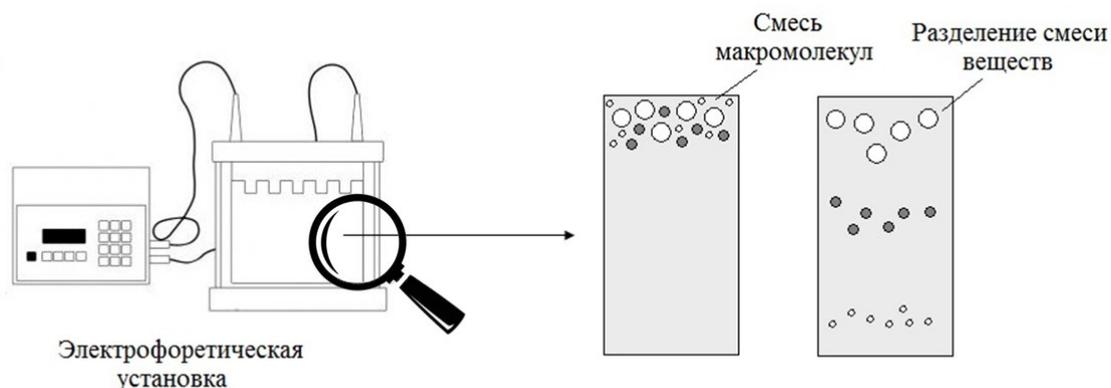


Рисунок 10 – Принципиальная схема электрофоретической установки

Большое число молекул от простых до самых сложных, попадая в раствор, приобретают положительный, либо отрицательный заряд. При подключении постоянного электрического тока заряженные молекулы начинают двигаться в направлении электрода противоположенного заряда: отрицательно заряженные ионы (*анионы*) – к положительно заряженному электроду (*аноду*), положительно заряженные (*катионы*) – к отрицательно заряженному электроду (*катоду*). Метод электрофоретического разделения

макромолекул широко используется в биологии и медицине для выделения, характеристики и анализа белков и нуклеиновых кислот.

3.1 Возникновение и развитие электрофореза

Открытие явлений электрофореза датировано 1807 годом и связано с именем профессора Московского университета Ф.Ф. Рейса.

Таблица 3 – История развития электрофореза

Дата	Событие
30-е годы XX века	Электрофорез начали использовать в биологии и медицине, после того как А. Тизелиус разработал метод электрофореза в свободной жидкости и сконструировал прибор для электрофоретического разделения и анализа смеси белков методом подвижных, или свободных границ.
1940	J.S.I. Philpot начал использовать колонки с градиентом плотности буферных растворов, что препятствовало конвекции и стабилизировала электрофоретические зоны.
50-е годы	Исследованиями многочисленных ученых продолжали усовершенствование метода электрофореза. Подбирались оптимальные условия для разделения, а также был создан прибор для электрофореза в градиенте плотности. Впервые в качестве твердого носителя была использована фильтровальная бумага.
1952	Начали использовать гранулированный материал, представляющий собой сухой порошок, удерживающий на поверхности различные количества воды. Были апробированы порошки из стекла, целлюлозы, крахмала, а также порошкообразные гели (сефадекс, агароза).
1953	P. Grabar предложил принципиально новый метод электрофореза, основанный на сочетании двух различных методов – собственно электрофореза и иммунодиффузии.
1955	O. Smithies впервые использовал крахмальный гель – поддерживающую среду, обладающую свойствами молекулярного сита.
1957	J. Kohn предложил использовать в качестве твердого носителя для электрофореза пленки из ацетатцеллюлозы, благодаря чему добились более высокой разрешающей способности метода.

Продолжение таблицы 3

Дата	Событие
1959	S.Rayond и L. Weintraub использовали для электрофореза химически и механически прочный полиакриламидный гель, который можно было применять в широком диапазоне рН, ионной силы и температуры.

3.2 Общие принципы метода

Оборудование для электрофореза состоит в основном из двух частей: источника питания и собственно электрофоретического блока. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. В электрофоретический блок входят источник тока, электроды, буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка (рисунок 11).

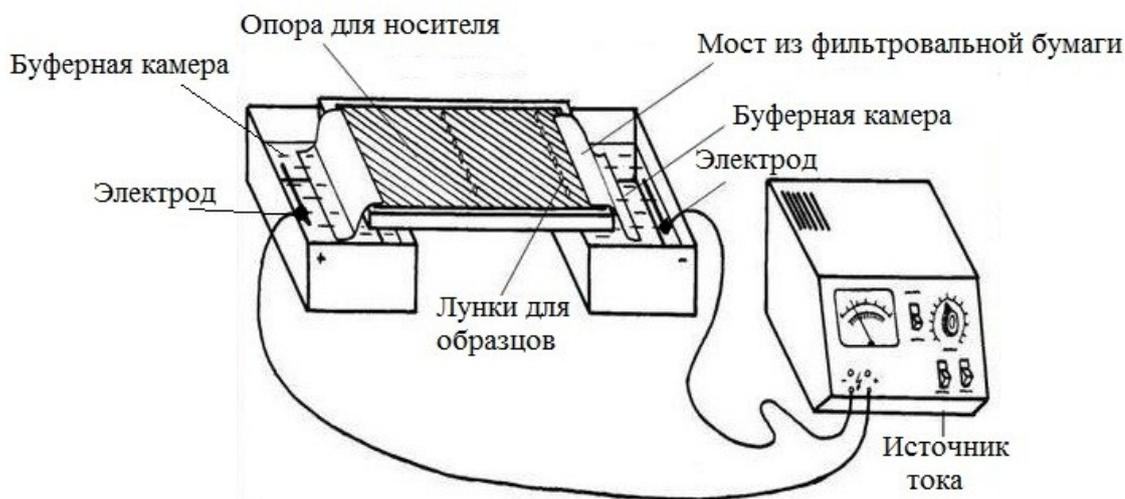


Рисунок 11 – Устройство электрофоретической установки

Во время работы электрофоретический блок нужно закрывать крышкой, чтобы свести до минимума испарение буферного раствора и обеспечить электрическую изоляцию.

В ходе работы с данной установкой выделяют следующие основные этапы.

1) *Насыщение носителя.* Если носитель не является гелем, для обеспечения электропроводности его необходимо насытить буфером до начала электрофореза. Насыщение лучше производить до нанесения образца, иначе это с самого начала приведет к его размыванию. Насыщение носителя производят посредством его плавного погружения в буфер.

2) *Нанесение образца.* Раствор с образцом обычно наносят микропипеткой в виде маленького пятна или узкой полосы. Если отдельные компоненты смеси имеют противоположные заряды, они в ходе разделения будут двигаться к разным электродам, и образец в этом случае нужно наносить примерно посередине. Если же все компоненты будут двигаться в одном направлении (то есть они все заряжены либо положительно, либо отрицательно), то образец нужно наносить как можно дальше от соответствующего электрода, у противоположного конца носителя, чтобы разделяемые компоненты проходили большее расстояние. При *горизонтальном электрофорезе* полоски фильтровальной бумаги, пропитанные образцом, вводят в щель или ямку, вырезанные на поверхности геля. При *вертикальном электрофорезе* образец в 10 % растворе сахарозы наслаивают на поверхность вертикального столбика геля. К образцам, представляющими собой белковые смеси, для улучшения их *солюбилизации* (растворимости) добавляют мочевины или додецилсульфат натрия (ДСН). В состав смесей довольно часто включают также краситель, например бромфеноловый синий. Наблюдая за его движением, можно получить некоторое представление о поведении системы в ходе разделения.

3) *Разделение.* После нанесения образца включают источник питания, поддерживая соответствующее напряжение в течение всего процесса разделения. Даже при наличии стабилизированных источников питания необходимо постоянно следить за работой прибора, так как если носитель подготовлен недостаточно тщательно, возможен перегрев, а в случае

применения бумаги, возможно, даже ее обугливание. Низковольтный электрофорез обычно завершается в течение от 1 часа до 2 часов. Разделение при высоком напряжении, как правило, заканчивается в течение 1 часа. По окончании электрофореза сначала выключают источник питания, а затем извлекают носитель.

4) *Извлечение носителя.* Бумагу, полоски ацетата целлюлозы и тонкослойные пластины извлекают и сушат прямо на воздухе, обычно в печи при 110 °С. Для извлечения цилиндрических полиакриламидных гелей столбик геля обводят струей воды под давлением, применяя для этого шприц для подкожных инъекций. Благодаря этому гель отстает от стенок трубки, и его выталкивают. Для уменьшения диффузии веществ, подвергшихся разделению, гели при необходимости помещают в фиксирующий раствор, например, 7 % раствор уксусной кислоты.

5) *Окрашивание и извлечение веществ.* Большинство биологических соединений не окрашено, и для определения их местоположения по завершении разделения необходимо сделать их видимыми. Наиболее широко практикуемый метод определения местоположения веществ после электрофореза на бумаге, ацетате целлюлозы и в геле – это обработка среды красителем, который избирательно окрашивает компоненты образца. Если краситель количественно взаимодействует с компонентами смеси, то можно определить количество окрашенного вещества одним из двух способов, либо методами спектрофотометрии, либо с помощью *денситометра* (прибор, измеряющий степень потемнения объектов). Локализацию белков, обладающих ферментативной активностью, можно определить косвенным путем. Для этого гель помещают в раствор субстрата данного фермента, и, если продукт реакции окрашен, сразу выявляется его местоположение, а, следовательно, и местоположение фермента. Местоположение радиоактивных веществ можно обнаружить методом автордиографии или с помощью прибора для сканирования радиохроматограмм.

3.3 Влияние некоторых факторов на подвижность разделяемых веществ

1) *Образец исследования.* Электрофоретическая подвижность заряженных молекул образца зависит от ряда факторов.

А) Заряд. Подвижность возрастает с увеличением суммарного заряда, а величина заряда в большинстве случаев зависит от рН.

Б) Размеры. Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность. Это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров.

В) Форма. Молекулы одинакового размера, но различной формы (например, фибриллярные и глобулярные белки, обладают разной подвижностью; это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии).

2) *Электрическое поле.* Согласно закону Ома, сила тока I (в амперах), напряжение V (в вольтах) и сопротивление K (в омах) связаны следующим соотношением: $I = V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все эти три фактора.

А) Сила тока. Для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться (ток должен быть постоянным).

Б) Напряжение. Используются как низкие (от 100 В до 500 В), так и высокие (от 500 В до 10000 В) напряжения. Высокие напряжения применяют в основном для разделения высокомолекулярных веществ.

В) Сопротивление. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов. В ходе электрофореза выделяется тепло, при этом сопротивление уменьшается. Следовательно, при постоянном напряжении такое нагревание приведет к увеличению силы тока

и усиленному испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на постоянном уровне либо напряжение, либо силу тока. Испарение сводят до минимума, помещая аппарат под воздухонепроницаемую крышку. Для дополнительного охлаждения при работе с высоким напряжением в аппарат встраивается охлаждающая система.

3) *Буфер*. Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость миграции веществ.

А) Состав буфера. Наиболее, широко применяемые буферы – формиатный, ацетатный, цитратный, вероналовый, фосфатный, трис (трисаминометан), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и пиридиновый. Поскольку буферы служат для образца растворителями, то некоторая диффузия нанесенного образца неизбежна. Это особенно заметно для малых молекул, таких, как аминокислоты и сахара. Диффузию можно свести до минимума, если наносить образцы в виде узких полос и в умеренных количествах, использовать высокое напряжение и как можно быстрее проводить разделение, а по его завершении быстро вынимать и высушивать образцы.

Б) Концентрация буфера. По мере увеличения ионной силы буфера компонент тока, обусловленный переносом ионов буфера, будет возрастать, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, уменьшаться. Таким образом, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а, следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая

способность хуже, чем при высокой ионной силе. Таким образом, при выборе ионной силы буфера приходится идти на некоторые компромиссы.

4) *Носитель*. В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако, их состав все же не безразличен для подвижности разных веществ, и выбор соответствующей среды зависит от природы образца.

А) Адсорбция. *Адсорбция* – удерживание молекул образца носителем, как при адсорбционной хроматографии. Это приводит к размыванию пятен, в результате чего образец движется не в виде четкой полосы, а имеет вид кометы и разрешающая способность метода при этом уменьшается. Адсорбция приводит также к уменьшению скорости миграции. Наибольшей способностью к адсорбции обладает бумага, однако это нежелательное ее свойство удается устранить, если использовать ацетат целлюлозы.

Б) *Электроосмос (электроэндосмос)*. Это явление обусловлено возникновением относительного заряда между молекулами воды буферного раствора и поверхностью носителя. Ионизация групп носителя и поверхностная адсорбция ионов буфера обычно приводит к образованию из молекул воды ионов *гидроксония* (H_3O^+ , комплексный ион – соединение протона с молекулой воды). Так как эти ионы заряжены положительно, они движутся к катоду, захватывая растворенные нейтральные вещества и убыстряя движение катионов; скорость движения анионов при этом падает. Обычно данными эффектами можно пренебречь, однако, если определяют *изоэлектрическую точку вещества* (pI; кислотность среды, при которой определённая молекула или поверхность не несёт электрического заряда), нужно вводить соответствующую поправку. Как правило, это делают, следя за движением электрически нейтральных соединений, таких, как мочевины или глюкоза. Электроосмос менее заметен в носителе из ацетата целлюлозы или в полиакриламидном геле, чем в крахмальном геле или на бумаге.

В) Молекулярное сито. Свойствами *молекулярного сита* обладает применяемый в гель-электрофорезе полужесткий носитель (гель); такие его

свойства способствуют разделению смесей заряженных макромолекул, например белков, которые различаются не только по электрофоретической подвижности, но также формой и размерами. Гели состоят из беспорядочно переплетающихся молекулярных цепей, распределенных по всему объему геля и образующих ситоподобную структуру. В соответствии с конкретными требованиями, разделения размер пор гелей можно варьировать в некоторых пределах. Принцип действия молекулярного сита в агаровом, крахмальном и полиакриламидном гелях заключается в том, что крупные молекулы движутся сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор, которые определяется числом поперечных сшивок в геле. При использовании гелей типа *сефадекса* (микропористый материал, представляющий собой декстран, молекулы которого соединены химическими связями) ситуация обратная – в соответствии со спецификой их природы миграция малых молекул тормозится сильнее, чем крупных.

3.4 Приготовление носителей и их свойства

1) *Бумага*. Специальной электрофоретической бумаги не существует – подходит обычная хроматографическая бумага. Для удаления загрязнений, затрудняющих в ряде случаев дальнейший анализ, некоторые виды хроматографической бумаги обрабатывают кислотой. Бумага очень удобна в качестве носителя, так как не требует подготовки. Ее только нужно разрезать до определенного размера. При электрофорезе с использованием бумаги всегда наблюдается некоторая адсорбция. Ее можно уменьшить, используя буфер с более высоким значением рН, чем изоэлектрическая точка образца, однако электроосмос вследствие особенностей химического состава бумаги всегда будет проявляться в той или иной степени. Данный метод является самым простым.

2) *Ацетат целлюлозы*. Вследствие его очень незначительной адсорбирующей способности можно даже для макромолекул получить высокое разрешение с небольшим количеством вещества. Ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Таким образом, большая часть тока обусловлена ионами образца, что обеспечивает очень быстрое их разделение. Тем не менее, это сопровождается выделением большого количества тепла, и поэтому при работе с высоким напряжением нужно принимать меры предосторожности, чтобы полосы не высохли вследствие испарения. Электрофорез на ацетате целлюлозы широко применяется в клинических исследованиях, а в сочетании с иммунодиффузией может использоваться и для иммуноэлектрофореза. Отсутствие адсорбции на ацетате целлюлозы и обусловленная этим высокая разрешающая способность позволяет при использовании радиоизотопов получать четко разграниченные радиоактивные области.

3) *Тонкие слои*. Тонкие слои окиси кремния, *кизельгура* (осадочная горная порода, состоящая преимущественно из остатков диатомовых водорослей), окиси алюминия или целлюлозы наносят на стеклянные пластинки так же, как и при тонкослойной хроматографии. Пластины помещают горизонтально в аппарат для электрофореза, и тонкому слою дают возможность насытиться буфером за счет диффузии раствора из буферной камеры через соединяющие фитили. Тонкослойный электрофорез, подобно тонкослойной хроматографии, проходит быстро и дает хорошее разрешение при высокой чувствительности. В сочетании с хроматографией тонкослойный электрофорез очень удобен для двумерных разделений, когда после электрофореза в перпендикулярном ему направлении проводят хроматографирование. Такой метод, известен под названием *метода отпечатков пальцев* и дает неоценимую возможность охарактеризовать гидролизаты белков и нуклеиновых кислот. Тонкослойные носители, подобные тем, которые описаны выше, используются и для разделения при высоких напряжениях.

4) *Гели*. Агаровые, крахмальные, полиакриламидные и другие гели готовят непосредственно перед использованием, а это зачастую процесс, требующий времени. Свойства гелей таковы, что и адсорбция, и электроосмос, и расширение зон в результате диффузии очень незначительны. Поэтому *гель-электрофорез* применяется и для препаративных целей, но гораздо более широко используется, как аналитический метод и особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающиеся массы.

А) Крахмальные гели. Крахмальные гели готовят путем нагревания и охлаждения смеси частично гидролизованного крахмала с соответствующим буфером. Это приводит к переплетению разветвленных цепей молекул и образованию полужесткой структуры. Гели обычно наносят на прямоугольные пластины из плексигласа, размеры которых зависят от того, в каком положении (горизонтальном или вертикальном) будут проводить разделение. Перед использованием пластины с гелями выдерживают при температуре от 0 °С до 4 °С. Наибольшее применение крахмальные гели для электрофореза нашли при разделении сложных смесей структурных и физиологически активных белков.

Б) Агар. Это смесь двух галактозных полимеров, агарозы и агаропектина. Их концентрация в геле равна всего 1 %, то есть агар содержит большое количество воды, вследствие чего ионы в процессе электрофореза движутся очень быстро. Благодаря этому свойству агар очень удобен для разделения и обнаружения антигенов методом иммуноэлектрофореза.

В) Полиакриламидный гель (ПААГ). Полиакриламидные гели обладают рядом свойств, благодаря которым они особенно успешно применяются для разделения макромолекул:

- варьирование размера пор в широких пределах;
- возможно их применение с самыми разными буферами;
- быстрое разделение;
- низкий уровень адсорбции и электроосмоса;

- отсутствие способности поглощать ультрафиолетовый свет (следовательно, местоположение белков после разделения можно определить по поглощению при этой длине волны);

- после разделения макромолекулы можно окрашивать и определять количество вещества с помощью денситометра.

Чем меньше процентное содержание акриламида, тем крупнее поры и тем меньшее сопротивление оказывает гель прохождению больших молекул. Для разделения веществ с молекулярным весом около 10⁴ дальтон применяется 30 % гель, а для веществ с молекулярным весом более 10⁸ дальтон – гель с 3 % содержанием акриламида.

3.5 Специальные электрофоретические методы

Обычно выделяют следующие основные типы электрофоретических систем.

А) *Электрофорез с подвижной границей (фронтальный электрофорез)*. Речь идет о свободном перемещении заряженных частиц в буферном растворе. При этом не происходит полного разделения фракций, а можно только различать границы движущихся фронтов белка.

Б) *Зональный электрофорез*. При таком способе возможно разделение смеси веществ на фракции и отдельные зоны.

В) *Стационарный или вытесняющий электрофорез*. Через некоторое время после начала разделения устанавливается состояние равновесия, и ширина зон в дальнейшем не изменяется.

Различные методы электрофоретического разделения веществ кратко освещены в следующих пунктах.

1) *Высоковольтный электрофорез*. При использовании такого метода электрофореза улучшается разрешение, и разделение проходит очень быстро. Для этой цели используют источники питания, обеспечивающие напряжение

до 10 000 В силу тока до 600 мА и создающие *градиент потенциала* до 200 В/см⁻¹ (это скорость возрастания потенциала в направлении кратчайшем между двумя точками). При высоковольтном электрофорезе выделяется такое большое количество тепла, что требуется эффективная система охлаждения. Охлаждение осуществляют двумя способами. Первый с помощью полного погружения (насыщенную буфером бумагу с нанесенным образцом погружают в большой объем охлаждающей жидкости, которая действует как жидкий теплообменник и отводит от бумаги тепло, например, толуол). Такой метод достаточно эффективен и технически легко осуществим, однако охлаждающие жидкости, как правило, токсичны и легко воспламеняемы. Второй вариант – система охлаждающих пластин. Такой метод безопаснее и более эффективен. Две пластины (как правило, алюминиевые) плотно, под давлением прижимаются надувной прокладкой к изолированному от них носителю. В охлаждающих пластинах по специальным каналам циркулируется вода.

Исключительно важно, чтобы все оборудование было полностью электрически изолировано, поскольку применяемые напряжения смертельны.

2) *Проточный электрофорез (непрерывный)*. Данный вид электрофореза считается разновидностью низковольтного электрофореза на бумаге. Образец (растворенный или суспендированный в буфере) непрерывно наносят в верхней части вертикально-расположенного листа бумаги. Образец увлекается вниз буфером, стекающим под действием силы тяжести, одновременно с этим заряженные компоненты образца под влиянием электрического поля перемещаются в горизонтальном направлении. Применяется в основном для фракционирования клеток различных типов, клеточных органелл и фрагментов мембран.

3) *Электрофорез в полиакриламидном геле*. ПААГ – представляет собой синтетический материал с капиллярной структурой, полученный в результате полимеризации акриламида в присутствии «сшивающего» реагента. Размеры пор в геле могут быть сопоставимы с размерами белковых

макромолекул и регулируются изменением соотношения акриламида и «сшивающего» реагента. Подвижность макромолекул находится в обратной зависимости от среднего размера пор в геле, в силу чего при электрофорезе в ПААГ разделение молекул происходит не только в соответствии с их зарядом, но и с размерами. Таким образом, ПААГ служит не только поддерживающей средой, но и сам принимает участие в процессе разделения молекул. ПААГ прозрачен, механически прочен, химически устойчив и инертен, нерастворим в большинстве растворителей. Его можно использовать в широком диапазоне рН, ионной силы и температуры. Гель не сорбирует исследуемые вещества и при проведении электрофореза не возникает явление эндосмоса. Данный вид электрофореза обладает высокой разрешающей способностью, что позволяет разделять многокомпонентные смеси и характеризовать макромолекулы по величине их заряда, молекулярной массе и размерам. К недостаткам метода можно отнести то, что одна полоса на электрофореграмме может включать несколько компонентов, так как крупные молекулы с большим зарядом могут мигрировать с такой же скоростью, как мелкие с небольшим зарядом.

4) *Диск-электрофорез*. Является вариантом электрофореза в ПААГ. Метод получил такое название от английского слова discontinuity – неоднородный, поскольку для проведения электрофореза применяют неоднородную разделяющую систему и в результате разделения в ПААГ белки образуют зоны, имеющие форму дисков. При диск-электрофорезе разделение проводится в геле с различным размером пор, также применяются растворы с разным рН, что дает прерывистый градиент электрического потенциала и рН. Благодаря этому помимо разделения белков на фракции, происходит их концентрирование. Прибор для диск-электрофореза состоит из верхнего и нижнего сосудов, в которых расположены электроды. Стекланные трубки, заполненные гелем из полиакриламида, помещают вертикально между электродными камерами, вставляя в специальные отверстия, вырезанные в дне верхней камеры.

5) *Иммуноэлектрофорез*. Этот метод, сочетающий зональный электрофорез с иммунодиффузией, дает возможность различить сходные по электрофоретической подвижности вещества с помощью специфической *реакции преципитации* (это осаждение растворимого антигена при действии антител в присутствии электролита) между антигеном и соответствующим антителом. Метод особенно ценен для обнаружения антигенов в сложных физиологических смесях, например антигенов иммуноглобулинов.

6) *Изоэлектрическое фокусирование*. Это метод разделения веществ, обладающих *амфотерными свойствами* (вещества, которые обладают и кислотными, и щелочными свойствами), в соответствии со значением их изоэлектрической точки в среде с градиентом pH. Подключение постоянного электрического тока приводит к тому, что заряженные молекулы, которые вначале были равномерно распределены в среде или нанесены в смеси, начинают движение в соответствии со своим зарядом в направлении противоположно заряженного электрода. Молекулы веществ мигрируют в градиенте pH, пока не достигнут положения, где их заряд будет полностью скомпенсирован (*изоэлектрическая точка*). В результате молекулы, которые имеют одинаковые изоэлектрические точки, концентрируются в узкой зоне. Во время проведения изоэлектрического фокусирования молекулы остаются сконцентрированными, так как электрическое поле препятствует диффузии. Наиболее удачным вариантом является изоэлектрофокусирование в ПААГ. Высокая разрешающая способность этого метода позволяет разделять генетические варианты одного и того же белка, отличающиеся всего одной аминокислотой.

7) *Изотахофорез*. Такой вид электрофореза, при котором молекулы под действием электрического поля разделяются в соответствии с их зарядами, образуя узкие зоны, которые затем движутся с одинаковой скоростью, располагаясь друг за другом в соответствии с величиной подвижности каждой зоны. При изотахофорезе имеет место автоматическое повышение резкости границ между зонами – *эффект Кольрауша*.

Преимущество этого метода состоит в том, что в отличие от изоэлектрического фокусирования, этот метод не приводит к осаждению белков.

8) *Капиллярный электрофорез*. Представляет собой вариант зонального электрофореза, который может быть использован как в свободном электролите, так и в поддерживающей среде. В качестве камеры для электрофореза используют тонкостенный кварцевый капилляр, помещенный между двумя электродными камерами. Принцип метода капиллярного электрофореза представлен на рисунке 12.

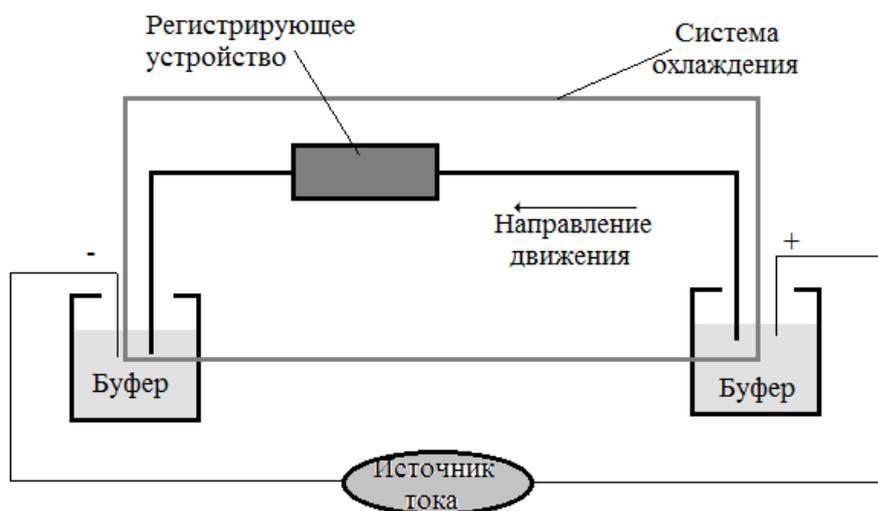


Рисунок 12 – Принцип метода капиллярного электрофореза

Заполнение капилляра гелем дает более высокую степень разделения, однако при этом увеличивается время проведения за счет снижения скорости миграции. Благодаря использованию капилляров с очень маленьким внутренним диаметром и очень высокого напряжения электрического поля, при капиллярном электрофорезе достигают очень быстрого разделения макромолекул с высоким разрешением. Продолжительность процедуры может быть от 5 минут до 30 минут. Разделение молекул в исследуемом образце происходит за счет движения заряженных молекул, на которые действуют электрическое поле и ток жидкости, образующийся за счет электроосмоса и направленный в противоположном направлении. Стенка

капилляра имеет отрицательный заряд, а раствор буфера заряжен положительно, что создает ток жидкости под действием электроосмоса. Направление движения белков определяется следующим соотношением: электроосмотическая подвижность превышает скорость миграции под действием внешнего электрического поля. В результате исследуемые вещества мигрируют в направлении отрицательно заряженного катода. Благодаря высокой разрешающей способности и хорошей воспроизводимости и продуктивности (более 100 образцов в час) результатов, капиллярный электрофорез применяется для анализа разнообразных веществ – неорганических катионов и анионов, лекарственных веществ, аминокислот, пептидов, белков, олигонуклеотидов и оптических изомеров.

4 Физические методы анализа

4.1 Основные принципы физических методов

Физические методы – методы, при реализации которых регистрируется аналитический сигнал физических свойств (ядерные, спектральные, оптические) без проведения химической реакции.

Физические характеристики объектов:

а) способность атомов элементов к испусканию характеристического излучения;

б) способность атомов или молекул веществ взаимодействовать с электромагнитным излучением;

в) способность атомов или молекул веществ взаимодействовать с движущимися заряженными частицами.

В основе физических методов лежит взаимодействие падающего излучения, потока частиц или какого-либо поля с веществом и измерение результата этого взаимодействия. По результату взаимодействия (то есть по прошедшему через вещество излучению) можно обнаружить и исследовать некоторое свойство вещества.

Результат измерения характеристических свойств – сигнал – несет в себе качественную и количественную информацию об определяемом веществе (элементный, изотопный, молекулярный и фазовый состав). Отклик прибора, измеряемый аналитиком, называют сигналом.

Достоинства физических методов исследования: низкие пределы обнаружения, высокая чувствительность, избирательность (селективность), быстрота определения, возможность автоматизации, осуществление дистанционного анализа.

4.2 Классификация физических методов

Классификация представлена на рисунке 13.



Рисунок 13 – Классификация физических методов

4.2.1 Спектроскопические методы

- 1) *Оптические методы:*
 - а) колебательная спектроскопия;
 - б) электронная спектроскопия.

Колебательная спектроскопия – раздел молекулярной спектроскопии, изучающий спектры поглощения и отражения, обусловленные квантовыми переходами между колебательными уровнями энергии молекул. Колебательные спектры могут быть получены либо в результате непосредственного поглощения веществом инфракрасного излучения, либо при поглощении видимого и ультрафиолетового излучения. Соответственно колебательная спектроскопия подразделяется на инфракрасную спектроскопию и спектроскопию комбинационного рассеяния (рамановскую). Колебательная спектроскопия используется для получения информации о структуре молекулы, для количественного анализа, для качественного анализа.

Электронная спектроскопия является весьма чувствительным и удобным методом для исследований вещества во всех трех агрегатных состояниях. Она используется для изучения кинетики реакций, количественных анализов. Эти спектры позволяют устанавливать наличие тех или иных групп в молекуле, то есть осуществлять групповой (функциональный) анализ, изучать строение молекул, исследовать таутомерию (самопроизвольная обратимая изомерия, при которой 2 или более изомера легко переходят друг в друга) и другие превращения.

2) *Магниторезонансные методы:*

а) ядерный магнитный резонанс (ЯМР);

б) электронный парамагнитный резонанс (ЭПР).

Метод ЯМР основан на взаимодействии магнитного и радиочастотного полей с ядрами, которые имеют отличный от нуля собственный магнитный момент. Такими являются, например, ядра изотопов ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P , для которых спиновое квантовое число равно $1/2$, а также ряд других ядер с суммарным спином отличным от $1/2$. Метод ЯМР является структурным методом анализа, что привело к его очень широкому распространению в химии, биологии, медицине. В спектрах магниторезонансных методов отслеживается зависимость интенсивности

резонансного поглощения энергии радиочастотного излучения веществом, которое помещено в постоянное магнитное поле. Спектр – это зависимость интенсивности от частоты падающей электромагнитной волны или напряженности постоянного магнитного поля.

Явление ЭПР заключается в резонансном поглощении электромагнитного излучения в диапазоне радиочастот веществами, помещенными в постоянное магнитное поле, и обусловленное квантовыми переходами между энергетическими подуровнями, связанными с наличием магнитного момента у электронных систем. Также ЭПР называют электронный спиновый резонанс (ЭСР), магнитный спиновый резонанс (МСР) и, среди специалистов, работающих с магнитно-упорядоченными системами, ферромагнитный резонанс (ФМР).

4.2.2 Дифракционные методы

Данные методы используют волновые свойства вещественных частиц (электронов, нейтронов). Волновая природа рентгеновских лучей была открыта в 1912 году немецким физиком Лауэ. Он же заложил основы рентгеновской кристаллографии.

В дифракционных методах измеряют зависимость интенсивности рассеянного излучения от угла рассеяния. При этом анализируются лучи, длина волны которых после рассеяния не изменяется, то есть имеет место так называемое упругое рассеяние.

Выделяют следующие виды:

А) *Рентгеноструктурный анализ (РСА)* позволяет определять координаты атомов в трёхмерном пространстве кристаллических веществ от простейших соединений до сложных белков.

Б) *Газовая электронография (ГЭ)* определяет геометрию свободных молекул в газах, то есть молекул, не подверженных влиянию соседних

молекул, как это имеет место в кристаллах. Электронография применяется для изучения тонких пленок, поверхностей и газов.

В) *Дифракция электронов* – метод исследования структуры твердых тел.

Г) *Нейтронография* – в основе лежит рассеяние нейтронов на ядрах атомов, в отличие от первых двух методов, где используется рассеяние на электронных оболочках. Рентгенография и нейтронография используются для исследований кристаллов или аморфной конденсированной фазы в макроскопических размерах.

Д) *Дифракция отражённых электронов* – кристаллографический метод, применяемый в растровом электронном микроскопе.

Е) *Фотокристаллография* – кристаллографический метод изучения свойств кристаллов в возбужденном состоянии.

Наиболее широкое применение в биохимии нашел метод РСА, который позволяет определять координаты атомов в трехмерном пространстве кристаллической решетки веществ от простейших соединений типа NaCl до таких сложных биополимеров, как белки, нуклеиновые кислоты, органеллы, вирусы.

В числе дифракционных методов, для исследования небольших молекул, применяется ГЭ. С ее помощью определяют геометрию свободных молекул в газах, то есть молекул, не подверженных влиянию соседних частиц, как это имеет место в конденсированной фазе.

Сопоставление РСА и ГЭ для одних и тех же веществ дает возможность оценить влияние кристаллического поля на структуру молекулу.

4.2.3 Ионизационные методы

- 1) Масс-спектрометрия;
- 2) Рентгеновская электронная спектроскопия (РЭС);
- 3) Оптическая ультрафиолетовая электронная спектроскопия (фотоэлектронная спектроскопия, ФЭС).

Отличие этой группы методов от предыдущих: в результате взаимодействия какого-либо падающего излучения или потока частиц с веществом, молекулы этого вещества ионизируются и из них формируется новый поток частиц, который направляется на анализ.

4.3 История развития спектральных методов исследований

Выдающийся английский физик и математик И. Ньютон, основоположник классической физики и математического анализа, первым открыл явление дисперсии света с соответствующим спектром в виде разложения белого света на семь цветов при помощи трехгранной стеклянной призмы, о чем сообщил на заседании Лондонского королевского общества 6 февраля 1672 году.

Астроном-самоучка Ф.В. Гершель в 1800 году открыл и исследовал инфракрасную часть спектра, за которым в 1801 году последовало обнаружение И.В. Риттером и ультрафиолетовой части спектра излучения вещества.

В 1802 году У.Х. Волластон первый обратил внимание исследователей природы на темные линии в спектре Солнца и открыл линейчатый спектр светящихся газов.

Первое серьезное исследование этих линий было предпринято только в 1814 году Йозефом Фраунгофером. В его честь эффект получил название «Фраунгоферовы линии». Фраунгофер установил стабильность положения

линий, составил их таблицу (всего он насчитал 574 линии), присвоил каждой буквенно-цифровой код. Не менее важным стало его заключение, что линии не связаны ни с оптическим материалом, ни с земной атмосферой, но являются природной характеристикой солнечного света. Аналогичные линии он обнаружил у искусственных источников света, а также в спектрах Венеры и Сириуса.

Труды Г.Р. Кирхгофа и Р.В. Бунзена, опубликованные в период с 1859 по 1862 годы заложили фундамент новой физико-химической науки – спектроскопии и её практического применения – спектрального анализа вещества.

В 1859 году Г. Кирхгоф и Р. Бунзен после серии экспериментов заключили: каждый химический элемент имеет свой неповторимый линейчатый спектр, и по спектру небесных светил можно сделать выводы о составе их вещества. С этого момента в науке появился спектральный анализ, мощный метод дистанционного определения химического состава.

Для проверки метода в 1868 году Парижская академия наук организовала экспедицию в Индию, где предстояло полное солнечное затмение. Там учёные обнаружили: все тёмные линии в момент затмения, когда спектр излучения сменил спектр поглощения солнечной короны, стали яркими на тёмном фоне.

Природа каждой из линий, их связь с химическими элементами выяснялись постепенно. В 1860 году Кирхгоф и Бунзен при помощи спектрального анализа открыли цезий, а в 1861 году – рубидий. А гелий был открыт на Солнце на 27 лет ранее, чем на Земле (1868 и 1895 г.г.). Спектральные исследования, проведенные во второй половине девятнадцатого и первой половине двадцатого веков, привели физиков и химиков к открытию 14 новых элементов, представленных в настоящее время в соответствующих ячейках периодической таблицы химических элементов Д.И. Менделеева.

4.4 Спектр электромагнитного излучения. Основные характеристики

Совокупность всех электромагнитных волн образует сплошной *спектр электромагнитного излучения*. Он подразделяется на следующие *диапазоны* (рисунок 14).

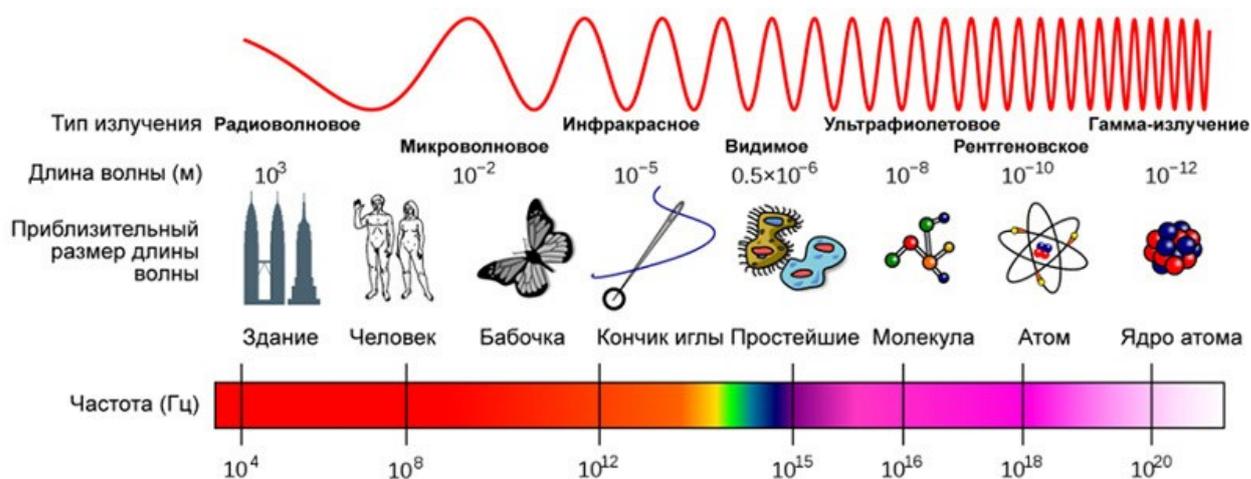


Рисунок 14 – Спектр различных видов электромагнитного излучения

1) *Радиоволны*. Радиоволны могут значительно различаться по длине – от нескольких сантиметров до сотен и даже тысяч километров, что сопоставимо с радиусом Земного шара (около 6400 км). Волны всех радиодиапазонов широко используются в технике – дециметровые и ультракороткие метровые волны применяются для телевидения и радиовещания в диапазоне ультракоротких волн с частотной модуляцией (УКВ/FM), обеспечивая высокое качество приема сигнала в пределах зоны прямого распространения волн. Радиоволны метрового и километрового диапазона применяются для радиовещания и радиосвязи на больших расстояниях с использованием амплитудной модуляции (АМ), которая обеспечивает его передачу на большие расстояния в пределах Земли благодаря отражению волн от ионосферы планеты.

2) *Микроволны*. Микроволны и радиоволны диапазона сверхвысоких частот (СВЧ) имеют длину от 300 мм до 1 мм. Сантиметровые волны, подобно дециметровым и метровым радиоволнам, практически не поглощаются атмосферой и поэтому широко используются в спутниковой и сотовой связи и других телекоммуникационных системах. Более короткие СВЧ-волны также находят множество применений в промышленности и в быту – микроволновые печи.

3) *Инфракрасные лучи (ИК)*. Эта часть электромагнитного спектра включает излучение с длиной волны от 1 миллиметра до восьми тысяч атомных диаметров (около 800 нм). Лучи этой части спектра человек ощущает непосредственно кожей, как тепло. Поскольку большинство объектов на поверхности Земли излучает энергию в инфракрасном диапазоне волн, детекторы инфракрасного излучения играют немаловажную роль в современных технологиях обнаружения. Инфракрасные окуляры приборов ночного видения позволяют людям «видеть в темноте», и с их помощью можно обнаружить не только людей, но и технику, и сооружения, нагретые за день и отдающие ночью свое тепло в окружающую среду в виде инфракрасных лучей.

4) *Видимый свет*. Длины электромагнитных волн видимого светового диапазона колеблются в пределах от восьми до четырех тысяч атомных диаметров (от 800 нм до 400 нм). Человеческий глаз представляет собой идеальный инструмент для регистрации и анализа электромагнитных волн этого диапазона.

5) *Ультрафиолетовые лучи (УФ)*. К ультрафиолетовым лучам относят электромагнитное излучение с длиной волны от нескольких тысяч до нескольких атомных диаметров (от 400 нм до 10 нм). В этой части спектра излучение начинает оказывать влияние на жизнедеятельность живых организмов. Мягкие ультрафиолетовые лучи в солнечном спектре (с длинами волн, приближающимися к видимой части спектра), например, вызывают в умеренных дозах загар, а в избыточных – тяжелые ожоги. Жесткий

(коротковолновой) ультрафиолет губителен для биологических клеток, поэтому используется в медицине для стерилизации хирургических инструментов и медицинского оборудования, убивая все микроорганизмы на их поверхности.

б) *Рентгеновские лучи.* Излучение в диапазоне длин волн от нескольких атомных диаметров до нескольких сот диаметров атомного ядра называется рентгеновским. Рентгеновские лучи проникают сквозь мягкие ткани организма и поэтому незаменимы в медицинской диагностике. Как и в случае с радиоволнами временной разрыв между их открытием в 1895 году и началом практического применения, ознаменовавшимся получением в одной из парижских больниц первого рентгеновского снимка, составил считанные годы.

7) *Гамма-лучи.* Самые короткие по длине волны и самые высокие по частоте и энергии лучи в электромагнитном спектре – это γ -лучи. Они состоят из фотонов сверхвысоких энергий и используются сегодня в онкологии для лечения раковых опухолей. Однако их влияние на живые клетки столь губительно, что при этом приходится соблюдать крайнюю осторожность, чтобы не причинить вреда окружающим здоровым тканям и органам.

4.5 Энергетический спектр электромагнитного излучения

Энергию электромагнитной волны можно характеризовать длиной волны (λ , м), частотой (ν , Гц) и волновым числом ($1/\lambda$).

Длина волны λ показывает наименьшее расстояние между точками, колеблющимися в одинаковых фазах. Это линейная величина, в единицах СИ измеряется в метрах (м) и его долях.

Частота ν показывает число колебаний электрического поля в 1 с, измеряется в герцах ($1 \text{ Гц} = 1 \text{ с}^{-1}$). Частота определяется источником излучения.

Волновое число имеет размерность см^{-1} , оно показывает число волн, приходящихся на 1 см.

По официальной номенклатуре ИЮПАК $1 \text{ см}^{-1} = 1 \text{ Кайзер}$. Спектр различных видов электромагнитного излучения, типы вызываемых им переходов в веществе, и способы наблюдения представлен на рисунке.

Энергия электромагнитного излучения E зависит от частоты излучения и определяется соотношением (1):

$$E = h\nu, \quad (1)$$

где h – постоянная Планка, равная $6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Дж}\cdot\text{с}$.

4.6 Классификация спектральных методов исследования

Среди современных методов анализов все большее распространение приобретает спектроскопия, позволяющая получить наиболее полную информацию о важнейших свойствах продукта.

Спектральные методы исследования основаны на использовании явления поглощения (испускания) электромагнитного излучения атомами или молекулами определенного вещества. Спектральный анализ используется для определения разнообразных органических соединений, а также минеральных элементов с концентрацией от 10^{-2} моля до 10^{-6} моля.

Спектральные методы дают широкие возможности для наблюдения и исследования соответствующих аналитических сигналов в различных областях электромагнитного спектра – рентгеновское излучение, ультрафиолетовое излучение, видимый свет; инфракрасное и радиоволновое излучение. Для исследования свойств пищевых продуктов наибольший интерес представляют области: видимая (от 200 нм до 400 нм) со стеклянной

оптикой, ультрафиолетовая (от 400 нм до 800 нм) с кварцевой оптикой и инфракрасная (от 2 мкм до 15 мкм).

Под воздействием различных излучений происходят электронные переходы в молекулах вещества или свободных атомах исследуемого химического элемента (аналитический сигнал – поглощение или испускание), а также изменения ориентации спинов атомов (аналитический сигнал – ядерный магнитный резонанс) или электронов (аналитический сигнал – электронный парамагнитный резонанс). Аналитические сигналы измеряют различными методами.

По источнику и типу аналитического сигнала спектральные методы делят согласно таблице 4.

Таблица 4 – Классификация спектральных методов

Спектроскопия	Источник аналитического сигнала	Аналитический сигнал	Метод
Молекулярная	Молекула ↓	Поглощение (абсорбция) Испускание (люминесценция)	Молекулярно-абсорбционная спектрометрия (МАС); молекулярно-люминесцентная спектрометрия (МЛС)
Атомная	Атом ↓	Поглощение (абсорбция) Испускание (эмиссия)	Атомно-абсорбционная (ААС); атомно-эмиссионная (АЭС)
Магнитного резонанса	Ядро атомов (магнитный момент ядра) Электрон (магнитный момент электрона)	Ядерный магнитный резонанс – ЯМР-спектр Электронный парамагнитный резонанс – ЭПР-спектр	Спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР); Спектрометрия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

Спектроскопию условно можно разделить на эмиссионную и абсорбционную. Эмиссионная спектроскопия исследует излучательную способность вещества. Испускание энергии связано с предварительным термическим и энергетическим возбуждением атомов, когда электроны с основного уровня переходят при поглощении энергии на более высокий

энергетический уровень. Абсорбционная спектроскопия исследует поглощательную способность вещества. При этом анализируемую пробу помещают между источником электромагнитного излучения с определенным диапазоном частот и спектрометром. Спектрометр измеряет интенсивность света, прошедшего через пробу, в сравнении с источником первоначального излучения при заданной длине волны.

В зависимости от целей анализа и типов спектров выделяют атомный и молекулярный спектральный анализы, которые позволяют определять элементный и молекулярный состав вещества, соответственно.

4.7 Законы поглощения электромагнитного излучения и способы их выражения. Закон Бугера-Ламберта-Бера, закон аддитивности

Основные положения и законы абсорбции излучения справедливы для всех областей спектра – от рентгеновского до радиоизлучения. Количественно поглощение излучения системой описывается законами Бугера-Ламберта-Бера и аддитивности.

Поглощение света – это явление уменьшения интенсивности света при прохождении его через вещество. Уменьшение интенсивности света происходит в результате того, что энергия света переходит в другие виды энергии: энергию активизации, ионизации молекул, энергию теплового хаотического движения частиц в веществе. При прохождении излучения через раствор светопоглощающего вещества поток излучения ослабляется тем сильнее, чем больше энергии поглощают частицы данного вещества. Понижение интенсивности зависит от концентрации поглощающего вещества и длины пути, проходимого потоком. Эта зависимость выражается законом Бугера-Ламберта-Бера. Чтобы учесть потери света, прошедшего через раствор, на отражение и рассеяние, сравнивают интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и растворитель. При одинаковой

толщине слоя в кюветах из одного материала, содержащих один и тот же растворитель, потери на отражение и рассеяние света будут примерно одинаковы у обоих пучков света, и уменьшение интенсивности будет зависеть от концентрации вещества.

Для однородного твердого вещества поглощение света подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера: *интенсивность света I при прохождении через вещество толщиной l уменьшается по экспоненциальному закону. Закон Бугера записывается (2):*

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-elC}, \quad (2)$$

где I_0 – интенсивность монохроматического пучка света, падающего на вещество;

e – молярный коэффициент поглощения;

l – толщина поглощающего слоя, см;

C – концентрация раствора, моль/л.

Графически закон Бугера-Ламберта-Бера представлен на рисунке 15.

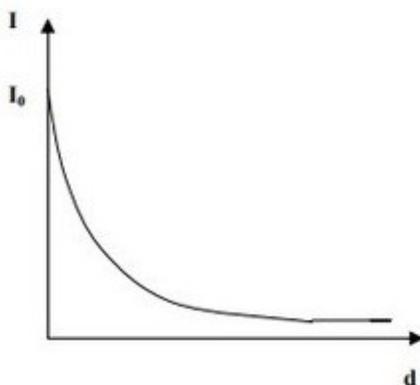


Рисунок 15 – Закон Бугера-Ламберта-Бера

Основной закон светопоглощения, описывающий поглощение смесью веществ называется законом аддитивности: *если через систему, содержащую несколько окрашенных частиц различного сорта, пропустить*

электромагнитное излучение, то оптическая плотность, есть сумма оптических плотностей растворов индивидуальных веществ.

Это справедливо, если:

- а) каждый компонент смеси подчиняется закону Бугера-Ламберта - Бера;
- б) между компонентами смеси отсутствует химическое взаимодействие.

4.8 Атомная спектрометрия

Атомная спектроскопия (АС) включает несколько аналитических методов, используемых для определения элементного состава пробы посредством исследования ее электромагнитного спектра или масс-спектра (рисунок 16).



Рисунок 16 – Классификация атомной спектрометрии

Суть метода: при поглощении энергии (абсорбции) электрон переходит на более высокий энергетический уровень ($E_1 \leftrightarrow E_2$) – ААС. Возбужденный электрон возвращается в основное состояние и испускает свет определенной длины волны (испускание) – МП-АЭС, ИСП-ОЭС (рисунок 17).



Примечания: иллюстрация компании «Agilent»

Рисунок 17 – Наглядная схема перехода электрона на более высокий уровень

4.8.1 Атомно-абсорбционные методы

Методы атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) основываются на том факте, что элементы в атомизированном состоянии поглощают свет при определенной длине волны, переходя из основного состояния в возбужденное состояние.

Количество поглощенной световой энергии пропорционально количеству атомов аналита на пути распространения излучения.

Калибровка метода выполняется посредством введения известных концентраций атомов аналита на пути распространения излучения и построения графика зависимости поглощения от концентрации.

Схема устройства представлена на рисунке 18.



Рисунок 18 - Схема устройства атомно-абсорбционной спектроскопии

Лампа излучает свет соответствующий исследуемому элементу (рисунок 19). Источником света, главным образом, используемым в атомно-абсорбционной спектроскопии, является лампа с полым катодом. Обычно каждая лампа предназначена для анализа одного элемента, в некоторых случаях можно объединить несколько элементов в одну лампу. Из-за этого ограничения атомно-абсорбционная спектроскопия обычно используется для анализа либо какого-то одного элемента, либо небольшой группы элементов.



Примечание: иллюстрация компании «Agilent»

Рисунок 19 – Конструкция лампы с полым катодом

Атомизатор преобразует жидкую пробу в свободные атомы, поглощающие энергию излучения лампы. На рисунке 20 представлены этапы атомизации.

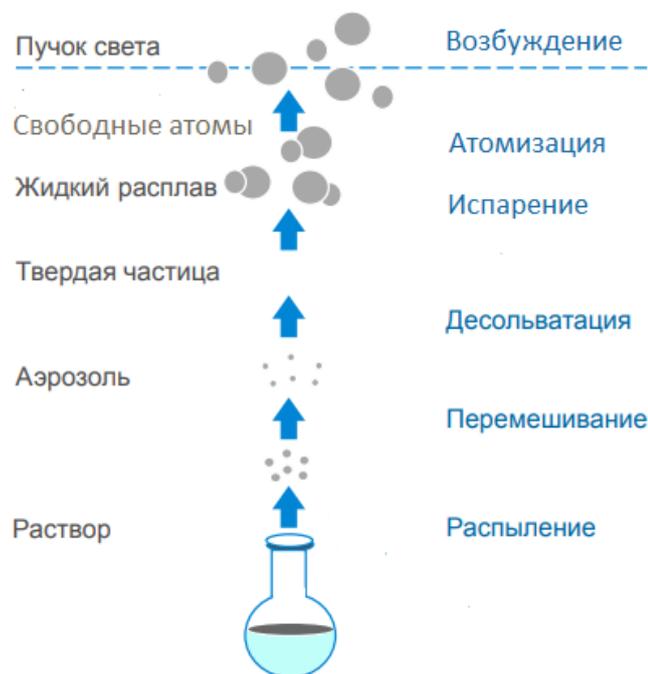


Рисунок 20 – Схема процесса атомизации

Атомы могут поглощать строго определенные порции энергии в виде: теплоты и света при определенных длинах волн.

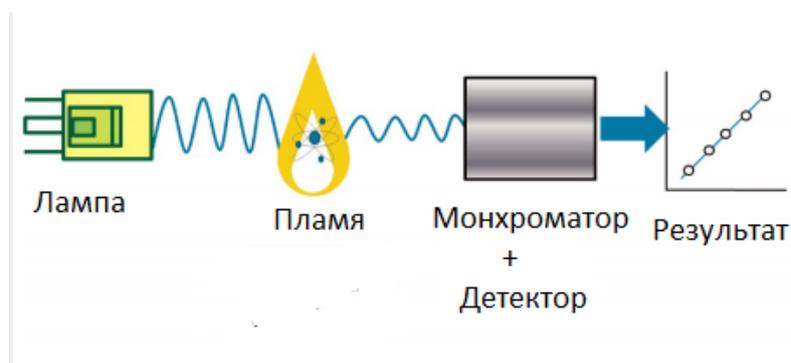
Монохроматор выделяет длину волны, используемую для измерений.

Детектор измеряет интенсивность излучения, поглощенного свободными атомами.

Разновидностью является пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия (ПААС). Здесь проба готовится в жидком виде и распыляется в пламя (атомизация происходит в пламени) (рисунок 21).

Преимуществом ПААС является возможность быстрого анализа, хорошая воспроизводимость, простота в эксплуатации, невысокая стоимость.

Недостатки: требуются воспламеняемые газы, невозможна работа без участия оператора, проба не должна содержать избыточных количеств растворенных твердых веществ.



Примечание: иллюстрация Atomic spectroscopy applications in the contract environmental laboratory

Рисунок 21 – Схема проведения пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии

ААС с электротермическим атомизатором – графитовая печь. В большинстве случаев требуется растворение пробы. Проба вводится в графитовую трубку и электротермически нагревается, проходя различные стадии до атомизации аналита. В атомно-абсорбционной спектроскопии с атомизацией в графитовой печи атомизация происходит в три стадии: сушка, озоление, атомизации (рисунок 22).

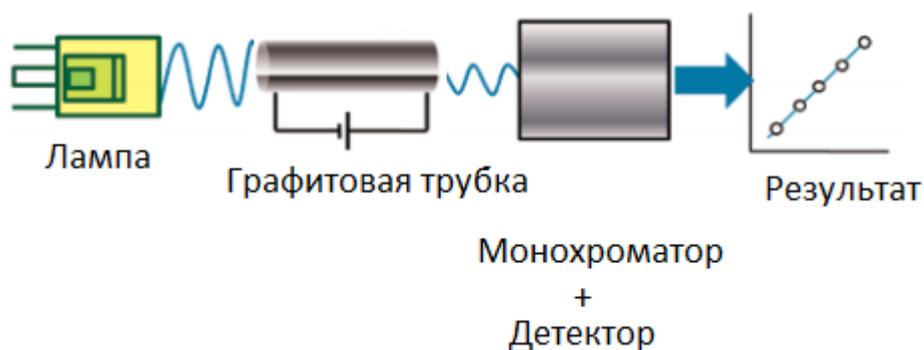


Рисунок 22 – Схема проведения атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермическим атомизатором

Преимуществом данного метода является высокая чувствительность благодаря тому, что вся проба атомизируется одновременно и свободные атомы остаются в оптическом пути более длительное время, сниженные объемы проб, возможен анализ ультраследовых количеств, может использоваться без участия оператора.

Недостатки: медленно работает, меньшее количество элементов может быть проанализировано, разработка методик требует наличия навыков, чаще требуется калибровка методом добавления внутренних стандартов (по сравнению с пламенной ААС), дорогие расходные компоненты (графитовые трубки).

На рисунке 23 представлен диапазон анализируемых элементов с помощью ААС.

H																			He	
Li	Be																			Ne
Na	Mg																			Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br				Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I				Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At				Rn
Fr	Ra	Ac																		
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu				
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Mn	No	Lr				

Примечание: иллюстрация компании «Agilent»

Рисунок 23 – Диапазон анализируемых элементов с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии

Ключевые области применения: определение следовых количеств металлов / примесей в маслах, растениях, воде; анализ элементов в жидкостях, воде, почве, пищевых продуктах, плазме крови, полупроводниках.

4.8.2 Атомно-эмиссионные методы

В связи с недостатками ААС распространение получили методы, не требующие специальных ламп для каждого элемента. Эти методы,

называемые атомно-эмиссионной спектроскопией (АЭС), основываются на том, что после возбуждения атома определенного элемента (как в атомно-абсорбционной спектроскопии) он излучает свет с характеристическим набором длин волн (эмиссионный спектр) при возвращении в основное состояние.

Пламя не является идеальным источником возбуждения для атомно-эмиссионной спектроскопии. Используются следующие методики:

а) Атомно-эмиссионная спектроскопия с микроволновой плазмой (МП-АЭС);

б) Оптико-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС).

МП-АЭС – азотная плазма используется для десольватации, атомизации и возбуждения атомов в жидкой пробе, распыленной в плазме. Азотная плазма значительно горячее (до 5 000 К), чем воздушно-ацетиленовое пламя, используемое в ААС. Атомная эмиссия достаточно интенсивна для большинства элементов, что обеспечивает лучшие возможности для детектирования и расширенный линейный динамический диапазон по сравнению с пламенной ААС для большинства элементов.

Интенсивность излучаемого света измеряется с помощью оптического детектирования при длинах волн, являющихся характеристическими для исследуемых элементов.

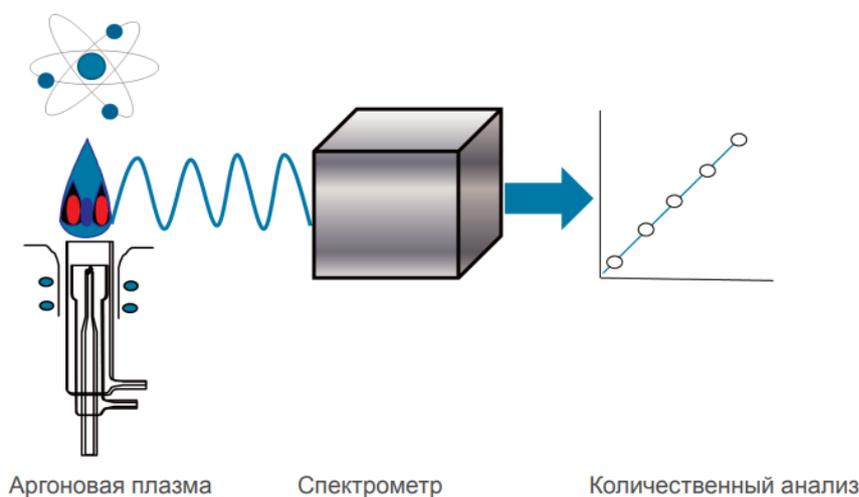
Достоинства МП-АЭС: безопасная методика (без воспламеняющегося газа); низкие эксплуатационные расходы, связанные с тем, что азот можно выделить из сжатого воздуха с помощью генератора азота; для анализа не требуются лампы; идентификация и количественный анализ; практически всех металлов и многих металлоидов; более высокие рабочие характеристики, чем у пламенной ААС.

Недостатки: более высокая исходная стоимость, чем у ААС; больше интерференций по сравнению с пламенной ААС (включая спектральные интерференции); меньшая чувствительность, чем в ААС с атомизацией в

графитовой печи и ИСП-МС; меньшая производительность, чем в ИСП-ОЭС; невозможно определение изотопов.

Ключевые области применения: определение следовых количеств элементов в геологических пробах; определение металлов в вытяжках почв; определение макроэлементов в пище и напитках; анализ нефти; анализ сточных вод.

ИСП-ОЭС – индуктивно-связанная аргоновая плазма (горячее, чем в МП, до $10\ 000^\circ\text{K}$) используется для десольватации, атомизации и возбуждения атомов в жидкой пробе, распыленной в плазме (рисунок 24).



Примечание: иллюстрация компании «Agilent»

Рисунок 24 – Схема спектрометра с индуктивно-связанной аргоновой плазмой

Интенсивность излучаемого света измеряется с помощью оптического детектирования при длинах волн, являющихся характеристическими для исследуемых элементов.

С помощью ИСП-ОЭС можно измерять и атомную, и ионную эмиссию, поэтому возможен мониторинг большего количества длин волн.

Достоинства метода: самый высокий пробопоток; одновременный многоэлементный анализ (до 73 элементов); широкий динамический диапазон; низкое потребление аргона; безопасная методика (без воспламеняющегося газа).

Недостатки: более высокая исходная стоимость, чем у ААС и МП-АЭС; больше спектральных интерференций, чем в МП-АЭС; меньшая чувствительность, чем в ААС с атомизацией в графитовой печи и ИСП-МС; невозможно определение изотопов.

Ключевые области применения: мониторинг воды, сточных вод, твердых отходов; определений следовых количеств элементов в воде; мониторинг ртути в образцах из окружающей среды; количественный анализ нескольких элементов в образцах воды, почвы, отложений; анализ почвы — анализ содержания микроэлементов (сельское хозяйство); определение драгоценных металлов и золота.

4.9 Молекулярная спектromетрия

В методах молекулярной спектromетрии с электромагнитным излучением взаимодействуют молекулы определяемых вещества. Выделяют следующие виды.

1) *Спектрофотометрический анализ.* Основан, на поглощении излучения диапазона от 200 до 800, связанного с осуществлением электронных переходов валентных электронов.

Применение – определение отдельных элементов и органических соединений. Для идентификации органических соединений может быть использовано их собственное поглощение в УФ области, обусловленное наличием специфических групп атомов, часто называемых хромофорами. Спектрофотометрические методы, по сравнению с фотоколориметрическими, позволяют решать более широкий круг задач:

- проводить количественное определение веществ в широком интервал длин волн (от 185 нм до 1100 нм);
- осуществлять количественный анализ многокомпонентных систем (одновременное определение нескольких веществ);

- определять состав и константы устойчивости светопоглощающих комплексных соединений;

- определять фотометрические характеристики светопоглощающих соединений.

Существуют приборы для измерений в видимой, УФ- и ИК-областях спектра. Принципиальная схема спектрофотометра практически не зависит от спектральной области.

Спектрофотометры, как и фотометры, бывают одно- и дулучевые. В дулучевых приборах световой поток каким-либо способом раздваивают или внутри монохроматора, или по выходе из него: один поток затем проходит через испытуемый раствор, другой – через растворитель. Однолучевые приборы особенно удобны при выполнении количественных определений, основанных на измерении оптической плотности при одной длине волны. Большая скорость и удобство измерения при работе с дулучевыми приборами полезны в качественном анализе, когда для получения спектра оптическая плотность должна быть измерена в большом интервале длин волн. Кроме того, дулучевое устройство легко приспособить для автоматической записи непрерывно меняющейся оптической плотности: во всех современных регистрирующих спектрофотометрах для этой цели используют именно дулучевую систему

2) *Флуориметрический анализ.* Многие органические соединения или их комплексы с ионами металлов способны к фотолюминесценции, вызванной испусканием квантов в видимой области при возбуждении молекул УФ излучением и видимым светом. Такой вариант люминесцентного анализа называют флуориметрическим. Флуориметрия дает более низкий предел обнаружения по сравнению со спектрофотометрией .

3) *Инфракрасная спектрометрия.* Основное назначение – идентификация химических соединений по их колебательным и реже вращательным спектрам.

4) *Комбинационное рассеяние света (КРС, Рамановская спектрометрия, Раман-эффект)*. Этот метод позволяет наблюдать и эти колебания и, таким образом, дополняет результаты ИК спектрометрического исследования.

5) *Фотоакустическая спектрометрия*. Этот способ относительно нов и весьма удобен при исследованиях больших молекул в биохимических исследованиях.

4.10 Спектрометрия магнитного резонанса

Методы основаны на измерении резонансного поглощения электромагнитного излучения радиочастотного диапазона, прошедшего через пробу.

Ядерный магнитный резонанс. Наблюдается только на ядрах имеющих магнитный момент – ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , в то время как электронный парамагнитный резонанс на электронах, обладающих нескомпенсированным спином. Для наблюдения резонансного поглощения исследуемое вещество помещают в сильное постоянное магнитное поле и одновременно налагают на него переменное радиочастотное поле. В этом случае частицы, обладающие магнитными свойствами, имеют возможность находиться на одном из появляющихся под воздействием магнитного поля энергетическом уровне, т.е. реализуются их энергетические переходы. Этот факт и регистрируется как спектр магнитного резонанса, удобно обсуждать с точки зрения классической электродинамики.

ЯМР используют при изучении органических, неорганических, биологических и элементоорганических соединений, включая макромолекулы полимеров и протеинов. Ценную информацию дают химические сдвиги, данные о спин-спиновом взаимодействии, исследование тонкой структуры пиков. В современных приборах с высоким разрешением

использую ЯМР спектрометры с Фурье-преобразованием и с электромагнитами со сверхпроводниками. Возможности ЯМР спектроскопии ограничены ядрами, обладающими магнитными моментами. Большинство элементов, как правило, имеют один стабильный изотоп с магнитным моментом. Если его распространенность в природе мала, используют прием изотопного обогащения.

Электронный парамагнитный резонанс. Электронный парамагнитный резонанс можно наблюдать для веществ, в которых атомы и молекулы имеют неспаренные электроны. Это могут быть соединения парамагнитных ионов металлов (Ti(III), V(IV), Mo(V), Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(III), Cu(II), Ag(II), Eu(II)), органические и неорганические радикалы, атомы и молекулы с нечетным числом электронов (NO, H, N), полупроводники, возбужденные триплетные состояния молекул. Метод позволяет исследовать структуру соединений и химическую связь в них. Идея ЭПР состоит в том, что неспаренный электрон, обладающий спиновым вращательным моментом, под воздействием электромагнитного поля микроволнового диапазона приобретает магнитный момент, который может взаимодействовать с налагаемым внешним магнитным полем H . Это приводит к возможности нахождения электрона на уровнях с различной ориентацией спина. Между этими двумя уровнями и наблюдается резонансный переход, регистрируемый как сигнал ЭПР.

Взаимодействие спинов электрона и ядра в молекуле приводит к появлению сверхтонкой структуры спектра ЭПР, которое является мерой спиновой плотности электрона на ядрах. Анализ интенсивностей и энергий расщепления позволяет установить природу парамагнитного состояния. Расширение возможностей метода на диамагнитные ионы дает использование их комплексообразования с органическими реагентами, представляющими собой устойчивые свободные радикалы. Такие реагенты называют спин-мечеными.

4.11 Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ – это метод исследования строения тел, использующий явление дифракции рентгеновских лучей, метод исследования структуры вещества по распределению в пространстве и интенсивностям рассеянного на анализируемом объекте рентгеновского излучения. Дифракционная картина зависит от длины волны используемых рентгеновских лучей и строения объекта. Для исследования атомной структуры применяют излучение с длиной волны $\sim 1 \text{ \AA}$, т.е. порядка размеров атома.

Методами рентгеноструктурного анализа изучают металлы, сплавы, минералы, неорганические и органические соединения, полимеры, аморфные материалы, жидкости и газы, молекулы белков, нуклеиновых кислот и т.д. Рентгеноструктурный анализ является основным методом определения структуры кристаллов. При исследовании кристаллов он даёт наибольшую информацию. Это обусловлено тем, что кристаллы обладают строгой периодичностью строения и представляют собой созданную самой природой дифракционную решётку для рентгеновских лучей. Однако он доставляет ценные сведения и при исследовании тел с менее упорядоченной структурой, таких, как жидкости, аморфные тела, жидкие кристаллы, полимеры и другие. На основе многочисленных уже расшифрованных атомных структур может быть решена и обратная задача: по рентгенограмме поликристаллического вещества, например легированной стали, сплава, руды, лунного грунта, может быть установлен кристаллический состав этого вещества, то есть выполнен фазовый анализ.

В ходе рентгеноструктурного анализа исследуемый образец помещают на пути рентгеновских лучей и регистрируют дифракционную картину, возникающую в результате взаимодействия лучей с веществом. На следующем этапе исследования анализируют дифракционную картину и

расчётным путём устанавливают взаимное расположение частиц в пространстве, вызвавшее появление данной картины.

Рентгеноструктурный анализ кристаллических веществ распадается на два этапа.

А) Определение размеров элементарной ячейки кристалла, числа частиц (атомов, молекул) в элементарной ячейке и симметрии расположения частиц (так называемой пространственной группы). Эти данные получают путём анализа геометрии расположения дифракционных максимумов.

Б) Расчёт электронной плотности внутри элементарной ячейки и определение координат атомов, которые отождествляются с положением максимумов электронной плотности. Эти данные получают анализом интенсивности дифракционных максимумов.

Существуют различные экспериментальные методы получения и регистрации дифракционной картины. В любом случае имеется источник рентгеновского излучения, система для выделения узкого пучка рентгеновских лучей, устройство для закрепления и ориентирования образца в пучке и приёмник рассеянного образцом излучения. Приёмником служит фотоплёнка, либо ионизационные или сцинтилляционные счётчики рентгеновских квантов. Метод регистрации с помощью счётчиков (дифрактометрический) обеспечивает значительно более высокую точность определения интенсивности регистрируемого излучения.

Основными рентгеновской съёмки кристаллов являются: метод Лауэ, метод порошка (метод дебаеграмм), метод вращения и его разновидности – метод качания и различные методы рентгенгонометра.

4.12 Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия – метод исследования вещества путём определения отношения массы к заряду (качества) и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином процессе воздействия на вещество.

Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия непосредственно детектирует сами частицы вещества.

Масс-спектрометр – это вакуумный прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра.

Масс-спектр – это зависимость интенсивности ионного тока (количества) от отношения массы к заряду (качества). Ввиду квантования массы и заряда типичный масс-спектр является дискретным. Природа анализируемого вещества, особенности метода ионизации и вторичные процессы в масс-спектрометре могут оставлять свой след в масс-спектре. Так ионы с одинаковыми отношениями массы к заряду могут оказаться в разных частях спектра и даже сделать часть его непрерывным.

Ионы бывают однозарядные и многозарядные, причём как органические, так и неорганические. Большинство небольших молекул при ионизации приобретает только один положительный или отрицательный заряд. Атомы способны приобретать более одного положительного заряда и только один отрицательный. Белки, нуклеиновые кислоты и другие полимеры способны приобретать множественные положительные и отрицательные заряды.

Атомы химических элементов имеют специфическую массу. Таким образом, точное определение массы анализируемой молекулы, позволяет определить её элементный состав. Масс-спектрометрия также позволяет

получить важную информацию об изотопном составе анализируемых молекул.

В органических веществах молекулы представляют собой определённые структуры, образованные атомами. Природа и человек создали поистине неисчислимо многообразие органических соединений. Современные масс-спектрометры способны фрагментировать детектируемые ионы и определять массу полученных фрагментов. Таким образом, можно получать данные о структуре вещества.

Принцип работы. Чтобы получить масс-спектр необходимо превратить нейтральные молекулы и атомы, составляющие любое органическое или неорганическое вещество, в заряженные частицы – ионы. Этот процесс называется ионизацией и по-разному осуществляется для органических и неорганических веществ. Далее необходим перевод ионов в газовую фазу в вакуумной части масс-спектрометра. Глубокий вакуум обеспечивает беспрепятственное движение ионов внутри масс-спектрометра, а при его отсутствии ионы рассеются и рекомбинируют (превратятся обратно в незаряженные частицы).

Условно способы ионизации органических веществ можно классифицировать по фазам, в которых находятся вещества перед ионизацией.

1) Газовая фаза:

- электронная ионизация (EI);
- химическая ионизация (CI);
- электронный захват (EC);
- ионизация в электрическом поле (FI).

2) Жидкая фаза:

- термоспрей;
- ионизация при атмосферном давлении (AP);
- электроспрей (APESI);
- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);

- фотоионизация при атмосферном давлении (APPI).

3) Твёрдая фаза:

- прямая лазерная десорбция - масс-спектрометрия (LDMS);

- матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI);

- масс-спектрометрия вторичных ионов (SIMS);

- бомбардировка быстрыми атомами (FAB);

- десорбция в электрическом поле (FD);

- плазменная десорбция (PD).

В неорганической химии для анализа элементного состава применяются *жёсткие методы ионизации*, так как энергии связи атомов в твёрдом теле гораздо больше и значительно более жёсткие методы необходимо использовать для того, чтобы разорвать эти связи и получить ионы:

а) ионизация в индуктивно-связанной плазме (ICP);

б) термоионизация или поверхностная ионизация;

в) ионизация в тлеющем разряде и искровая ионизация ;

г) ионизация в процессе лазерной абляции.

Масс-анализаторы. Полученные при ионизации ионы с помощью электрического поля переносятся в масс-анализатор. Там начинается второй этап масс-спектрометрического анализа – сортировка ионов по массам (m/z).

Существуют следующие типы масс-анализаторов:

1) Непрерывные масс-анализаторы:

а) магнитный и электростатический секторный масс-анализатор;

б) квадрупольный масс-анализатор.

2) Импульсные масс-анализаторы:

а) времяпролётный масс-анализатор;

б) ионная ловушка;

в) квадрупольная линейная ловушка;

г) масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием.

Разница между непрерывными и импульсными масс-анализаторами заключается в том, что в первые ионы поступают непрерывным потоком, а во вторые – порциями, через определённые интервалы времени.

Масс-спектрометр может иметь два масс-анализатора. Такой масс-спектрометр называют тандемным. Тандемные масс спектрометры применяются, как правило, вместе с «мягкими» методами ионизации, при которых не происходит фрагментации ионов анализируемых молекул (молекулярных ионов). Таким образом, первый масс-анализатор анализирует молекулярные ионы. Покидая первый масс-анализатор, молекулярные ионы фрагментируются под действием соударений с молекулами инертного газа или излучения лазера, после чего их фрагменты анализируются во втором масс-анализаторе. Наиболее распространёнными конфигурациями тандемных масс спектрометров являются квадруполь-квадрупольная и квадруполь-времяпролётная.

Детекторы. Последним элементом упрощённого масс-спектрометра, является детектор заряженных частиц. Первые масс-спектрометры использовали в качестве детектора фотопластинку. Сейчас используются диодные вторично-электронные умножители, в которых ион, попадая на первый диод, выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий диод, выбивают из него ещё большее количество электронов и т. д. Другой вариант – фотоумножители, регистрирующие свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора. Кроме того, используются микроканальные умножители, системы типа диодных матриц и коллекторы, собирающие все ионы, попавшие в данную точку пространства (коллекторы Фарадея).

5 Методы иммунохимических исследований

Методы иммунного анализа широко вошли в медицинскую практику. Во всех областях современной медицины используется иммунный анализ с диагностической и аналитической целями. Особенно важно, что они дают возможность идентифицировать биологические компоненты (гормоны, ферменты, нейропептиды, продукты иммунной системы, антигены и т.д.) в низких и очень низких концентрациях.

Иммунный анализ основывается на реакции взаимодействия антигена (АГ) и антитела (АТ) с образованием иммунного комплекса, с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель) (рисунок 25). Эти реакции называют серологическими, так как для их постановки используют сыворотки, содержащие антитела. Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы

Сферы применения. Данные методы показаны, когда необходимо количественно определить концентрации химических веществ, содержащихся в очень низких концентрациях: используются для лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, распознавания аллергии и аутоиммунных болезней, беременности, гормональных нарушений.



Рисунок 25 – Реакция «антиген-антитело»

Специфичность: высокоспецифичны (от 95 % до 98 %), можно легко и точно дифференцировать в биологической пробе химические вещества, имеющие очень схожую молекулярную структуру (например, тироксин и трийодтиронин).

Чувствительность: при помощи иммунологических методов исследования в биологической пробе можно определить химические вещества в концентрациях вплоть до моль/л.

Для детектирования результатов иммунохимической реакции один из компонентов реакции (гаптен или антитело) метят специальной меткой. В зависимости от природы применяемой метки и способа ее детектирования существуют следующие *виды иммунохимического анализа:*

- а) радиоиммунный (РИА);
- б) иммуноферментный (ИФА);
- в) флуоресцентно-иммунный;
- г) методы, основанные на реакции агглютинации / преципитации;
- д) иммуноблоттинг;
- е) иммуноцито- и иммуногистохимия;
- ж) методы проточной цитофлуориметрии.

Реагенты:

1) Антиген (*АГ*) – это любое чужеродное вещество, которое стимулирует к выработке антител. По химической природе – это белки, пептиды, полисахариды. Та часть молекулы антигена, которая соединяется с антителом, называется эпитопом или антигенной детерминантой (общие участки от нескольких эпитопов).

1) антитело (*АТ*) или иммуноглобулины – крупные белки (от 150 до 190 кДа): IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Различаются между собой по строению и аминокислотному составу тяжёлых цепей и по выполняемым эффекторным функциям. Иммуноглобулины G, D, E – мономеры; M – пентамер; A – в крови мономер, в секретах – димер.

В молекуле иммуноглобулина выделяют следующие области: Fc-фрагмент – константный домен и Fab-фрагмент – антигенсвязывающий, переменный домен.

Антитела могут быть моноклональными и поликлональными. АТ с одной специфичностью связывания называются моноклональными. Моноклональные антитела направлены к определенному эпитопу антигена. Они вырабатываются одним клоном, являющимся потомством одной исходной клетки. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью действия, осуществляется полная стандартизация препарата АТ, а также свободный выбор АГ-детерминант к которому образуются АТ, поэтому их применение в иммунохимических анализах является предпочтительным. Их искусственно получают в лабораториях с использованием гибридомной технологии.

Гибридомы представляют собой клоны клеток, полученных путем слияния антителообразующей клетки человека с опухолевыми клетками. Гибридная клетка получает от антителообразующей клетки способность продуцировать иммуноглобулины, а от опухолевой клетки – способность к самоподдержанию и неограниченному росту. Такая гибридная клетка, помещенная в питательную среду, размножается и вырабатывает в надосадочную жидкость антитела. В процессе культивирования проводят постоянный контроль антител на специфичность иммунохимическими методами. Полученные антитела являются молекулярно однородными и доступными для получения в относительно больших количествах.

Смесь иммуноглобулинов различающихся по специфичности называют поликлональные АТ. Поликлональные антитела являются производными нескольких клеточных клонов и направлены против разных эпитопов одного и того же антигена. Их получают путем иммунизации животных антигенами.

В диагностических тест-системах в качестве «ловушек» применяются IgG, так как:

а) содержание в сыворотке IgG (от 75 % до 80 %) больше, чем других классов;

б) молекула представлена мономером;

в) АТ получают в результате иммунизации животных соответствующим АГ (используют крыс, мышей, кроликов, овец, коз, лошадей).

Реакция АГ-АТ (3):



где K_1 – константа скорости прямой реакции;

K_2 – константа скорости обратной реакции.

Константы показывают, какая доля молекул вступает в реакцию (4).

$$K_p = \frac{[\text{АТ} - \text{АГ}]}{[\text{АТ}] \times [\text{АГ}]}, \quad (4)$$

где K_p – константа равновесия.

5.1 Основные принципы метода иммунного анализа

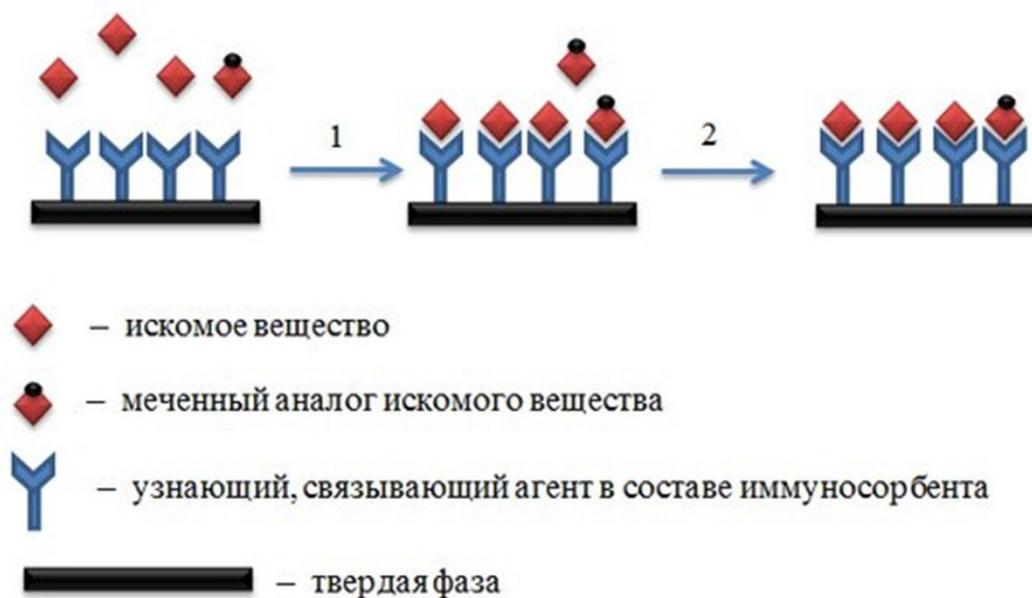
В основе лежит реакция АГ-АТ. В зависимости от того, что является искомым веществом (АГ или АТ), от соотношения их количества методы различают *по типу связывания*:

а) конкурентное связывание;

б) неконкурентное связывание;

в) неравновесное связывание.

Конкурентный метод. Метод заключается в конкурентном взаимодействии между стандартным меченным и определяемым веществом за связывание с узнающим агентом на твердой фазе (рисунок 26).



Обозначения: 1 – фаза инкубации, 2– промывка

Рисунок 26 – Схема конкурентного связывания

Меченый реагент вносится в строго дозированном количестве, т.к. если будет его избыток, то это не даст определить определяемое вещество в малых концентрациях.

Содержание вещества в образце обратно пропорционально количеству меченого реагента, связанного с твердой фазой.

Неконкурентный метод. Предназначен для определения веществ, молекулы которых имеют, как минимум, два участка связывания (эпитопа), и предполагают использование двух узнающих агентов. Первый в избыточном (максимально возможном) количестве иммобилизован на твердой фазе и связывает молекулы определяемого вещества, находящиеся в жидкой фазе. Второй узнающий агент имеет метку и связывает второй эпитоп молекулы определяемого вещества, его добавляют либо сразу с исследуемым образцом (одностадийная схема), либо после связывания молекул определяемого

вещества с первым узнающим реагентом и последующей промывки (двухстадийная схема). Если определяемое вещество антиген, то используют «сэндвич-метод» (рисунок 27).

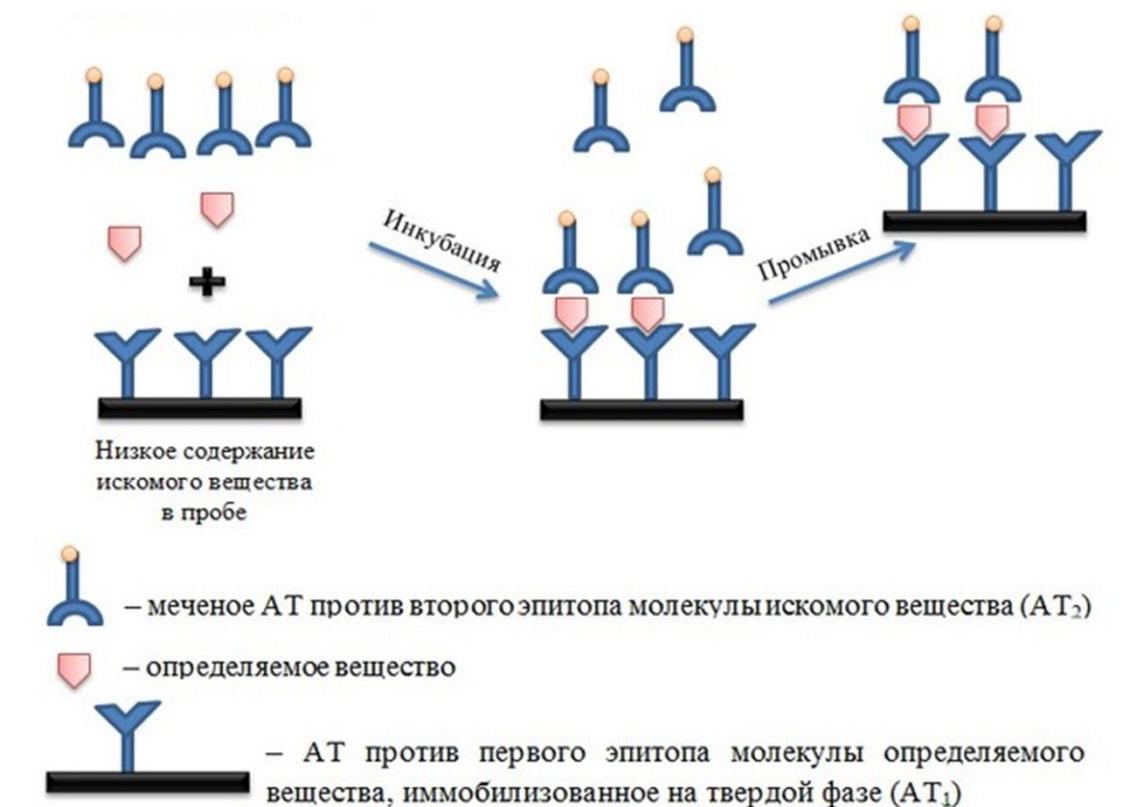


Рисунок 27 – Схема «сэндвич-метод»

На твердой фазе адсорбированы антитела к исследуемому антигену. После инкубации исследуемого материала и образования комплекса «антитело-антиген» проводится удаление несвязавшихся компонентов, добавляется конъюгат, т.е. антитела к искомому антигену, меченые ферментом. По завершении инкубации, с последующим удалением непрореагировавшего конъюгата промывкой, образуется комплекс, в котором антиген как бы заключен между двумя слоями антител. Наличие меченных ферментом антител определяется при помощи соответствующего субстрата. «Сэндвич-метод» используется для выявления HBsAg, HBeAg, антигена вируса гепатита А.

Если необходимо определить АТ, то АГ закреплен на твердой фазе, а второй меченый – антивидовое АТ (рисунок 28).

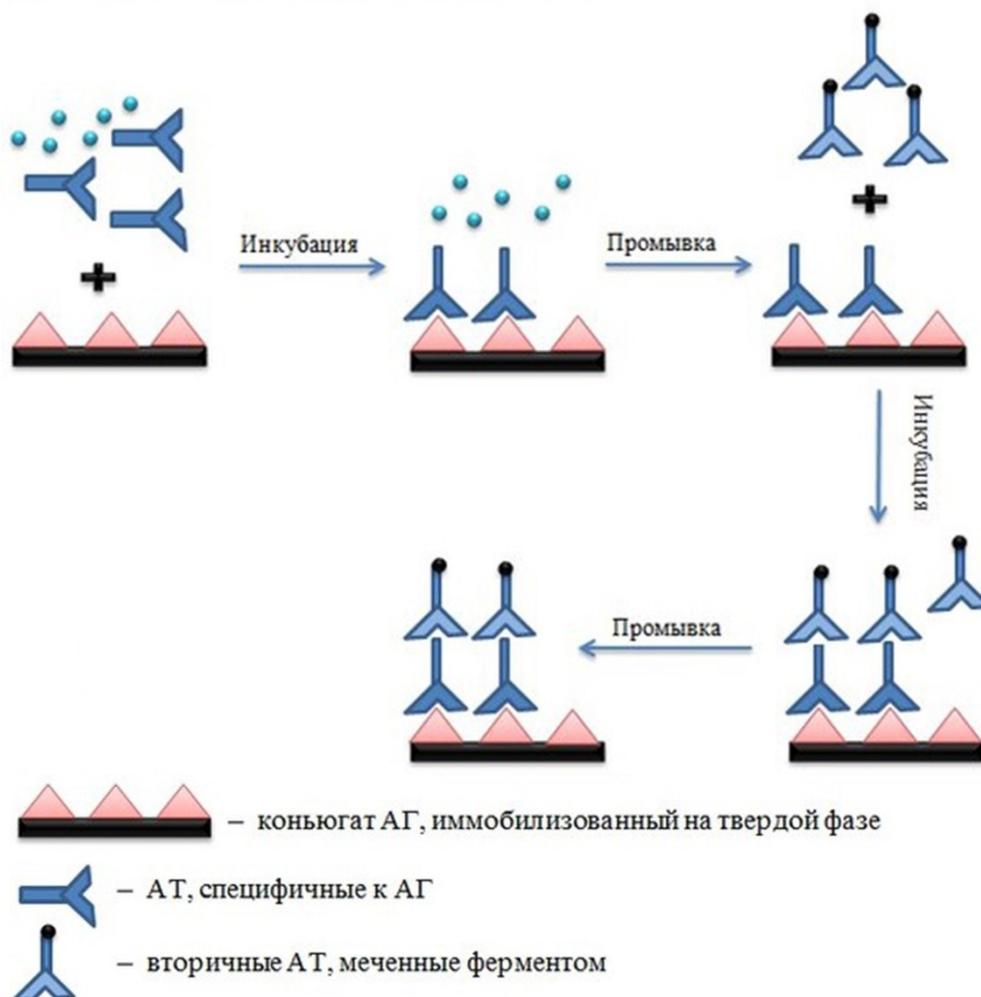


Рисунок 28 – Схема определения антитела неконкурентным методом

Неравновесный метод. Используют для АГ менее 1000 Да, имеющих одну АГ-детерминанту, молекула определяемого вещества связывается со строго определенным избытком меченых АТ в жидкой фазе, затем добавляют АГ или антивидовые АТ, иммунизированные на твердом носителе с целью удаления из жидкой фазы несвязанных АТ.

Виды меток, используемых в иммуноанализе:

- а) нерастворимые частицы (латексные гранулы, частицы графита);
- б) соли металлов и красителей (золото, Luminous Red G);
- в) радионуклиды (^{125}I , ^3H);
- г) вещества, рассеивающие электроны;

- д) бактериофаги;
- е) флуоресцентные красители;
- ж) хемилюминесцирующие и биолюминесцирующие вещества;
- з) липосомы;
- и) простетические группы;
- к) субстраты ферментов;
- л) ферменты (пероксидаза хрена).

5.2 Радиоиммунологический анализ

Радиоиммунологический анализ (РИА) представляет количественное определение антигенов или антител, принципиальной основой которого является конкурентное связывание искомым (немеченых) и идентичных искусственно-меченых веществ со специфическими связывающими системами.

Специфическая связывающая система («биндер», т.е. связывающий) вступает в равноправное взаимодействие как с исследуемым веществом («лигандом»), так и с его аналогом, меченым радиоактивным нуклидом, связываясь с ним в количествах, пропорциональных их исходным концентрациям. Таким образом, чем больше содержание исследуемого вещества в данной пробе, тем меньшая часть его меченого аналога свяжется со специфической связывающей системой и тем большая часть его останется несвязанной. В качестве связывающего агента используют – антитела, а в качестве лиганда – антигены.

Чаще всего комплекс «лиганд + биндер» выпадает в осадок, а несвязанная часть меченого аналога остаётся в надосадочной жидкости. При этом количество искомого вещества в различных пробах варьируется, а количество меченого аналога и специфической связывающей системы – постоянно. Кроме того, обычно меченого «лиганда» больше, чем «биндера».

Отделив комплекс меченый «лиганд + биндер» от несвязавшегося «лиганда», можно измерить связавшуюся величину активности, которая обратно пропорциональна содержанию искомого вещества. Одновременно в тех же условиях проводится серия анализов с известными концентрациями искомого вещества (так называемые стандартные разведения), которые позволяют построить калибровочную кривую, отражающую изменения связанной активности в зависимости от концентрации немеченого искомого вещества. Сопоставление активности исследуемых проб и проб с известной концентрацией позволяет определить неизвестную концентрацию.

Принцип метода. Основа анализа – использование радиоактивных меток для детекции специфических комплексов АГ-АТ. Обычно используют изотопы йода (^{125}I или ^{131}I), изотоп водорода (тритий ^3H). Далее определяют радиоактивность комплекса: количество меченого антигена, связавшегося с антителами, обратно пропорционально количеству искомого антигена. Учет реакции проводят по убыванию или по возрастанию радиоактивности (в зависимости от методики РИА) с помощью специальных счетчиков β - или γ -излучения. Радионуклид ^{125}I менее стабилен, чем тритий и реактивы с данной меткой необходимо использовать в течении от 3 до 8 недель. Антигены, меченные тритием ^3H , дольше сохраняются (от 3 до 6 месяцев), но имеют низкую удельную радиоактивность и требуют специальных приборов для радиометрии – жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Применение. РИА применяют для выявления АГ микроорганизмов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов.

Метод высокочувствителен, однако постепенно вытесняется иммуноферментным анализом, что связано с небезопасностью работы с радиоактивными изотопами, короткими сроками хранения и наличием сложного регистрационного оборудования. Также необходима специальная система производства, доставки, учета, утилизации реагентов меченных радионуклидами.

Виды радиоиммунного анализа:

- а) радиоиммунологический;
- б) иммунорадиометрический (иммунную метку содержит АГ);
- в) радиорецепторный (этот анализ незаменим для определения активной формы веществ).

5.2.1 Основные компоненты радиоиммунологического анализа

1) *Исследуемый материал* (плазма и сыворотка крови, моча, слюна). Кровь переносится в пробирку из шприца без пенообразования (для предупреждения гемолиза); оптимальное время от взятия крови до анализа – 30 минут, при накоплении образцов пробы хранят в замороженном виде (минус 20 °С); при исследовании гормонов с лабильной структурой (например, паратгормон) кровь забирается в пробирку, находящейся на ледяной бане; плазма (сыворотка) переносится в специальные пробирки малого объема, которые должны плотно закрываться; повторное замораживание и размораживание проб не допускается; рекомендуемая продолжительность хранения биосубстратов в замороженном виде от 1-3 месяцев до 1 года.

2) *Лиганды*. Выделяют немеченый лиганд (АГ) – искомое вещество, обладающее антигенной активностью и содержащееся в опытной пробе (белки, гормоны); меченный лиганд (АГ) – аналог искомого вещества, содержащий радиоактивную метку. Получают их двумя способами:

- а) из биологических жидкостей, тканей или культур клеток путем очистки методами гель-фильтрации, хроматографии, электрофореза;
- б) с помощью химического синтеза.

3) *Радиоактивная метка*. Метка должна быть стабильна, не изменять иммунореактивность лиганда, иметь высокую удельную радиоактивность. Изотоп ^{125}I используют для мечения белков и пептидов, имеющих в своем

составе аминокислоты – тирозин или гистидин. Изотоп ^3H используют для мечения других веществ (например, гормонов).

4) *Связывающий реагент.* Реагент должен обладать высокой специфичностью – связывать только анализируемую субстанцию и быть индифферентным к другим веществам, в том числе со сходным строением; должен обладать высоким сродством к связываемому веществу (определяет степень прочности образованной связи).

5) *Растворы, в которых протекают иммунологические реакции.* Чаще всего применяются фосфатный, боратный, барбитуратный буферные растворы и трисбуфер. Требования:

а) рН от 7,4 до 8,6;

б) низкая ионная сила (от 0,01 до 0,1 моль);

в) не должен содержать микроорганизмы;

г) для предупреждения повреждений белковых молекул к раствору добавляют ингибиторы протеаз (например, 20 кЕ/мл контрикала).

б) *Стандарты.* Это растворы, содержащие аналогичные антигены в известной концентрации, их исследуют параллельно с опытной пробой для количественного наблюдения. Используют несколько стандартов с последовательно возрастающей концентрацией для построения калибровочной кривой.

5.2.2 Основные этапы радиоиммунологического анализа

1 этап. Внесение аналога определяемого вещества, меченного радиоактивной меткой, и опытного образца в пробирку, содержащую связывающий компонент.

2 этап. Стадия инкубации (образование специфических комплексов). Основная характеристика: время проведения – достаточное для полного

связывания лиганда биндером (связывающий агент); температура реакционной среды (оптимальная для осуществления иммунной реакции).

3 этап. Этап разделения связанного и свободного лиганда. После взаимодействия антигенов с антителами образовавшиеся комплексы антиген-антитело отделяют от свободного меченого антигена.

Отделение комплекса антиген-антитело производят различными способами (таблица 5).

Таблица 5 – Основные методы разделения

Метод	Вещества	Плюсы	Минусы
Адсорбция свободной фракции	уголь, ионообменные смолы, тальк, двуокись кремния	простота, скорость, низкая стоимость, стабильность реагентов.	зависимость от концентрации белка, недостаточная специфичность.
Осаждение связанной фракции	органические вещества (этанол), соли (сульфат аммония, сульфат магния).	простота, скорость, низкая стоимость, стабильность реагентов.	низкая специфичность, зависимость от концентрации белка, возможный эффект вторичного растворения комплекса АГ-АТ.
Метод двойных антител	антитела, присоединенные к твердой матрице, специфические антиглобулины.	специфичность и полное разделение свободной фракции от связанной, мягкое осаждение, сохранение комплекса АГ-АТ.	длительность инкубации, возможность перекрестных реакций.
Метод твердой фазы	антитела, связанные ковалентно или за счет неспецифической сорбции с поверхностью пробирок, гранул, дисков.	простота, скорость, возможность автоматизации.	нет

4 этап. Радиометрия пробы и обработка результатов исследования.

Регистрация. Отделив меченый несвязанный антиген от комплекса антиген-антитело, определяют количество меченого антигена, связавшегося в комплексе по количеству импульсов с помощью сцинтилляционного счетчика.

Количественная оценка результатов исследования.

а) арифметическая шкала концентрации стандарта: по оси абсцисс откладывают концентрацию определяемого вещества; по оси ординат откладывают один из параметров – число распадов за единицу времени; отношение радиоактивности связанной фракции (В) к свободной фракции (F); отношение радиоактивности связанной фракции (В) к общей радиоактивности меченого лиганда (Т); отношение радиоактивности связанной фракции (В) при нулевой концентрации немеченого лиганда (В₀).

б) логарифмическая шкала.

5.2.3 Достоинства и недостатки радиоиммунологического анализа

Достоинства:

а) высокая чувствительность – определяет минимальное количество вещества от 10^{-14} моль/л до 10^{-15} моль/л;

б) специфичность;

в) надежность – определение чистого количества вещества;

г) точность – воспроизводилось результатов;

д) доступность автоматизации.

Недостатки:

а) радиационное повреждение меченого реагента, потеря активности в реакциях;

б) короткое время существования изотопа;

в) исследования проводятся в специальных лабораториях;

г) сложность утилизации отходов; большая и дорогая аппаратура для регистрации результатов.

5.3 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) – лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями.

ИФА по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами:

- 1) высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата;
- 2) возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала;
- 3) стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более);
- 4) простотой проведения реакции;
- 5) наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета;
- 6) возможностью автоматизации всех этапов реакции;
- 7) относительно низкой стоимостью диагностических наборов.

5.3.1 Этапы иммуноферментного анализа

Любой вариант ИФА содержит 3 обязательных этапа.

1 этап. Этап узнавания тестируемого соединения специфическим к нему АТ, что ведет к образованию иммунного комплекса. Кинетика иммунной реакции зависит от качества используемых в тест-системах иммунных компонентов: специфичности (аффинности) АТ, степени очистки и полноценности АГ, физико-химических параметров проведения реакции (температура, площадь твердой фазы, состав буферного раствора).

Способы ускорения диффузии:

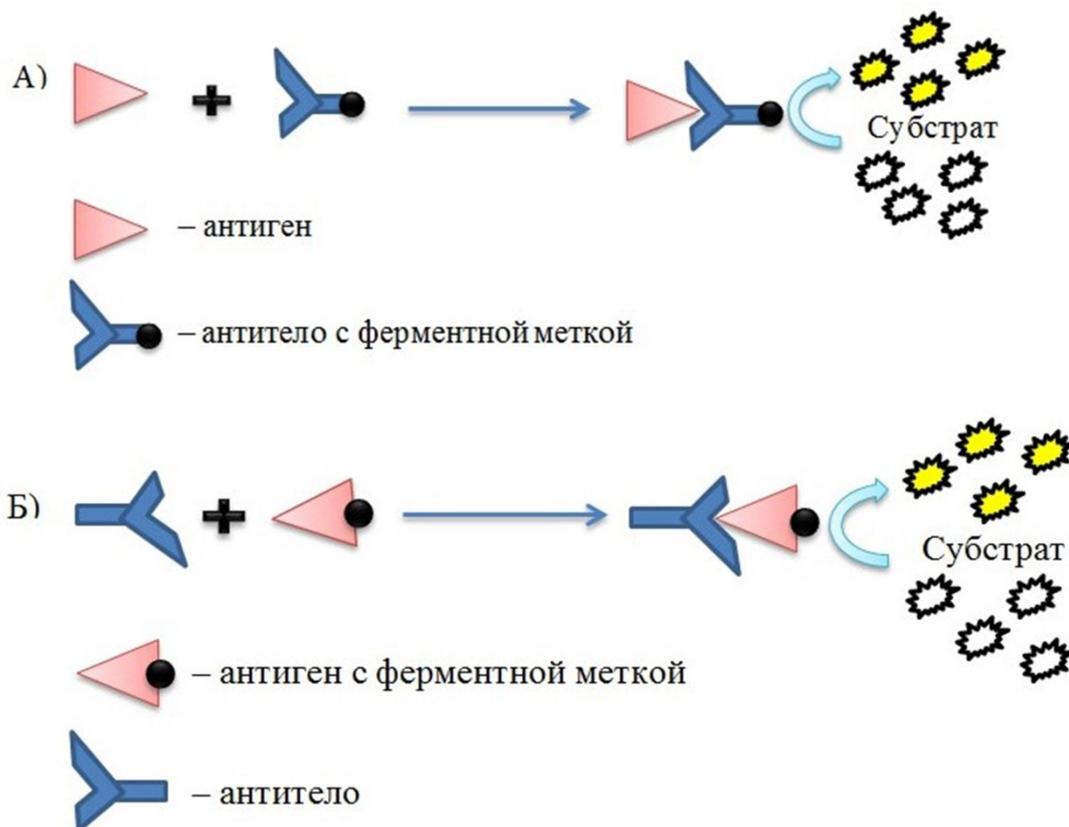
- а) повышение температуры (максимальная температура 45 °С);
- б) снижение вязкости опытного образца (разведение сыворотки);
- в) механическое перемешивание.

2 этап. Этап формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания.

3 этап. Этап превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал, который можно определить путем: оценки степени окрашивания основной части индикаторной полоски; измерения оптической плотности окрашенных растворов; измерения интенсивности флуоресценции и хемилюминесценции.

5.3.2 Основной принцип иммуноферментного анализа

Метод основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом, в результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывается окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически (рисунок 29).



Обозначения: А) Схема для выявления антигенов, Б) Схема для выявления антител

Рисунок 29 – Иммуноферментный анализ:

Для выявления компонентов используют фермент. Он не виден, поэтому применяют посредники для визуализации – хромоген – химическое соединение, хорошо растворимое в воде, раствор которого бесцветен. Превращение бесцветного хромогена в цветное вещество хромофор происходит под действием фермента, для которого хромоген является субстратом. В результате соединение приобретает цвет. Хромофор либо остается в растворе, либо уходит в осадок.

Меченый компонент в конце реакции может находиться в двух состояниях: связанное с комплексом АГ-АТ или в свободном состоянии.

Количество комплексов оценивается по каталитической активности ферментной метки.

5.3.3 Классификация иммуноферментного анализа

В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:

1) *По типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА, различают:*

а) конкурентный метод: в конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментном и конкурирующий за центры специфического связывания с ним.

б) неконкурентный метод: для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания.

2) *Все методы ИФА делятся на:*

а) гомогенные: если все три стадии ИФА проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе гомогенных. В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирование активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело. При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антиген-фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1 минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.

б) гетерогенные: для гетерогенных методов характерно проведение анализа в двухфазной системе с участием твердой фазы – носителя, и обязательная стадия разделения иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов (отмывка), которые находятся в разных фазах (образовавшиеся иммунные комплексы находятся на твердой фазе, а непрореагировавшие комплексы – в растворе). Гетерогенные методы, в которых формирование иммунных комплексов на первой стадии протекает на твердой фазе, называют твердофазными методами.

Методы относятся к гомогенно-гетерогенным, если 1 стадия – образование специфических комплексов происходит в растворе, а затем для разделения компонентов используют твердую фазу с иммобилизованным реагентом.

3) По принципу определения тестируемого вещества:

а) прямое определение концентрации вещества (антигена или антитела) по числу провзаимодействующих с ним центров связывания. В этом случае ферментная метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу.

б) определение концентрации вещества по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центров связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала.

5.3.4 Компоненты иммуноферментного анализа

Компоненты:

- а) ферменты;
- б) субстраты;

- в) антигены и антитела;
- г) конъюгат;
- д) твердая фаза.

Ферменты. Ферментные метки обладают чрезвычайно мощным каталитическим действием, одна молекула фермента может реагировать с большим количеством молекул субстрата. Таким образом, фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно определить по образованию продуктов, катализируемой им реакции. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в молекуле многочисленных функциональных групп (сульфгидрильных, карбоксильных, остатков тирамина), через которые можно ковалентно присоединить молекулы лиганда.

Ферментные маркеры, используемые в ИФА, должны обладать следующими свойствами:

- а) высокая активность и стабильность фермента в условиях анализа, при модификации и в конъюгате с антителами или другими белками;
- б) наличие чувствительных субстратов и простота метода определения продуктов или субстратов ферментативной реакции;
- в) возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- г) отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

В ИФА может использоваться не менее 15 различных ферментов. Наибольшее применение, в соответствии с вышеназванными требованиями, нашли пероксидаза хрена (ПХ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и β -D-галактозидаза (таблица 6). Все три стабильны и катализируют высокочувствительные реакции. Кроме того, продукты, получаемые в результате реакций, катализируемых этими ферментами, в зависимости от используемого субстрата, могут выявляться не только колориметрическими методами, но также флуоресцентными методами. Другие ферменты

используются значительно реже. Это объясняется их более низкой в сравнении с ПХ и ЩФ удельной активностью.

Субстраты. Выбор субстрата в первую очередь определяется используемым в качестве метки ферментом, так как реакция фермент-субстрат высокоспецифична (таблица).

Основные требования к субстрату:

- а) обеспечение высокой чувствительности метода при выявлении фермента в конъюгате;
- б) образование хорошо учитываемых (например, окрашенных) продуктов реакции фермент-субстрат;
- в) субстрат должен быть безопасным, дешевым, доступным и удобным для применения.

Таблица 6 – Ферменты и их субстраты наиболее широко используемые в ИФА

Фермент	Источник получения	Субстрат (рекомендуемая длина волны при фотометрии, нм)	Конъюгирующий реагент
Пероксидаза хрена	Хрен	О-фенилендиаминдигидрохлорид (ОФД, 492 нм)	Глутаральдегид
β -D-галактозидаза	<i>E. Coli</i>	О-нитрофенил- β -D-галактозид (420 нм)	Мета-малеимидобензол-N-гидроксисукцинимидный эфир
Щелочная фосфатаза	<i>E. Coli</i> , слизистая кишечника телянка	P-нитрофенилфосфат (405 нм), 5-Бром-4-хлоро-3-индолил фосфат	Глутаральдегид

Чаще используют хромогенные субстраты, которые, разрушаясь, образуют окрашенное вещество. Перспективным является использование высокоэнергетических субстратов – флуоресцентных, хемипюминесцентных.

Применение таких субстратов позволяет теоретически повысить чувствительность ИФА на два порядка.

Антигены и антитела. АГ и АТ, используемые в ИФА, должны быть высокоочищенными и высокоактивными. Кроме того, АГ должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант, чужеродностью и гомогенностью. Многие синтетические и рекомбинантные АГ вирусов и бактерий хорошо себя зарекомендовали при использовании в ИФА. Это существенно повысило специфичность и во производительность метода за счет сведения к минимуму перекрестных реакций.

Одним из наиболее важных реагентов в ИФА являются антитела. Чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител. Используемые антитела могут быть поли- или моноклиональными, различного класса (IgG или IgM) и подкласса (IgG1, IgG2), антиаллотипическими или антиидиотипическими. При низкой аффинности АТ распад комплекса АГ-АТ приводит к удалению связанного АГ из системы. Чувствительность и специфичность метода повышается при использовании моноклональных антител. В этом случае появляется возможность обнаруживать низкие концентрации АГ (АТ) в испытуемых образцах.

Конъюгат – это антиген или антитело, меченные ферментной меткой. Образование конъюгата – один из важных этапов проведения ИФА.

При формировании конъюгата подбирают такой оптимальный метод введения ферментной метки, чтобы оба компонента конъюгата сохраняли свою биологическую активность.

Конъюгирование фермента с иммунохимически активными белками производится различными методами: химическая сшивка, ковалентное связывание молекулы фермента с АГ или АТ и образование соединений через нековалентные связи, например, когда связь между ферментом и АГ

или АТ осуществляется иммунологически, через взаимодействие антиген-антитело.

Наиболее широкое распространение получили ковалентные способы приготовления конъюгатов. Выбор реакции связывания определяется типом доступных функциональных групп в данных белковых молекулах. В качестве реагентов, используемых для введения фермента в молекулы антигенов и антител, используют глутаровый альдегид, периодат натрия и др.

Существует одноэтапный и двухэтапный методы получения конъюгатов с помощью глутарового альдегида. Могут образовываться конъюгаты различных размеров с редуцированной ферментативной активностью (от 15 % до 60 % от свободного фермента). Образовавшийся конъюгат больших размеров может стерически затруднять определение тестируемого вещества. Конъюгаты с относительно низкой молекулярной массой состоят из Fab-фрагмента и одной молекулы фермента.

В результате двухэтапного синтеза, который заключается в поэтапном получении сначала модифицированного с помощью сшивающего агента фермента, его выделении, а затем последующем взаимодействии его с антигеном (антителом), образуются молекулы однородного состава, содержащие 1-2 молекулы фермента на молекулу иммуноглобулина и сохраняющие высокую ферментативную и иммунологическую активность. Однако количество таких образовавшихся конъюгатов невелико (для пероксидазы хрена составляет от 5 % до 10 %).

Наибольшее практическое применение нашел метод получения иммунопероксидазных конъюгатов, основанный на окислении углеводного компонента фермента периодатом натрия (связывание пероксидазы в конъюгат достигает от 70 % до 90 % от начального количества фермента).

Надежный конъюгат должен обладать следующими свойствами:

а) высоким антительным титром и высокой афинностью к антигену, чтобы его можно было использовать в большом разведении, и таким образом, уменьшить неспецифическое связывание;

- б) достаточной специфичностью в рабочем разведении;
- в) преобладанием мономерных форм над полимерными, т.к. полимерные формы имеют тенденцию к неспецифической адгезии на пластике, что приводит к высокому фоновому уровню реакции;
- г) оптимальным молярным соотношением между ферментом и антителами (оптимальное соотношение составляет около 1:1);
- д) достаточной ферментативной активностью конъюгата. Это свойство определяется главным образом условиями конъюгации и соотношением молекул фермента и антител в конъюгате.

Твердая фаза. В качестве твердой фазы для проведения ИФА можно применять различные материалы: полистирол, поливинилхлорид, полипропилен и другие вещества. Твердой фазой могут служить стенки пробирки, 96-луночные и другие планшеты, шарики, бусины, а также нитроцеллюлозные и другие мембраны, активно сорбирующие белки.

5.3.5 Иммунизация антигена или антител на твердой фазе

Иммунизация антигена или антител на твердой фазе возможна различными способами:

- а) пассивная адсорбция, основанная на сильных гидрофобных взаимодействиях между белками и синтетической поверхностью;
- б) ковалентное прикрепление к твердой фазе;
- в) иммунохимическое и другие (нековалентное и неадсорбционное присоединение).

Пассивная адсорбция белков широко используется при проведении ИФА на платах для титрования, на нитроцеллюлозных мембранах. Пассивная адсорбция идет по принципу насыщения и коррелирует с молекулярной массой адсорбируемого вещества. Адсорбционная поверхность мембран

различного типа (нитроцеллюлоза, нейлон и др.) в 100-1000 раз выше, чем у пластика.

Полисахариды и сильногликозилированные белки часто имеют низкую аффинность для полистирола. Необходимы другие методы для их иммобилизации, например, ковалентное присоединение с помощью глутарового альдегида. Ковалентное присоединение эффективно, если в качестве твердой фазы используются гидрофильные бусы (агароза) и полистироловые бусы.

Иммунохимические методы основываются на использовании предварительно адсорбированных «ловушечных» антител для иммобилизации антигена или антител. Антиген, иммобилизованный иммунохимически, в 10 раз активнее, чем пассивно адсорбированный антиген. Могут использоваться лектины или иммуноглобулин-связывающие белки бактерий, которые легко адсорбируются на пластике или других гидрофобных поверхностях, например конканавалин А (Кон А) или стафилококковый белок А. Кон А способен иммобилизовать gp 120 - белок вируса ВИЧ.

5.3.6 Варианты постановки ИФА

Для проведения ИФА необходимы:

- а) полистироловый планшет или другие использующиеся варианты твердой фазы;
- б) отмывающий раствор;
- в) конъюгат (меченные ферментной меткой антигены или антитела);
- г) смесь используемых субстратов;
- д) останавливающий раствор (стоп-реагент – раствор для останавливания реакции);

е) образцы, используемые для положительного и/или отрицательного контроля;

ж) стандартный антиген (для построения калибровочной кривой);

з) одно- и многоканальные пипетки;

и) вошер (промыватель);

к) оптический прибор для определения оптической плотности исследуемого раствора (ИФА-ридер, считыватель, который последовательно фотометрирует все лунки);

л) от 5 до 100 мкл исследуемого биологического материала.

Общий принцип. На 1 этапе реакции адсорбируют антигены или антитела на твердой фазе. При этом не связавшиеся с твердой фазой реагенты легко удаляются отмыванием.

В сенсibilизированных лунках инкубируют исследуемый образец. В лунках с положительным контролем – стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием.

При добавлении конъюгата антитело-фермент или антиген-фермент и связывании его с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для последующего взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит к развитию цветной реакции. Эту реакцию можно остановить на нужной стадии, выраженность окрашивания можно оценить визуально или по оптической плотности.

Важный этап любого варианта твердофазного анализа – процедура отмывки 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.

Выделяют следующие варианты ИФА:

- а) конкурентный метод;
- б) «сэндвич»-вариант ИФА для выявления АГ
- в) прямой ИФА;
- г) непрямой ИФА;
- д) ингибиторный ИФА;
- е) метод иммуноферментных пятен.

Конкурентный ИФА. Этот вариант анализа основан на конкуренции меченых (конъюгат) и немеченых (исследуемых) антител за связывание с антигеном, адсорбированным на твердой фазе. Количество фермента, присоединившегося к твердой фазе, уменьшится пропорционально содержанию в смеси свободных антител. Для определения антигена используется тот же вариант, но в этом случае искомым антигеном конкурирует с меченым, стандартным антигеном за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы.

Конкурентный метод требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и легко может быть автоматизирован. При проведении конкурентного ИФА для выявления антител лучше использовать меченые моноклиальные антитела, тогда конкуренция конъюгата с исследуемым образцом происходит за единственный эпитоп адсорбированного на твердой фазе антигена. Этот вариант ИФА применяется для определения различных соединений, таких как иммуноглобулины человека, раково-эмбриональный антиген, инсулин и др. Он позволяет выявлять антитела к диагностически значимым эпитопам инфекционных агентов.

Основные этапы анализа для выявления антигена (рисунок 30):

- 1) На твердой фазе иммобилизуют специфические для выявляемого антигена моноклональные антитела.

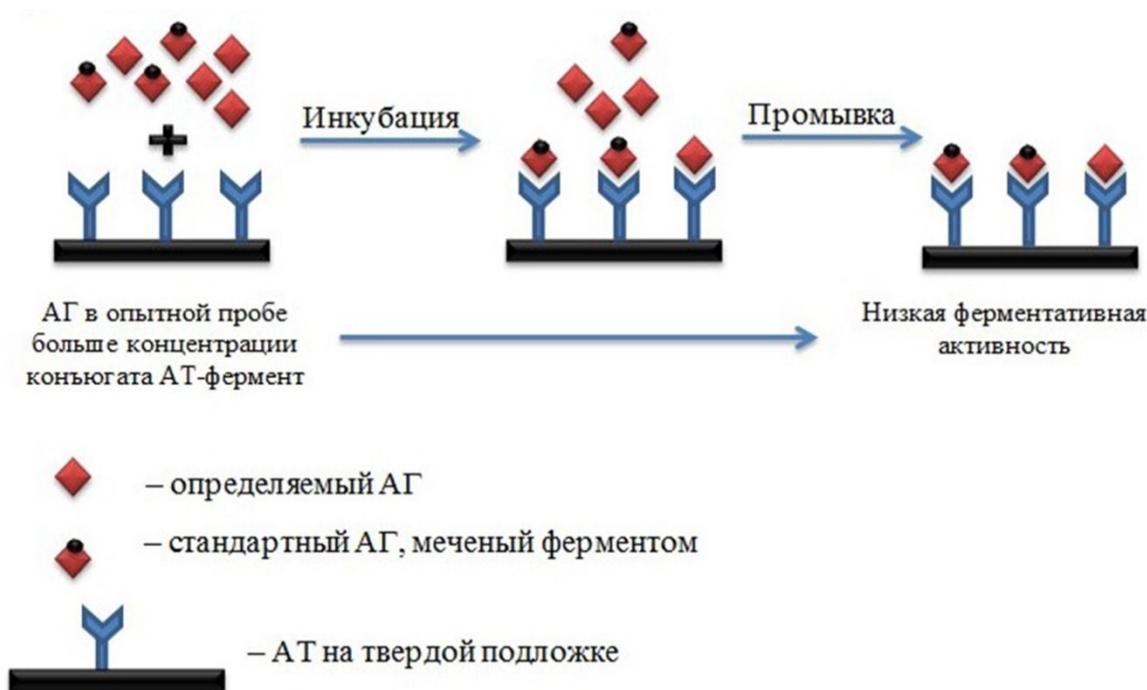


Рисунок 30 – Схема конкурентного метода определения АГ

2) В лунки панелей вносят в известной концентрации антиген, меченный ферментом, и исследуемый образец. Проводят инкубацию и отмывку. Параллельно в соседних лунках ставят положительный и отрицательный контроли. Для построения калибровки используют стандартный немеченый антиген в различных разведениях.

3) Добавляют субстрат, инкубируют, останавливают реакцию при развитии оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.

4) Учет реакции на ИФА-ридере.

В этом случае количество антигена в исследуемом образце обратно пропорционально ферментативной активности на твердой фазе.

Прямой ИФА.

1) В лунках панелей адсорбируют антигены или антитела (исследуемый материал). Выше отмечалось, что антигены существенно различаются по способности адсорбироваться на разных видах пластика в зависимости от того, к какому классу веществ (белкам, углеводам или липопротеинам) они принадлежат. Часто в прямом ИФА антиген,

иммобилизованный на твердой фазе, это клетки и другие корпускулярные антигены. Контроль. В качестве контроля используют лунки с адсорбированным положительным контрольным образцом, в котором обязательно содержится искомым антиген, и отрицательным контрольным образцом заведомо не содержащим исследуемого антигена. При наличии очищенного стандартного антигена реакцию проводят в нескольких разведениях, так чтобы можно было построить калибровочную кривую.

2) Блокируют свободные места связывания, оставшиеся на твердой фазе, с помощью БСА казеина и др. (для предотвращения неспецифической сорбции конъюгата на твердой фазе).

3) В лунки вносят меченные ферментом антитела или антигены (конъюгат), инкубируют. Связывание конъюгата с твердой фазой будет происходить лишь в случае комплементарности обоих компонентов системы. После инкубации с конъюгатом лунки отмывают, удаляя, таким образом, не связавшуюся часть конъюгата.

4) Затем в лунки вносят субстрат, специфичный для используемого фермента, и инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем, ферментативную реакцию останавливают.

5) Учет реакции. Сначала результаты реакции учитывают визуально. Для более точного учета результатов интенсивность окрашивания оценивают на ИФА-ридере с соответствующим светофильтром. По результатам проведенного анализа строят график зависимости оптической плотности от концентрации.

Непрямой ИФА. Этот вариант ИФА используют обычно для выявления специфических антител. В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген и инкубируют с образцами сыворотки или другого биологического материала, полученного от больного (спинномозговая жидкость, слюна и др.). Специфические антитела, связавшиеся с антигеном на твердой фазе, выявляют с помощью антиглобулинового конъюгата. В

зависимости от цели анализа используют разные антиглобулиновые реагенты, выявляющие антитела всех изотипов, либо специфичные к отдельным классам и подклассам иммуноглобулинов. Основное достоинство метода состоит в универсальности конъюгата. Один и тот же конъюгат может служить для выявления антител человека к самым разным антигенам в любых образцах. Реакция методически проста.

Основные этапы непрямого ИФА для определения антител:

1) Антиген адсорбируют на твердой фазе, затем отмывают от не связавшихся компонентов.

2) Блокируют свободные места связывания. Отмывают.

3) В лунки вносят исследуемый материал, инкубируют и затем проводят процедуру отмывки. Параллельно ставят пробы с положительным и отрицательным контролями.

4) Добавляют антиглобулиновый конъюгат в рабочем разведении, инкубируют, отмывают от несвязавшихся компонентов.

5) Вносят субстрат, инкубируют. По достижении оптимального уровня окрашивания в лунках с положительным контролем реакцию останавливают, добавляя стоп-раствор.

6) Измеряют количество продукта реакции на ИФА-ридере (рисунок 31).

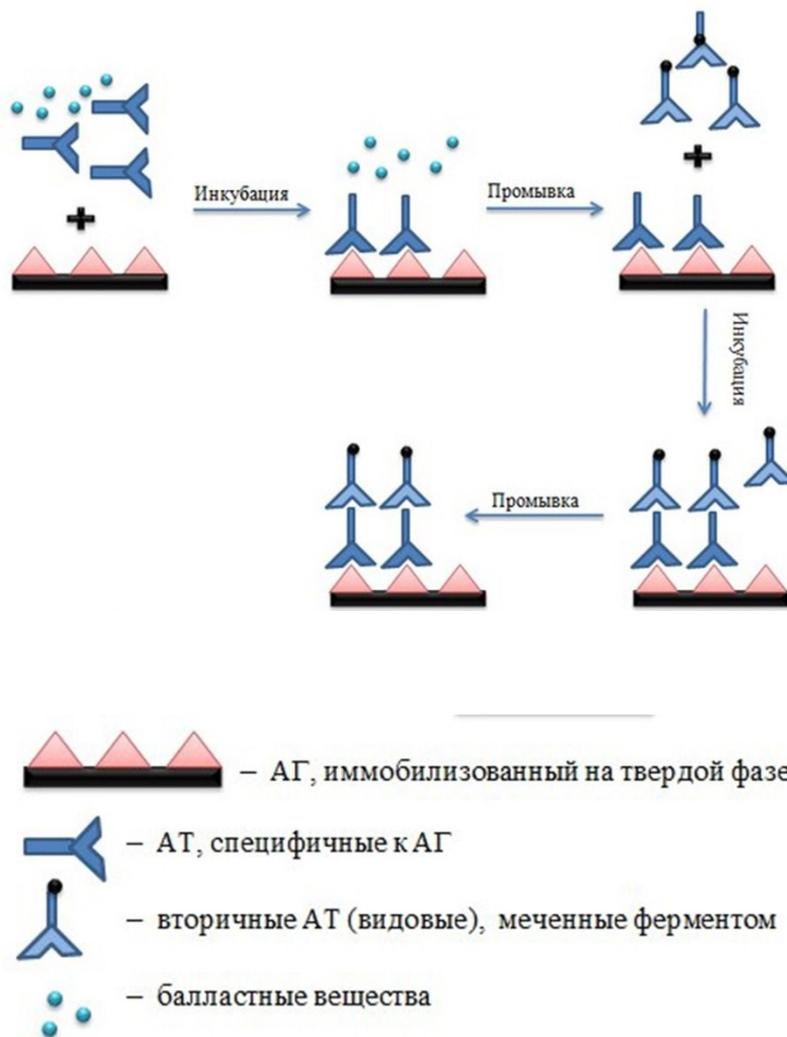


Рисунок 31 – Иммуноферментный анализ

При оптимальных условиях проведения анализа метод высокоспецифичен и чувствителен. Он позволяет выявлять нанogramмовые количества антител в сыворотках исследуемых больных. Для получения удовлетворительных результатов необходима стандартизация реагентов и методических приемов. Этот вариант ИФА может также использоваться для тестирования моноклональных антител.

«Сэндвич» – вариант ИФА для выявления антигенов. Антигены, определяемые с помощью данного варианта ИФА, должны иметь несколько эпитопов, способных связывать антитела, или обладать повторяющимися, пространственно разделенными эпитопами одинаковой специфичности.

При проведении этого варианта ИФА высокоспецифичные поли- или моноклональные антитела, адсорбированные на твердой фазе, инкубируют с исследуемым образцом. После процедуры отмывания в лунки вносят меченные ферментом антитела (конъюгат) к тому же антигену и далее проводят все остальные этапы реакции. Эффективность образования специфического комплекса на каждой стадии анализа зависит от константы связывания реакции антиген-антитело.

Основные этапы анализа:

1) На твердой фазе иммобилизуют моноклональные антитела или аффинно-очищенные поликлональные антитела.

2) В лунки панелей вносят исследуемый образец, параллельно ставят положительный контрольный образец и отрицательный контрольный образец в различных разведениях. Инкубируют и отмывают.

3) В лунки вносят меченные ферментом моноклональные или поликлональные антитела – конъюгат. После инкубации проводят отмывку.

4) Вносят субстрат, инкубируют. Реакцию останавливают при достижении оптимального окрашивания в лунках с положительным контролем.

5) Учет результатов на ИФА-ридере.

Основным достоинством метода является высокая чувствительность, превосходящая возможности других схем ИФА (рисунок 32).

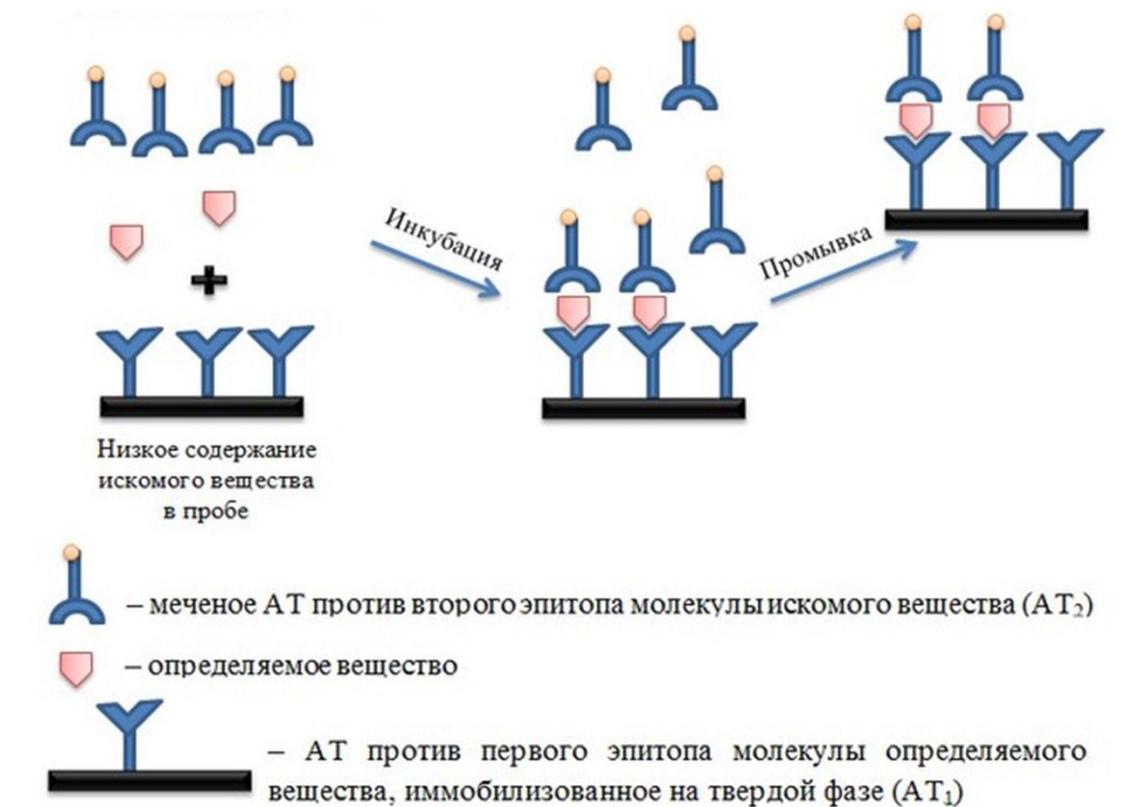


Рисунок 32 – Схема определения АГ по методу «сэндвича»

Ингибиторный ИФА. В этом варианте ИФА антиген, присутствующий в исследуемом образце, связывается с моноклональными антителами, меченными ферментной меткой, и ингибирует их взаимодействие со стандартным антигеном, иммобилизованным на твердой фазе. Присутствие в образце даже следовых количеств специфичного к конъюгату антигена будет ингибировать связывание меченых антител с иммобилизованным антигеном. Степень ингибирования прямо пропорциональна содержанию антигена в растворе. Для проведения количественного анализа строят калибровочную кривую с помощью последовательных разведений стандартного антигена. Основные этапы ингибиторного ИФА для выявления антигена.

1) В лунках панелей адсорбируют стандартный антиген. Подбирают рабочее разведение меченых антител с помощью титрования.

2) Проводят предварительную инкубацию конъюгата в разведении, предшествующем рабочему, с разведениями исследуемого образца, стандартного антигена и положительных контрольных проб.

3) Смесь переносят в лунки панелей. Для контроля 100%-ного связывания в несколько лунок вносят только меченые антитела, без ингибирующего антигена. Панели инкубируют, затем проводят отмывку.

4) Добавляют субстрат.

5) Проводят учет результатов.

Концентрация определяемого антигена в исследуемом образце обратно пропорциональна ферментативной активности на твердой фазе.

ИФА может использоваться не только для определения растворимого антигена или антитела, но и клеток, вырабатывающих различные белки.

Метод иммуноферментных пятен (ELISPOT). В 1983 году адаптировали технологию твердофазного ИФА для определения лимфоидных клеток, секретирующих антитела или антигены (например, цитокины), *in vitro*. Метод получил название ELISPOT (метод иммуноферментных зон или пятен). Основной принцип метода:

1) На поверхности полистироловой лунки (используют 24-х луночные панели для культивирования клеток) сорбируют антигены или антитела, которые служат «ловушечными» реагентами.

2) Добавляют исследуемые лимфоидные клетки, культивируют несколько часов при 37 °С, давая им возможность занять определенное место и выполнить секреторную функцию. Антитела или антигены, секретируемые такими клетками, улавливаются адсорбированными на твердой фазе реагентами.

3) Клетки удаляют, используя для этого отмывающий раствор с детергентом, лизирующим клетки.

4) Участки накопления секреторных продуктов проявляют, добавляя связанные с ферментом антитела (антиглобулиновый реагент).

5) Добавляют смесь субстрата с агарозой (используемые субстраты должны растворяться в агарозе и образовывать нерастворимые продукты реакции), на поверхности твердой фазы образуются коричневые или голубые пятна (в зависимости от используемых ферментов и субстратов), выявляя участки, где располагались клетки. Образовавшиеся пятна подсчитывают под микроскопом, это и будет количество секретирующих клеток.

В качестве твердой фазы может быть использована нитроцеллюлозная мембрана. В этом случае есть ряд преимуществ: из-за высокой адсорбционной способности НЦМ требуется значительно меньшее количество антигена, используемого в качестве «ловушечного» реагента, кроме того, отпадает необходимость во включении агарозы в субстрат.

При параллельном определении количества секретирующих клеток и общего количества секретируемого антигена или антитела в лунке, что возможно при использовании другого субстрата, можно выявить количество секретируемого вещества единичной клеткой.

Данный метод нашел широкое применение для оценки количества клеток, секретирующих антиген, улавливаемый адсорбированными антителами, используется для определения количества клеток, секретирующих цитокины (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α).

5.4 Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг (ИБ) – высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Сущность его заключается в переносе молекул исследуемого вещества с одного твердого носителя, используемого для фракционирования биополимеров, на другой, где с помощью иммунохимической реакции происходит их специфическое выявление. В зависимости от исследуемого вещества различают ДНК, РНК и белок – блоттинг.

Антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их (блоттинг – от англ. *blot* – пятно) из геля на активированную бумагу (1) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного (2). Затем, после инкубации, отмывают от не связавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом (3). Образовавшийся на полоске комплекс [антиген + антитело больного + антитело против Ig человека] выявляют добавлением хромогенного субстрата (4), изменяющего окраску под действием фермента (рисунок 33).

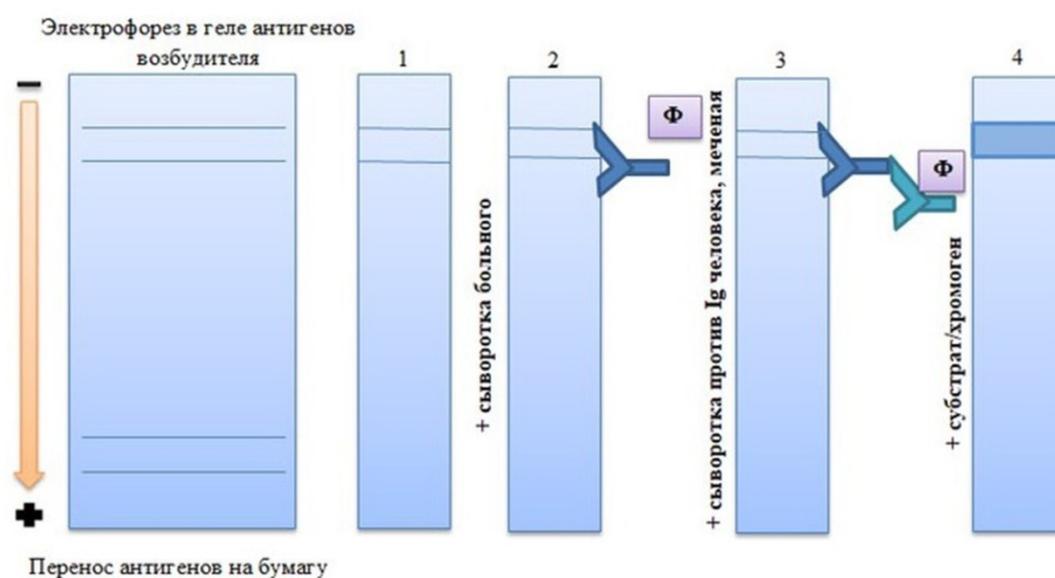


Рисунок 33 – Краткая схема иммуноблотинга

При постановке иммуноблоттинга соблюдается следующая методическая последовательность:

- 1) Электрофоретическое разделение анализируемого материала на индивидуальные белки или полипептиды в геле.
- 2) Получение реплики путем блоттинга белков или полипептидов с геля на твердофазный матрикс.

3) Блокирование фона, отмывка от компонентов, используемых при блокировании фона.

4) Инкубирование со специфической тест-сывороткой.

5) Отмывка от избытка сыворотки; инкубирование с Ig к антителам специфической тест-сыворотки, конъюгированными с меткой.

6) Отмывка от избытка меченого иммунореагента.

7) Выявление тестируемых антигенов автордиографически или ферментативно по реакции с соответствующим субстратом. Иммунохимическое выявление антигенов можно проводить с помощью антител, конъюгированных с меткой. В качестве метки в последнее время широко применяют либо радиоактивные изотопы, либо ферменты (пероксидазу, щелочную фосфатазу, лактамазу).

Время блоттинга путем диффузии составляет от 36 до 48 ч. Но наиболее быстрый и эффективный способ переноса белков с гелей – электроблот, время которого, в основном, составляет от 1 до 3 ч, для некоторых высокомолекулярных белков – более 12 ч. Конкретный выбор сорбентов для различных модификаций блотов (нитроцеллюлоза либо бумага, обработанная соответствующим образом), выбор условий блокирования и иммуно-химического выявления антигенов полностью зависит от антигена, его количества, метода иммуноанализа и целей исследования. Метод ИБ по целому ряду обстоятельств получил наибольшее распространение как метод, пригодный для использования в качестве теста подтверждения. Безусловное достоинство метода – возможность тестирования антител к слабо или вовсе нерастворимым антигенам и исключение стадии введения радиоактивной метки в антигены. О чувствительности в случае ИБ судят по предельному количеству нанесенного на гель антигена, которое при фракционировании белков удается выявить иммунохимически после переноса с геля на твердую фазу (нитроцеллюлозу). Общая чувствительность анализа зависит от целого ряда причин: условий фракционирования и иммобилизации антигена на

твердом носителе, уровня фона, специфичности и аффинности антител. Важное значение имеет вид используемой метки и способ ее выявления.

Таким образом, метод иммуноблотинга позволяет идентифицировать зоны антигена на твердой фазе, не связывая весь белок с антителами специфической сыворотки. Иммуноблотинг и его модификации в основном используются для типирования бактериальных и вирусных антигенов и антител, особенно в случае недостаточной разрешающей способности обычных систем, а также при анализе иммуноглобулинов, нуклеиновых кислот или как тест подтверждения в сочетании с другими методами.

6 Полимеразно-цепная реакция

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР / PCR) позволяет многократно воспроизводить (амплифицировать) выбранный фрагмент ДНК.

Компоненты реакции:

1) ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.

2) Два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК. Праймер – короткий синтетический олигонуклеотид длиной от 18 до 30 оснований. При выборе праймеров придерживаются условиям – GC-состав примерно от 40 до 60 %, близкие к температуре плавления (T_m) комплекса праймер-матрица, отсутствие неспецифических вторичных структур (шпилек, димеров), а также желательно, чтобы на 3'-конце был гуанин или цитозин, поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

3) Термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Фермент должен сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют полимеразу, выделенную из термофилов. Одна из первых термостабильных ДНК-полимераз была выделена из бактерий *Thermus aquaticus* и названа Taq-полимеразой. Недостаток этой полимеразы заключается в том, что вероятность внесения ошибочного нуклеотида у неё достаточно высока (10^{-5} на 1 цикл), так как у этого фермента отсутствуют механизмы исправления ошибок (3'→5' экзонуклеазная активность). Полимераза Pfu, выделенная из архей, обладает таким механизмом, её использование значительно уменьшает число мутаций в ДНК, но скорость работы ниже, чем у Taq. Сейчас применяют смеси Taq и Pfu, чтобы добиться одновременно высокой скорости полимеризации и высокой точности копирования. Taq-полимераза имеет температурный оптимум 70 °C и не инактивируется при 95 °C, что позволило

автоматизировать процедуру ПЦР. Первоначально использовался фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы I *E.coli* (PolIK), который было необходимо вносить после каждого цикла, кроме того появлялись вторичные участки связывания и специфичность была неполной;

4) Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);

5) Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;

6) Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции (рН, ионную силу раствора). Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

Добавление пирофосфатазы может увеличить выход ПЦР-реакции. Этот фермент катализирует гидролиз пирофосфата, побочного продукта присоединения нуклеотидтрифосфатов к растущей цепи ДНК, который может ингибировать ПЦР-реакцию.

ПЦР проводят в *амплификаторе* – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок.

При проведении ПЦР выполняется от 20 до 35 циклов, каждый из которых трех стадий. За двадцать циклов ПЦР удастся увеличить количество исследуемого материала ДНК примерно в миллион раз.

Стадии ПЦР:

1) Денатурация. Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимеразы) на от 0,5 до 2 мин, чтобы разрушились водородные связи между двумя цепями ДНК. Эта стадия называется плавлением (денатурацией). Иногда перед первым циклом (до добавления полимеразы) проводят предварительный прогрев реакционной смеси в течение 5 минут для полной денатурации матрицы и праймеров. Такой приём называется горячим стартом, он позволяет снизить количество неспецифических продуктов реакции.

2) Отжиг. Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается на 5 °С ниже их температуры плавления. Время стадии – от 0,5 до 2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре).

3) Элонгация. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки, начиная синтез второй цепи от его 3'-конца. Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится от 7 до 10 мин.

Применение. Криминалистика – ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления – кровь, слюна, сперма, волосы. Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого. Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически – одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью ДНК электрофореза. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (*genetic fingerprint*).

Установление отцовства. Хотя «генетические отпечатки пальцев» уникальны (за исключением случая однояйцевых близнецов), родственные связи все же можно установить, сделав несколько таких отпечатков. Тот же

метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов.

Медицинская диагностика. ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций.

Персонализированная медицина. Известно, что большинство лекарств действуют не на всех пациентов, для которых они предназначены, а лишь на от 30 до 70 % их числа. Кроме того, многие лекарства оказываются токсичными или аллергенными для части пациентов. Причины этого – отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого – менее. Для того, чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным генотипированием (*prospective genotyping*).

Клонирование генов. Клонирование генов (не путать с клонированием организмов) – это процесс выделения генов и, в результате генно-инженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена. ПЦР используется для того, чтобы амплифицировать ген, который затем вставляется в вектор – фрагмент ДНК, переносящий чужеродный ген в тот же самый или другой, удобный для выращивания, организм. В качестве векторов используют, например, плазмиды или вирусную ДНК. Вставку генов в чужеродный организм обычно используют для получения продукта этого гена – РНК или, чаще всего, белка. Таким образом в промышленных количествах получают многие белки для использования в сельском хозяйстве, медицине и др.

Секвенирование ДНК. В методе секвенирования с использованием меченых флуоресцентной меткой или радиоактивным изотопом дидезоксинуклеотидов ПЦР является неотъемлемой частью, так как именно в ходе полимеризации в цепь ДНК встраиваются производные нуклеотидов, меченые флуоресцентной или радиоактивной меткой. Это останавливает реакцию, позволяя определить положения специфических нуклеотидов после разделения синтезированных цепочек в геле.

7 Банк тестовых заданий

7.1 Тестовые задания по методам хроматографии

1 Виды хроматографического анализа:

- a) скоростной;
- b) препаративный;
- c) качественный;
- d) количественный;
- e) зональный.

2 На чем основан хроматографический метод исследования:

- a) на различной окраске компонентов смеси;
- b) на различной окраске подвижной и неподвижной фаз;
- c) на распределении компонентов смеси в жидкой фазе;
- d) на распределении компонентов смеси в твердой фазе
- e) на распределении компонентов смеси между подвижной и неподвижной фазами.

3 Какие признаки положены в основу классификации хроматографии:

- a) механизм соединения;
- b) агрегатное состояние фаз;
- c) механизм разделения;
- d) способ проведения;
- e) цель проведения процесса.

4 Виды хроматографии по агрегатному состоянию фаз:

- a) твердотельная;
- b) газовая;
- c) паровая;
- d) жидкостная;
- e) сверхкритическая флюидная.

5 Виды хроматографии по цели проведения процесса:

- a) научная;
- b) аналитическая;
- c) обучающая;
- d) препаративная;
- e) промышленная.

6 Виды хроматографии по способу проведения процесса:

- a) колбочная;
- b) колоночная;
- c) бумажная;
- d) тонкослойная;
- e) хроматография в толстом слое.

7 Виды хроматографии по механизму разделения:

- a) хроматография в толстом слое;
- b) адсорбционная;
- c) ионообменная;
- d) аффинная;
- e) молекулярно-ситовая.

8 Как называют неподвижную фазу:

- a) абсорбент;
- b) сорбент;
- c) адсорбент;
- d) элюент.

9 С именем какого ученого связывают возникновение хроматографии:

- a) М.С. Цвет;
- b) М.В. Ломоносов;
- c) Т.Б. Гапон;
- d) Н.А. Измайлов;
- e) А. Мартин.

10 Какое явление в хроматографии называется «удерживанием»:

- a) замедленное движение молекул X и Y относительно движения подвижной фазы;
- b) движение подвижной фазы относительно неподвижной;
- c) прекращение движения молекул X и Y относительно движения подвижной фазы.

11 Какое явление в хроматографии называется «размыванием»:

- a) разность скоростей перемещения молекул X и Y;
- b) растворение молекул X и Y в подвижной фазе;
- c) абсорбция молекул X и Y.

12 Что собой представляет «приведенное время удерживания» t_R :

- a) время пребывания несорбируемого вещества в хроматографе;
- b) абсолютное время удерживания за вычетом мертвого времени;
- c) время пребывания молекул в неподвижной фазе;
- d) время пребывания исследуемого вещества в хроматографе.

13 От каких факторов зависит характер распределения смеси вещества:

- a) размера колонки;
- b) коэффициент распределения;
- c) число уравниваний;
- d) концентрации вещества.

14 Чем обусловлено размывание хроматографических зон:

- a) плотностью твердой фазы;
- b) неоднородностью потока по сечению колонки;
- c) продольной диффузией;
- d) скорость подачи подвижной фазы;
- e) диффузией и массопереносу молекул из одной фазы в другую.

15 Количество вещества в подвижной фазе, доступное обнаружению хроматографическим детектором:

- a) минимальный предел;

- b) предел детектирования;
- c) минимум детекции;
- d) удел детектирования.

16 Распределение соединения между двумя несмешивающимися фазами определяется:

- a) коэффициентом распределения;
- b) уровнем распределения;
- c) показателем распределения;
- d) массой вещества.

17 Виды жидкостной хроматографии по типу неподвижной фазы:

- a) жидкостно-газовая;
- b) жидкостно-жидкостная;
- c) жидкостно-твердофазная;
- d) жидкостно-гелевая;
- e) жидкостно-плазменная.

18 Классификация жидкостной хроматографии по способу проведения процесса:

- a) колоночная;
- b) тонкослойная;
- c) в толстом слое;
- d) пленочная;
- e) тонкослойная жидкостная под давлением.

19 Особенности высокоэффективной жидкостной хроматографии:

- a) использование мелкодисперсных сорбентов;
- b) давление до $3 \cdot 10^7$ Па;
- c) использование крупнодисперсных сорбентов;
- d) медленная скорость потока;
- e) высокая скорость потока.

20 Вид хроматографии, основанный на биологической совместимости макромолекул:

- a) ионообменная хроматография;
- b) распределительная хроматография;
- c) аффинная хроматография;
- d) катионообменная хроматография.

7.2 Тестовые задания по методам электрофореза

1 На каком принципе основан электрофорез:

- a) разделение ионов при движении их в растворе под действием электромагнитного поля;
- b) разделение молекул при движении их в растворе под действием магнитных свойств;
- c) разделение ионов при движении их в растворе под действием электрического тока;
- d) разделение молекул при движении их в растворе под действием электрического тока.

2 Автор электрофореза:

- a) Цвет М.С.;
- b) Ломоносов М.В.;
- c) Рейсс Ф.Ф.;
- d) Семенов Н.Н.

3 Методы электрофореза:

- a) ионообменный;
- b) проникающий;
- c) фронтальный;
- d) на колонке;
- e) зональный.

4 Какие реакции происходят на аноде и катоде в процессе электролиза:

- a) $3e^- + 3H_2O \rightarrow 2OH^- + H_2 \uparrow$;
- b) $2e^- + 2H_2O \rightarrow 2OH^+ + H_2 \uparrow$;
- c) $2e^- + 2H_2O \rightarrow 2OH^- + H_2 \uparrow$;
- d) $H_2O \rightarrow 2H^- + 2O_2 \uparrow + 2e^-$;
- e) $H_2O \rightarrow 2H^+ + 1/2 O_2 \uparrow + 2e^-$.

5 Основные блоки прибора для электрофореза на бумаге:

- a) агарозная гель;
- b) буферный электролит;
- c) охлаждающая система;
- d) электроды;
- e) электролитический мостик.

6 Сколько отсеков содержит буферная камера:

- a) 1;
- b) 2;
- c) 3;
- d) 4;
- e) 5.

7 Типы носителей при электрофорезе:

- a) ацетат целлюлозы;
- b) тонкий слой алюминия;
- c) аммонийная соль угольной кислоты;
- d) агаровые гели;
- e) полиакриламидные гели.

8 Назовите общее условие для выбора носителя:

- a) электролабильность;
- b) мелкопористость;
- c) разделяемые вещества должны двигаться в виде отчетливых зон;
- d) прозрачность.

9 Факторы, влияющие на подвижность пробы:

- a) образец;
- b) электрическое поле;
- c) концентрация;
- d) буфер;
- e) носитель.

10 Факторы, влияющие на электрофоретическую подвижность заряженных молекул образца:

- a) величин заряда;
- b) характера заряда (+, -);
- c) межмолекулярных взаимодействий;
- d) размер молекулы;
- e) форма молекулы.

11 Параметры электрического поля, используемые при электрофорезе:

- a) постоянный ток;
- b) переменный ток;
- c) напряжение 50-100 В;
- d) напряжение 100-500 В;
- e) напряжение 500-10000 В.

12 Максимальная воспроизводимость результата достигается при помощи:

- a) стабилизированных источников питания;
- b) системы подачи воздуха;
- c) нагревающей системы;
- d) воздухонепроницаемой крышки;
- e) охлаждающей системы.

13 Буферы, применяемые при электрофоретическом разделении:

- a) ацетатный;
- b) цитратный;

- c) аммонийный;
- d) фосфатный;
- e) пиридиновый.

14 Меры обеспечивающие снижение диффузии образца в буфер:

- a) нанесение образца в виде узких полос;
- b) использование низкого напряжения;
- c) использование высокого напряжения;
- d) максимальная скорость проведения разделения;
- e) быстрое высушивание образцов.

15 Из какого материала применяются электроды при электрофорезе:

- a) нержавеющей сталь;
- b) лигированная сталь;
- c) серебро;
- d) золото;
- e) платина.

16 Виды электрофореза по расположению носителя:

- a) вертикальный;
- b) горизонтальный;
- c) наклонный;
- d) спиральный;
- e) замкнутый.

17 Преимущества носителей из полиакриламидных гелей:

- a) размер пор варьирует в широких пределах;
- b) сочетаются с разными буферами;
- c) низкие показатели электроосмоса и адсорбции;
- d) не поглощают ультрафиолетовый свет при 270 нм;
- e) одинаковый размер пор.

18 Перечислите специальные электрофоретические методы:

- a) высоковольтный электрофорез;
- b) непрерывный (проточный) электрофорез;
- c) диск – электрофорез;
- d) иммуноэлектрофорез;
- e) изометрическое фокусирование;
- f) изотахофорез.

19 Параметры источника питания при высоковольтном электрофорезе:

- a) сила тока 100 мА;
- b) сила тока 600 мА;
- c) напряжение 100 В;
- d) напряжение 10 000 В;

7.3 Тестовые задания по физическим методам исследования

1 Главное преимущество спектральных методов:

- a) быстрота анализа;
- b) позволяет обнаружить незначительные количества вещества;
- c) вещество в процессе исследования не разрушается;
- d) дешевизна метода;
- e) простота метода.

2 Какие параметры определяют абсолютный спектр:

- a) коэффициент молярной экстинкции;
- b) длина волны;
- c) количество излученного света;
- d) количество поглощенного света;
- e) толщина образца.

3 Чему равна постоянная Планка:

- a) $66,3 \times 10^{-34}$ Дж/с;

b) $6,63 \times 10^{34}$ Дж/с;

с) $6,63 \times 10^{-34}$ Дж/с;

d) $66,3 \times 10^{34}$ Дж/м;

e) $6,63 \times 10^{34}$ Дж/м.

4 Что означает флуоресценция:

a) испускание молекулой света;

b) излучение;

с) поглощение молекулой света;

d) квантовый выход.

5 Что определяет масс-спектрометрия:

a) массу молекулы;

b) объем молекулы;

с) удельный вес молекулы;

d) излучаемый спектр;

e) длину волны.

6 Физические характеристики объектов:

a) способность атомов элементов к испусканию
характеристического излучения;

b) способность атомов или молекул веществ взаимодействовать с
электромагнитным излучением;

с) способность атомов или молекул веществ взаимодействовать с
движущимися заряженными частицами.

**7 В каком спектральном диапазоне фотоны обладают
максимальной энергией:**

a) гамма;

b) сверхвысоких частот (СВЧ);

с) ультрафиолетовом;

d) оптическом;

e) инфракрасном;

f) рентгеновском.

8 Какие энергетические переходы ответственны за излучение и поглощение микроволнового излучения?

- a) колебательно-вращательные;
- b) вращательные;
- c) все возможные;
- d) электронные;
- e) микроволновые;
- f) колебательные.

9 Дифференциальная спектрофотометрия используется для:

- a) только твердых тел;
- b) только как детектор в хроматографии;
- c) слабо поглощающих растворов;
- d) сильно поглощающих растворов;
- e) сильно рассеивающих растворов;
- f) сложных смесей веществ.

10 Что редко определяют при помощи спектрофотометрии:

- a) полимеры;
- b) алифатические соединения;
- c) хромофоры в клетках;
- d) неорганические анионы;
- e) изотопы;
- f) органические красители.

11 Чем отличаются атомные спектры одного и того же элемента в ААС и АЭС:

- a) разным числом линий;
- b) другими электронными переходами;
- c) спектральным диапазоном;
- d) шириной линий;
- e) относительной интенсивностью линий.

12 Эмиссионный спектр атома представляет собой:

- a) набор узких линий;
- b) набор широких полос;
- c) комбинацию узких полос и широких линий;
- d) непрерывную кривую с максимумами.

13 Нагрев анализируемого образца до высокой температуры в методе атомно-абсорбционной спектроскопии используется:

- a) только для его атомизации;
- b) только для ионизации атомов;
- c) только для возбуждения атомов;
- d) для атомизации с последующим возбуждением атомов;
- e) для атомизации с последующей ионизацией атомов.

14 Аналитическим сигналом при проведении качественного атомно-эмиссионного анализа является:

- a) длины волн спектральных линий;
- b) интенсивность спектральных линий;
- c) ширина спектральных линий ;
- d) расстояние между спектральными линиями;
- e) этот метод почти не используют для качественного анализа.

15 Аналитическим сигналом при проведении качественного атомно-абсорбционного анализа является:

- a) длины волн спектральных линий;
- b) интенсивность спектральных линий;
- c) ширина спектральных линий ;
- d) расстояние между спектральными линиями;
- e) этот метод почти не используют для качественного анализа.

16 Какой из перечисленных ниже методов атомизации образца используется в атомно-абсорбционной спектроскопии:

- a) введение в пламя;
- b) введение в дугу постоянного тока;
- c) введение в дугу переменного тока;
- d) с помощью искрового разряда;
- e) ни один из перечисленных.

17 Какой метод атомизации образца и возбуждения атомов позволяет качественно определять наиболее широкий круг элементов в методе атомно-эмиссионного анализа:

- a) пламя;
- b) дуга постоянного тока;
- c) дуга переменного тока;
- d) искра.

18 Основным ограничением применения атомно-эмиссионного метода анализа с применением индуктивно-связанной плазмы (ИСП) является:

- a) высокая стоимость аппаратуры и расходных материалов;
- b) невозможность проведения качественного анализа;
- c) невозможность проведения количественного анализа;
- d) большая погрешность измерений;
- e) небольшой круг определяемых элементов.

19 Основным ограничением применения атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) является:

- a) малая чувствительность;
- b) большая погрешность измерений;
- c) сложность проведения количественного анализа;
- d) необходимость перенастройки аппаратуры для определения каждого элемента;
- e) небольшой круг определяемых элементов.

20 Квант какого из перечисленных ниже типов электромагнитных излучений имеет наименьшую энергию:

- a) видимого;
- b) рентгеновского;
- c) ультрафиолетового;
- d) инфракрасного.

7.4 Тестовые задания по иммунохимическим методам исследования

1 Виды иммуноферментного анализа по типу реагентов:

- a) неконкурентный;
- b) противодействующий;
- c) сочетанный;
- d) конкурентный.

2 Какие инфекции можно выявить методом иммуноферментного анализа:

- a) ВИЧ-инфекция;
- b) вирусные гепатиты;
- c) герпетическая инфекция;
- d) дизентерия.

3 Свойства ферментных маркеров, используемых в ИФА:

- a) высокая активность и стабильность;
- b) нестабильность;
- c) наличие чувствительных субстратов;
- d) возможность адаптации субстратных систем к дальнейшему усилению;
- e) отсутствие фермента и его ингибиторов в исследуемой биологической жидкости.

4 Ферменты, наиболее часто используемые в ИФА:

- a) пероксидаза хрена;
- b) щелочная фосфатаза;
- c) калий гидрогеназа;
- d) натрий пероксидаза;
- e) D-галактозидаза.

5 Пути иммобилизации АГ или АТ на твердой фазе:

- a) пассивная абсорбция;
- b) пассивная адсорбция;
- c) ковалентное прикрепление;
- d) иммунохимический;
- e) активная адсорбция.

6 Материалы, применяемые в качестве твердой фазы при ИФА:

- a) полистирол;
- b) поливинилхлорид;
- c) полипропилен;
- d) полиэтилен.

7 Какие изотопы обычно используют в радиоиммунологическом анализе:

- a) ^{125}I ;
- b) ^{131}I ;
- c) ^3H ;
- d) ^1H .

8 В диагностических тест-системах в качестве «ловушек» применяются:

- a) IgG;
- b) IgA;
- c) IgM;
- d) IgD;
- e) IgE.

9 Растворы, в которых протекают иммунологические реакции, отвечают следующим требованиям:

- a) pH от 7,4 до 8,6;
- b) низкая ионная сила;
- c) не должен содержать микроорганизмы;
- d) все ответы верны.

10 Чувствительность радиоиммунологического анализа:

- a) 10^{-14} - 10^{-15} моль/л;
- b) 10^{-13} - 10^{-14} моль/л;
- c) 10^{-10} - 10^{-12} моль/л;
- d) низкая чувствительность.

8 Темы реферативных работ

1. Радиоиммунологический анализ: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
2. Создание и применение различных видов иммуносенсоров.
3. Иммуноферментный анализ: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
4. Масс-спектрометрия: этапы проведения и применение в биологии и медицине.
5. Иммуноблотинг: техника, методика выполнения и применение.
6. Атомно-абсорбционная спектрометрия: теоретические основы и принцип метода.
7. Масс-спектрометрия теоретические основы и принцип метода.
8. Фемтосекундная спектроскопия: типы фемтосекундных лазеров, регистрация спектральных характеристик.
9. Фотоакустическая спектрометрия: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
10. Использование метода рамановской спектрометрии в биохимических исследованиях.
11. Рентгенофлуоресцентная спектрометрия: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
12. Инфракрасная спектрометрия: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
13. Использование радиохимического метода в биохимии.
14. Применение радиометрического анализа в исследовании живых систем.
15. Теоретические основы, техника проведение и использование атомно-эмиссионного спектрального анализа.
16. Физические основы спектрометрических методов исследования.

17. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические методы анализа в биохимии.
18. Активационный анализ: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
19. Электронный парамагнитный резонанс: физика явления, основные параметры спектров ЭПР, техника проведения и применение.
20. Ядерно-магнитный резонанс: теоретические основы, техника проведения и применение в биохимических исследованиях
21. Использование метода поляризационно-адсорбционной спектроскопии в биохимии
22. УФ-спектроскопия: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.
23. Метки, используемые в ИФА. Использование новых пероксидаз растений в ИФА.
24. Фотоколориметрия: теоретические основы, техника проведения и применение в биохимических исследованиях
25. Спектрофотометрический анализ: принцип метода, этапы проведения и применение в биологии и медицине.

9 Вопросы, выносимые на экзамен

1. Методы исследования в биологии. Основные понятия. Классификация. Эмпирический метод в биологии.
2. Метод моделирования. Основные понятия. Виды моделей в биологии. Физико-химические и математические модели.
3. Преимущества моделирования. Детермированное, стохастическое, динамическое и дискретное моделирование.
4. Виды лабораторных животных. Линейные и нелинейные виды.
5. Методы заражения лабораторных животных. Заболевания лабораторных животных.
6. Основные методы статистического анализа в биологии. Формулировка статистических гипотез, обработка результатов. Нормальное распределение. Основные статистические методы.
7. Структура вивария. Требования к помещению для содержания лабораторных животных. Пополнение вивария. Уборка. Правила кормления лабораторных животных. Эвтаназия.
8. Применение биологических методов исследования в различных отраслях науки и производства.
9. Методика дифференциального центрифугирования.
10. Физико-химические свойства белков. Особенности выделения белков. Методы разрушения тканей и экстракции белков. Методы очистки белков.
11. Причины варьирования результатов исследования.
12. Методы биохимических исследований. Требования к методам биохимическим исследованиям. Основные классы природных биомолекул.
13. Общий экспериментальный подход в биохимии. Последовательность изучения биохимических процессов.
14. Основы метода центрифугирования. Технологические параметры центрифугирования. Факторы, влияющие на кинетику центрифугирования.

15. Классификация методов центрифугирования (по режиму работы, по расположению вала). Препаративное и аналитическое центрифугирование.
16. Препаративное центрифугирование: зональное центрифугирование, изопикническое центрифугирование.
17. Препаративное центрифугирование: дифференциальное центрифугирование, равновесное центрифугирование в градиенте плотности.
18. Формирование и извлечение градиентов: природа градиентов, методика создания ступенчатого и плавного градиента плотности, извлечение градиентов из центрифужных пробирок.
19. Метод ультрацентрифугирования. Субклеточное фракционирование. Этапы. Условия экстрагирования.
20. Хроматография. Область применения. Классификация хроматографических методов.
21. Теоретические основы хроматографического процесса. Коэффициент распределения.
22. Понятие хроматографического детектора, дифференциальные и интегральные детекторы. Характеристики детекторов. Применение детекторов. Хроматограмма – основные термины и определения.
23. Аффинная хроматография. Применение.
24. Газовая хроматография: особенности, ограничения. Основные части хроматографа. Требования к колонкам. Подвижная фаза. Виды детекторов.
25. Виды газовой хроматографии. Свойства адсорбента. Классификация адсорбента. Параметры структуры адсорбента.
26. Жидкостная хроматография. Классификация. Применение. Схема устройства жидкостного хроматографа. Адсорбционная хроматография.
27. Распределительная жидкостная хроматография.
28. Техника колоночной хроматографии. Хроматографические колонки. Резервуары для элюента. Смесители. Внесение препарата в колонку. Детекторы.

29. Жидкостная хроматография. Классификация. Применение. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

30. Ионообменная хроматография. Ионообменники. Элюент. Ионные и неионные взаимодействия вещества и сорбента. Применение ионообменной хроматографии

31. Тонкослойная хроматография. Применение ТСХ.

32. Адсорбционная хроматография. Сорбенты.

33. Сверхкритическая флюидная хроматография.

34. Электрофорез. Факторы, влияющие на подвижность компонентов пробы. Принцип электрофореза. Зональный электрофорез.

35. Электрофорез. Носители и их свойства.

36. Иммунный электрофорез. Реакции антиген-антитело. Иммуноэлектрофорез в агаровых или агарозных гелях.

37. Физико-химические основы метода капиллярного электрофореза.

38. Специальные электрофоретические методы - изометрическое фокусирование

39. Специальные электрофоретические методы - диск-электрофорез.

40. Методы детектирования, используемые при капиллярном электрофорезе.

41. Особенности и преимущества капиллярного электрофореза.

42. Авторадиография.

43. Метод меченых атомов. Радиоактивные изотопы, используемые в биологии. Измерение радиоактивности.

44. Метод ПЦР.

45. Физические методы исследования (классификация, теоретические основы, достоинства, применение)

46. Дифракционные методы исследования (классификация, теоретические основы, достоинства, применение).

47. Ионизационные методы исследования (разновидности, теоретические основы, достоинства, применение)

48. Основные исторические этапы развития спектральных методов исследования.

49. Классификация спектральных методов исследования. Области спектра электромагнитного излучения, используемые в спектрометрических методах исследования. Закон Ламберта-Бера.

50. Физический смысл и особенности оптической спектроскопии. Атомная спектрометрия.

51. Схема возникновения аналитических сигналов при атомной спектрометрии. Процесс «атомизации». Температурные параметры различных источников возбуждения.

52. Атомно-эмиссионный и атомно-абсорбционный методы.

53. Атомно-эмиссионная фотометрия пламени: особенности используемого горючего газа, применение.

54. Рентгеновский эмиссионный и флуоресцентный методы анализа.

55. Радиометрические методы анализа. Разновидности, применение.

56. Радиоактивационный анализ: физические основы, оборудование, применение.

57. Особенности радиохимического анализа.

58. Спектрофотометрический анализ.

59. Метод фотоакустической спектрометрии.

60. Особенности фотометрического и фототурбидиметрического титрования.

61. Особенности и применение флуориметрических методов анализа.

62. Инфракрасная спектроскопия: особенности, принцип метода, применение.

63. Классы хромофоров биологических полимеров. Особенности поглощения аминокислотных остатков. Влияние простетических групп белков на поглощение.

64. Принципы устройства приборов для УФ-спектроскопии и методы анализа.

65. Особенности ИК спектроскопии.
66. Спектрометрия магнитного резонанса.
67. Применение ЯМР.
68. Электронный парамагнитный резонанс.
69. Область применения и принцип действия масс-спектрометра.
70. Основные характеристики масс-спектрометров. Способы и приемы разделения ионов при масс-спектрометрии. Способы идентификации вещества при масс-спектрометрии.
71. Методы ионизации молекул. Методы регистрации ионных токов.
72. Качественная и количественная масс-спектрометрия. Применение масс-спектрометрии.
73. Иммуноферментные методы исследования. Классификации ИФА (по типу реагентов, по типу реакций, по принципу определения тестируемого вещества). Практическое применение ИФА.
74. Основные принципы методов иммуноанализа. Метод агглютинации.
75. Классификация иммунохимических методов исследования. Виды и характеристика меток, используемых в иммуноанализе.
76. Теоретические основы иммунохимических методов исследования. Реакция антиген-антитело.
77. Радиорецепторный анализ. Основные компоненты и этапы
78. Основы и варианты радиоиммунологического анализа. Особенности.
79. Иммунорадиометрический анализ.
80. Основные компоненты и этапы ИФА.
81. Этапы проведения ИФА
82. Метод иммунного блотинга.
83. Конкурентный метод иммуноанализа
84. «Сендвич» метод иммуноанализа. Двойной «сендвич» метод.

Список использованных источников

- 1 Зобенко, В.Я. Краткий курс биологической физики / В.Я. Зобенко, Г.А. Плутахин. – Краснодар: КубГАУ, 2016. – 228 с.
- 2 Уильямс, Б. Методы практической биохимии / Б. Уильямс, К. Уилсон. – М.: Издательство «Мир», 1978. – 273 с.
- 3 Урванцева, Г.А. Биохимия и молекулярная биология / Г.А. Урванцева, Е.Л. Грачева. – Ярославль: ЯрГУ, 2017. – 44 с.
- 4 Туркова, Я. Аффинная хроматография / Я. Туркова. – М.: Издательство «Мир», 1988. – 472 с.
- 5 Берчфилд, Г. Газовая хроматография в биохимии / Г. Берчфилд, Э. Сторрс. – М.: Издательство «Мир», 1964. – 620 с.
- 6 Винарский, В.А. Хроматография: Курс лекций: В 2 ч. Ч.1. Газовая хроматография / В.А. Винарский. – Минск: БГУ, 2002. – 192 с.
- 7 Сычев, К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / К.С. Сычев. – М.: Техносфера, 2010. – 272 с.
- 8 Бёккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Бёккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
- 9 Рачинский, В.В. Хроматография в биологии / В.В. Рачинский, Т.Б. Гапон. – М.: Издательство Академии Наук СССР, 1953. – 198 с.
- 10 Ламоткин, С.А. Хроматография и электрофорез / С.А. Ламоткин. – Минск : БГТУ, 2014. – 289 с.
- 11 Шевченко, О.П. Электрофорез в клинической лаборатории / О.П. Шевченко, В.В. Долгов, Г.А. Олефиренко. – М. : Реафарм, 2006. – 160 с.
- 12 Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 447 с.
- 13 Духин, С.С. Электрофорез /С.С. Духин, Б.В. Дерягин. – М.: Издательство «Мир», 1976. – 330 с.

14 Долгов, В.В. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях / В.В. Долгов, Н.Г. Ракова, В.Е. Колупаев, Н.А. Рытикова. –Издательство «Триада», 2007. – 320 с.

15 Шигина, Ю.В. Иммунология: учебное пособие / Ю.В. Шигина. – М.: РИОР Издательский дом, 2007. – 183с.

16 Егоров, А. М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров, А. П. Осипов, Б. Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, – 1991.

17 Кишкун, А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике / А.А. Кишкун. – М.: Медицинское информационное агентство, 2009.

18 Северин, Е.С. Биохимия: учеб. для студентов мед. вузов / Е. С. Северин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 766 с.

19 Комов, В. П. Биохимия : учеб. для вузов / В. Т. Комов, В. Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2008. – 640 с.

20 Соколовский, А.Е. Физико-химические методы анализа / А.Е. Соколовский, Е.В. Радион. – Минск: БГТУ, 2007. – 123 с.

21 Комкова, О.П. Механизмы серологических реакций / О.П. Комкова, А.М. Образцова, Н.А. Сидорова. – Петрозаводск, 2006. – 61 с.