

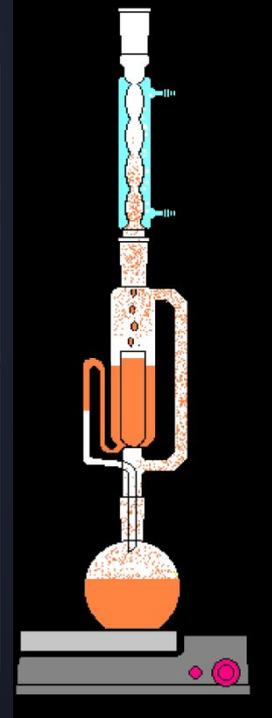
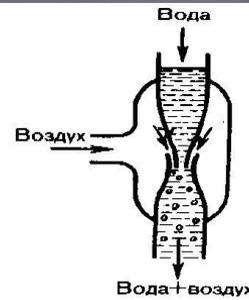
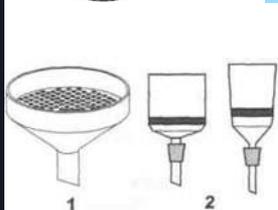
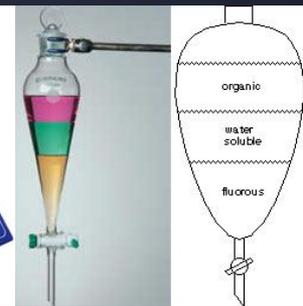
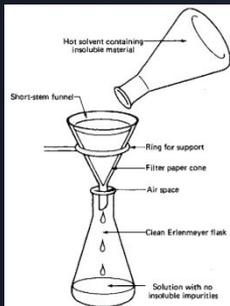
# Методы биохимии растений

1. Методы препаративной химии и биохимии.
2. Методы выделения органелл.
3. Спектральные методы.
4. Хроматография.
5. Электрофорез.
6. Методы меченых атомов.
7. Генная инженерия.

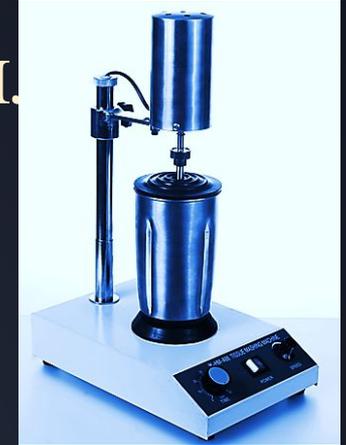


# Методы препаративной химии и биохимии

1. Гомогенизация.
2. Экстракция.
3. Очистка.
4. Инкубация.



# Методы выделения органелл



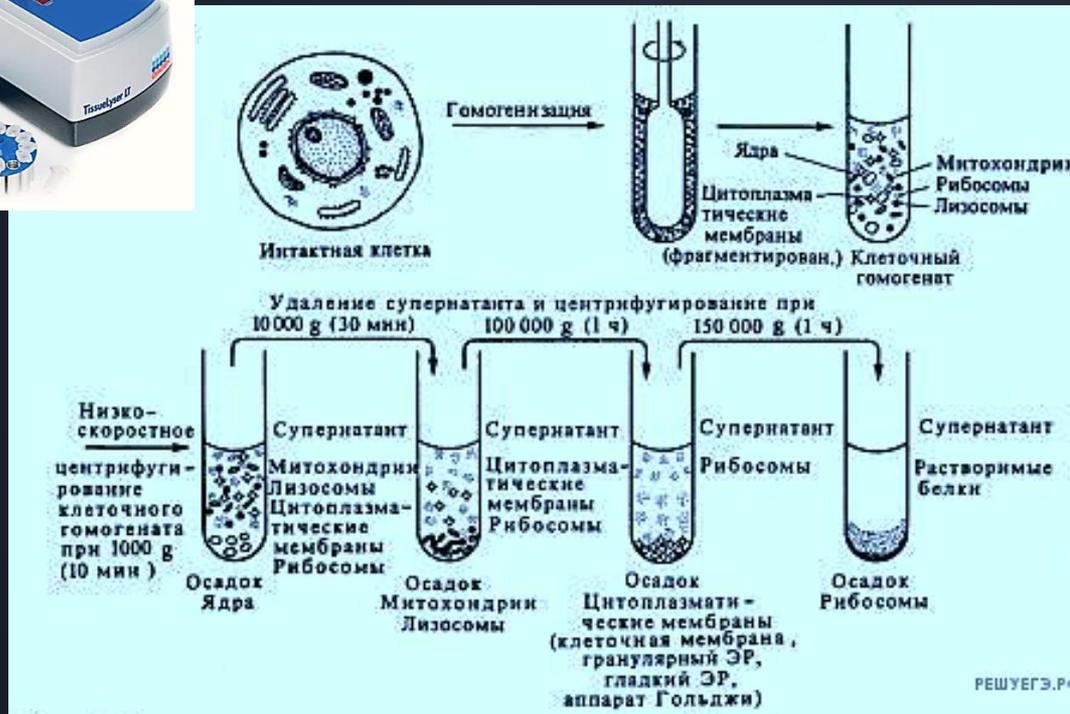
## Способы разрушения тканей и клеток

- Физические методы
  - Механическая гомогенизация
  - Разрушение с помощью высокого давления
  - Разрушение в жидких средах
  - Прочие методы
  - Разрушение ультразвуком

Для того чтобы фракционировать клеточные органеллы, образец измельчают и **гомогенизируют** в забуференной среде с использованием **гомогенизатора Поттера-Элвехема** (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном цилиндре).

Для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была изотонической. Если раствор гипотоничен, органеллы будут набухать и лопнуть, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются.

# Методы выделения органелл



Последовательность осаждения органелл клетки из гомогената:

1. Целые клетки и их фрагменты
2. Ядра
3. Хлоропласты
4. Митохондрии
5. Лизосомы (и др. микротельца)
6. Микросомы (фрагменты ЭПС)
7. Рибосомы

# Методы выделения органелл

**Дифференциальное центрифугирование** используют для исследования биохимических и физиологических механизмов клетки. Клеточные фракции сохраняют свою морфологическую и функциональную целостность.

**Ядро** седиментирует уже при ускорении, достигаемом с помощью настольных центрифуг.

Декантирование супернатанта и тщательное повторное ресуспендирование осадка дает фракцию, **обогащенную клеточными ядрами.**

Однако эта фракция содержит другие клеточные компоненты в качестве примесей, например фрагменты цитоскелета.



# Методы выделения органелл

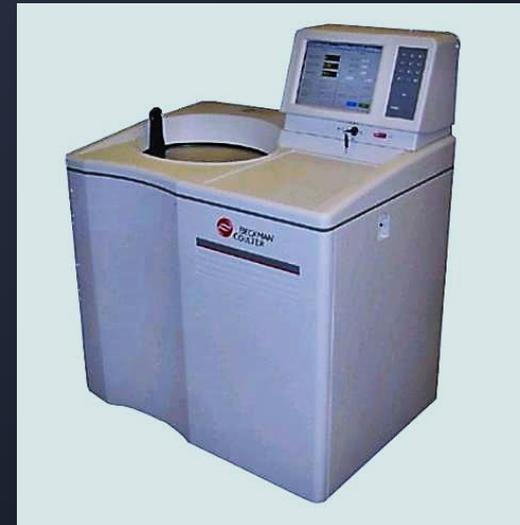
Частицы меньших размеров и менее плотные, чем ядро, получают при воздействии на супернатант постепенно увеличивающегося ускорения .

Эта операция проводится на более мощных центрифугах: **высокоскоростные центрифуги с охлаждением и ультрацентрифуги.**

Супернатант последнего центрифугирования представляет собой цитозоль, т.е. растворимые компоненты клетки, перешедшие при гомогенизации в буферный раствор.

Выделение клеточных органелл проводят **при низких температурах (0-5°C)**, чтобы уменьшить степень деградации материала за счет реакций, катализируемых ферментами; последние высвобождаются в процессе разрушения ткани.

Добавление тиолов и хелатирующих агентов необходимо для защиты функциональных **SH**-групп от окисления.



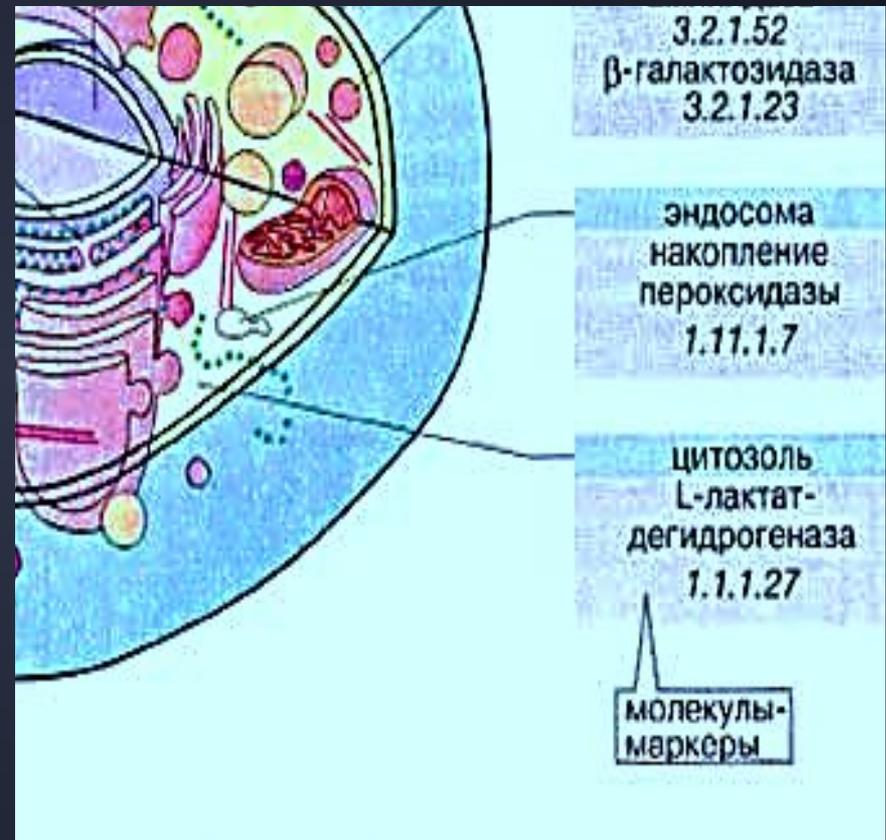
# Методы выделения органелл

В процессе фракционирования важно контролировать чистоту фракций.

Присутствие в определенной фракции той или иной органеллы и наличие других компонентов определяют с помощью **молекул-маркеров**.

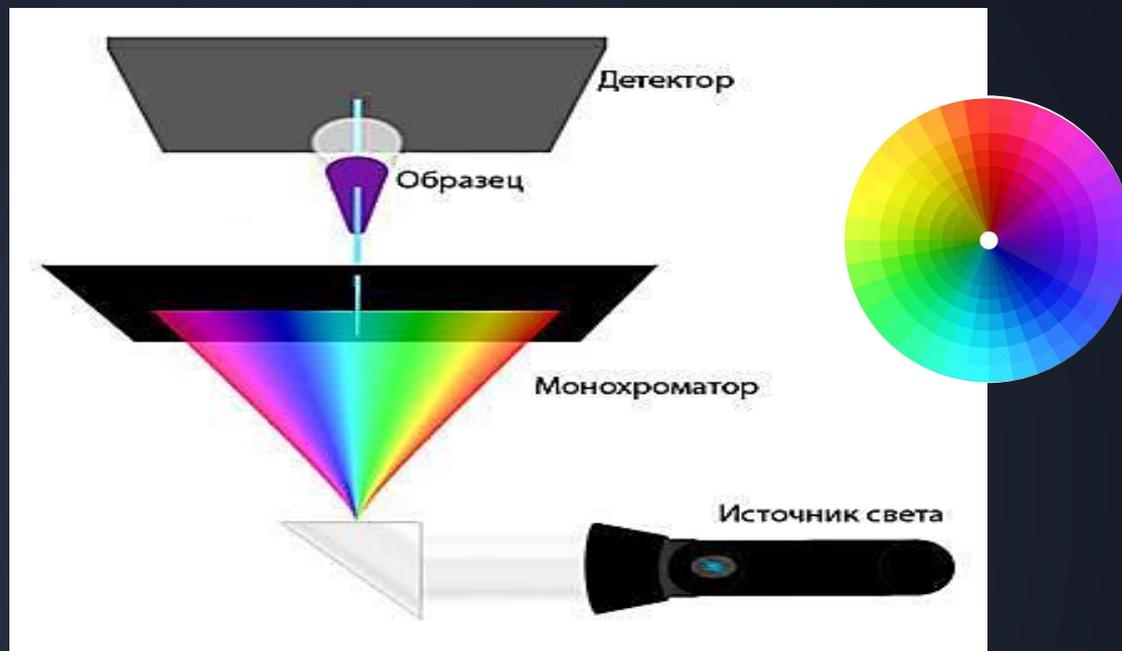
Обычно это **органелло-специфичные ферменты (ферменты-маркеры)**.

Распределение ферментов-маркеров в клетке отражает локализацию в ней соответствующих каталитических реакций.



# Спектральные методы

Спектральные (оптические) методы используют для изучения химического состава веществ на основе их способностей по испусканию и поглощению света.



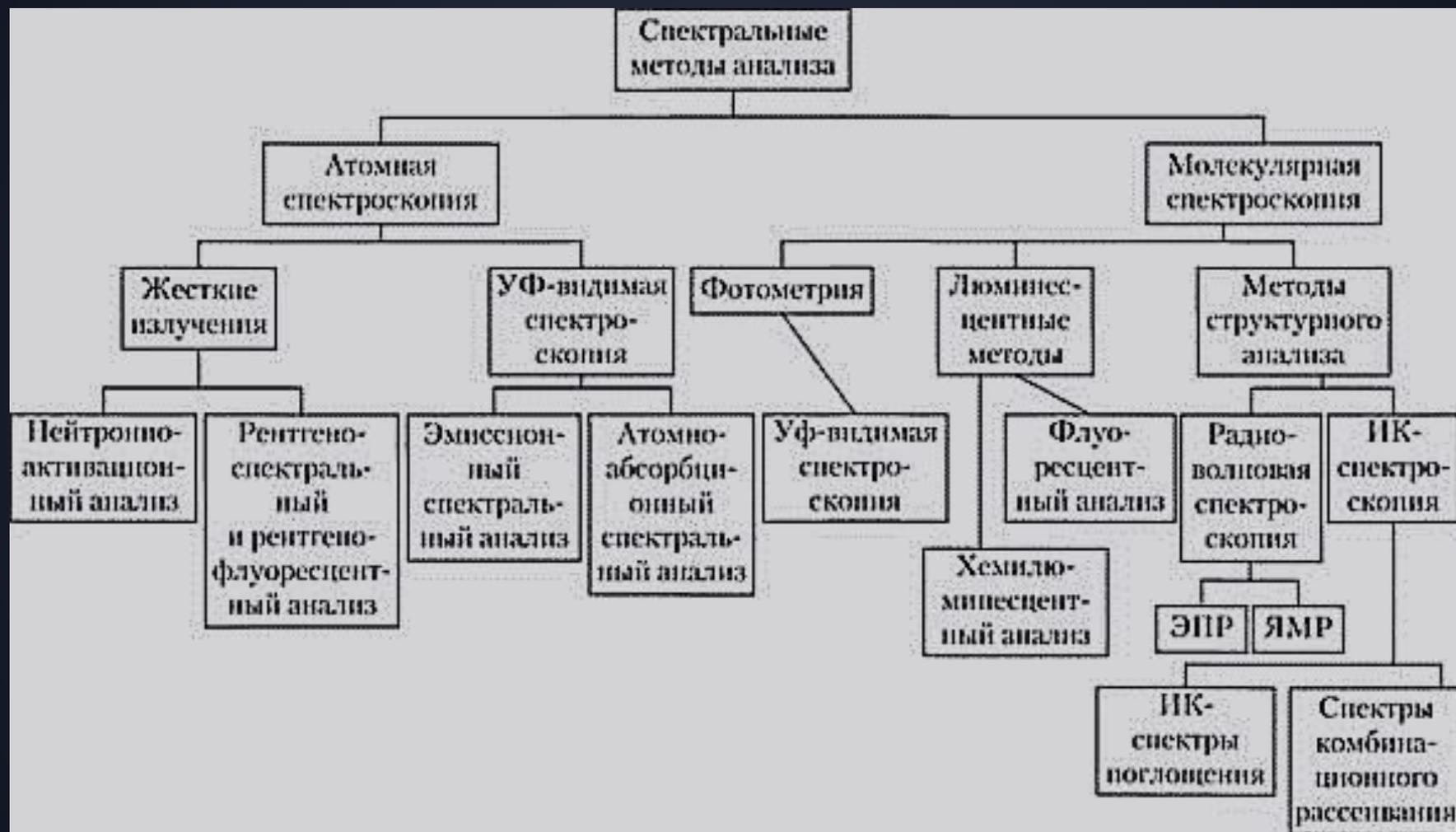
Абсорбционные спектральные методы основаны на избирательном поглощении света исследуемым веществом и подчиняются закону Бугера-Ламберта-Бера (поглощение света пропорционально концентрации поглощающего вещества и толщине поглощающего слоя).

Эмиссионный спектральный анализ проводят по спектрам испускания атомов, ионов или молекул, возбужденных различными способами.

Люминесцентные методы основаны на люминесценции — свечении под воздействием облучения светом, электронами, в результате химических реакций.

Пламенная спектрофотометрия – разновидность эмиссионного спектрального анализа, основана на изучении эмиссионных спектров элементов анализируемого вещества, возникающих под влиянием мягких источников возбуждения.

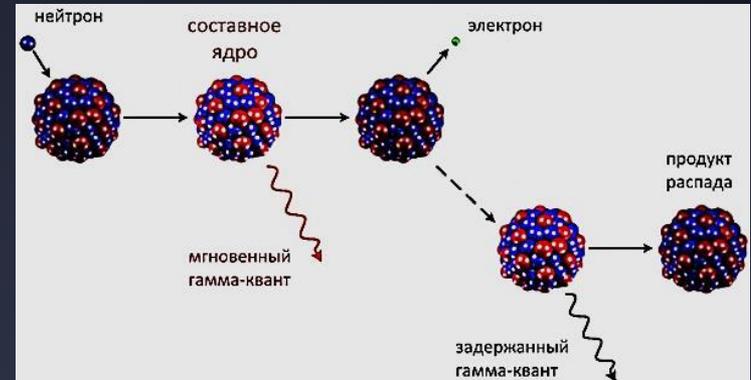
# Спектральные методы



# Ядерные спектральные методы

## Нейтронно-активационный анализ

Дает наиболее полную картину по валовому содержанию различных химических элементов без указания химической структуры.



В результате взаимодействия с веществом появляются ядерные изотопы, анализируя которые можно идентифицировать практически все элементы Периодической системы. Метод крайне дорогой, нуждающийся в ядерном реакторе как источнике нейтронов, в сложной компьютерной технике.

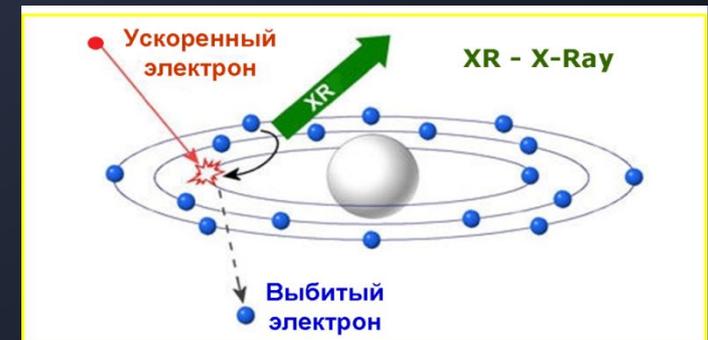
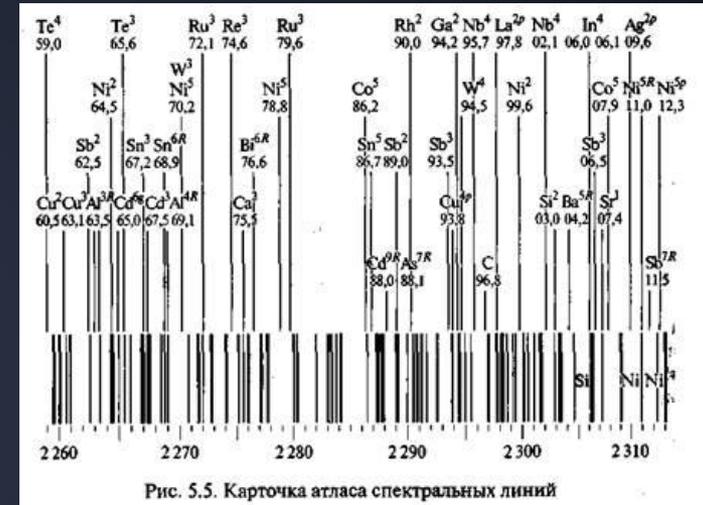
Этот метод был использован для выявления источников загрязнения Арктики твердыми аэрозольными частицами, содержащими тяжелые металлы. Каждый источник таких частиц имеет характерное только для него соотношение различных элементов. Было установлено, что загрязнение Арктики происходит в основном от Норильского горнообогатительного комбината.

# Ядерные спектральные методы

**Атомно-эмиссионная спектроскопия** основана на регистрации спектра испускания света веществом, находящимся в состоянии плазмы ("атомного пара").

**Атомно-абсорбционный метод** по технике эксперимента близок к эмиссионно-спектральному, но кванты не излучаются, а поглощаются.

**Рентгеноспектральный анализ** основан на получении спектров различных элементов и веществ под воздействием рентгеновского излучения.



# Ядерные спектральные методы – методы структурного анализа

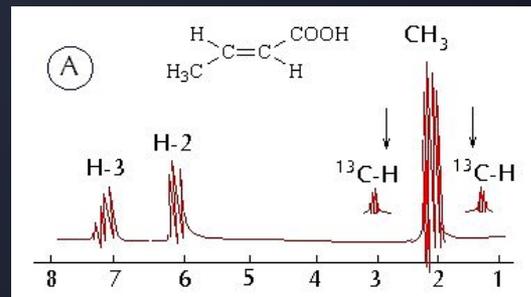
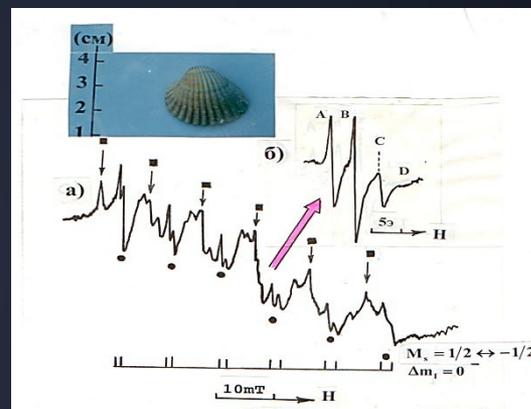
## Радиоволновая спектроскопия

Информация о структуре органических молекул может быть получена методами электронного парамагнитного и ядерного магнитного резонанса.

Явления резонанса заключается в индуцировании электронных и ядерных переходов с помощью дополнительного переменного поля, расположенного перпендикулярно постоянному магнитному полю.

Метод ЭПР используется для анализа строения и свойств свободных радикалов и комплексов ионов переходных металлов. Методом ЭПР можно анализировать лигнино- и суберино-подобные вещества, которые содержат свободные радикалы. Этот метод применяется для изучения окислительно-восстановительных процессов с участием ионов меди и марганца.

Метод ЯМР дает информацию о структуре органических веществ, в том числе и пространственной.

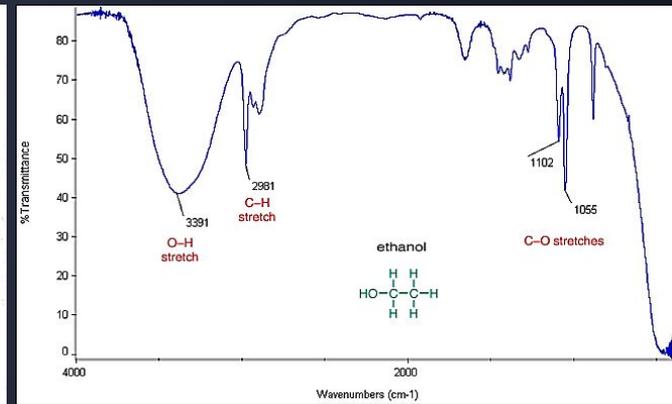
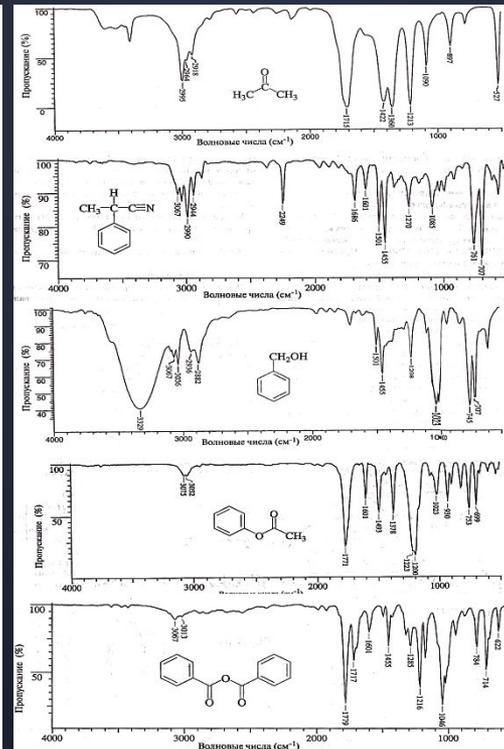
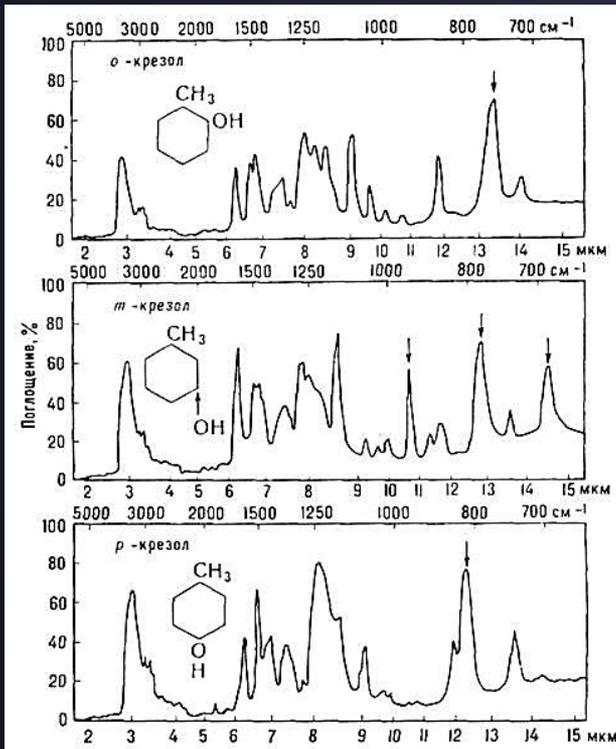


# Методы структурного анализа – ИК-спектроскопия

## Принцип метода

При пропускании ик излучения через вещество происходит возбуждение колебательных движений молекул или их отдельных фрагментов. Наблюдается ослабление интенсивности света, прошедшего через образец.

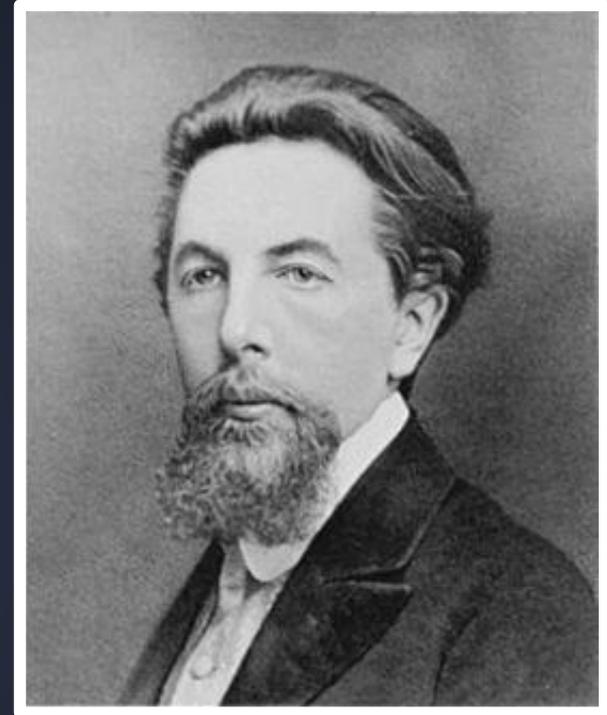
Поглощение происходит не во всём спектре излучения, а при тех длинах волн, энергия которых соответствует энергиям возбуждения колебаний в изучаемых молекулах.



# Хроматография

**Хроматография** (от др.-греч. χρῶμα — цвет) — динамический сорбционный метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ.

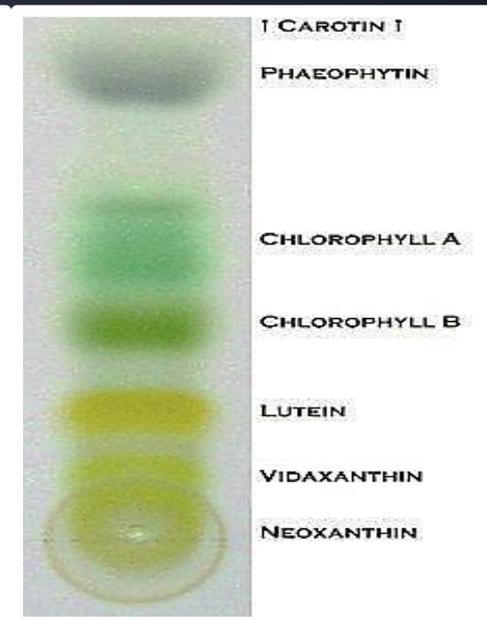
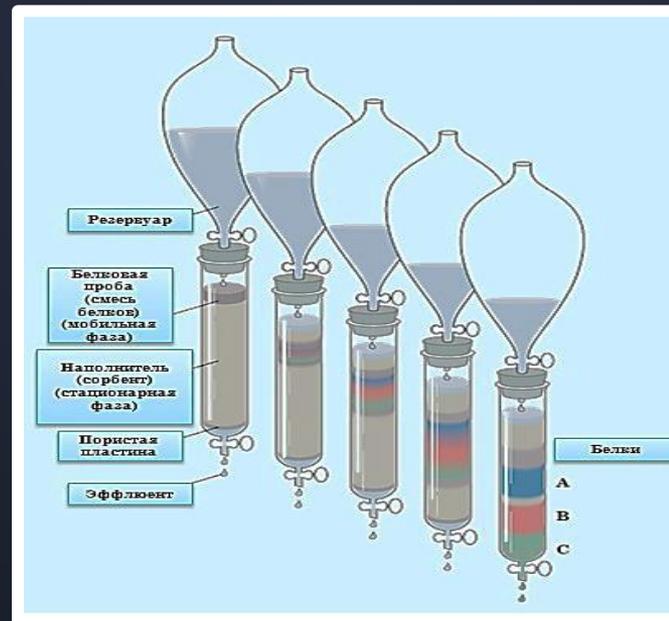
Метод основан на том, что на неподвижной фазе, вдоль которой перемещается подвижная фаза, каждый из компонентов движется со своей собственной скоростью независимо от других.



Михаил Семёнович Цвет

# Хроматография

**Хроматография** применяется для разделения смесей на составляющие их компоненты. Метод основан на том, что на неподвижной фазе, вдоль которой перемещается подвижная фаза, каждый из компонентов движется со своей собственной скоростью.



# Хроматография

По физической природе неподвижной фазы

Жидкая  
колончатая

Газоносная

По распределению сорбатов между фазами

Адсорбционная  
ионообменная

Экстракционная  
осадочная

на я

По технике выполнения  
плоскостная

Капиллярная

По цели проведения

Аналитическая

Препаративная

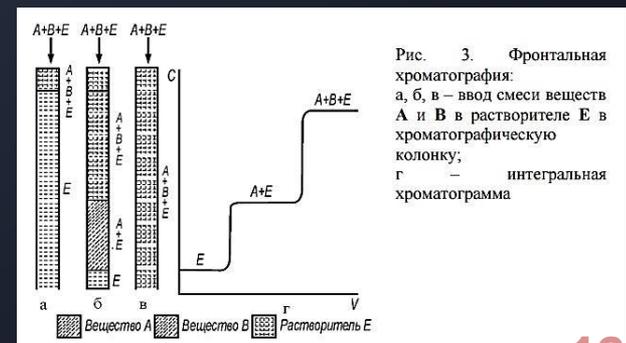
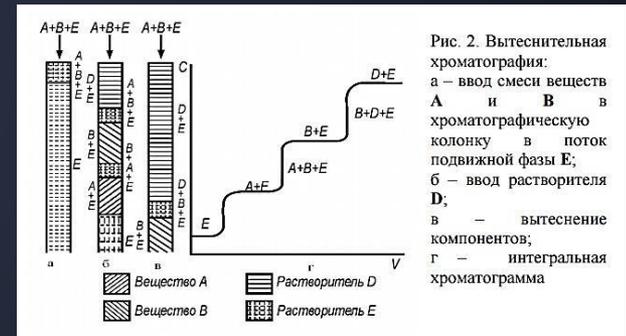
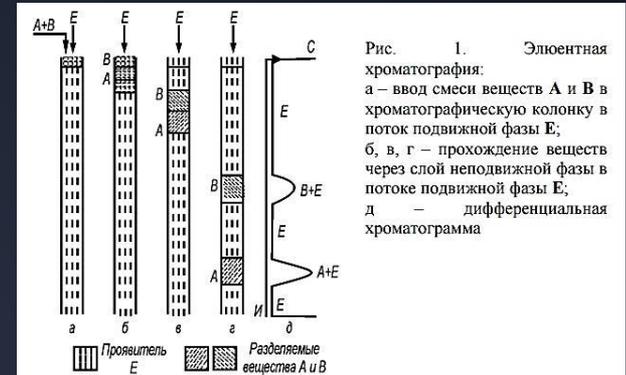
Промышленная

По способу ввода пробы

Элюентная

Вытеснительная

Фронтальная



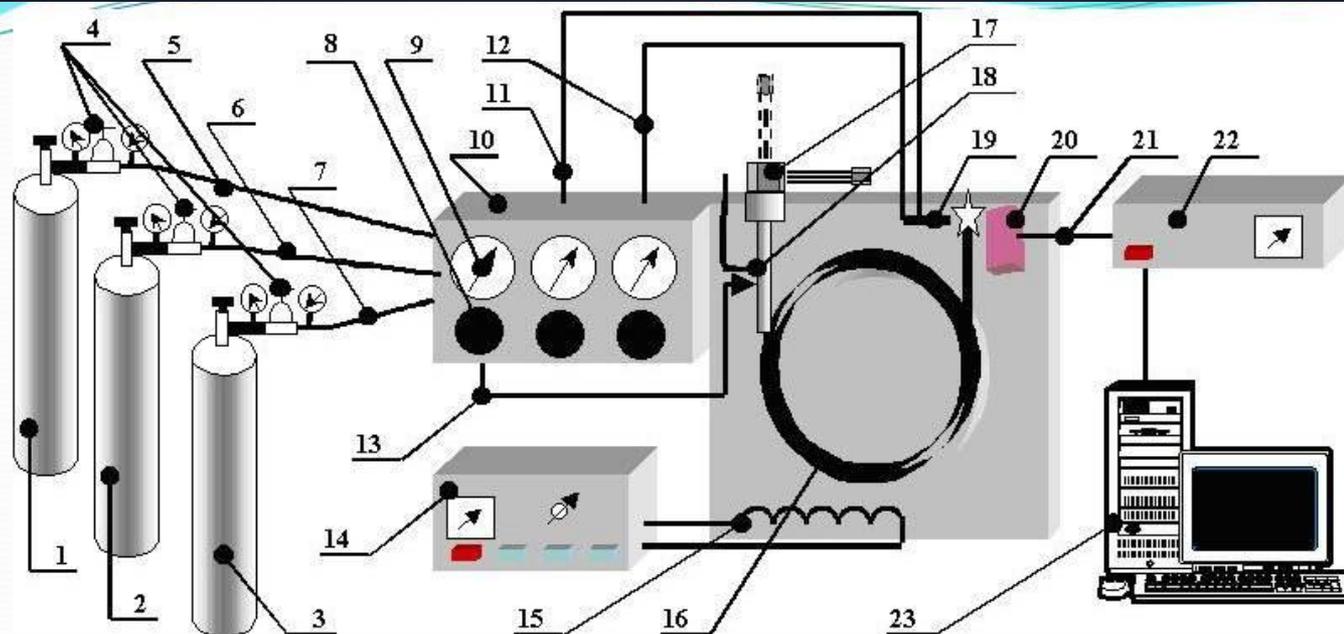
# Хроматография

- ✓ **Газовая хроматография:** подвижной фазой служит газ-носитель (водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ), протекающий через неподвижную фазу с большой поверхностью. Газ-носитель не реагирует с неподвижной фазой и разделяемыми веществами.
- ✓ Различают **газо-твёрдофазную и газо-жидкостную хроматографию.** В первом случае неподвижной фазой является твёрдый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия), во втором — жидкость, нанесённая на поверхность инертного носителя.



- ✓ Разделение основано на **различиях в летучести и адсорбируемости** компонентов разделяемой смеси.
- ✓ Метод можно использовать для анализа газообразных, жидких и твёрдых веществ с молекулярной массой меньше **400**, которые должны удовлетворять определённым требованиям: **летучесть, термостабильность, инертность, лёгкость получения.** Этим требованиям удовлетворяют многие органические вещества, поэтому газовую хроматографию широко используют как серийный метод анализа органических соединений.

# Хроматография



1. Баллон с газом носителем (азот), 2. Баллон с водородом, 3. Баллон со сжатым воздухом, 4. Редукторы, 5. Капиллярная газовая линия газа носителя, 6. Капиллярная газовая линия водорода, 7. Капиллярная газовая линия сжатого воздуха, 8. Регуляторы рабочего давления газов, 9. Манометры рабочего давления газов, 10. Газовый блок хроматографа, 11. Подающий капилляр водорода, 12. Подающий капилляр сжатого воздуха, 13. Подающий капилляр газа носителя, 14. Блок автоматической регулировки температуры термостата, 15. Нагревательный элемент термостата, 16. Капиллярная колонка, 17. Устройство ввода анализируемого материала в хроматограф, 18. Испаритель, 19. Горелка, 20. Ионизационно-пламенный детектор, 21. Коаксиальный кабель, 22. Измеритель малых токов, 23. Компьютер.

# Хроматография

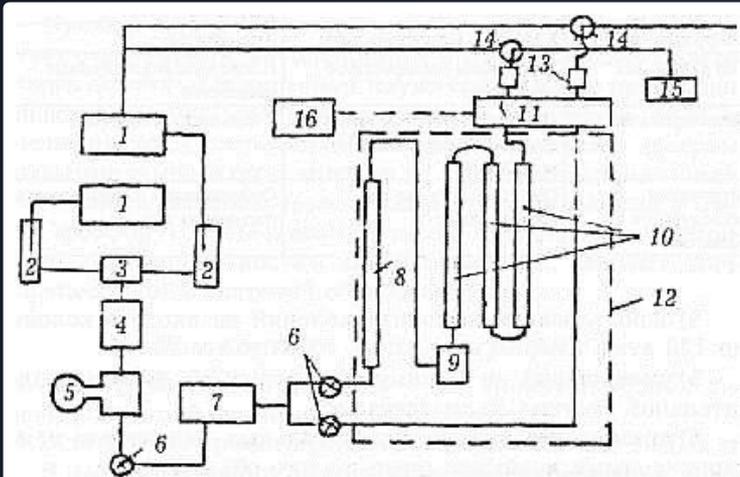


Рис. 4.8. Жидкостный хроматограф:

- 1 — резервуар; 2 — дегазатор; 3 — смеситель; 4 — фильтр;
- 5 — насос; 6 — перекрывающие краны; 7 — устройство для сглаживания пульсаций давления; 8 — предварительная насыщающая колонка; 9 — устройство для ввода проб;
- 10 — хроматографические колонки; 11 — детектор;
- 12 — термостат; 13 — измерители потока; 14 — кран;
- 15 — сборник фракций; 16 — самописец

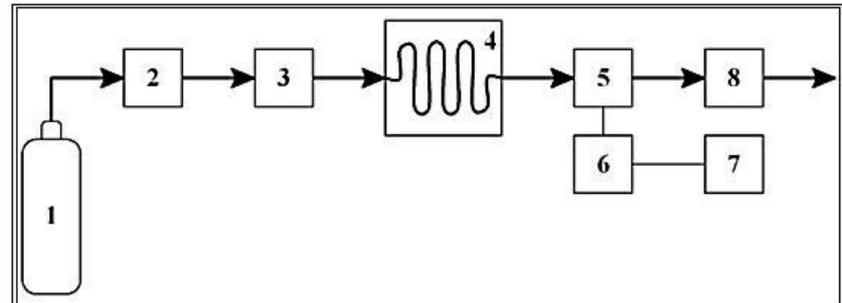


Схема газового хроматографа

- 1 — источник газа-носителя (подвижной фазы)
- 2 — регулятор расхода газа носителя
- 3 — устройство ввода пробы
- 4 — хроматографическая колонка в термостате
- 5 — детектор
- 6 — электронный усилитель
- 7 — регистрирующий прибор (самописец, компьютер)
- 8 — расходомер

# Хроматография



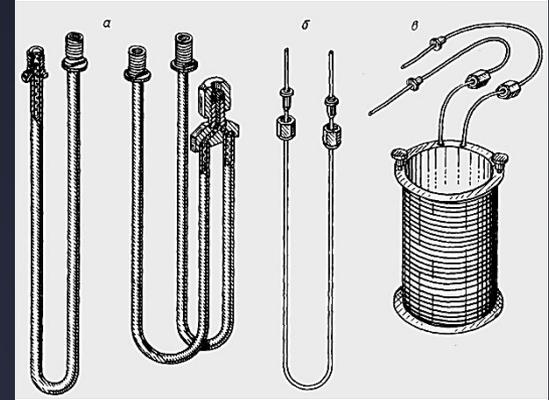
Газовый хроматограф



Жидкостный хроматограф

# Хроматография

- ✓ Для газовой хроматографии обычно используют **U-образные** или **спиральные колонки**.
- ✓ **Внутренний диаметр** колонок — **2-15 мм**, а длина — **1-20 м**.
- ✓ **Материалом** для изготовления колонок служит стекло, нержавеющая сталь, медь, иногда фторопласт.
- ✓ В последнее время распространены капиллярные колонки из **плавленного кварца** с нанесенной внутри неподвижной фазой. Длина подобных колонок может достигать сотен и даже тысяч метров, хотя чаще используются колонки длиной **30-50 м**.
- ✓ **Набивные (насадочные) колонки** — колонки большого диаметра (обычно **2 мм**), заполненные адсорбентом.
- ✓ **Капиллярные колонки** изготавливают из капилляров очень малого диаметра (**0,53 мм, 0,32 мм, 0,25 мм и 0,1 мм**). Чем меньше диаметр колонки, тем меньше размытие пиков в результате диффузии и, соответственно, тем выше эффективность.



# Хроматография

**Детектор – устройство, способное реагировать на изменение концентрации определяемого вещества. Детекторы условно делятся на универсальные и селективные.**

- ✓ К универсальным относится детектор по теплопроводности (ДТП, устаревшее название — катарометр). Принцип действия заключается в изменении температуры нагретой нити при обдувании её газом (пробой) с разной теплопроводностью.



# Хроматография

- ✓ **селективные детекторы:**
- ✓ **Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)** селективно определяет углеводороды. Принцип действия заключается в изменении силы тока в плазме водородно-кислородного пламени при попадании в неё горючих соединений углерода.
- ✓ **Пламенно-фотометрический детектор (ПФД)** определяет излучение молекул или атомов вещества при их попадании в плазму водородно-кислородного пламени. Теоретически ПФД может определять очень широкий спектр веществ, однако на практике он чаще всего используется при анализе соединений серы, азота и фосфора, а также иногда ртути.
- ✓ Разновидность ПФД является **пульсирующий пламенно-фотометрический детектор (ППФД)**, отличающийся тем, что в нём горение пламени происходит не постоянно, а импульсами с частотой **2-4 Гц**. Периодический характер пламени позволяет проводить временное разделение фронтов свечения разных веществ, например, серы на фоне углерода, то есть селективность ППФД значительно выше, чем у ПФД.

# Хроматография

- ✓ **Термоионный детектор (ТИД)**. В нем используется керамический шарик с таблеткой из соли щелочного металла (сульфат рубидия или бромид цезия), нагреваемый до высокой температуры. Используется для селективного определения азота и фосфора.
- ✓ **Электрозахватный детектор (ЭЗД)**. В данном виде детектора используется источник бета-частиц (электронов), как правило,  $^{63}\text{Ni}$ , или альфа-частиц ( $^{269}\text{Pu}$ ). Если в газе, проходящем мимо такого радиоактивного источника, оказываются молекулы, склонные к ионизации, возникает пропорциональный их концентрации ток, который можно измерить.
- ✓ Разновидностью ЭЗД является **детектор дифференциальной ионной подвижности (ДДИП)**, компактный и доступный для использования в портативных хроматографах. Детектор может селективно определять сернистые компоненты и непредельные углеводороды в концентрациях до **0,1 ppm**.
- ✓ **Хемилюминесцентный детектор (ХЛД)** является одним из самых сложных, однако обладает непревзойдённо высокой чувствительностью для определённых групп компонентов (в частности, серосодержащих — до **0,1 ppb**). Перед ХЛД устанавливается ПИД, а в самом ХЛД используется озонатор.

# Физические методы анализа

- Масс-спектрометрический метод** заключается в
- ✓ ионизации газообразной пробы электронной бомбардировкой,
  - ✓ ионы подвергаются воздействию магнитного поля. В зависимости от массы и заряда ионы отклоняются с разной скоростью и разделяются,
  - ✓ в качестве детектора применяют электрометрические усилители, электронные умножители и детекторы с фотоумножителем, а также фотопластинки.
  - ✓ Газовая хроматография позволяет разделить смесь веществ на отдельные компоненты. Приборы, в которых масс-спектрометрический детектор скомбинирован с газовым хроматографом, называются хромато-масспектрометрами.
  - ✓ Комбинацию жидкостных хроматографов с масс-спектрометрами называют ЖХ/МС.

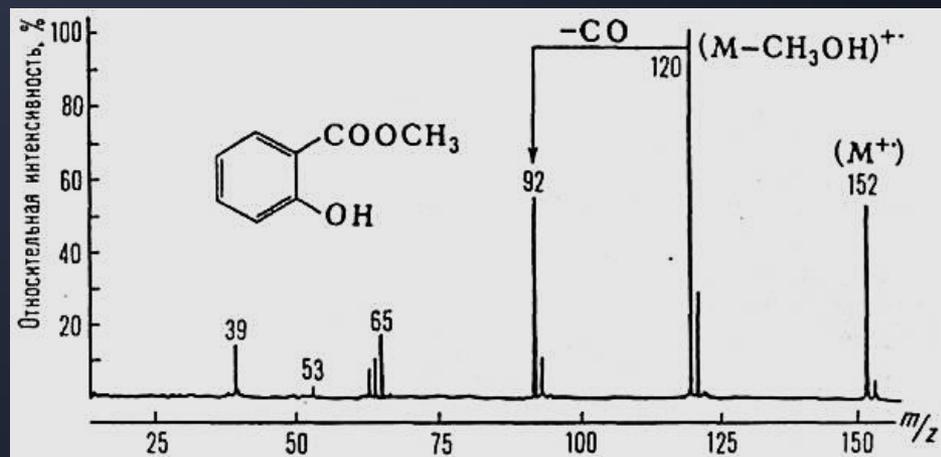
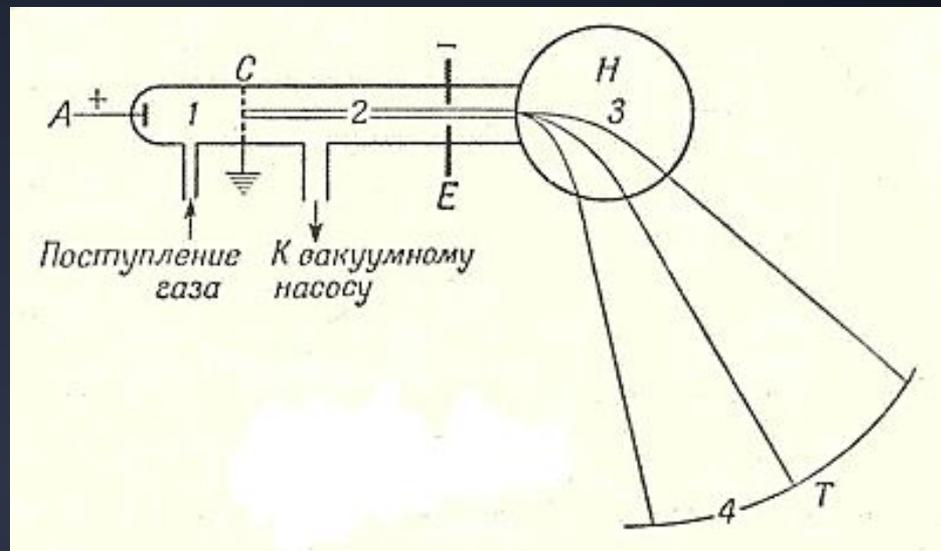
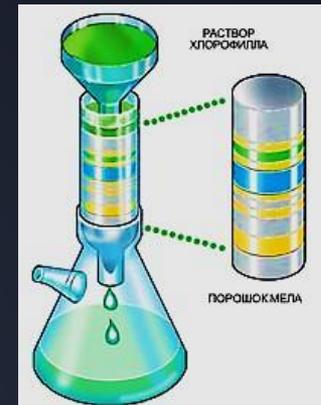


Рис. 1. Масс-спектр метилсалицилата.

# Хроматография

**Жидкостная хроматография — это хроматография, в которой подвижной фазой является жидкость. Жидкостная хроматография разделяется на:**

- ✓ **жидкостно-адсорбционную** (разделение соединений происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности адсорбента),
- ✓ **жидкостно-жидкостную, или распределительную** (разделение осуществляется за счет различной растворимости в подвижной фазе - элюенте и неподвижной фазе, физически сорбированной или химически привитой к поверхности твердого адсорбента),
- ✓ **ионообменную хроматографию**, где разделение достигается за счет обратимого взаимодействия анализируемых ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента - ионита. О
- ✓ особое место в использовании методов жидкостной хроматографии занимают **гель-хроматография и аффинная хроматография.**

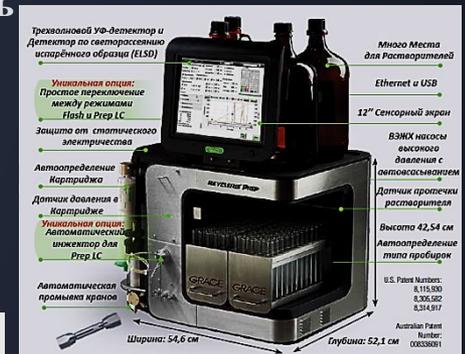
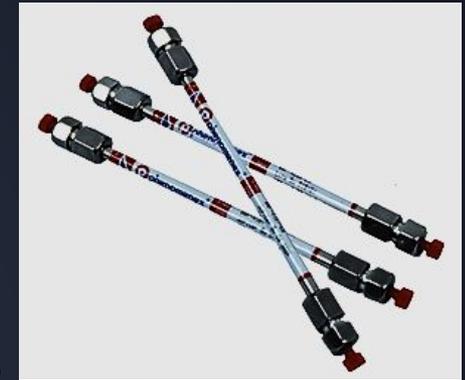
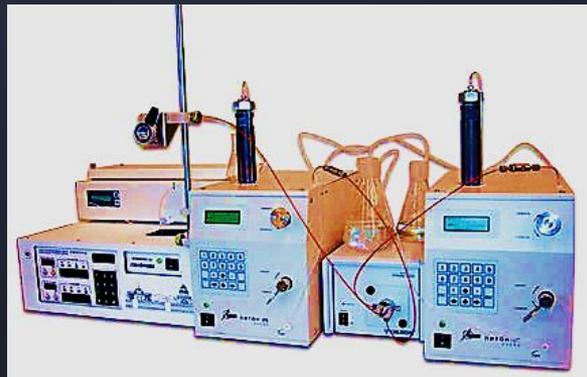


# Хроматография

## Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

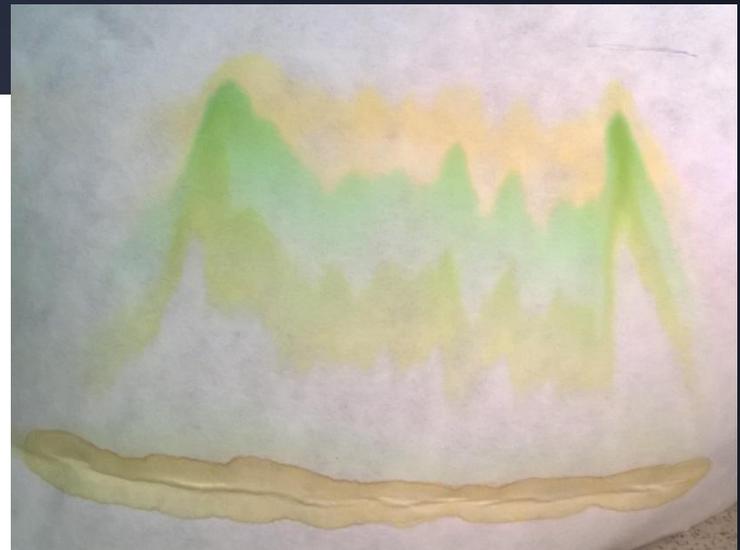
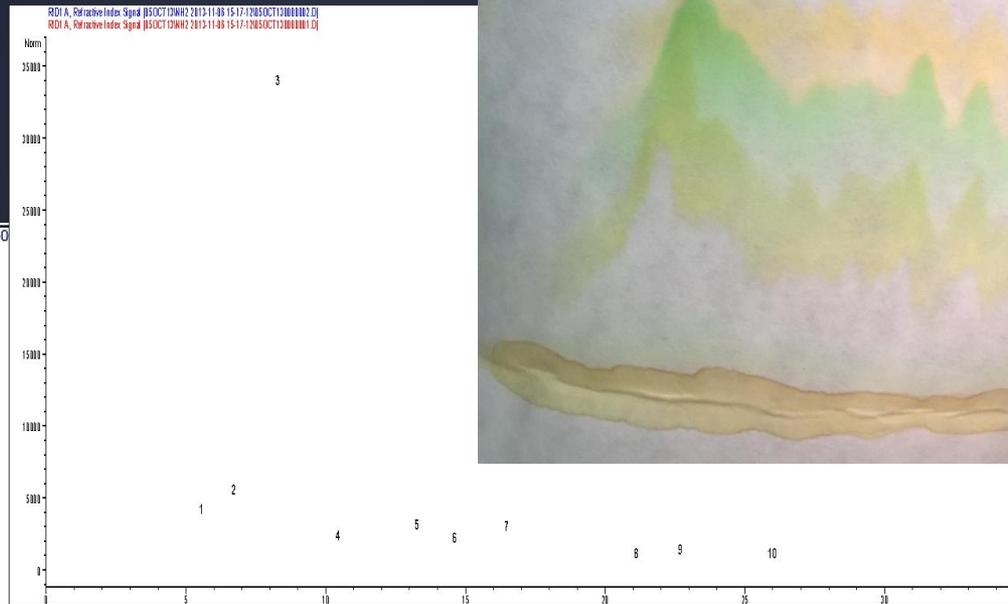
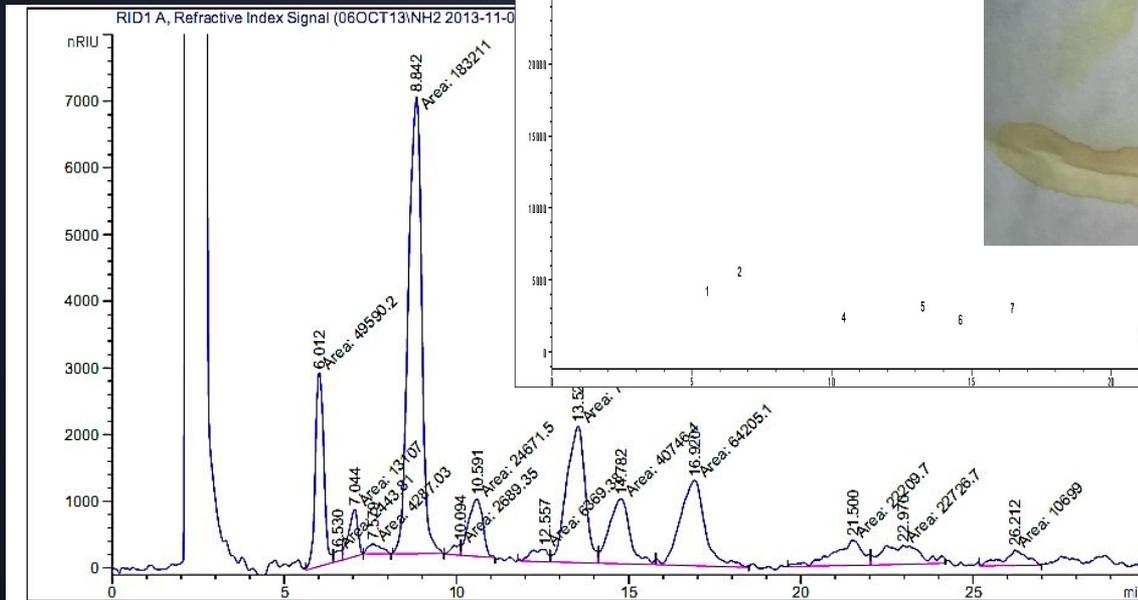
- ✓ Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование **высокого давления** (до **400 бар**) и **мелкозернистых сорбентов** (обычно **3—5 мкм**, сейчас до **1,8 мкм**).
- ✓ **Нормально-фазовая ВЭЖХ**: неподвижная фаза более полярна, чем подвижная.
- ✓ **Обращённо-фазовая ВЭЖХ** проводится с использованием неполярной неподвижной фазы и полярных (водных) элюентов. Неподвижная фаза – силикагель, поверхность которого модифицирована. Возможно увеличить время удерживания путём добавления воды в мобильную фазу, делая среду гидрофобного анализируемого вещества к гидрофобной стационарной фазе сильнее.
- ✓ **Детекторы для ВЭЖХ :**

Ультрафиолетовый  
Фотодиодно-матричный  
Флуориметрический  
Электрохимический  
Рефрактометрический  
Масс-селективный



# Хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) смеси сахаров. Наложение хроматограмм: образец **№1** (красная хроматограмма), образец **№1 +** добавка глюкозы (**2**) и сахарозы (**3**) (синяя хроматограмма)



# Методы меченых атомов

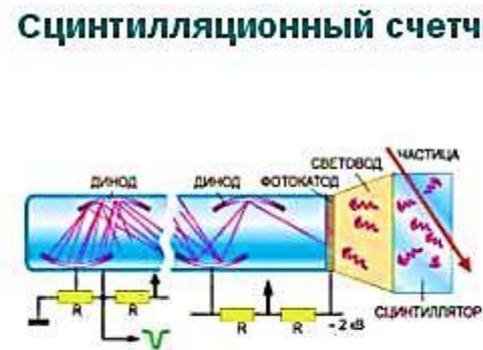
## Суть метода:

- ✓ Добавление к исследуемому веществу радиоактивного изотопа и улавливание его излучения.
- ✓ По химическим и многим физическим свойствам радиоактивный изотоп неотличим от устойчивых изотопов того же элемента.
- ✓ Радиоактивный изотоп может быть обнаружен с помощью специальных приборов благодаря своему излучению.
- ✓ Меченые атомы – радиоактивные или стабильные изотопы.
- ✓ Изотопы – атомы, имеющие одинаковый заряд ядра, но различную массу (т.е. отличаются числом нейтронов в ядре).
- ✓ В качестве меченых атомов могут быть использованы и стабильные изотопы.
- ✓ Для измерения относительной распространенности стабильных изотопов используют масс-спектрометр.

<i>Изотоп</i>	<i>Природное содержание</i>	<i>Тип излучения</i>	<i>Период полураспада</i>
$^1\text{H}$	99,98	-	-
$^2\text{H}$	$1,56 \cdot 10^{-2}$	-	-
$^3\text{H}$	-		12,3 лет
$^{13}\text{C}$	1,108	-	-
$^{14}\text{C}$	-		5730 лет
$^{15}\text{N}$	0,365	-	-
$^{18}\text{O}$	0,204	-	-
$^{32}\text{P}$	-		14,2 сут
$^{35}\text{S}$	-		87 сут
$^{36}\text{Cl}$	-		$3 \cdot 10^5$ лет
$^{42}\text{K}$	-	+	12,4 года
$^{60}\text{Co}$	-	+	5,22 лет
$^{55}\text{Fe}$	-	Рентгеновское излучение	4 года
$^{59}\text{Fe}$	-	+	45 сут
$^{131}\text{I}$	-	+	8 сут

# Методы меченых атомов

## Приборы для обнаружения элементарных частиц



**Процессы, происходящие во время взаимодействия между элементарными частицами и приборами их обнаружения**

Ведет к появлению ионов в газах, находящихся во внешнем электрическом поле

Вызывает возбуждение атомов

Ведет к появлению ионов в газах, пересыщенных паром (или в перегретой жидкости)

### Подтверждение регистрации частиц

Акустическая индикация разрядного столкновения через усилитель

Появление свечения в люминоформном слое

Образование следов (пузырьков пара) в перенасыщенном паре камеры

# Методы меченых атомов



Авторадиограмма распределения  $^{32}\text{P}$  в листьях помидора

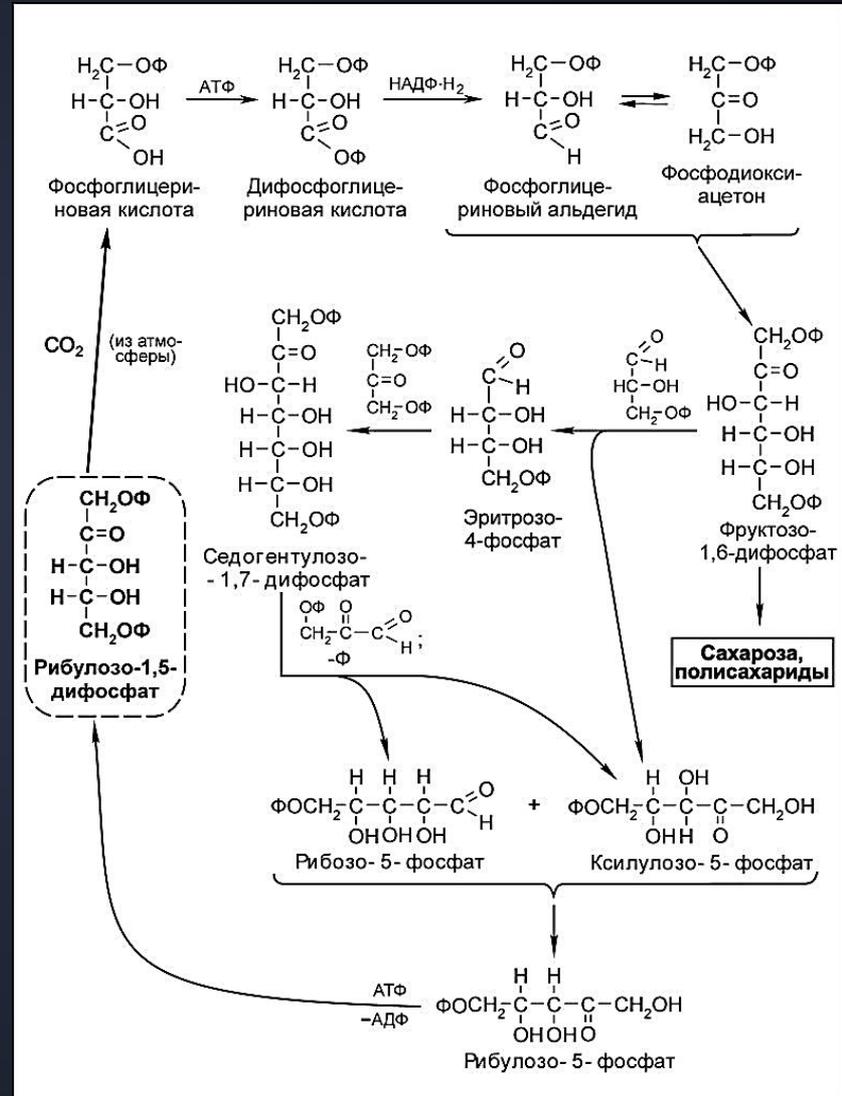
## Авторадиография

- ✓ Различные соединения распределяются по поверхности куска фильтровальной бумаги.
- ✓ Помещают срез ткани (или фильтровальную бумагу) на куске фотобумаги.
- ✓ Она будет засвечена излучением, а затем при проявлении позволит определить локализацию радиоактивных изотопов. Такой снимок называют радиоавтографом.

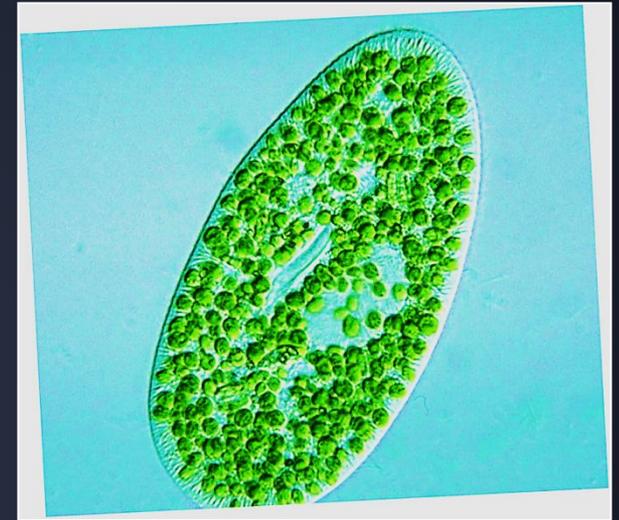
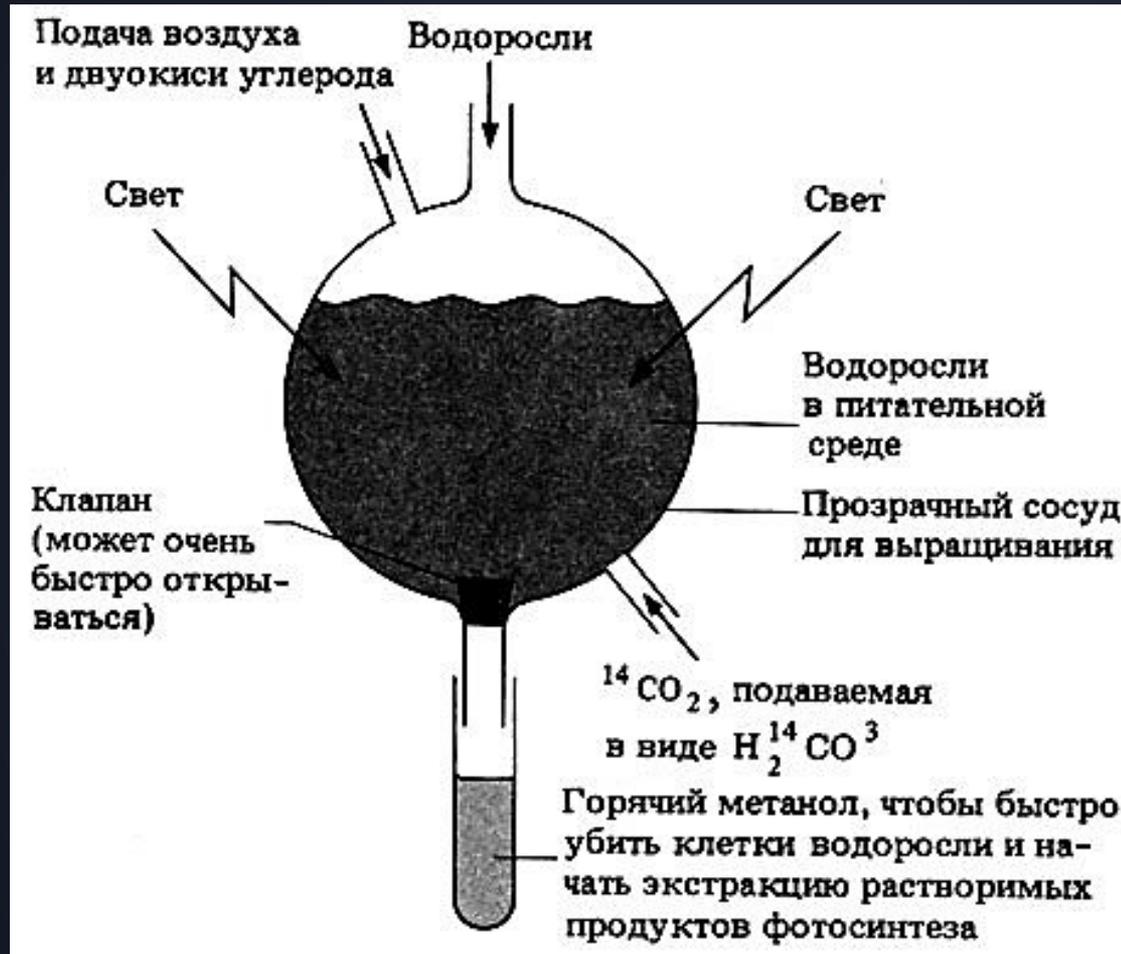
# Методы меченых атомов



- ✓ М. Кальвин выяснил сущность темновых реакций фотосинтеза с помощью метода меченых атомов.
- ✓ В **1961 г.** получил Нобелевскую премию за свои исследования.
- ✓ Использовал изотоп углерода  $^{14}\text{C}$ . Объект – хлорелла.



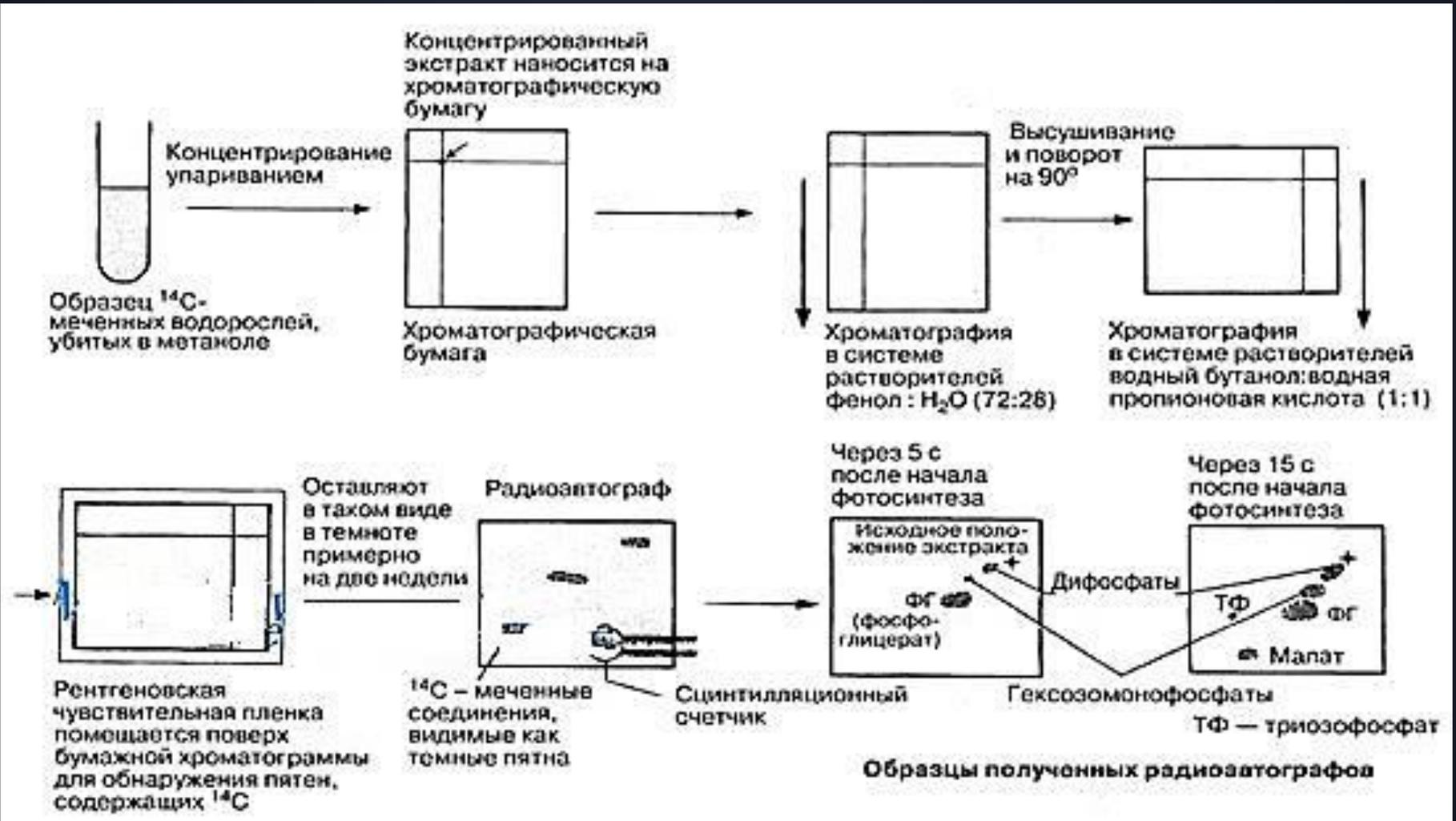
# Методы меченых атомов



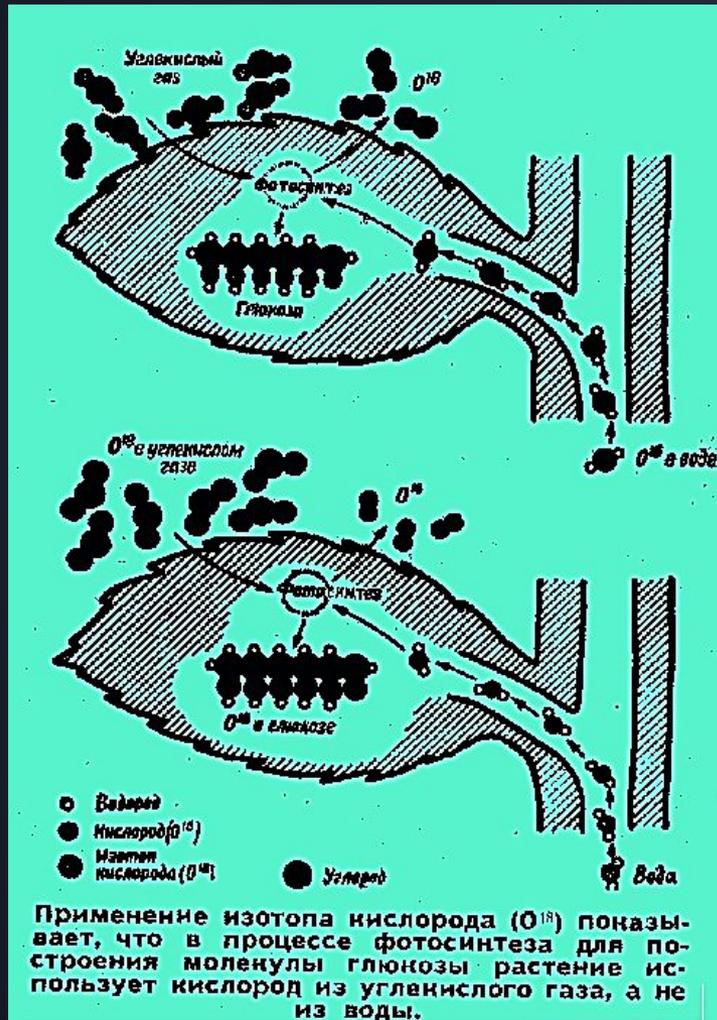
Аппарат Кальвина для введения изотопа углерода в суспензию водорослей

# Методы меченых атомов

Идентификация с помощью метода бумажной хроматографии



# Методы меченых атомов



- Применение изотопа кислорода  $^{18}O$
- **1941 г.** М. Камен и С. Рубен, американские химики, проводили исследования по выяснению происхождения кислорода растений (из воды или углекислого газа).
- **1960 г.** Академик Виноградов и его сотрудники Тейс и Кутюрин провели опыты и выяснили, что свободный кислород, выделяющийся при фотосинтезе, первоначально входил в состав воды.

# Методы меченых атомов в сельском хозяйстве



Чтобы выяснить, какое из фосфорных удобрений лучше усваивается растением, помечают различные удобрения радиоактивным фосфором  $^{32}\text{P}$ . Исследуя затем растения на радиоактивность, можно определить количество усвоенного ими фосфора из разных сортов удобрения.

Радиоселекция.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Обнинск

# Культура клеток растений и генная инженерия

- ✓ Исследование путей биосинтеза ценных органических соединений растительного происхождения.
- ✓ Синтез продуктов из тех растений, которые трудно выращивать.
- ✓ Синтез новых веществ с помощью модифицированных растений.
- ✓ Использование культуры клеток для биотрансформации веществ.
- ✓ Исследование биосинтетических процессов клетки, их метаболических путей и способов регуляции.



# Электрофорез