

Principles and Techniques of **BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY**

Edited by Keith Wilson and John Walker

Sixth edition



CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

Оглавление

<i>Предисловие редакторов перевода</i>	5
<i>Предисловие редакторов шестого издания</i>	7
<i>Авторы</i>	9
<i>Принятые сокращения</i>	11
Глава 1. Теоретические основы биохимического анализа	13
К. УИЛСОН (разд. 1.7 в соавторстве с Дж. Файффом)	
1.1. Общие понятия.....	13
1.2. Единицы измерения (размерности).....	15
1.3. Слабые электролиты.....	22
1.4. Буферные растворы — их природа и способы приготовления.....	27
1.5. рН-электрод и кислородный электрод	30
1.6. Количественный биохимический анализ.....	41
1.7. Основы клинического биохимического анализа	62
1.8. Техника безопасности в лаборатории.....	84
1.9. Дополнительная литература	86
Глава 2. Методы культивирования клеток	87
Э. БЕЙДОУН	
2.1. Введение	87
2.2. Лаборатория и оборудование для культивирования клеток	88
2.3. Техника безопасности при работе с культурой клеток	93
2.4. Методы стерилизации и правила работы с культурой клеток.....	94
2.5. Типы животных клеток. Характеристики клеток в культуре.....	98
2.6. Бактериальные клетки	111
2.7. Культуры растительных клеток	115
2.8. Применение клеточных культур.....	120
2.9. Дополнительная литература	121

Глава 3. Центрифугирование	122
К. ОЛЕНДИК	
3.1. Введение	122
3.2. Теоретические основы седиментации.....	123
3.3. Типы центрифуг. Правила работы и техника безопасности	128
3.4. Препаративное центрифугирование	137
3.5. Аналитическое центрифугирование.....	146
3.6. Дополнительная литература	151
Глава 4. Микроскопия	152
С. ПЭДДОК	
4.1. Введение	152
4.2. Световой микроскоп.....	155
4.3. Оптические срезы	168
4.4. Визуализация живых клеток и тканей	173
4.5. Стереомикроскоп.....	177
4.6. Электронный микроскоп.....	177
4.7. Получение изображений в биохимии	182
4.8. Специальные методы получения изображения.....	185
4.9. Сохранение изображений, их представление и другая информация	186
4.10. Дополнительная литература	187
Глава 5. Теоретические основы молекулярной биологии и биоинформатики. Методы	189
Р. РЕЙПЛЭЙ	
5.1. Введение	189
5.2. Структура нуклеиновых кислот	190
5.3. Гены и структура генома	197
5.4. Локализация и упаковка нуклеиновых кислот	201
5.5. Функции нуклеиновых кислот	203
5.6. Манипуляции с нуклеиновыми кислотами: основные инструменты и методы	215
5.7. Выделение и разделение нуклеиновых кислот.....	216
5.8. Молекулярная биология и биоинформатика.....	224
5.9. Молекулярный анализ последовательностей нуклеиновых кислот.....	226
5.10. Полимеразная цепная реакция	234
5.11. Определение первичной нуклеотидной последовательности ДНК (секвенирование)	244
5.12. Дополнительная литература	252
Глава 6. Рекомбинантная ДНК и генетический анализ	253
Р. РЕЙПЛЭЙ	
6.1. Введение	253
6.2. Библиотеки генов.....	254

6.3. Векторы для клонирования	264
6.4. Гибридизация и зонды	284
6.5. Скрининг геномных библиотек (клонотека)	286
6.6. Применение клонирования генов	290
6.7. Экспрессия чужеродных генов	296
6.8. Анализ генов и их экспрессии	302
6.9. Анализ целых геномов.....	317
6.10. Фармакогеномика.....	324
6.11. Молекулярная биотехнология и ее применение.....	324
6.12. Дополнительная литература	327
Глава 7. Иммунохимические методы.....	328
Р. ТОРП и С. ТОРП	
7.1. Введение	328
7.2. Получение антител	334
7.3. Очистка иммуноглобулинов и получение их фрагментов	346
7.4. Иммунопреципитация.....	353
7.5. Мечение антител.....	360
7.6. Иммуноблоттинг	368
7.7. Иммуноанализ.....	370
7.8. Иммуногистохимические и иммуноцитохимические методы.....	381
7.9. Аффинность и авидность.....	387
7.10. Поверхностный плазмонный резонанс в иммунохимии	388
7.11. Дополнительная литература	388
Глава 8. Структура белков. Функциональный анализ и методы очистки	390
ДЖ. УОЛКЕР	
8.1. Ионные свойства аминокислот и белков	390
8.2. Структурная организация белков.....	394
8.3. Очистка белков.....	398
8.4. Методы определения строения белка	421
8.5. Протеомика. Функции белка	437
8.6. Дополнительная литература	449
Глава 9. Методы масс-спектрометрии.....	450
Э. ЭЙТКЕН	
9.1. Введение	450
9.2. Ионизация	452
9.3. Масс-анализаторы	459
9.4. Детекторы.....	477
9.5. Получение структурной информации методом тандемной масс-спектрометрии.....	477
9.6. Анализ белковых комплексов	490
9.7. Обработка результатов. Анализ баз данных.....	494
9.8. Дополнительная литература	496

Глава 10. Методы электрофореза	498
ДЖ. УОЛКЕР	
10.1. Основы метода.....	498
10.2. Матрица.....	502
10.3. Электрофорез белков	507
10.4. Электрофорез нуклеиновых кислот	524
10.5. Капиллярный электрофорез	529
10.6. Электрофорез на микрочипах	535
10.7. Дополнительная литература	536
Глава 11. Хроматографические методы	537
К. УИЛСОН	
11.1. Теоретические основы хроматографии.....	537
11.2. Параметры хроматографического процесса	542
11.3. Жидкостная хроматография (LPLC и ВЭЖХ).....	553
11.4. Адсорбционная хроматография	570
11.5. Распределительная хроматография.....	574
11.6. Ионообменная хроматография	580
11.7. Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация)	585
11.8. Аффинная хроматография	589
11.9. Газожидкостная хроматография	596
11.10. Тонкослойная (планарная) хроматография	603
11.11. Выбор хроматографической системы.....	606
11.12. Дополнительная литература	607
Глава 12. Методы спектроскопии.	
I. Атомная и молекулярная спектроскопия	
Д. ГОРДОН	
12.1. Введение	608
12.2. Гамма-спектроскопия и гамма-резонансная спектроскопия.....	612
12.3. Рентгеновская спектроскопия	613
12.4. Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра	615
12.5. Спектрофлуориметрия	629
12.6. Метод кругового дихроизма	639
12.7. Турбидиметрия и нефелометрия	642
12.8. Люминометрия.....	643
12.9. Атомная спектроскопия.....	646
12.10. Лазеры	651
12.11. Дополнительная литература	652

Глава 13. Методы спектроскопии.	
II. Колебательная спектроскопия.	
Спектроскопия ЭПР и ЯМР	653
Д. ГОРДОН	
13.1. Введение	653
13.2. Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	654
13.3. Метод электронного парамагнитного резонанса.....	657
13.4. Метод ядерного магнитного резонанса	664
13.5. Дополнительная литература	681
Глава 14. Радиоизотопные методы	682
Р. СЛЕЙТЕР	
14.1. Природа радиоактивности.....	682
14.2. Методы детектирования и измерения радиоактивности	690
14.3. Другие практические аспекты измерения радиоактивности	715
14.4. Преимущества и ограничения экспериментов с радиоактивной меткой.....	720
14.5. Техника безопасности	721
14.6. Радиоизотопы в биологических исследованиях.....	724
14.7. Дополнительная литература	729
Глава 15. Ферменты	730
К. УИЛСОН	
15.1. Общая характеристика. Номенклатура	730
15.2. Методы изучения ферментативных реакций.....	734
15.3. Стационарная кинетика ферментативных реакций	747
15.4. Активные центры ферментов и механизмы катализа	771
15.5. Регуляция активности ферментов	778
15.6. Дополнительная литература	788
Глава 16. Мембранные рецепторы	789
К. УИЛСОН	
16.1. Роль рецепторов в передаче сигнала.....	789
16.2. Количественные аспекты связывания лигандов с рецепторами	790
16.3. Методы изучения лиганд-рецепторного взаимодействия	800
16.4. Структура рецепторов	819
16.5. Механизмы передачи сигнала	825
16.6. Десенсибилизация и перемещение рецепторов	838
16.7. Дополнительная литература	842

Предисловие редакторов перевода

Если обратиться к истории развития наук о «живой материи» (к этим наукам относятся и биохимия), очевидно, что выдающиеся открытия в этой области были сделаны только при переходе научных исследований на качественно новый уровень. Так, создание технологий рекомбинантных ДНК стало возможным после открытия эндонуклеаз рестрикции II типа, распознающих определенные специфические последовательности ДНК. После химического синтеза ДНК и РНК были разработаны различные методы анализа с ДНК- и РНК-зондами, нашедшие широкое применение в фундаментальных исследованиях, а также в медицине и криминалистике (например, ДНК-фингерпринтинг). Химический синтез целых генов позволяет не только избежать сложной процедуры клонирования, но и оптимизировать последовательности эукариотических генов для их экспрессии в бактериях. Накопление результатов химического и ферментативного секвенирования ДНК стало одной из предпосылок появления новой науки биоинформатики. В международных банках данных GeneBank и EMBL число белковых последовательностей, полученных путем трансляции ДНК, в десятки тысяч раз превосходит число аминокислотных последовательностей, полученных путем пептидного секвенирования. Без этого было бы просто невозможно определение нуклеотидных последовательностей геномов целых организмов, включая геном человека.

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

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

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

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

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

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

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

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

*А. В. Левашов,
В. И. Тишков*

Предисловие редакторов шестого издания

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

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

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

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

учных достижений и снабжены примерами, которые помогут студентам лучше разобраться в изложении теоретических основ и особенностей применения соответствующих методов.

Нам приятно представить читателю пять новых авторов: Элестер Эйткен (соавтор гл. 1 «Теоретические основы биохимического анализа»), Энвар Бейдоун (гл. 2 «Методы культивирования клеток»), Джон Файфф (соавтор гл. 1), Кэй Олендик (гл. 3 «Центрифугирование») и Стефен Пэддок (гл. 4 «Микроскопия»). Мы хотим выразить искреннюю благодарность всему авторскому коллективу за вклад в создание этого издания. С прискорбием вынуждены сообщить о безвременной кончине Дерека Гордона, автора двух глав по спектральным методам. Дерек был воодушевленным, преданным своему делу и очень уважаемым преподавателем биохимии, который всегда стремился объяснить студентам химические основы любого аналитического метода, который используется в биохимических исследованиях.

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

Джон Уолкер и Кейт Уилсон
Ноябрь 2004

АВТОРЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Принятые сокращения

Эти сокращения использованы в книге без расшифровки.

АДФ	аденозин-5'-дифосфат
АМФ	аденозин-5'-монофосфат
АТФ	аденозин-5'-трифосфат
ГТФ	гуанозинтрифосфат
ДДТ	2,2-бис-(4-хлорфенил)-1,1,1-трихлорэтан
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
т. п. н.	тысяча пар нуклеотидов
цАМФ	циклический АМФ
ЦТФ	цитидинтрифосфат
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
e^-	электрон
FAD	флавинадениндинуклеотид (окисленный)
FADH ₂	флавинадениндинуклеотид (восстановленный)
FMN	флавиномононуклеотид (окисленный)
FMNH ₂	флавиномононуклеотид (восстановленный)
Нерес	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
M_r	относительная молекулярная масса
NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)
NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
NADP ⁺	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленный)
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный)
Pipes	1,4-пиперазинбис(этансульфоновая кислота)

P _i	неорганический фосфат
ppm	части на миллион
ppb	части на миллиард
PP _i	неорганический пирофосфат
r.p.m.	число оборотов в минуту
SDS	додецилсульфат натрия
Tris	2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

Глава 1

Теоретические основы биохимического анализа

1.1 ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ

1.1.1 Задачи биохимического анализа

Задача биохимии — изучение химических процессов, происходящих в живых организмах. Биохимические исследования имеют целью выяснение молекулярных основ функционирования клетки. Поэтому при биохимических исследованиях изучаются:

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

Первые биохимические исследования были выполнены главным образом на таких простых бактериях и эукариотах, как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Neurospora crassa* и *Chlorella pyrenoidosa*. Накопление данных о природе клеточных компонентов и о механизмах контроля в этих организмах, а также осознание того, что существует определенная аналогия с многоклеточными организмами, — оба этих момента позволили использовать весь огромный мир живых организмов в качестве моделей при детальном биохимическом исследовании. Биохимики чаще работают с моделями *in vitro*, чем с целыми клетками или организмами, поскольку это гораздо проще как для постановки эксперимента, так и для интерпретации резуль-

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

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

1.1.2 Планирование биохимического эксперимента

Успехи биохимии, как и любой другой науки, основаны на тщательном планировании и исполнении эксперимента и анализе его результатов, для ответа на конкретный вопрос или подтверждения гипотезы. Планирование эксперимента подразумевает выполнение некоторого числа обязательных стадий:

- идентификация объекта изучения;
- критическая оценка современного состояния знаний («литературный обзор») по данному вопросу, в том числе плюсов и минусов принятой методологии, а также новых гипотез;
- формулировка вопроса или гипотезы, на изучение которых направлен эксперимент;
- тщательный выбор биологической системы (вид организма, *in vivo* или *in vitro*);
- идентификация искомой переменной; учет других факторов, которые необходимо контролировать для того, чтобы результат эксперимента определялся исключительно искомой переменной;
- дизайн эксперимента; обязательно — статистическая обработка результатов, оценка материалов и оборудования; техника безопасности;
- проведение эксперимента; построение необходимых градуировочных зависимостей и контроль регистрируемых результатов;
- воспроизведение эксперимента, если это необходимо для однозначной интерпретации результатов;
- анализ результатов, в том числе выбор подходящего статистического метода обработки данных;
- формулировка основных выводов, следующих из полученных данных;
- формулировка новых гипотез и будущих экспериментов, основанных на результатах исследования.

Во многих биохимических экспериментах выполняются одни и те же процедуры, в частности, бывает важно измерять и контролировать рН, температуру и содержание кислорода. Кроме того, в ходе биохимических ис-

следований приходится готовить растворы с известной концентрацией и изучать распределение с малыми объемами реагентов. В данной главе рассмотрены многие элементы эксперимента, необходимые как при его проведении, так и при анализе результатов.

1.2 ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ (РАЗМЕРНОСТИ)

1.2.1 Система СИ

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

Таблица 1.1. Система СИ. Основные и производные единицы

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

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

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

* При стандартной температуре и стандартном давлении

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

1.2.2 Растворы и способы выражения концентрации

Раствором называют гомогенную смесь одного или нескольких веществ с жидким компонентом (растворителем). Концентрация каждого растворенного вещества в растворе отражает его содержание в заданном количестве растворителя (по массе или по объему). Простейшим способом выражения концентрации является указание массы растворенного вещества в единице объема растворителя (w/v), объема в единице объема (v/v) или массы в единице массы (w/w). Кроме того, w/v, v/v и w/w можно представить в виде процентов, для чего соответствующие данные умножают на 100. 1%-й раствор хлорида натрия содержит 1 г NaCl в 100 г раствора. Реже концентрации растворов выражают относительно всего раствора в частях растворенного вещества на миллион (ppm) или в частях на миллиард (ppb). В таком случае единицами измерения могут быть граммы на миллион (миллиард) граммов или см³ на миллион (миллиард) см³. Так, если в воздухе содержится ~8 ppm оксида углерода CO, то имеется в виду объемное

Таблица 1.3. Приставки, используемые в размерностях

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

Таблица 1.4. Связь внесистемных единиц объема с единицами СИ

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

содержание. Если единицы ppm применяют для выражения концентрации водного раствора, 1 г воды считают эквивалентным 1 см³. Следовательно, 8 ppm означает 8 г вещества в 1000 дм³ раствора, 8 мг в 1 дм³, 8 мкг в 1 см³ или 8 нг в 1 мм³ (см. табл. 1.4).

Молярность

В системе СИ количество любого вещества измеряется в **молях**. 1 моль — это количество вещества, содержащее $6,022 \cdot 10^{23}$ молекул (число Авогадро). В общем случае 1 моль — количество вещества, в котором число частиц равно числу Авогадро. Таким образом, можно говорить о моле молекул, атомов, ионов и даже электронов. Для практических расчетов важно знать, что 1 моль любого вещества равен его **молекулярной массе**, выраженной в граммах, а молекулярная масса — сумма масс атомов в составе молекулы. Обратите внимание, что принято употреблять термин «молекулярная масса», а не устаревший термин «молекулярный вес». В СИ концентрацию вещества выражают в молях в кубическом метре (моль/м³) (см. табл. 1.1). Для лабораторной практики эти значения слишком велики, поэтому обычно концентрацию выражают в молях в кубическом дециметре (1 дм³ = 10^{-3} м). В некоторых учебниках и журналах, особенно в тех, что выходят в США, по-прежнему приняты устаревшие единицы — литр (л) и его производные (см. табл. 1.4). В данной книге объем выражен

в кубических дециметрах или в их долях (табл. 1.4). **Молярность** раствора отражает число молей вещества в 1 дм³ раствора. Молярность обозначают символом М, но поскольку в СИ заглавная буква М означает также приставку «мега», то для молярности рекомендуют использовать выражение моль/дм³. Несмотря на это во многих учебниках и журнальных статьях молярность продолжают обозначать как М; мы в данной книге придерживаемся такого же способа обозначения.

Атомные и молекулярные массы измеряются в **дальтонах** (Да) или **килодальтонах** (кДа). Один дальтон соответствует $1/_{12}$ массы изотопа углерода-12 (¹²C). Однако биохимики предпочитают пользоваться **относительной молекулярной массой** (M_r), которая, по определению, равна отношению молекулярной массы вещества к $1/_{12}$ массы изотопа ¹²C. Следовательно, M_r — величина безразмерная. Так, относительная молекулярная масса хлорида натрия составляет 23 (Na) + 35,5 (Cl) = 58,5; 1 моль NaCl = 58,5 г. Если такое количество хлорида натрия растворить в воде и довести объем раствора до 1 дм³, получим одномолярный (1 М) раствор.

В биологических системах вещество чаще всего присутствует в небольших концентрациях, да и объемы растворов, используемых в эксперименте *in vitro*, обычно невелики. Поэтому концентрации рабочих растворов обычно выражают не в молях, а в ммоль/дм³, мкмоль/дм³ или нмоль/дм³ (табл. 1.5).

ПРИМЕР 1 РАСЧЕТ МОЛЯРНОСТИ РАСТВОРА

Вопрос 1 Как приготовить 250 см³ 0,1 М раствора глюкозы?

Ответ Формула глюкозы C₆H₁₂O₆, поэтому ее молекулярная масса составляет (6·12) + (12·1) + (6·16) = 180 Да. При растворении 180 г глюкозы в 1 дм³ воды получается 1 М раствор, следовательно, при растворении 18 г в 1 дм³ получается 0,1 М раствор. Таким образом, для приготовления 250 см³ 0,1 М раствора нужно растворить в воде 4,5 г глюкозы и в мерной колбе довести объем раствора до 250 см³.

Вопрос 2 Как приготовить 10 см³ 0,01 М раствора глюкозы из 0,1 М запасного раствора?

Ответ Применим следующую формулу: $M_1V_1 = M_2V_2$, где $M_1 = 0,1$, V_1 неизвестен, $M_2 = 0,01$, $V_2 = 10$ см³. Таким образом, $0,1V_1 = 0,01 \cdot 10$, откуда $V_1 = 1,0$ см³. Итак, для получения требуемого раствора необходимо отобрать 1,0 см³ запасного раствора (для большей точности используйте подходящую автоматическую пипетку) и в мерной посуде довести объем до 10 см³.

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

Ответ Раствор с концентрацией 20 ppm содержит 20 г вещества в 1·10⁶ г или 20 мг в 1 кг. Если считать, что плотность раствора равна 1 г/см³, это соответствует концентрации 20 мг/дм³. Отсюда молярность раствора глюкозы составляет $20 \cdot 10^{-3} / 180$ М, т. е. $0,11 \cdot 10^{-3}$ М или 0,11 мМ.

Вопрос 4 Какова молярность чистой воды?

Ответ Молекулярная масса воды 2 + 16 = 18 Да. Следовательно, 1 дм³ воды (1000 г при плотности 1 г/см³) содержит $1000/18 = 55,6$ М.

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

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

Разведение*

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

1.2.3 Концентрация или активность?

Диссоциация электролитов в растворах. Ионная сила раствора

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

* Приготовление раствора путем разбавления более концентрированного раствора.

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

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \dots + c_n z_n^2) = \frac{1}{2} \sum c z^2 \quad (1.1)$$

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

В отличие от солей типа NaCl и KNO_3 , построенных из однозарядных ионов, степень диссоциации солей типа MgSO_4 , содержащих двухзарядные ионы, меньше из-за образования ионных пар. В водном растворе противоположно заряженные ионы притягиваются друг к другу, могут образовывать достаточно прочно связанные пары, которые ведут себя как одна частица. Так, в 0,25 М растворе MgSO_4 только 65% этого вещества представлено ионами магния и сульфата, а 35% существуют как ионные пары. Из-за образования ионных пар расчет ионной силы растворов таких солей усложняется.

В водных растворах анионы и катионы окружены оболочкой из молекул растворителя и противоположно заряженных ионов. В молекуле воды связь $\text{O}-\text{H}$ полярная и на каждом атоме водорода сосредоточен заряд δ^+ , а на атоме кислорода — заряд $2\delta^-$. Ионная оболочка несет заряд, который по знаку противоположен заряду центрального иона и несколько меньше его по величине. Наличие ионной оболочки приводит к снижению эффективного заряда центрального иона и, следовательно, уменьшает притяжение к противоположно заряженным ионам. Данный эффект усиливается при повышении ионной силы раствора, что лежит в основе метода осаждения белков высаливанием (разд. 8.3.4).

Пример 2 РАСЧЕТ ИОННОЙ СИЛЫ

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

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

1) Найдем $c z^2$ для каждого иона:

$$\text{Na}^+ = 0,1 \cdot (+1)^2 = 0,1 \text{ М}$$

$$\text{Cl}^- = 0,1 \cdot (-1)^2 = 0,1 \text{ М}$$

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

2) Проведем аналогичный расчет:

$$\text{Na}^+ = 0,1 \cdot (+1)^2 + 0,02 \cdot (+1)^2 = 0,12 \text{ М}$$

$$\text{Cl}^- = 0,1 \cdot (-1)^2 = 0,10 \text{ М}$$

$$\text{K}^+ = 0,05 \cdot (+1)^2 = 0,05 \text{ М}$$

$$\text{NO}_3^- = 0,05 \cdot (-1)^2 = 0,05 \text{ М}$$

$$\text{SO}_4^{2-} = 0,01 \cdot (-2)^2 = 0,04 \text{ М}$$

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

Замечание 1: единица измерения ионной силы — М (т. е. моль/л).

Замечание 2: для Na_2SO_4 $c = 0,02$, поскольку при диссоциации Na_2SO_4 образуется 2Na^+ .

Замечание 3: для 1 М раствора электролита типа 1:1 (NaCl) ионная сила равна 1 М, для электролита 2:1 (MgCl_2) — 3 М, для электролита 2:2 (MgSO_4) — 4 М, а для электролита 3:1 (FeCl_3) — 6 М.

Замечание 4: по мере повышения концентрации и ионной силы погрешность подобных расчетов постоянно возрастает, так что становится необходимым учитывать коэффициент активности.

Активность и коэффициент активности

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

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

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

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

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

1.3 СЛАБЫЕ ЭЛЕКТРОЛИТЫ

1.3.1 Слабые электролиты в биохимии

Многие молекулы, играющие важную роль в биохимических процессах, являются слабыми электролитами, т. е. кислотами или основаниями, которые в водных растворах ионизированы лишь частично. В качестве примеров можно назвать аминокислоты, пептиды, белки, нуклеозиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты. Активность этих молекул зависит от их состояния ионизации при рН внутри клетки (или же в межклеточном пространстве). Например, активные центры ферментов содержат функциональные группы — карбоксильные и аминогруппы боковых цепей аминокислот, из которых построены молекулы данного белка. Для осуществления каталитической функции функциональные группы ферментов должны находиться в определенном состоянии ионизации. Но прежде чем перейти к детальному рассмотрению ионизации (диссоциации) сложных молекул, следует остановиться на диссоциации воды.

1.3.2 Диссоциация слабых кислот и оснований

Диссоциация воды

Вода — один из самых важных слабых электролитов. Степень диссоциации воды незначительна, в чистой воде присутствует очень небольшое количество ионов водорода и ионов гидроксила. На самом деле свободный ион водорода (протон) в водном растворе вообще не существует, поскольку он присутствует в виде иона гидроксония (H_3O^+):



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

В науках о живой материи в последние десятилетия сделаны по-настоящему революционные открытия, что внесло концептуальные изменения в профессиональное образование.

Эта книга широко используется за рубежом как учебник по современным методам биохимии и молекулярной биологии.

Здесь читатель найдет описание «маршрутов» получения новых знаний в практической биохимии.

В учебнике на высоком профессиональном уровне изложены практические приемы работы в биохимической лаборатории, в том числе с культурами клеток, а также теоретические основы следующих физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования:

- центрифугирование
- микроскопия
- электрофорез
- масс-спектроскопия
- методы выделения и очистки клеточных компонентов, нуклеиновых кислот и белков
- хроматографические методы
- спектральные методы
- иммунохимический анализ
- радиоизотопный анализ
- методы биоинформатики
- технология рекомбинантной ДНК и генетический анализ.

Для студентов вузов, преподавателей и специалистов (биохимиков, молекулярных биологов, химиков и биофизиков, а также фармакологов и медиков).