

**Хроматография** (от др.-греч. χρῶμα — «цвет») — метод разделения и анализа смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ. Основан на распределении веществ между двумя фазами — неподвижной (твёрдая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе) и подвижной (газовая или жидкая фаза, элюент). Метод был предложен в 1903 г. Михаилом Семеновичем Цветом - выдающимся русским исследователем. Первоначально свой метод М.С. Цвет назвал адсорбционным анализом (1903) и лишь через три года - хроматографическим методом (1906).

Более 60 процентов химических исследований во всем мире проводится с помощью различных видов хроматографии. Современные хроматографы способны разделить и идентифицировать несколько сотен соединений за один анализ. Некоторые хроматографические детекторы могут определять количество вещества в масштабе ppb. Благодаря этим преимуществам, хроматография в настоящее время широко используется в Криминалистика: анализ образцов, полученных с мест преступления Мониторинг загрязнений: для обнаружения небольших концентраций опасных загрязнителей в воздухе и воде. Медицинская сфера: в процессе производства и контроле качества биологических и фармацевтических продуктов. Пищевая промышленность: обнаружение порчи в пищевых продуктах, определение качества продуктов питания, а также контроле пищевых добавок. Юридические действия: определить наличие алкоголя в крови и кокаина в моче. Радиохимия: для характеристики радиоактивно меченных соединений и определения радиохимической чистоты. Помимо этого, хроматография также используется для расшифровки ДНК и в биоинформатике, клинической диагностике заболеваний и расстройств, а также в различных исследовательских целях.

**Электрофорез** (от электро- + др.-греч. φορέω «переношу») — это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые было открыто профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году.

Электрофорез применяют в лечебных целях в физиотерапии. В химической промышленности он используется для осаждения дымов и туманов, для изучения состава растворов и др. Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии, биохимии и молекулярной биологии. Одним из методов для подтверждения подлинности анализируемого белка и наличия белковых примесей в исследуемом образце является электрофоретическое исследование. Электрофорез занимает центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

В биохимии и молекулярной биологии электрофорез используется для разделения макромолекул — белков и нуклеиновых кислот (а также их фрагментов). Различают множество разновидностей этого метода (см. статью Электрофорез белков). Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества и используется в биохимии, молекулярной биологии,

клинической диагностике, популяционной биологии (для изучения генетической изменчивости) и др.

**Метод дифференциального центрифугирования** основан на разной скорости осаждения (седиментации) отдельных частиц под действием центробежной силы и используется для разделения внутриклеточных структур. Коэффициент седиментации ( $S$ ) определяется скоростью движения макромолекул в поле с ускорением, равным  $1$ , измеряется в единицах, называемых СВЕДБЕРГАМИ. Для определения  $S$  используется центрифугирование при высокой скорости (30 000–60 000 об./мин). Исследуемый материал предварительно измельчают в гомогенизаторе. При скоростной седиментации используется среда одинаковой плотности. Компоненты клетки, вначале равномерно распределенные по всему объему пробирки, при центрифугировании оседают каждый со своей скоростью. В результате, содержимое пробирки разделяется на фракции (слои), из которых нижняя представлена самыми тяжелыми структурами, а верхняя — самыми легкими (рис. 5).

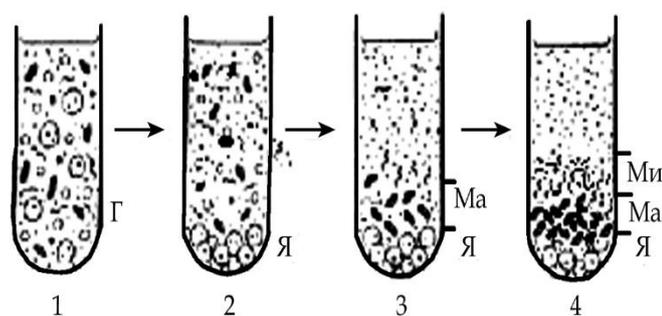


Рис. 5. Схема дифференциального центрифугирования: Г — гомогенат; Я — ядерная фракция; Ма — макросомальная фракция (митохондрии, лизосомы); Ми — микросомальная фракция (фрагменты мембран, микропузырьки, рибосомы)

Дифференциальное центрифугирование — это метод, используемый для разделения различных компонентов смеси в зависимости от их размера, формы и плотности. Он включает в себя вращение смеси на высоких скоростях с помощью центрифуги, которая создает центробежную силу, разделяющую компоненты смеси на основе их физических характеристик.

Некоторые распространенные применения дифференциального центрифугирования включают:

**Выделение клеток и органелл из тканей:** Дифференциальное центрифугирование можно использовать для отделения клеток от тканей или для выделения определенных органелл (таких как ядра или митохондрии) из клеток.

**Очищающие белки:** Дифференциальное центрифугирование можно использовать для разделения белков в зависимости от их размера и формы, что позволяет исследователям очищать определенные белки для дальнейшего изучения.

**Разделение вирусов и бактерий:** Дифференциальное центрифугирование можно использовать для отделения вирусов и бактерий от других компонентов смеси, таких как клетки или ткани.

**Анализ состава образцов:** Дифференциальное центрифугирование можно использовать для анализа состава образца, например, типов и пропорций различных типов клеток или присутствующих органелл.

В целом дифференциальное центрифугирование является широко используемым методом в различных областях, включая биологию, биохимию и медицину, и имеет множество важных применений в исследованиях и анализе.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (а именно ДНК) в биологическом материале (пробе).

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК) и широко используется в биологической и медицинской практике, например, для диагностики заболеваний (наследственных, инфекционных), для установления отцовства, для клонирования генов, выделения новых генов.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20—40 тысяч пар нуклеотидов.

#### Применение ПЦР

ПЦР используется во многих областях для проведения анализов и в научных экспериментах.

#### Криминалистика

ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, сперма, волосы и т. п. 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 электрофореза ДНК. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (*genetic fingerprint*).

#### Установление отцовства

Хотя «генетические отпечатки пальцев» уникальны, родственные связи всё же можно установить, сделав несколько таких отпечатков.[≡] Тот же метод можно применить, слегка модифицировав его, для установления эволюционного родства среди организмов.

#### Медицинская диагностика

ПЦР даёт 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. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы (в зависимости от величины инкубационного периода) до того, как проявятся симптомы заболевания.

#### Персонализированная медицина

Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых 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 определённый цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее активен.

#### Клонирование генов

Клонирование генов (не путать с клонированием организмов) — это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных 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.