

2000

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 41
бр. 6

YU ISSN04406826

UDC 54.001.93



**ХЕМИЈСКИ
ПРЕГЛЕД**

српско
хемијско
друштво

2000



www.shd.org.yu/hp.htm

српско хемијско друштво

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД



Годиште 41.

број 6

Издаје

СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК

Станислав Р. Арсенијевић

**ЗАМЕНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ
УРЕДНИКА**

Ратко М. Јанков

Издавање часописа „ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД“ помажу: Технолошко-металуршки факултет, Хемијски факултет и Факултет за физичку хемију у Београду.

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Никола Благојевић, Драгомир Виторовић, Иван Гутман, Иван Драганић, Војислав Илић, Јован Јовановић, Славко Нешић, Владимир Павловић, Владимир Рекалић, Слободан Рибникар, Момчило Ристић (председник), Љубиша Ристовић, Миленко Ђелап, Живорад Чековић, Миленко Шушић.

Годишња претплата за студенте и ученике који нису чланови СХД 50 дин, за појединце који нису чланови СХД 100 дин, за радне организације 250 дин., за иностранство 30 US \$. Претплату прима Српско хемијско друштво, Београд, Карнегијева 4/III. Жиро рачун 40803-678-0-5738.

Web site: www.shd.org.yu/hp.htm

e-mail: hempred@chem.bg.ac.yu

Припрема за штампу: Јелена и Зоран Димић,
Светозара Марковића 2, 11000 Београд

Штампа: Завод за графичку технику Технолошко-металуршког факултета Београд, Карнегијева 4

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Славица Стевановић, Примена мембранских техника у методама хемијске анализе, I део: Развијене технике	122
Данко Обрадовић, Реакција полимеризације ланца (ПЦР)	128
ВЕСТИ ИЗ СХД	143
БЕЛЕШКЕ	
Хемијска читанка	141

CHEMICAL REVIEW

Volume 41

NUMBER 6

Editor in chief

STANIMIR R. ARSENIJEVIĆ

Deputy Editor in chief

RATKO M. JANKOV

SERBIAN CHEMICAL SOCIETY

Karnegijeva 4

Belgrade/Yugoslavia

CONTENTS

ARTICLES

Slavica Stevanović, Analytical Application of Membrane Techniques, Part I: Developed Techniques ----- 122

Danko Obradović, Polymerase Chain Reaction 128

NEWS FROM SCS ----- 143

NOTE ----- 141

ХИМИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Том 41

№ 6

Ответственный редактор

СТАНИМИР Р. АРСЕНИЕВИЧ

Заместитель ответственного редактора

РАТКО М. ЈАНКОВ

СЕРБСКОЕ ХИМИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

Карнегиева 4

Белград/Югославия

СОДЕРЖАНИЕ

СТАТЬИ

Славица Стеванович, Применение мембранных техник в методах химического анализа, I часть: разработанные техники ----- 122

Данко Обрадович, Реакция полимеризации цепи ----- 128

НОВОСТИ ИЗ СХО ----- 143

ЗАМЕТКИ ----- 141



УВОДНИК

Стигосмо и до шестог броја у овом годишту. То констатујемо како бисмо истакли да смо успели у настојањима да *Хемијски њрељед* излази редовно, без двоброја, односно по 6 бројева годишње. Тако нешто обећали смо у Уводнику броја 1 из овог (41.) годишта, а ево, на крају године, саопштавамо да смо обећање испунили. Морамо да признамо да нам бројеви нису баш излазили у темпу који смо прижељкивали, односно како смо планирали (бр. 1 за фебруар, а затим, редом: април, јуни, септембар, новембар и децембар), али смо сигурни да ћемо, наредне године, постићи и шест засебних бројева и регуларност излажења. О свим проблемима које смо имали у вези са финансирањем излажења током ове године овом приликом нећемо. Важно је да смо успели да редовно излазимо

Да ли се повећао број претплатника? чланова?

* *
*

На овом месту и у ово време требало би да се подсетимо да је година на истеку, а тиме и Ваша чланарина за Српско хемијско друштво, као и Ваша претплата на *Хемијски њрељед*. Овај мали пасус у Уводнику треба да послужи и као подсетник да што пре намирите чланарину на 2001. годину, а тиме и да обезбедите свој лични примерак *Хемијског њрељеда*. Помиње се да би чланарина за 2001. годину требало да буде 300 динара, али ће коначна одлука о томе бити донета на састанку Управног одбора Друштва.

* *
*

40. Саветовање Српског хемијског друштва одржаће се 18. и 19. јануара 2001. године у Новом Саду. На седници Председништва СХД донета је одлука да висина котизације за чланове СХД за ову манифестацију буде 500 динара, а за не-чланове 600 динара. (Верица – за Вести из СХД.)

* *
*

Хемијски прегледима неки свој устаљен изглед, али се труди да буде флексибилан и да не робује сопственој форми. У овом броју појављују само два обимна, али по нашем мишљењу веома интересан-

тна и актуелна чланка који већ подуже чекају да буду одштампани. Због овога у овом броју нема рубрике Вести из школа, вести за школе. Међутим, већ у следећем броју појавиће се други део чланка о Знању хемије на пријемном испиту на Хемијском факултету у Београду, од Драгице Шишовић, који вероватно ишчекујете.

* *
*

Рубрика Дискусиони форум по својој природи је повремена, када има потребе да се сучеле различита гледишта на струковно релевантне теме.

На текст проф. Чековића, који је покренуо много актуелних и важних проблема око хемије као струке није било писаних коментара. То нас чуди, јер време кроз које тренутно (а и мало дуже) пролазимо није време у коме свако може да живи (само) мирно радећи посао за који се школовао.

* *
*

И ове године, као и у протеклих 8 година, у новембру месецу требало је да се одржи Свечана годишња седница Српског хемијског друштва. Она ће бити одржана 7. децембра. У Вестима из СХД наћи ћете неке од података о овој манифестацији.

* *
*

Почетком јесени 2000. године СХД постало је један од суорганизатора у креирању будућег Центра за развој идеја активног учења у настави хемије. У иницирању и стварању оваквог центра, сем СХД-а, учествују још: УНИЦЕФ- Канцеларија у Београду, Институт за психологију Филозофског факултета у Београду и Хемијски факултет Универзитета у Београду.

* *
*

У неким од наредних бројева Хемијског прегледа обезбедићемо више података о овој активности.

Редакција ХП



ЧЛАНЦИ

СЛАВИЦА СТЕВАНОВИЋ, Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду, Карнегијева 4, Београд, Југославија

ПРИМЕНА МЕМБРАНСКИХ ТЕХНИКА У МЕТОДАМА ХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ I ДЕО: РАЗВИЈЕНЕ ТЕХНИКЕ

УВОД

У раду је дат преглед развијених и потенцијалних мембранских метода које се примењују у аналитичкој хемији, са посебним нагласком на примени методе мембранске екстракције и мембранске адсорпције за концентрисање и одређивање анализита из веома разблажених раствора.

У првом делу рада описане су развијене мембранске технике за одвајање анализита из сложене основе (матрице) непогодне за анализу и концентрисање анализита из веома разблажених раствора.

С обзиром да су процеси одвајања недељиви део квалитативне и квантитативне хемијске анализе, логична последица брзог развоја мембранских сепарационих техника је њихова све чешћа примена у аналитичкој хемији.

Примена мембранских метода у аналитичкој хемији може се сагледати у два правца:

1. Један од могућих је развој мембранских метода за издвајање чисте компоненте из сложене матрице непогодне за анализу, у облику погодном за мерења концентрације дате компоненте, било директно или након одговарајуће припреме (мембранска дестилација, первапорација, дијализа, мембранска екстракција и пертракција). Вишеструки мембрански контактори могу успешно да се примене за симултано раздвајање два или више анализита из њихових смеша.

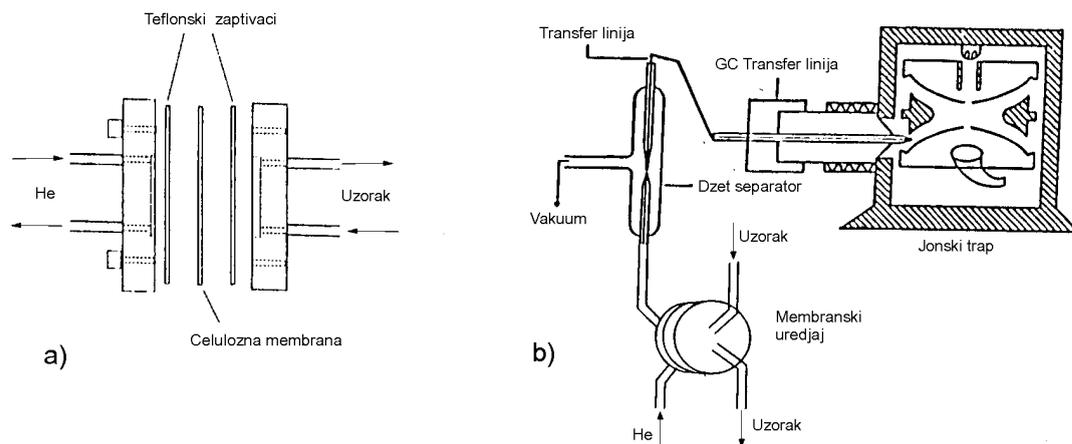
2. Друга могућност је развој мембранских процеса за концентрисање веома разблажених раствора испитиваног раствора (јоно-измењивачке мембране, мембранска екстракција и пертракција, мембранска апсорпција и персорпција, мембранска адсорпција итд.).

ОДВАЈАЊЕ АНАЛИТА

У првом случају, дакле када је у питању одвајање анализита, истраживања су најчешће рађена у циљу развоја сензора који функционишу на бази селективног транспорта анализита кроз мембрану до одго-

варајућег детектора. 1930. године Маклнес (MacInnes) је први пут практично применио данас незаменљиву **стаклену електроду** за директна рН-метријска односно потенциометријска мерења¹. Појава стаклене електроде, која представља селективну мембрану пропустљиву практично само за H_3O^+ јоне, покренула је развој мембранских јон-селективних електрода за разне јоне². Тако данас имамо неколико типова **електрода са чврстом мембраном**, као и неколико типова **електрода са течном мембраном**^{3,4}.

Следећа примена мембранских техника у аналитици вредна помена је свакако ПЕРМС метода, односно пермеабилна мембранска масена спектрометрија. Овде пропустљива мембрана служи за селективно узорковање компонената смеше која се анализира масеним спектрометром. Раздвајање компонената приликом узорковања одвија се услед различите брзине проласка компонената кроз мембрану, а као последица различитих вредности коефицијентна расподеле компонената у мембранској фази⁵⁻⁷. Развоју ПЕРМС методе претходила је примена мембрана, најчешће силиконских, за повезивање масеног спектрометра са гасним хроматографом који је раздвајао компоненте смеше ради њихове идентификације. Другим речима, гасне компоненте неке гасне смеше или испарљиве компоненте неке течне смеше најпре су раздвајане техником гасне хроматографије, а затим су, тако раздвојене, пропуштане кроз мембрану у вакум систем масеног спектрометра ради идентификације. Мембрана је служила искључиво за концентрисање компонената до количине неопходне за идентификацију^{8,9}. Убрзо затим је уследио развој мембранских уређаја за раздвајање и селективно узорковање компонената смеше, што је довело до елиминисања потребе за гасним хроматографом. Тако је настала МИМС техника (Membrane Introduction Mass Spectrometry)¹⁰. Погодном хемијском модификацијом материјала за израду мембрана које се користе у МИМС техници могуће



Слика 1. а) Шема мембранског уређаја који се користи у подеоној МИМС методи
 б) Конфигурација система за мерење подеоном МИМС методом

је остварити висок степен селективности узорковања компонената смеше. По аналогији са подеоном хроматографијом, ова нова метода је добила назив подеона МИМС метода. На слици 1 приказана је шема мембранског уређаја који се користи у подеоној МИМС методи¹¹.

Чен Ксу (Chen Xu) и сарадници су врло успешно применили овај уређај за одређивање веома малих концентрација бензалдехида у води ($10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$). Они су у мембранском уређају (слика 1.а) инсталирали алкиламин-модификовану целулозну мембрану коју су изложили дејству $0,01 \text{ M}$ раствора КОН, услед чега је дошло до формирања имина. Затим су кроз мембрану пропустили узорак воде који садржи бензалдехид. Имино групе у мембрани су хемијски везале бензалдехид и на тај начин га издвојиле из воденог узорка. Затим је уследило пропуштање раствора хлороводоничне киселине, услед чега је дошло до киселе хидролизе имина. То је довело до ослобађања бензалдехида из мемbrane, уз истовремено концентрисање до концентрације од $10 \text{ mg}/\text{dm}^3$, што је довољно за детекцију у масеном спектрометру.

Испитивана је и могућност примене микропорозних мембрана за физичко раздвајање реагенса од струје раствора за анализу приликом праћења концентрација неких раствора у проточним системима. У том случају могуће је контролисати брзину дозирања реагенса (која је најчешће веома мала, реда величине $10^{-5} \text{ dm}^3/\text{h}$), помоћу порозности и површине мемbrane, концентрације реагенса у резервоару и примењеног градијента притиска¹². На тај начин се остварује мали утрошак реагенса, упрошћен је систем за дозирање и остварена је занемарљива контаминација струје анализираних супстанци реагентом.

КОНЦЕНТРИСАЊЕ АНАЛИТА

Други правац развоја могућности примене мембранских метода у аналитичкој хемији је концентри-

сање анализата из веома разблажених раствора, како би се задовољили све оштрији захтеви у погледу квалитета производа, посебно хране и воде за пиће, као и заштите животне средине. Мембранске методе се могу успешно користити за концентрисање трагова анализата ако се испуне два услова. Први услов је да запремина узорка (напојног раствора) буде знатно већа од запремине прихватног раствора. Други услов је да се обезбеди погонска сила која ће терати аналит да се креће кроз мембрану супротно концентрационом градијенту, тј. из раствора мање концентрације у раствор веће концентрације ("узводни" пренос).

Међутим, квантитативни пренос анализата кроз мембрану из узорка у прихватни раствор је немогуће постићи; уместо тога систем ће успоставити равнотежу у моменту који зависи од састава узорка и прихватног раствора, што компликује квантитативну процедуру. Штавише, време за које се достиже равнотежа често је веома дуго, што чини методу непрактичном за аналитичке сврхе. Да би се то превазишло, развијена је кинетичка метода фиксног времена за квантификовање резултата анализе¹³. Ова метода предвиђа одређивање фактора обогаћења **OF** у неком прописаном времену трајања процеса **t**. **OF** се дефинише као

$$\text{OF} = C_{A,P,t} / C_{A,U,0} \quad (1)$$

где је $C_{A,U,0}$ почетна концентрација анализата у узорку, а $C_{A,P,t}$ концентрација анализата у прихватном раствору после времена **t**. За одређивање фактора **OF** користи се стандардни раствор, а непознати узорак се затим подвргава процедури под истим условима. Концентрација анализата у непознатом узорку се израчунава као

$$C_{A,U,0} = C_{A,P,t} / \text{OF} \quad (2)$$

Алтернативно, може се користити калибрациони дијаграм припремљен са серијом стандардних раствора који су подвргнути процедури под прописаним условима. У овом случају нагиб криве $C_{A,P,t}$ у

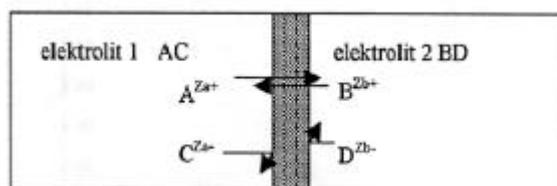
зависности од $C_{A,P,t}$ представља фактор обогаћења **OF**.

Овакав приступ аналитичкој примени мембранских техника искоришћен је код метода на принципу Донанове (Donnan) дијализе¹⁴ и метода са течним мембранама¹⁵.

Методе које користе Донанову дијализу: Донанова дијализа се дешава када се јоно-измењивачка полупропустљива мембрана нађе између два електролита различитог састава. У том случају ће катјон-измењивачка мембрана пропуштати катјоне, док ће скоро потпуно блокирати кретање анијона. Кретање катјона кроз мембрану из једног електролита у други одвијаће се све док се у систему не успостави Донанова равнотежа (слика 2), која је за катјоне А и В са наелектрисањем Z_A односно Z_B дефинисана следећим изразом¹⁶:

$$(M_{A,1} / M_{A,2})^{Z_B / Z_A} = M_{B,1} / M_{B,2} \quad (3)$$

где M представља моларитет датих катјона у равнотежи. Уколико су електролити 1 и 2 различите јонске јачине, доћи ће до Донанове дијализе, односно до кретања катјона насупротив концентрационом градијенту, а тиме до њиховог концентрисања.



Слика 2. Шематски приказ Донанове дијализе.

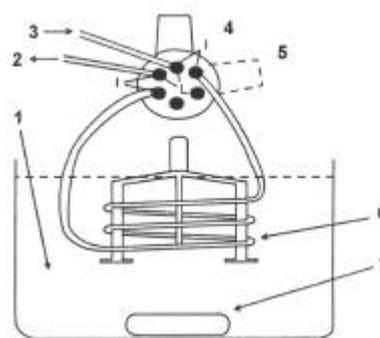
Размотримо конкретан пример: узорак (електролит 1), кога чини 100 cm^3 $1,0 \times 10^{-5} \text{ M NaCl}$ и прихватни раствор (електролит 2), кога чини 1 cm^3 $0,1 \text{ M KNO}_3$ раздвојени су катјон-измењивачком мембраном. Катјони Na^+ и K^+ могу слободно да се размењују кроз мембрану између два водена раствора, док се однос концентрација анијона $[\text{NO}_3^-]/[\text{Cl}^-]$ не мења током Донанове дијализе. Из услова електронутралности оба раствора следи да је збир концентрација катјона константан и једнак концентрацији одговарајућег анијона у сваком моменту дијализе, па и у моменту Донанове равнотеже, односно $[\text{K}^+]_1 + [\text{Na}^+]_1 = 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ и $[\text{K}^+]_2 + [\text{Na}^+]_2 = 0,1 \text{ M}$. На основу биланса масе следи да је, у Донановој равнотежи, $[\text{Na}^+]_1 = 9,9 \times 10^{-8}$, $[\text{Na}^+]_2 = 9,9 \times 10^{-4}$, $[\text{K}^+]_1 = 9,9 \times 10^{-6}$ и $[\text{K}^+]_2 = 9,9 \times 10^{-2}$, што је у сагласности са једначином (3). То значи да је 99% Na^+ јона прешло из узорка у прихватни раствор, односно фактор обогаћења износи 99 ($\text{OF} = 99$).

За концентрисање анијона користи се анијон-измењивачка мембрана.

Применом Донанове дијализе за концентрисање и издвајање анализата из сложеног узорка могуће је усавршити постојеће или развити нове аналитичке методе. За директну примену Донанове дијализе,

праћења аналитичка метода мора бити прилагођена за мерења у растворима велике јонске јачине. До сада је највећа пажња посвећена електрохемијским методама као што су потенциометријске и амперометријске јон-селективне електроде^{17,18}, затим пулсна поларографија и стрипинг волтаметрија¹⁹.

Донанова дијализа комбинована је и са атомско-спектроскопским одређивањима у циљу побољшања границе детекције и сепарације анализата од супстанци које могу да ометају усисавање узорка и/или распршивање. Развијени су проточни уређаји на принципима Донанове дијализе за континуално узорковање код пламеног атомског апсорпционог спектрометра²⁰ (слика 3)



Слика 3. Проточни уређај за узорковање на бази Донанове дијализе код пламене ААС²⁰:

1 – узорак; 2 – пламен; 3 – носећи раствор, 4 – положај вентила за пуњење; 5 – положај вентила за ињектирање; 6 – Нафион мембрана у облику спиралне цеви; 7 – магнетно зрно.

Аналит прелази из узорка (1), путем Донанове дијализе, кроз мембрану у облику спиралне цеви (6) у носећи (прихватни) раствор (3), који струји кроз унутрашњост цеви и истовремено се концентрише. Концентрисани аналит улази у ињектор који га усисава и распршује у пламен атомског апсорпционог спектрометра.

Донанова дијализа је такође комбинована и са јонском хроматографијом²¹. Основни проблем код упаривања Донанове дијализе са јонском хроматографијом стварала је велика јонска јачина концентрисаног електролита, што је практично онемогућавало примену детектора на бази проводљивости. Отуда су развијени супресори јонске јачине електролита. Ови супресори у основи садрже јоно-измењивачку мембрану²² или комбинацију јоно-измењивачке и полимерне мембране²³, најчешће у облику шупљих влакана, чиме се повећава корисна површина мембране по јединици запремине.

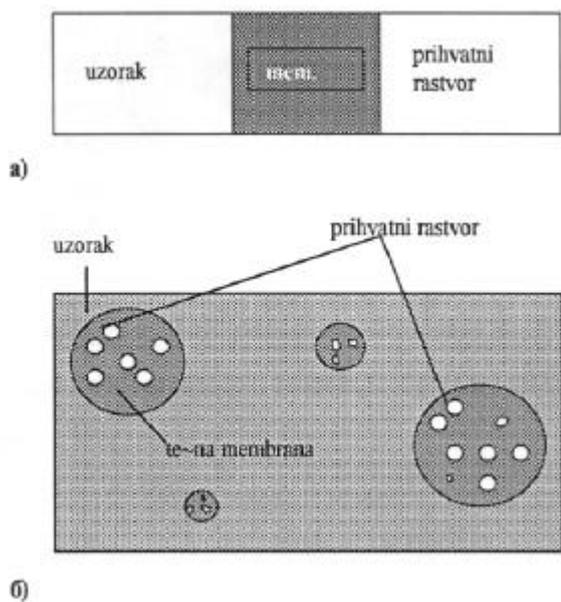
Концентрисање применом течних мембрана

Течна мембрана може да се дефинише као танак слој течности између две гасовите или течне фазе са којима се битно не меша.

Развијена су два главна типа течних мембрана:
 1. Површински активне течне мембране (слика 4), где површински напон на граници фаза одржава мембрану.

Оне могу бити у облику: - **континуалне течне мембране (Bulk Liquid Membrane-BLM)** које се користе искључиво за фундаментална истраживања феномена преноса, због релативно велике дебљине и мале контактне површине чиме се остварује врло мали флукс раствора (слика 4 а) и

- **емулзионе течне мембране (ELM)**. Овде је дебљина мембране значајно смањена, а контактна површина драстично повећана што пружа велике могућности за практичну примену ELM у аналитици за концентрисање анализата (слика 4 б).



Слика 4. Површински активне течне мембране: а) континуалне (BLM) и б) емулзионе (ELM).

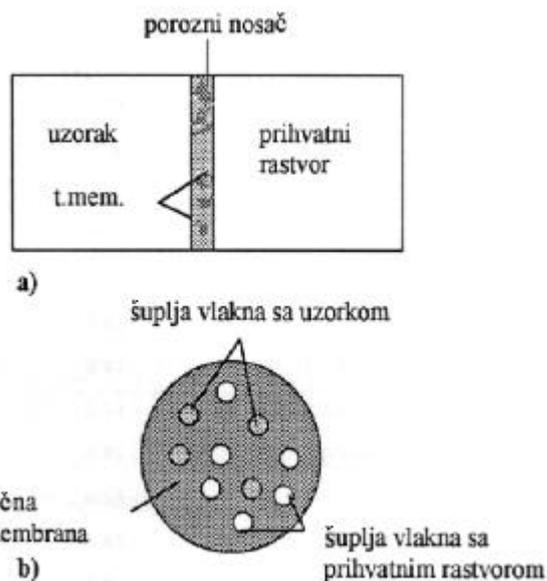
2. Имобилисане течне мембране (слика 5) где је мембранска течност имобилисана у порама неког чврстог микропорозног филма: - **течне мембране на носачу (Supported Liquid Membrane-SLM)**,

или између два микропорозна филма, при чему мембранска течност може, а не мора да кваси спонтано поре: - **обухваћене (запреминске) течне мембране (Contained Liquid Membrane-CLM)**.

Код ових мембрана се контактна површина значајно може повећати применом порозног имобилизатора у облику шупљих влакана.

Поједине компоненте из гасовите или течне смеше преносе се кроз мембрану у прихватну фазу путем дифузије. Постоје три главна типа дифузије кроз мембрану:

- пасивна дифузија, пренос масе је у смеру концентрационог градијента
- олакшани пренос, пример преноса кисеоника из ваздуха у крв преко хемоглобина



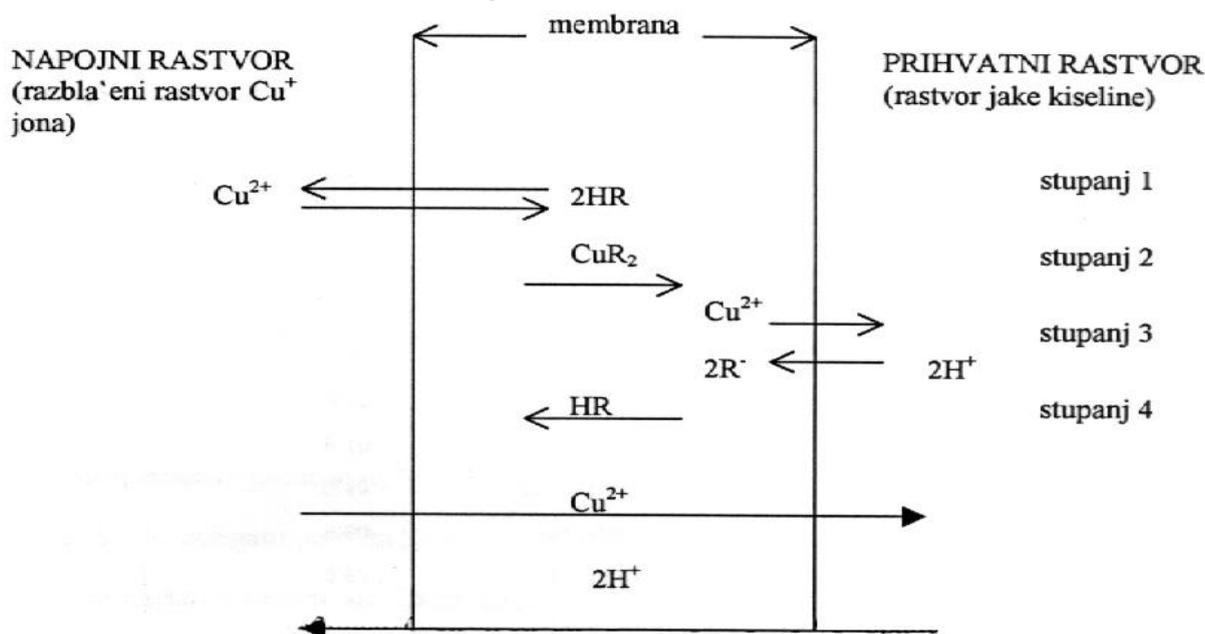
Слика 5. Имобилисане течне мембране: а) течне мембране на носачу (SLM) и б) обухваћене течне мембране (CLM).

- купловани (упарени) пренос сличан је олакшаном преносу, с обзиром да се у мембрани налази преносник. Међутим, у куплованом преносу кретање једне јонске врсте кроз мембрану изазива кретање друге (или више других) јонске врсте кроз мембрану у истом или у супротном смеру. Захваљујући овом купловању, једна врста је у могућности да се креће насупротив свом концентрационом градијенту, под условом да је концентрациони градијент супротне јонске врсте довољно велики. Ова “узводна” дифузија идентична је процесу активног преноса који се одвија кроз мембране ћелија живих организама

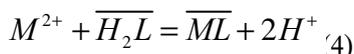
За концентрисање анализата применом течне мембране од значаја је овај трећи тип преноса, односно купловани пренос, јер он обезбеђује кретање анализата из разблаженог узорка у концентровани прихватни раствор. Механизам овог поступка може се објаснити на примеру концентрисања бакра применом ди-хидрокси оксима ЛИКС 84 (2-хидрокси-5-нонилацетофенон оксим) као комплексирајућег средства (слика 7.).

Пренос јона бакра је куплован са преносом протона у супротном смеру. Према томе, градијент рН кроз мембрану омогућава пренос јона бакра из узорка у прихватни раствор “узводно”, односно насупротив концентрационом градијенту.

Данеси (Danesi)²⁴ је развио једноставан модел за “узводни” пренос кроз течну мембрану која садржи мобилни преносник. У случају преноса јона метала уз помоћ хелатирајућег агенса L, на граници фаза узорак/мембрана и мембрана/прихватни раствор одиграва се следећа повратна реакција:



Слика 7. Шематски приказ концентрисања бакра применом течне мембране (раствор LIX 84 у керозину)
 ступањ 1 – Cu^{2+} јон реагује са два молекула комплексирајућег средства (XP) при чему се ослобађају два H^+ јона на страни разблаженог узорка ($\text{pH} = 5$);
 ступањ 2 – комплекс CuR_2 дифундује кроз мембрану у правцу свог концентрационог градијента;
 ступањ 3 – Cu^{2+} јон се измењује са два H^+ јона на страни раствора јаке киселине ($\text{pH} = 1$);
 ступањ 4 – слободни молекули HR повратно дифундују кроз мембрану.



где надвучени симболи означавају неводену (мембранску) фазу. У случају да је концентрација преносника у мембранској фази најмање 100 пута већа од концентрације јона метала у узорку, M^{2+} , онда се флуks металног јона, J , може представити изразом:

$$J = \frac{K_d c}{K_d \frac{d_a}{D_a} + \frac{d_a}{D_o}} \quad (5)$$

где је K_d коефицијент расподеле, $ML/[M^{2+}]$, d_a дебљина воденог дифузионог слоја, d_o је дебљина мембране, D_a је коефицијент дифузије јона метала у воденом раствору, а D_o је коефицијент дифузије комплекса у мембрани. Следи да је:

$$J = kc \quad (6)$$

ако су испуњени следећи услови: d_a је константно за константну геометрију мембранске ћелије, константан састав мембране и константну брзину мешања. pH узорка је или константан или у опсегу где је K_d константно, а pH прихватног раствора је довољно низак да омогућава потпуну дисоцијацију комплекса ML на граници мембрана/прихватни раствор.

За аналитичко концентрисање применом кинетичке методе фиксног времена неопходно је да кон-

центрација јона метала у узорку c буде константна, а то се постиже тако што је запремина узорка велика а време дијализе кратко. Даље је неопходно одредити граничне услове у којима је флуks J константан. У том случају ће фактор обogaћења OF бити директно пропорционалан времену дијализе.

Преглед примењених техника са течним мембранама за концентрисање растворака у аналитичке сврхе дат је табеларно у Таблици 1.

Таблица 1. Примена техника са течним мембранама за концентрисање аналита

АНАЛИТ	ТИП МЕМ-БРАНЕ	ПРЕНОСНИК	РЕФ.
Cd (II)	SLM поли(тетрафлуоретилен)	три-н-октилметил амоний - хлорид	Uto <i>et al.</i> ²⁵
Cu (II)		батокупроин	
U (VI)		три-н-бутил фосфат	
As(III)	SLM, полипропилен	додекан	Cox <i>et al.</i> ²⁶
Zn(II)	SLM	дифенилтиокарбазон	Cox <i>et al.</i> ²⁷

Am(III), Cf(III) i Cm(III)	ELM	D2EHPA	Novikov <i>et al</i> 28
U, ретке земље	SLM, силикон	TBP, D2EHPA, PC-88A	Gill <i>et al.</i> ²⁹

ЗАКЉУЧАК

Методe одвајања које користе пренос масе кроз мембрану још увек нису нашле широку примену у аналитичкој хемији. Највише се примењују методе на бази Донанове дијализе и методе са течним мембранама и то углавном за концентрисање метала пре њиховог одређивања. Лако се укључују у “on-line” системе и омогућавају аутоматско узорковање што пружа овим техникама велику могућност интеграције са инструменталним аналитичким методама као што су УВ-видљива-ИЦ-спектрофотометрија, ААС и масена спектрометрија, гасна и течна хроматографија.

Abstract

ANALYTICAL APPLICATION OF MEMBRANE TECHNIQUES
PART I: DEVELOPED TECHNIQUES

Slavica Stevanović

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, POB 494, 11000 Belgrade, Yugoslavia

A review of developed and potential membrane methods for analytical application is presented with particular respect to membrane extraction and membrane adsorption methods for preconcentration and determination of analytes in very diluted solutions.

In the first part of the paper the developed membrane techniques for separation and concentration of analytes from very diluted and complex solutions are described.

ЛИТЕРАТУРА

- R. Blash and E. Lobel, in P. Meares (ed.) **Membrane Separation Processes**, Elsevier, Amsterdam, pp 477, 1976.
- M.S. Jovanović, **Elektroanalitička hemija**, TMF, Beograd, 1978.
- D.S. Papastathopoulos, E.P. Diamandis and T.P. Hadji Ioannou, *Anal. Chem.*, **52**, 2100 (1980).
- T. Imato, A. Jyo and N. Ishibashi, *Anal. Chem.*, **52**, 1893 (1980).
- J.C. Tow, L.B. Westover and L.F. Sonnaben, *Am. Ind. Hyg.*, **36**, 374 (1975).
- J. C. Weaver, M.K. Mason, T.A. Jarrell and J.W. Peterson, *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 296 (1976).
- J.C. Weaver and J.H. Abrams, *Rev. Sci Instrum.*, **50**, 478 (1979).
- W.H. McFadden, **Techniques of Combined Gas Chromatography Mass Spectrometry**, Willey-Interscience, New York, 1973.
- C.C. Greenwalt, K.J. Voorhees and J.H. Futrell, *Anal. Chem.*, **55**, 468 (1983).
- G.J. Kallos and N.H. Mahle, *Anal. Chem.*, **55**, 813 (1983).
- C. Xu, J.S. Patrick and R.G. Cooks, *Anal. Chem.*, **67**, 724 (1995).
- V. Nau and T.A. Nieman, *Anal. Chem.*, **51**, 424 (1979).
- J.A. Cox, in Z.B. Alfassi and C.M. Wai ed. **Preconcentration Techniques for Trace Elements**, CRC Press, London, pp 301, 1992.
- R. M. Wallace, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **6**, 423 (1967).
- G. Audunsson, *Anal. Chem.*, **60**, 1340 (1988).
- W. J. Blaedel and T.J. Hauptert, *Anal. Chem.*, **38**, 1305 (1966).
- J.A. Cox, P.J. Kulesza and M.A. Mbugwa, *Anal. Chem.*, **54**, 787 (1979).
- J.A. Cox and P.J. Kulesza, *Anal. Chim. Acta*, **158**, 335 (1984).
- J.A. Cox and Z. Twardowski, *Anal. Chem.*, **52**, 1503 (1980).
- J.A. Koropchak and L. Allen, *Anal. Chem.*, **61**, 1410 (1989).
- J.E. DiNunzio and M. Jubara, *Anal. Chem.*, **55**, 1013 (1983).
- J.G. Dorsey, M.S. Denton and T.W. Gilbert, *Anal. Chem.*, **50**, 1330 (1978).
- P.K. Dasgupta, R.Q. Bligh and M.A. Mercurio, *Anal. Chem.*, **57**, 484 (1985).
- P.R. Danesi, *Sep. Sci. Technol.*, **19**, 857 (1984-1985).
- M. Uto, H. Yoshida, M. Sugawara and Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **58**, 1798 (1986).
- J.A. Cox, A. Bhatnagar and R.W. Francis, Jr., *Talanta*, **33**, 713 (1986).
- J.A. Cox and A. Bhatnagar, *Anal. Lett.*, **2**, 2307 (1988).
- A.P. Novikov, T.V. Bunina and B.F. Myasoedov, *Radiochim.*, **30**, 362 (1988).
- J.S. Gill, U.R. Marvah and B.M. Mirsa, *J. Membr. Sci.*, **76**, 157 (1993).

РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРИЗАЦИЈЕ ЛАНЦА

Молекуларни биологи врло често долазе у ситуацију да анализирају неку секвенцу молекула ДНК. При том они у пракси раде различите врсте анализа. То могу бити: утврђивање присуства дате секвенце у узорку ДНК, утврђивање присуства неке мутације у анализираној секвенци (промене у примарној структури ДНК), одређивање примарне структуре молекула ДНК итд. Дата секвенца најчешће представља део неког молекула ДНК који је много већи од секвенце коју треба анализирати. Анализа наведене секвенце била би јако олакшана уколико би се она могла изоловати од других. Да ствар буде још тежа, у узорку се поред молекула са жељеном секвенцом обично налази и мноштво других молекула који и не садрже дату секвенцу. *Овај чланак говори о техници којом је могуће неки жељени део молекула ДНК, синтезом, умножили и добијли јако велики број идентичних копија жељеног фрагмента.*

Људска ћелија поседује 46 хромозома¹ који садрже ДНК молекуле. Сматра се да један хромозом садржи један молекул ДНК у непрекинutom низу и различите протеине који су везани за њега. Тачније, у ћелији се налазе 23 пара хромозома, односно за све што је потребно ћелији постоји двоструки запис. Један комплет од 23 хромозома води порекло од оца, а други од мајке. То би значило да у људској ћелији постоји 23 различита хромозома (у мушкој ћелији присутна су 24 различита хромозома) чија ДНК представља људски геном. Људски геном садржи око 3 милијарде базних парова. Анализирати неку људску секвенцу дужине од, на пример око 300 базних парова, која је део људског генома није ни мало лако јер ова секвенца представља само 0,00001% датог генома. Ако се узме у обзир да ћелија садржи у себи два комплета од по 23 хромозома и да примарна структура ДНК у та два комплета није у потпуности идентична (некада је управо циљ експеримента и да се утврди та разлика), онда ова секвенца може представљати само 0,000005% ДНК садржане у ћелијском једру (уколико је присутна само у једном комплету хромозома). Изоловање ове секвенце од остатка ДНК или бар само њено умножавање, па тиме и повећање њеног удела у општој маси ДНК знатно би олакшало анализу.

Горе наведени проблем решио је амерички научник Кери Мјулис (Kary B. Mullis) који је развио методу реакције полимеризације ланца. Ова метода се у пракси најчешће означава скраћеницом PCR од енглеског назива Polymerase chain reaction. PCR представља репликацију одређене специфичне секвенце молекула ДНК *in vitro*. На овај начин се умножава (амплифицира) тачно дефинисана жељена секвенца, а не читав молекул. Она се може ископирати у врло велики број копија. То може бити милијарду па и хиљаду милијарди пута. Овим би кратка секвенца дата у горе наведеном примеру била после добијања милијарду копија у 50 пута већој количини од остатка ДНК из једра, односно у 50000 пута већој количини уколико би се амплифицирала хиљаду милијарди пута. Овако умножену секвенцу много је лакше анализирати. Захваљујући овоме најчешће није потребна употреба радиоактивног материјала приликом анализе. Због тога је PCR унео праву револуцију у молекуларну биологију. Готово преко ноћи анализе које су биле немогуће или тешко изводиве постале су могуће, односно знатно лакше изводиве. Захваљујући овој методи урађени су радови у области фундаменталних наука од непроцењивог значаја. Она је нашла примену и у пракси. У дијагностици генетских и заразних болести, криминалистици, анализи археолошких узорака (људског, животињског и биљног порекла) као и у генетском инжењерству PCR је врло популарна метода која је често и незамењива. Она је већ толико ушла у практичну употребу да је изазвала промену неких постојећих и доношење нових закона у земљама где се примењује. Ово је метода која је већ почела да мења нашу свакодневницу, а пред њом је још већа будућност.

ИСТОРИЈАТ

Реакцију полимеризације ланца развио је амерички научник Кери Мјулис, хемичар по струци [1]. Он се 1979. године запослио у „Цетус корпорацији” у држави Калифорнија (Cetus Corporation, Emeryville) као лаборант. У овом предузећу бавио се синтезом радиоактивних олигонуклеотидних "проба"². Ове "пробе" су користили молекуларни биологи у својим експериментима за хибридизацију са ДНК молекулама, односно за налажење неких карактеристичних

1 Људска телесна ћелија садржи укупно 46 хромозома. 23 од њих воде порекло од оца, а 23 других од мајке. Може се рећи да у таквој ћелији постоји 23 пара хромозома. Хромозоми се деле на аутозоми и полне хромозоме који детерминишу пол јединке. Аутозома има 22 пара, док је полних хромозома у ћелији присутан само 1 пар. Полни хромозоми могу бити X и Y хромозоми. Код јединки женског пола присутна су 2 полна хромозома (1 пар) и оба су X типа. Код јединки мушког пола присутни су по један X и Y хромозом. Због тога се може рећи да јединке женског пола имају 23 различита хромозома, а јединке мушког пола 24 различита хромозома.

2 Енглески израз the probe заправо значи "сонда" и употребљава се да би се означило део молекула који је у стању да се закачи на одређено место на молекулу ДНК, означивши, својим присуством, место на ДНК за које се везало. Због (погрешне) сличности речи већина југословенских колега за ове молекуле користи реч ПРОБА, коју и ми овде користимо.

места у молекулима ДНК где је редослед нуклеотида комплементаран са редоследом нуклеотида из "пробе" коју додајемо, а „Цетус” је био један од произвођача ових "проба". "Пробе" су добијане контролисаном хемијском синтезом нуклеотида у олигонуклеотидне ланце жељене структуре, односно жељеног редоследа база (примарне структуре ДНК молекула). Најпре је та синтеза ишла ручно, али је почетком осамдесетих година, за хемичаре у овој области истраживања било знатно мање посла јер су они, користећи аутоматизоване уређаје који су се појавили у то време на тржишту, синтетисали велику количину олигонуклеотида за краће време него при ручној синтези. Ово је омогућило Мјулису да се бави и другим проблемима јер је имао више слободног времена. Он је тако почео да се бави упрошћавањем Сендерове методе за одређивање примарне структуре ДНК молекула у фази терминације ланца. Модификовањем принципа на којима се заснива овај поступак, случајно је дошао на идеју да развије PCR. То се, према његовом казивању, десило у току вожње, када је једног петка увече путовао аутом у своју виленицу на северу Калифорније.

Прва амплифицирана секвенца била је део плазмидне ДНК. Пошто је овај експеримент извео успешно Мјулис је одлучио да оптимизује услове реакције и амплифицира секвенцу која садржи одређени ген присутан у људском геному у једној копији. Упркос чињеници да је људски геном јако велик успео је да из укупне људске геномске ДНК селективно амплифицира дату секвенцу.

У пролеће 1984. године Мјулис је одлучио да обелодани своју методу и чује реакцију научне јавности на свој рад. Урадио је то на годишњој научној конференцији у фирми "Цетус", где је имао презентацију у виду постера. Ова конференција окупљала је најпознатије научнике па је тиме за њега она била врло интересантна, како би могао да чује мишљење еминентних стручњака о свом раду. Резултат презентације био је за Мјулиса поражавајући. Људи су пролазили поред његовог постера, бледо га посматрали и без задржавања незаинтересовано одлазили. Нико од присутних није увидео значај овог рада. Само један човек се задржао и схватио вредност његовог рада. То је био познати нобеловац Џошуа Ледерберг (Joshua Lederberg), председник Рокфелеровог универзитета. Он се дуго задржао код постера. У разговору са Мјулисом изјавио је да је он, у периоду после 1955. године када је пронађена ДНК полимеразе, својевремено пробао да искористи овај ензим за синтезу великих количина ДНК али без успеха. Мјулис је приметио да је то било због тога јер у то време није било могуће синтетисати олигонуклеотиде, а и није било информација о примарној структури ДНК молекула. Упркос чињеници да нико изузев Ледерберга није увидео значај овог рада, PCR је

ушао у огроман број лабораторија широм света и допринео да се изврше многа врло значајна открића у области молекуларне биологије. Десетак година после Цетусове конференције, тачније 1993. године, Кери Мјулис је постао лауреат Нобелове награде за хемију. Сам лауреат је изјавио да не може схватити чињеницу да се ове методе нико пре њега није досетио, упркос чињеници да је огроман број научника широм света радио на сличној проблематици.

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ PCR-A

PCR представља синтезу једне те исте одређене (краће) специфичне секвенце молекула ДНК у јако великом броју копија (амплификацију) на основу постојеће матрице која се копира. Овај процес је приказан на слици 1. PCR се може извршити у више циклуса, а сваки од њих се састоји од три корака. Реакција се најчешће одвија у микропруветама запремине 0,5 или 0,2 ml, при чему је запремина реакционе смесе обично 25-100 μ l.

Овде ће бити показано како се одвија једна типична реакција.

Први корак у процесу амплификације је денатурација ДНК. Она се изводи загревањем на температуру блиску температури кључања воде, при којој долази до раздвајања ланца дволанчаног ДНК молекула. Овим расплитањем ланца омогућава се приступ прајмерима који се везују за специфичне себи комплементарне једноланчане секвенце.

Други корак у амплификацији је везивање прајмера. Да би се прајмери (стабилно) везали, потребно је спустити температуру на неку која ће бити довољно ниска да омогући овај процес, а истовремено довољно висока да се очува специфичност везивања (односно да се спречи везивање прајмера за себи само делимично комплементарну секвенцу).

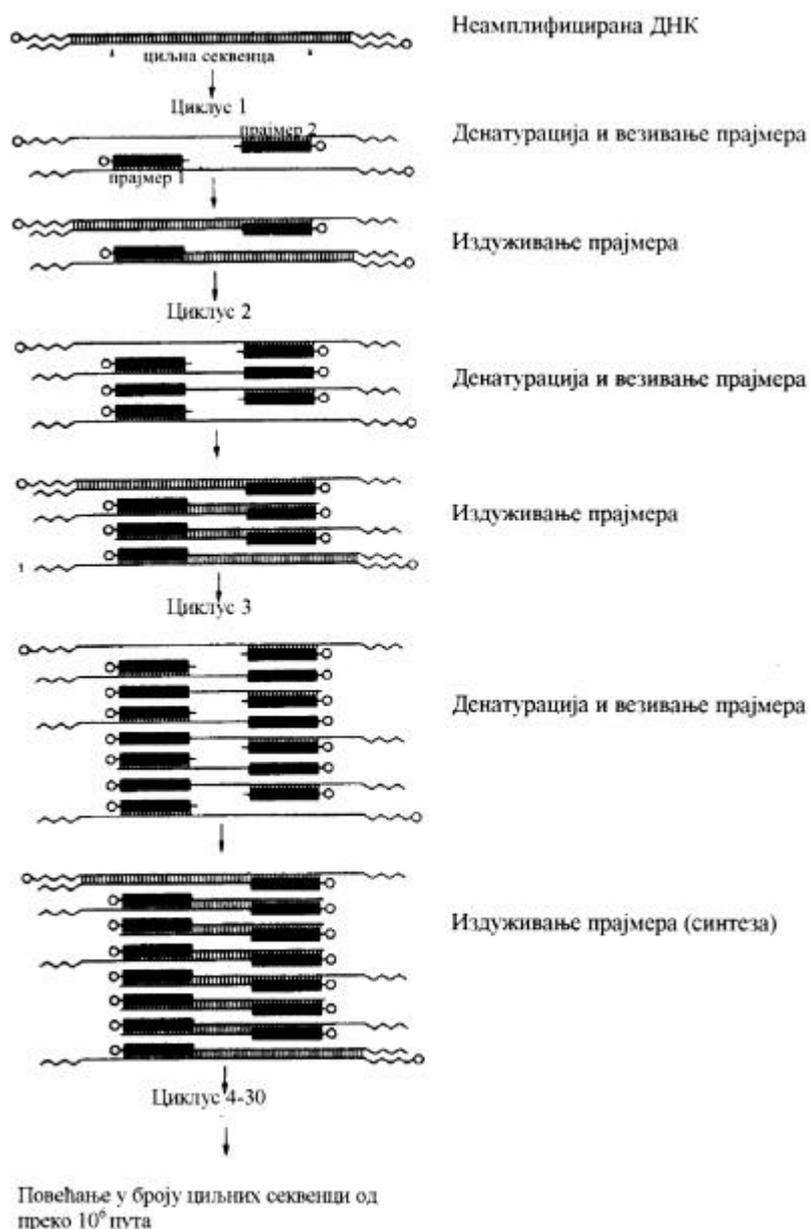
Трећи корак у амплификацији је синтеза (придодавање нуклеотида на постојећи "прајмер", односно издуживање "прајмера"). Она се изводи на нешто већој температури од температуре везивања, на којој је активност *Taq* полимеразе већа. Овим је завршен први циклус у амплификацији. Током овог, као и током сваког наредног, долази до удвостручења броја циљних секвенци, односно секвенци које се амплифицирају. Циклуси се понављају све док се не добије потребан број копија циљне секвенце.

За оне међу вама који желе да добију и нешто прецизније информације о условима за извођење ових реакција дајемо и нешто мало више детаља:

Реакциона смеша се састоји од реакционог пуфера у који су додате све компоненте потребне за одржавање реакције. Те компоненте су: ДНК молекули који садрже специфичне циљне секвенце које се амплифицирају (матрице), дНТФ¹ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ), ензим ДНК полимеразе, прајмери².

1 Ензими који самоумножавају (реплицирају) молекула ДНК морају да имају један ланац ДНК према коме пакују нуклеотиде, и комадић супротног ланца. Баз тог места које је.. уствари, дволанчано, нема ни репликације. "Прајмер" је управо тај комадић другог ланца, без кога ензим не врши полимеризацију. У случају PCR олигонуклеотид којег додајемо игра улогу "прајмера".

2 дНТФ је општа ознака за било који од 4 различита дезоксирибо-нуклеотид трифосфата.



Слика 1. Овде је приказан основни принцип реакције полимеризације ланца [2]

Прајмери су потребни да омогуће почетак синтезе молекула уз помоћ ензима ДНК полимеразе.

Реакција се најчешће одвија у запремини од 25 или 50 μl . Реакциона смеша садржи пуфер за PCR (овде је дат састав пуфера произвођача „Перкин Елмер“) у који улази: 10 mmol/l Tris-HCl (pH=8,3 на собној температури); 50 mmol/l KCl; 0,001% желатина; 1,5 mmol/l MgCl_2 . Поред пуфера смеша садржи: 200 $\mu\text{mol/l}$ дНТФ; 20 pmol/l прајмера 1, 20 pmol/l прајмера 2; ДНК молекули који садрже 10^2 - 10^6 цільних секвенци, 2 јединице ензима Таq ДНК полимеразе. Површина реакционе смесе се покрива минералним уљем које спречава испаравање воде из реакционе смесе. Температурни режим реакције у амплифика-

тору је: денатурација на 94°C у трајању од 20 секунди; везивање прајмера – 30 секунди на 55°C ; синтеза – 30 секунди на 72°C . Амплификација се обавља у 30 циклуса, што умножава цільну секвенцу у 1073741824 копија. Све компоненте се налазе у биде-стилованој води.

ФАКТОРИ КОЈИ УТИЧУ НА PCR

Пуфер за PCR

Реакција амплификације се не одвија у чистој води већ у пуферу [3, 4] који садржи различите компоненте. Пуфер се обично прави у концентрацији 10 пута већој од крајње концентрације (концентрације

у реакционој смеси у току реакције). Он се разблажује на потребну концентрацију приликом додавања реакционој смеси. Све концентрације компоненти које улазе у састав пуфера овде су дате управо као крајње концентрације у току реакције, а не 10 пута увећане. Свака од тих компоненти утиче на реакцију на свој начин. Због тога и састав пуфера није увек исти. Он се мења у зависности од услова реакције који се желе дефинисати. У састав пуфера увек улази Tris-HCl чија је концентрација у реакционој смеси 10-50 mmol/l, а рН 8,3-8,8 на температури од 20°C. Са променом температуре у току реакције доћи ће и до промене вредности рН. Пуфер садржи још и KCl у концентрацији до 50 mmol/l у реакцији, који олакшава везивање прајмера и повећава брзину синтезе *Taq* полимеразе. Већа концентрација од 50 mmol/l може инхибирати *Taq* полимеразу. Некада се у пуфер уместо KCl налази $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

У реакционој смеси обавезно мора бити магнезијум (у виду MgCl_2). Он утиче на специфичност реакције, активност ензима, тачност ензима (уношење погрешног некомплементарног нуклеотида у растући ланац ДНК), везивање прајмера, температуру денатурације ланца. Неке компоненте као што су дНТФ и ЕДТА које се могу наћи у реакционој смеси везују за себе магнезијум па ту чињеницу треба узети у обзир. Потребно је да се магнезијум налази у слободном виду у смеси како би се везао за ензим и омогућио његово функционисање. Због тога промена концентрације наведених компоненти у смеси може захтевати и промену концентрације магнезијума. Повећање концентрације магнезијума смањује специфичност реакције, а повећава количину производа и обратно. Уобичајена концентрација магнезијума је у опсегу 0,5-2,5 mmol/l - више од збира концентрација свих дНТФ-а који улазе у састав реакционе смеси. Концентрација од 10 mmol/l MgCl_2 инхибира реакцију за 40-50%. Магнезијум се често не налази у саставу пуфера, већ се одвојено додаје реакционој смеси. За сваки нови експеримент његова се концентрација одређује експериментално. Овим се избегава потреба за више истих пуфера који се разликују само у концентрацији магнезијума.

Поред наведених компоненти у састав пуфера могу улазити и још неке друге компоненте у зависности од потреба. Понекада се додаје 10% диметил-сулфоксид (ДМСО) који утиче на смањење непожељних интраланчаних веза молекула ДНК. Ипак, он смањује активност *Taq* полимеразе и то је разлог због чега његову употребу треба избегавати.

У циљу повећања стабилности ензима понекада се користе нејонски детерџенти Нонидет Р40 (Nonidet P40), Твин 20 (Tween 20), Лаурет 12 (Laureth 12) у концентрацији 0,05-0,1% и говеђи серум албумин или желатин [3].

Дезоксинуклеотид трифосфати

Присуство дНТФ-а је неопходно у реакцији амплификације, зато што се они уграђују у растући ланац. За одржавање стандардне реакције потребно је присуство све 4 врсте дНТФ-а (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ) и то у једнаким концентрацијама. Неједнаке концентрације ових дНТФ-а доприносе повећању погрешне уградње нуклеотида у растући ланац. Уобичајена концентрација дНТФ-а износи 20-200 $\mu\text{mol/l}$ од сваког, што је теоријски (уколико се у ланце ДНК угради пола количине свих дНТФ-а) довољно за синтезу 0,65-6,5 μg ДНК у реакционој смеси запремине 50 μl . Сувише мала концентрација може довести до успорења реакције и смањења количине производа реакције, док сувише велика до смањења специфичности и тачности уградње у ланац ДНК. Повећање укупне концентрације дНТФ-а на 4-6 mmol/l смањује брзину синтезе *Taq* полимеразе за 20-30%. Термостабилност дНТФ-а је висока, али ипак ограничена, тако да после 50 циклуса PCR-а остаје око 50% дНТФ [3].

Ензим

Синтезу у PCR-у обавља ензим ДНК полимеразе. Најпре је то била ДНК полимеразе која није термостабилна. У те сврхе коришћен је Кленовљев (Klenow) фрагмент ДНК полимеразе I *E. coli*. Пошто овај ензим није термостабилан синтеза се изводила на 37°C, због чега је и специфичност реакције била ниска. После сваке денатурације на преко 90°C, морала се додавати нова количина ензима. Ово је рађено јер је ензим који је био присутан приликом денатурације постајао неактиван на тој температури. Није се могао добити производ дужине веће од 400 bp (базних парова) уз његову употребу.

Примена термостабилних ензима омогућила је велики напредак у PCR-у. Први термостабилни ензим који је коришћен у овој реакцији био је ензим изолован из термофилне бактерије *Thermus aquaticus* сој Y11. Ова бактерија живи у гејзирима Јелоустонског националног парка у САД-у. Пошто она живи у топлим изворима чија је температура 70-75°C, поседовање термостабилне полимеразе омогућава јој живот у тим условима. Ова бактерија је први пут изолована 1969. године. Када је ензим био изолован његова молекулска маса била је процењена на 60/68 kDa, а специфична активност 2000-8000 јединица/mg [5,6]. Касније, 1989. године одређена је примарна структура гена за *Taq* ДНК полимеразу чија је активност била 200000 јединица/mg. На основу кретања у СДС-ПЕЈЦ (SDS-PAGE) закључено је да се овај ензим креће мало брже од фосфорилазе Б (97,3 kDa). Молекулска тежина одређена на основу примарне структуре ДНК износила је 93910 [7]. Методама генетичког инжењерства (рекомбинантне ДНК) урађено је молекулско клонирање овог гена у *E. coli* и добијена је рекомбинантна *Taq* ДНК полимеразе. Данас се углавном кори-

сти рекомбинантна *Taq* полимеразе која се изолује из *E. coli*. Тиме је постигнуто добијање ензима који има уједначен квалитет и перформансе у односу на природни ензим изолован директно из *T. aquaticus*.

Рекомбинантна *Taq* ДНК полимеразе која је у почетку коришћена није показивала коригујућу 3'-5' активност. Она је показивала 5'-3' егзонуклеазну активност зависну од синтeze (ник транслацију). Овај ензим је *in vitro* имао највећу брзину синтезе у температурном опсегу 75°C-80°C, где је брзина износила 150 нуклеотида у секунди. Ензим је испољавао врло мало синтетичке активности на температурама већим од 90°C што може бити последица смањене стабилности комплекса прајмер ДНК молекула. Брзина синтезе *Taq* полимеразе (користећи 30 нуклеотида дугачак прајмер богат са Г и Ц нуклеотидима на фагу М13) била је преко 60 нуклеотида у секунди на 70°C и 24 нуклеотида у секунди на 55°C. Брзина синтезе на 37°C је била 1,5, док је на 22°C била 0,25 нуклеотида у секунди [8]. Време полуживота на 92,5°C износило је 130 минута; на 95°C је било 40 минута; а на 97,5°C само 5-6 минута [3]. Овај ензим може рутински амплифицирати секвенце дужине до 1 kb, а у одређеним условима секвенце дугачке и до 10 kb. Максимална дужина амплифициране секвенце зависи од фактора као што су склоност секвенци да граде секундарне структуре, услови реакције итд.

Наведени ензим има и особину да на крају молекула не завршава синтезу већ додаје један истурени (најчешће аденински) нуклеотид (екстра А). Додају се и други типови нуклеотида, али дАТФ знатно чешће од других. Ово истурено А није присутно код свих молекула синтетисаних у PCR-у. Постоји једна фракција у производу реакције која има у потпуности тупе крајеве и погодна је за тупо молекуларно клонирање без икаквих додатних третмана. Ипак, наведену чињеницу треба узети у обзир приликом прорачуна ефикасности клонирања.

Taq полимеразе може уносити погрешан (некомплементарни) нуклеотид у растући ланац у току синтезе. Она *in vitro* не поседује 3'-5' коригујућу активност. Уколико се добро изведе оптимизација услова реакције, фреквенција мутација ће бити 10^{-5} по циклусу. Фреквенција мутација се може и повећати уколико то експеримент захтева. То се може постићи неједнаким повећањем концентрације различитих дНТФ-а изнад оптималне. Високом концентрацијом $MgCl_2$ у присуству $MnCl_2$ после 25 циклуса може се постићи фреквенција мутација од чак 2% [9].

Поред рекомбинантне *Taq* ДНК полимеразе која је некада коришћена, сада постоје рекомбинантне *Taq* полимеразе које имају модификоване секвенце ДНК клониране у *E. coli*. Захваљујући томе оне имају другачија својства.

Тако је добијен Стофелов (Stoffel) фрагмент рекомбинантне *Taq* ДНК полимеразе који има другачије карактеристике. Овај ензим има температурни

оптимум у опсегу 72-80°C, а његов полуживот на 97,5°C је 20 минута, док на 95°C износи 80 минута. Молекулска тежина му је 61 kDa. Он не поседује 5'-3' егзонуклеазну активност. Његова брзина синтезе на 72°C је 2-4 kb у минути, а оптимална концентрација магнезијума 2-10 mmol/l. Овај ензим додаје екстра А у мањој мери него *Taq* полимеразе која се у почетку користила. На основу наведених карактеристика очигледно је да овај модификовани ензим има другачија својства од оног о којем је првобитно било речи. Он је наведен као пример, а постоје и на други начин модификоване рекомбинантне *Taq* полимеразе са другачијим карактеристикама.

Поред термостабилног ензима изолованог из *Thermus aquaticus* сада су у употреби и термостабилни ензими изоловани из других микроорганизама. Тако је изолована *Tth* ДНК полимеразе из термофилног микроорганизама *Thermus thermophilus*. Најмаркантнија особина ове полимеразе је њена способност реверзне транскрипције (транскрипције РНК у ДНК) која је Mn^{2+} зависна. Овим је омогућено амплифицирање секвенци РНК молекула у једној реакцији. Урађено је молекуларно клонирање и гена за *Tth* ДНК полимеразу па је тако добијена рекомбинантна *Tth* ДНК полимеразе из *E. coli*, а добијене су и њене модификоване форме које имају измењене особине. Једна од њених модификованих форми (*Tth* полимеразе XL) има особину да може амплифицирати и врло дугачке секвенце. Он је предвиђен за амплифицирање ДНК секвенци дужине 5-40 kb. Овај ензим је рутински амплифицирао секвенце бета глобинског генског кластера дужине 19,6 kb из људске геномске ДНК и секвенце дугачке 42 kb из ДНК ламбда фага. Употреба *Tth* ДНК полимеразе XL се препоручује и уколико циљне секвенце имају тенденцију грађења секундарних структура које отежавају амплификацију.

Ензим *ULTma* ДНК полимеразе изолована је из хипертермофилне грам негативне еубактерије *Thermatoga maritima*, која је први пут откривена у геотермно загреваним морским седиментима на температури чак и до 90°C у Италији. Овај ензим има молекуларску масу 70 kDa. Његов ген је методама генетичког инжењерства модификован и клониран у бактерију *E. coli* у којој се и добија рекомбинантна форма полимеразе. Овај ензим има неке специфичне особине. Он је изузетно термостабилан и има полуживот од 40-50 минута на 97,5°C. Код њега изостаје додавање екстра А на крајевима новосинтетисаних молекула и он не показује 5'-3' егзонуклеазну активност. *ULTma* ДНК полимеразе поседује 3'-5' коригујућу егзонуклеазну активност што доприноси знатном смањењу фреквенције мутација у производу PCR-а. Њу треба користити у експериментима у којима је важно да се мутације генерисане у PCR-у сведу на минимум. Међутим, у експериментима у којима се жели детерминисати присуство неке мутације на основу везивања 3' краја прајмера за одређену

секвенци и његовог издуживања у PCR-у, овај ензим (као и све друге са истом особином) не треба користити. Његова коригујућа 3´-5´ активност ће уклонити евентуално некомплементарни нуклеотид са 3´ краја и омогућити издуживање 3´ краја прајмера што у противном не би било могуће.

Једна од новијих модификованих рекомбинантних *Taq* полимераза је и „Ampli Taq Gold“ ДНК полимераза која се активира топлотом. То значи да је пре употребе у неактивном виду, а да се загревањем на 95°C у трајању од 9-12 минута активира. Она олакшава извођење такозваног врућег старта. Пошто је пре првог загревања неактивна, њеним додавањем у реакциону смесу на собној температури неће доћи до синтезе неспецифичног производа. Загревањем реакционе смесе пре првог циклуса реакције на већ наведену температуру доћи ће до њене активације, али не на собној температури већ у условима који су дефинисани процедуром експеримента. Овим је реализација врућег старта олакшана јер је могуће додавање свих компонента реакције на собној температури без накнадног додавања неке од кључних компоненти која омогућава одвијање реакције. Први циклус је могуће започети и без прелиминарног загревања. Тако се омогућава постепено активирање ове полимеразе у току трајања реакције у корелацији са дужином њеног излагања повећаној температури. На овај начин активност полимеразе ће се повећавати са повећањем количине производа реакције. И овим поступком, као и врућим стартом омогућено је смањење количине неспецифичног производа реакције.

Термостабилна ДНК полимераза позната под називом „Vent“ је рекомбинантни ензим изолован из бактерије *Thermococcus litoralis*. Има време полуживота од 400 минута на 95°C, поседује 3´-5´ егзонуклеазну активност, док 5´-3´ егзонуклеазна активност изостаје. Овај ензим има могућност удаљавања ланца (strand displacement). Више од 95% производа синтетисано са њим има тупе крајеве (не поседује екстра А). Термостабилна ДНК полиметраза позната под називом „Deep Vent“ је рекомбинантни ензим изолован из бактерије *Pirococcus GB-D*. Он поседује исте особине као и „Vent“ изузев што му је време полуживота на 95°C чак 1380 минута.

Због постојања више типова термостабилних полимеразе јако је важно упознати се са њиховим својствима пре експеримента и одабрати најподобију. Тако резултати експеримента могу да не буду најоптималнији или експеримент може чак и да не успе уколико се не направи прави избор. Особине ензима је најлакше наћи у каталозима произвођача који гарантују веродостојност датих података (табела 1).

Прајмери

За извођење PCR-а неопходно је присуство прајмера. У својству прајмера се користе олигонуклео-

тиди дужине 17-30 нуклеотида. Присуство прајмера је потребно јер не постоји ДНК полимераза која може отпочети синтезу уколико нема прајмера везаног за ланац ДНК који се копира. ДНК полимераза копира ланац ДНК тако што додаје комплементарне нуклеотиде на 3´ крај прајмера. Прајмери истовремено дају специфичност реакцији везивањем за себи комплементарне секвенце и омогућавају преписивање само секвенце која се налази између два прајмера који учествују у реакцији. Сувише кратак прајмер не може обезбедити довољно високу специфичност везивања. Статистичку вероватноћу присуства неког низа нуклеотида у датој секвенци могуће је израчунати формулом $1/4^n$. Величина n представља дужину прајмера. Као пример може се узети прајмер дужине 16 нуклеотида. Пошто је $4^{16}=429967296$, може се очекивати да ће се у секвенци дужине око 4 милијарде базних парова у просеку једном поновити неки низ од 16 нуклеотида. Пошто је људски геном (који је један од највећих) дугачак око 3 милијарде бп, може се очекивати да ће минимално 17 нуклеотида дугачак прајмер давати довољно високу специфичност реакције чак и за тако велики геном, јер је $4^{17}=17179869184$. Код сувише дугачких прајмера неспецифично везивање би било толико изражено да чак ни повећана температура везивања не може спречити синтезу неспецифичног производа.

Специфичност реакције не детерминише само дужина прајмера већ и његова примарна структура. Уколико је удео Г и Ц нуклеотида у грађи прајмера већи већа је и температура везивања прајмера. Обично се за прајмер одабира секвенца која садржи 50-60% Ц и Г нуклеотида. Оптимална температура везивања зависи и од јонског састава реакционе смесе. Сувише ниска температура повећаће неспецифично везивање прајмера, а сувише висока спречиће везивање, па тиме довести и до изостанка реакције. Обично се за неко грубо одређивање оптималне температуре везивања прајмера користи формула $T_B=2(A+T)+4(G+C)^\circ C$. Величине А, Т, Г и Ц, представљају број датих типова нуклеотида у прајмеру; T_B је температура везивања. Оптимална температура везивања се потом прецизније одређује експериментално. Температура везивања прајмера је најчешће у опсегу 50-72°C. Раније, када је у употреби био Кленовљев фрагмент ДНК полимеразе I која је термостабилна, било је неопходно користити ниску температуру везивања прајмера. Због тога је и специфичност реакције била ниска. Температура везивања реакције треба да није виша од температуре везивања прајмера који има најнижу температуру од свих прајмера који учествују у реакцији.

На специфичност реакције јако утиче и примарна структура прајмера. Због тога њој треба посветити посебну пажњу. Врло је важна примарна структура низа нуклеотида који се налазе на 3´ крају прајмера. Ако један низ нуклеотида није комплементаран на 5´ крају до амплификације ће ипак доћи јер је низ

Табела 1. Пре почетка рада на било ком експерименту, потребно је прво упознати се са карактеристикама термостабилних ДНК полимераса. Овде су дати подаци за неке од њих који су пренети из каталога фирме Перкин Елмер (Perkin Elmer).

Назив производа	AmpliТaq® ДНК полимераса ¹ i Ampli-Тaq Gold™	AmpliТaq® ДНК полимераса, Стофелов фрагмент	rТth ДНК полимераса	rТth ДНК полимераса, XL	UITma® ДНК полимераса
Организам	Thermus aquaticus	Thermus aquaticus	Thermus thermophilus	Thermus thermophilus	Thermatoga maritima
Гаранција перформанси PCR-а	да	да	да	да	да
Техничка подршка PCR-а	да	да	да	да	да
Рекомбинантни ензим	да	да	да	да	да
Молекулска тежина	94 kDa	61 kDa	94 kDa	94 kDa	70 kDa
Ланац или субјединица	1	1	1	1	1
Број аминокиселина	832	544	832	*	610
СДС-ПАГЕ	1 трака	1 трака	1 трака	1 трака	1 трака
Оптимална температура синтезе	72°C-80°C	72°C-80°C	72°C-80°C	72°C-80°C	72°C-80°C
Брзина синтезе (72°C)	2 kb-4kb/мин	2 kb-4kb/мин	2 kb-4kb/мин	*	*
Активност реверзне транскрипције	минимална, ниска	минимална, ниска	да, Мп ²⁺ зависна	да, Мп ²⁺ зависна	-
	97,5°C/10 мин	97,5°C/20 мин	97,5°C/2 мин	97,5°C/2 мин	97,5°C/40 мин
Полуживот	95°C/40 мин	95°C/80 мин	95°C/20 мин	95°C/20 мин	
	92,5°C/>130 мин	-	-	-	-
са 10% глицерина	95°C/>60 мин	-	-	-	-
са 5% формамида	95°C/16 мин	-	-	-	-
са 10% формамида	95°C/2 мин	-	-	-	-
са 10% глицерина и 5% формамида	95°C/24 мин	-	-	-	-
Полуживот изражен у броју циклуса	50	100	25	25	200
Оптимална конц. јона Mg у PCR-у	1-4 mmol/l	2-10 mmol/l	1,5-2,5 mmol/l	1,5-2,5 mmol/l	1,5-2,0 mmol/l
Оптимални рН у PCR-у	7,0-7,5	7,0-7,5	7,0-7,5	7,0-7,5	8,3
Оптимална конц. dNTP у PCR-у	40-200 μmol/l сваког	40-200 μmol/l сваког	40-200 μmol/l сваког	40-200 μmol/l сваког	40-200 μmol/l сваког
Оптимална конц. Kcl у PCR-у	50 mmol/l	10 mmol/l	75-100 mmol/l	75-100 mmol/l	10-35 mmol/l
Оптимална конц. прајмера	0,1-1,0 μmol/l	0,1-1,0 μmol/l	0,1-1,0 μmol/l	0,4 μmol/l	0,1-1,0 μmol/l
Процесивност	50-60 база	5-10 база	30-40 база	30-40 база	*
Најдужи производ PCR-а	џ5 kb	*	џ5 kb	>40 kb	≤3 kb
Подаци приликом секвенцирања	400 база	400 база	400 база	400 база	400 база
Аналог супстрата					
Флуоресцентни ддНТФ/дНТФ	да	да	да	да	да
Дутф	да	да	да	да	да
деаза-дГТФ	да	да	да	да	да
биотин-11-дУТФ	да	*	да	да	да
дигоксигенин-дУТФ	да	*	-	-	-
ддНТФ	да	да	да	да	да
бромо-дУТФ	да	*	-	-	-
5'-3' егзонуклеазна активност	да	не	да	да	не
Додавање екстра А	да	да (мање)	да	да	не
3'-5' егзонуклеазна активност	не	не	не	да	да
Тaq I рестрикциона нуклеаза	не	не	не	не	не
Контаминирањост нуклеазама	не	не	не	не	не
Величина паковања	1	1 · 1000 J 6 · 1000 J	1 · 500 J	1 · 400 J 6 · 400 J	1 · 300 J
Испоручује се у концентрацијама	5 J/μl	10 J/μl	2,5 J/μl	2 J/μl	6 J/μl
Пуфер се испоручује заједно	да ¹	да	да	да	да
Пцр паковање унето	да	да	да	да	да
Услови приликом транспорта	лед у виду гела/амбиент	лед у виду гела	лед у виду гела	лед у виду гела	лед у виду гела
Услови складиштења	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C

*У току је испитивање.

¹Информација важи за AmpliТaq® ДНК полимеразу; LD, AmpliТaq® ДНК полимеразу; AS i нативну Тaq ДНК полимеразу.

на 3' крају везан за себи комплементарну секвенцу. На тај начин ДНК полимераза може додавати нуклеотиде на 3' крају. Уколико низ на 3' крају није комплементаран нема ни синтезу новог ланца јер ДНК полимераза не може да додаје нуклеотиде на 3' крају који није везан за циљну секвенцу. Ипак, уколико само последњи нуклеотид није комплементаран понекада може доћи до синтезе новог ланца. Због толерантности ДНК полимеразе коју она показује према неким некомплементарним паровима доћи ће до ефикасног издуживања прајмера уколико су они присутни на 3' крају као последњи пар. Уколико су на 3' крају парови А:Г, Г:А и Ц:Ц принос реакције ће се смањити 100 пута. Уколико је на овом крају пар А:А принос ће бити мањи 20 пута. При другим некомплементарностима нема значајног смањења приноса реакције. До јако великог смањења приноса ће доћи уколико постоји некомплементарност два последња нуклеотида на 3' крају прајмера са наспрамним нуклеотидима на циљној секвенци. Изузетак је уколико је некомплементарни нуклеотид на 3' крају прајмера Т. У том случају добиће се значајна количина производа реакције уколико је чак и суседни нуклеотид некомплементаран [10]. Ови подаци су врло битни при одабирању секвенце за синтезу прајмера јер правилно одабрана секвенца много утиче на повећање специфичности реакције.

Низ нуклеотида на 5' крају може садржати и некомплементарну секвенцу коју препознаје неки рестрикциони ензим или регулаторну секвенцу. Ове секвенце ће бити уграђене у производ и налазиће се на његовом крају. Оне битно не утичу на принос реакције.

При одабирању секвенце за прајмер треба избегавати оне које садрже инвертоване низове који граде интраланчане везе. Прајмер не треба да садржи 3 или више Ц или Г на 3' крају. На 3' крају не сме садржати ни секвенцу која је комплементарна 3' крају другог прајмера који учествује у реакцији јер може доћи до стварања *артефакта прајмер димер*.

За правилан одабир примарне структуре прајмера од велике помоћи могу бити и неки од компјутерских програма који обављају анализу расположивих секвенци и бирају ону која је најподобнија за прајмер.

Оптимална концентрација прајмера се обично креће у опсегу 0,05-0,5 $\mu\text{mol/l}$. Прајмер је једна од компоненти која се троши у реакцији тако што се уграђује у производ. Због тога сувише мала концентрација може довести до знатног смањења приноса реакције. Сувише велика концентрација може смањити специфичност реакције и повећати количину прајмер димер артефаката.

Број циклуса и њемперијурно временски параметри

Денатурација се обично ради у опсегу 90-97°C. Потребно је да се узорак налази свега неколико секунди на температури на којој долази до денатурације да би се ланци раздвојили. Међутим, то време је у пракси увек веће, јер је извесно време потребно да се температура грејног блока амплификатора пренесе кроз зид епрувете на течност са узорком који је у унутрашњости епрувете. Обично је довољно време од 30 секунди на 95°C да би дошло до потпуне денатурације ланца молекула ДНК. Често се ради једна иницијална денатурација пре првог циклуса PCR-а у трајању од више минута како би се ланци ДНК који могу бити и јако дугачки (што зависи од узорка) потпуно раздвојили.

Температура везивања је обично у опсегу 50-72°C, што зависи од структуре прајмера, о чему је већ било речи. Време везивања од 20 секунди често је довољно за овај корак PCR-а.

Температура синтезе је обично 70-75°C, а најчешће 72°C, што је у складу са температурним оптимумом активности термостабилне полимеразе. Време синтезе зависи од дужине циљне секвенце која се амплифицира као и од брзине синтезе ДНК полимеразе која се користи у реакцији. Најчешће је у оптималним условима 1 минут довољан за синтезу 2 kb. Ипак, уколико је мала концентрација ензима у односу на концентрацију производа (што је израженије у каснијим циклусима због нарастања количине производа), ово време може бити и дуже. Обично се време последњег циклуса продужи у трајању од неколико минута како би се синтетисали до краја несинтетисани фрагменти у процесу амплификације. Ова фаза се назива дорада.

Амплификацију је могуће изводити и на само две температуре. У овом случају везивање прајмера и синтеза раде се на истој температури која се обично креће у опсегу 55-75°C. Ипак, у већини случајева амплификација се ради на три температуре.

Број циклуса зависи од количине производа која се жели добити у реакцији. Испуњавање овог циља зависи и од броја циљних секвенци у узорку ДНК које се амплифицирају. Већи број циљних секвенци захтеваће мањи број циклуса за добијање жељене количине производа. Увек треба урадити најмањи број циклуса који је довољан за добијање неопходне количине производа. Сваки сувишан циклус утиче на повећање количине неспецифичног производа, што некада може негативно утицати на успешност експеримента. У пракси је најчешће довољно урадити 25-35 циклуса за добијање неопходне количине производа, али то наравно зависи од већ наведених фактора. Број циљних секвенци се у сваком циклусу реакције дуплира. Колико се пута умножи број циљних секвенци може се израчунати по формули $N=2^n$, где N показује колико пута су умножене циљне секвенце, а n представља број циклуса.

Није могуће извести неограничен број циклуса због појаве која се најчешће назива ефекат платоа. У пракси се обично може постићи 40-50 циклуса после чега ефекат платоа толико долази до изражаја да више није могуће изводити реакцију. Он се јавља када концентрација производа достигне 0,3-1 pmol. Постоји више разлога због којих долази до атенуације реакције у касним циклусима. Фактори који изазивају ефекат платоа су: недовољна количина компоненти које се троше у реакцији (прајмери, дНТФ), температура нестабилност компоненти које учествују у реакцији (у првом реду ДНК полимеразе и дНТФ), конкуренција за реактанте од стране неспецифичног производа који се такође у извесној мери амплифицира, сувише велика концентрација производа реакције од преко 10^8 mol доводи до брзе ренатурације денатурисаних циљних секвенци (што умањује могућност везивања прајмера за њих, смањује процесивност ензима и онемогућава нормалну синтезу).

Уколико је потребно добити огроман број копија не мора се радити одједном велики број циклуса. Може се урадити одређени број циклуса, а затим узети један део реакционе смесе, на пример 1/10 запремине, и пренети у другу епрувету. Допуњавањем са 9/10 запремине, која садржи све компоненте реакције изузев узорка (ДНК са циљним секвенцама) и вршењем још извесног броја циклуса, може се одложити достизање ефекта платоа и добити врло велика количина производа. До одлагања достизања платоа долази због разблажења производа и додавања нових количина реактаната који се троше у реакцији или су температурно нестабилни.

Неспецифични производ реакције

Синтеза неспецифичног производа у PCR-у је неминовна појава која увек прати синтезу специфичног производа. Неспецифични производ је увек присутан у реакцији и поред свих мера које се предузимају за његову елиминацију. Примена термостабилних ДНК полимераза (захваљујући оптималној температури везивања прајмера) је јако допринела повећању специфичности реакције. Производи PCR-а често се анализирају електрофорезом. Уколико је оптимизација реакције добро урађена, електрофорезом у агарозном гелу третираним етидијум-бромидом, приликом посматрања гела на УВ трансилуминатору често се може видети само специфични производ. То не значи да неспецифичног нема. Он је увек присутан, само у овом случају га има у количини која се не може детектовати примењеном методом. Њега је посебно тешко детектовати уколико он не представља молекуле ДНК који су највећим делом исте дужине. У том случају ови молекули ће бити електрофорезом размештени на велику површину гела, па их је тешко детектовати чак и ако представљају велики део приноса реакције. То значи да неспецифичан производ може имати знатан удео у

производу реакције, чак и у случају да се не може детектовати.

Неспецифичан производ не мора увек бити резултат неспецифичног везивања прајмера за ДНК узорка. Он може бити резултат прајмер димер артефаката. Они се јављају као последица везивања прајмера самих за себе својим 3' крајевима, после чега долази до њиховог издуживања под дејством ДНК полимеразе (синтеза). Ови артефакти уколико су присутни у довољној количини могу се видети на електрофоретском гелу као траке дужине до око 100 bp. Овај артефакт могуће је идентификовати уколико се амплификација ради са свим компонентама реакције изузев ДНК са циљном секвенцом. Појава наведених трака је поуздан знак да долази до појаве неспецифичног производа овог типа. Понекада се његова количина може знатно смањити (некада и до те мере да се и не примећује на електрофоретском гелу) при додавању ДНК узорка, због тога јер циљна секвенца долази у конкуренцију са овом појавом у погледу везивања прајмера. Количину овог типа неспецифичног производа могуће је смањити: променом примарне структуре прајмера, смањењем концентрације прајмера, повећањем температуре везивања прајмера (у тој мери да не изазове спречавање везивања прајмера за циљну секвенцу, па тиме и заустављање реакције).

Проблем може настати и ако се ради амплификација хетерозиготне секвенце са ДНК из диплоидне ћелије. У једном циклусу PCR-а може да се не обави синтеза комплетне секвенце која се амплифицира и води порекло од једног родитеља. У следећем циклусу та се секвенца на температури везивања може везати уместо прајмера за циљну секвенцу која води порекло од другог родитеља. У том случају, пошто је ДНК из хетерозиготне ћелије, у реакцији би се добио производ који не представља верну копију амплифицираних секвенци, већ комбинацију хетерозиготних секвенци оба родитеља. Ова врста артефакта представља производ својеврсне рекомбинације *in vitro* [11]. Њу је могуће умањити коришћењем ДНК полимераза која се одликује високом процесивношћу, као и одабирањем услова реакције који повећавају процесивност. Дуже време синтезе у сваком од циклуса може смањити количину оваквих артефаката.

Извор артефаката може да буде и ДНК која је присутна као примеса у ензиму. Ензим у овом случају није контаминиран са ДНК из неког извора са стране. То је геномска ДНК која потиче од микроорганизма који је синтетисао ензим у процесу његове производње (тај микроорганизам може бити и *E. coli* уколико је у питању рекомбинантни ензим). У току пречишћавања ензима долази до задржавања веома малих количина геномске ДНК ових микроорганизма. Приликом амплификације ДНК из неког узорка, може доћи и до амплификације ДНК која је унесена у реакцију заједно са ензимом. Ово је пого-

тово изражено уколико се ради више од 35 циклуса амплификације, јер мала количина ове ДНК може бити умножена у количини коју је лако детектовати, само ако се уради већи број циклуса. Повећањем количине циљне ДНК може се смањити број циклуса за њену амплификацију, а тиме и умањити појава ове врсте артефакта. Промена структуре прајмера такође може утицати на његово смањење.

На смањење специфичности реакције утиче и начин припреме реакционе смесе. Уколико се у реакциону смесу која се припрема на собној температури додају све кључне компоненте реакције без којих се реакција не може одвијати, може доћи до смањења специфичности реакције. Ово смањење специфичности настаје као последица повећаног неспецифичног везивања прајмера за време прављења реакционе смесе (прави се на собној температури). Одмах по везивању прајмера и пошто се додају све компоненте кључне за одвијање реакције отпочиње и процес синтезе. Овај процес се одвија и на собној температури, као и на свим другим температурама нижим од температуре везивања прајмера у току загревања у првом циклусу реакције. Умножавање неспецифичног производа ће бити највеће уколико до његове појаве дође у ранијим циклусима реакције. У овом случају до појаве неспецифичног производа долази чак и пре првог циклуса, а у току наредних циклуса доћи ће до увећања његове количине. Уколико се на собној температури додају све компоненте изузев једне кључне (ензим, прајмер, магнезијум итд.), синтеза неспецифичног производа у овој фази (пре првог циклуса) може се избећи. Ова компонента се може додати у току првог циклуса, на високој температури после денатурације ланца ДНК, када не може доћи до неспецифичног везивања прајмера. Овај поступак се у пракси назива врући старт. Применом „Ampli Taq Gold“ полимеразе поступак се може аутоматизовати на начин који је наведен при опису ензима. Ако се користи термостабилна полимеразе која се налази унутар воштаних куглица (таква полимеразе се може наћи на тржишту и назива се „Taq-Red“ полимеразе) поступак се такође може аутоматизовати. Ова полимеразе се одмах додаје у реакцију, али захваљујући воску не долази у контакт са реакционом смесом док она не достигне температуру од 60°C када се восак топи и ензим ослобађа.

Специфичност реакције могуће је повећати и употребом такозваних унутрашњих прајмера. Прво се уради одређен број циклуса амплификације са једним паром прајмера, а затим се настави са једним прајмером или паром прајмера који се налазе унутар секвенце која је амплифицирана са претходним паром. На овај начин други прајмер или пар прајмера се веже само за себи комплементарне секвенце, које су садржане само у циљној секвенци и даље амплифицира само циљну секвенцу, а не и неспецифични производ. Ово се у пракси постиже тако што се прво уради одређен број циклуса са само једним паром

прајмера. После тога обично се отвара епрувета и узима део реакционе смесе и пребације у другу епрувету са реакционом смесом која садржи други пар прајмера. На овај начин разблажењем се постиже смањење концентрације прајмера из првог дела реакције. Сада ће се у наставку обавити још један број циклуса у којима ће амплификација тећи углавном са другим паром прајмера, чија је концентрација сада много већа од првог пара. Приликом овог разблаживања може доћи до контаминације реакционе смесе. Како би се то спречило, овај поступак је упрошћен. Дизајнирањем прајмера тако да први пар има температуру везивања већу од другог (тако да се на тој температури други пар не веже) може се поједноставити поступак. После одређеног броја циклуса концентрација првог пара прајмера ће се знатно смањити (пошто се у реакцији троше), јер су присутни у одређеној лимитираној (првобитно прорачунатој) количини. Тада ће смањењем температуре везивања у следећим циклусима доћи до амплификације и са унутрашњим прајмерима, док ће амплификација са спољашњим бити мала због потрошености спољашњих прајмера.

Контаминација узорка

Контаминација узорака и реактаната који учествују у реакцији представља велики проблем приликом извођења PCR-а. Узрок овоме је умножавање циљне секвенце приликом амплификације у јако велики број копија, што је пожељно само уколико се не амплифицира и страна ДНК којом је реакција евентуално контаминирана. Контаминација са страном ДНК представља највећи проблем, али не треба занемарити ни контаминацију са прајмерима. Нека секвенца стране ДНК којом је контаминирана реакција може бити амплифицирана и тиме изазвати потешкоће при анализи. Исти проблем потенцијално изазива и контаминација са прајмерима коришћеним у некој другој реакцији PCR-а који могу амплифицирати неку другу секвенцу поред секвенце коју амплифицирају прајмери нормално присутни у реакцији. Контаминација реакције дешава се тако што се страна ДНК или прајмери непажњом директно унесу у реакциону смесу или се унесу преко неког претходно контаминираних реактанта.

Највећа могућност контаминације је при раду са много узорака јер се они могу међу собом контаминирати. Тада може доћи до лажно позитивних реакција. Врло често до контаминације долази при отварању микроепрувета када садржина из њих може да прсне по прстима експериментатора и да буде пренесена у другу епрувету, а такође и при отварању или при додиру врха пипете којом се пипетирају реактанати. Из тог разлог пожељно је пре отварања краткотрајно центрифугирање микроепрувета са овим компонентама у микроцентрифуги у трајању од десетак секунди. То је довољно да капљице садржине епрувета сакупљене на поклопцу падну на дно

и тиме се умањи могућност контаминације прстију експериментатора приликом отварања поклопца.

У циљу избегавања контаминација и већих последица треба се придржавати и неких правила која су устаљена у лабораторијама у којима се врши PCR. Лабораторијске посуде са критичним компонентама реакције треба да буду за једнократну употребу. Сви реагенти треба да буду подељени на мање аликвоте како при евентуалној контаминацији не би дошло до упропашћавања целокупне расположиве количине често скупоценог материјала. При додавању реактанта у реакциону смесу, прајмере и затим ДНК треба додати на крају, како би се смањило број операција са овим најкритичнијим компонентама. Уколико се поштују наведене препоруке могућност контаминације се своди на минимум.

Амплификациони ДНК

Амплификација ДНК се ради у уређајима који се називају амплификатори ДНК. Овај назив се користи како на енглеском говорном подручју, тако и у неким другим језицима. На енглеском говорном подручју се одомаћио и назив термал сајклер (thermal cycler). Овај уређај обезбеђује температурне услове реакције (у заданом времену) који су неопходни да би се она одвијала. У пракси се то остварује тако што амплификатор загрева и хлади епрувету у којој се налази реакциона смеша.

У почетку примене PCR-а нису постојали амплификатори, тако да се температурна промена остваривала у почетку са два (када се користио Кленовљев фрагмент ДНК полимеразе као ензим), а касније све више са три водена купатила. Када се користио Кленовљев фрагмент синтеза и везивање прајмера вршили су се на истој температури па су 2 водена купатила била довољна. Употребом термостабилних полимераза почела је да се користи посебна већа температура за синтезу како би се повећала специфичност реакције [4]. То је захтевало коришћење 3 водена купатила. Температурне промене реакције рађене су тако што је епрувета са реакционом смесом руком пребацивана из једног у друго купатило. Време инкубације у сваком од купатила мерено је хронометром. Аутоматизација овог поступка је постигнута употребом механичке руке (представља неку врсту робота) која је управљана по заданом програму. У овом случају она је обавила пребацивање епрувета из једног у друго водено купатило.

Други аутоматизовани приступ је био амплификатор који је имао суви термо блок, израђен од неког метала који је добар проводник топлоте, са отворима за смештај микроепрувета. Загревање термоблока остварено је електричним грејачем, а хлађење водом из водоводне мреже. Амплификатор се повезивао на водоводну славину преко црева које се прихрафљивало на њу, слично као што је то технички решено код машина за прање веша. Режим загревања и хлађења контролисан је програмом који је за-

даван микропроцесором. Проблем код овог типа амплификатора је потреба за константним, довољно високим и стабилним притиском у водоводној мрежи. Уколико нису испуњени ови захтеви може доћи до поремећаја у брзини прелаза температура или чак изостанка неких циклуса у реакцији. Ово експериментатор на крају неће ни знати уколико није непрекидно надгледао процес, па неће са сигурношћу моћи да објасни изостанак производа реакције или чудне неочекиване резултате. Код овог типа амплификатора немогуће је контролисати брзину хлађења термо блока. Брзина хлађења термо блока знатно зависи од температуре воде у водоводној мрежи, а она зависи од тренутних метеоролошких услова и годишњег доба. Исто тако, вода која пролази кроз термо блок да би га хладила изазива интензивну корозију блока, што скраћује његов радни век.

Постоји још једно техничко решење за обезбеђивање промене температуре реакције. Ову промену могуће је постићи и употребом такозваног Пелтиеровог елемента за хлађење, а за загревање такође истог елемента или стандардног електричног грејача. Промена температурних и временских режима се код овог типа амплификатора обавља микропроцесором којем се зада жељени програм. Проблем који се јавља код овог типа амплификатора су чести кварови због отказивања Пелтиерових елемената. До отказа елемената долази због исувише честих загревања и хлађења у циклусима амплификације. Том врстом амплификатора могуће је најпрецизније дефинисати брзину температурних промена. Овај прелаз може бити од великог значаја, а поготово је критичан при прелазу са температуре везивања на температуру синтезе. Ово је врло важно јер од тога много зависи поновљивост једном добијених резултата амплификације.

Савремени амплификатори имају поклопац на термо блоку којим се покривају епрувете. Он загрева поклопце епрувета и тако спречава кондензацију течности са унутрашње стране поклопца. Тиме је спречено значајно испаравање воде из реакционе смесе (што би променило концентрацију реактанта) и без употребе минералног уља.

Амплификација са воденим купатилима има своје мане и предности у односу на друге начине. Предности су: брзи прелаз са једне на другу температуру, одличан термички контакт између епрувете са реакционом смесом и воде (или уља уколико се оно користи као медијум) која предаје или преузима топлоту. Кашњење у прелазу топлоте овде је изазвано временом потребним за преношење епрувете из једног у друго купатило, као и прелазом топлоте кроз зид епрувете. Брзина промене температуре реакционе смесе зависи и од њене запремине. Што је запремина већа то је и инертност промене већа. Из ових разлога епрувете са тањим зидовима су погодније јер обезбеђују бржи пренос топлоте и имају мању инертност промене температуре јер поседују ма-

њу масу. Једна од мана овог начина обезбеђивања температурних услова амплификације је гломазност система од 3 водена купатила и механичке руке (уколико се и она примењује). Загревање водених купатила на радне температуре захтева доста времена, а прецизно подешавање температура још додатно одузима време. Пренос епрувете из једног у друго купатило може изазвати пад температуре за време док се епрувета налази у ваздуху, што је нарочито критично при прелазу са температуре везивања на температуру синтезе. Овај проблем се донекле може превазићи уколико се ова операција обавља брзо.

Неки од проблема који се јављају код амплификатора који користе суви блок за смештај и загревање епрувета су већ наведени. Један од озбиљних проблема може бити и лош термички контакт између зида епрувете и термо блока. Облик отвора за смештај епрувета у термо блоку треба да потпуно одговара спољашњем облику епрувета како би физички контакт, а тиме и пренос топлоте био добар. Уколико ово није случај, може доћи и до великих одступања у температури термо блока и реакционе смесе у епрувети чак и после дужег времена. Ово може бити врло проблематично, пошто и мала одступања од дефинисаних температура реакције могу врло негативно да се одразе на њу, па чак да доведу и до изостанка реакције. Проблем може бити израженији уколико је толеранција у облику и димензијама код епрувета приликом израде била велика. Овај проблем се може решити сипањем у отвор термо блока извесне количине топлотно проводећег уља.

И поред смањене поузданости у раду и још неких мана, суви амплификатори са Пелтиеровим елементима су узели примат међу уређајима присутним на тржишту. Већина савремених амплификатора ради на овом принципу. Предности и погодности које они пружају су заслужне за њихову широку распрострањеност.

PCR И ПАТЕНТНА ПРАВА

После открића PCR-а од стране Кери Мјулиса „Цетус“ је постао носиоц патентних права за ову иновацију. „Цетус“ је касније добио и патентна права за *Taq* полимеразу која је неопходна за процес амплификације. Ова фирма је тиме добила апсолутни монопол, како за производњу било које опреме за PCR укључујући амплификаторе, тако и за ензим *Taq* полимеразу. PCR се широко примењује у свим развијеним земљама не само у истраживањима, већ и у дијагностици разних болести. Ове примене имају тенденцију константног повећања. Процењује се да се годишње у свету прода *Taq* полимераза у вредности од око 200 милиона долара. Огромна зарада се остварује и продајом амплификатора и права на производњу амплификатора и остале опреме за процес амплификације, а то је све везано за парентна права на PCR. Кери Мјулис је од „Цетуса“ добио награду за допринос који је својим радом и открићем

PCR-а дао фирми у висини од само 10000 долара. То је био износ који је он добио од „Цетуса“ за бриљантно откриће које је вредно Нобелове награде и које је овој компанији донело годишње приходе од више стотина милиона долара са сталном тенденцијом убрзаног раста. Мјулис је на крају напустио „Цетус“ и више га не интересује сарадња ни са једном компанијом која се бави биотехнологијом. Он сада живи у малом стану на обали мора и бави се молекуларном биологијом (проблематиком синдрома имунодефицијенције и вируса ХИВ) и још неким другим областима.

Ипак, патентно право на производњу *Taq* полимеразе је у САД-у оспорено и 1999. године проглашено неважећим. У судском спору између америчке компаније „Промега“ (Promega) и швајцарског фармацеутског гиганта „Хофман-Ла Рош“ (Hoffmann-LaRoche) патент издат за овај ензим стављен је ван снаге. Наиме, „Цетус“ је 26. децембра 1989. године добио у САД-у патент за *Taq* полимеразу. Овим је он добио апсолутни монопол за производњу овог ензима. Ова компанија је уговором вредним 300 милиона долара продала патентна права компанији „Хофман-Ла Рош“ не само за PCR, већ и за *Taq* полимеразу. Овај уговор носи са собом и лиценцу коју је 1990. године Цетус продао „Промеги“ за производњу ензима. Међутим, „Хофман-Ла Рош“ је оспоравао право „Промеги“ да продаје ензим да би се користио за PCR. Другим речима, Промега је морала нагласити кушцу да он не може користити ензим за PCR и да, уколико то не испоштује, може се суочити са законским казнама. Ово би наравно драстично смањило продају „Промегиног“ ензима, а можда и потпуно прекинуло јер он налази највећу примену баш у PCR-у. „Хофман-Ла Рош“ базирао је свој захтев на чињеници да „Промега“ није купила лиценцу за PCR, већ само за производњу ензима па зато она може производити и продавати ензим, али се он не сме користити за PCR. „Хофман-Ла Рош“ је поднео и судску тужбу против „Промега“ због непоштовања патента.

„Промега“ је реаговала упозорењем да „Цетус“, а тиме и „Хофман-Ла Рош“ не може бити носиоц патента јер ензим нису први изоловали научници из „Цетуса“, већ је то урађено раније. „Промега“ је тврдњу базирала на чињеници да су *Taq* полимеразу раније изоловале две групе научника и то у Совјетском Савезу 1980. године Каледин (Каледин) и сарадници чији је рад публикован у Совјетском стручном часопису Биохемија (Биохимия) [6]. Рад ове групе је био надовезан на рад Чиена (Chien) и сарадника са Универзитета Синсинатија 1976. године који је публикован у Бактериолошком журналу (Journal of Bacteriology) [5]. „Хофман-Ла Рош“ није уважаио ово упозорење већ је поднео захтеве за патентирање у низу других држава. Тако је „Промега“ поднела контра тужбу са циљем да оспори важност патента. После вишегодишњих судских препуцавања, амерички

суд је у фебруару 1999. године донео судску пресуду којом се поништава патент за *Taq* полимеразу издат у САД-у и истовремено укидају сва ограничења везана за њену примену у PCR-у.

У судској истражи је утврђено да је „Цетус” поднео захтев за добијање патента за *Taq* полимеразу и да су захтев потписали неколико водећих научника који су радили за „Цетус”. То су били: Д. Гелфанд (D. Gelfand), С. Стофел (S. Stoffel), Ф. Лоујер (F. Lowyer) и Р. Саики (R. Saiki). Они су потписали изјаву у којој потврђују да су упознати са свим својим обавезама према патентном бироу (подношење тачних података, не довођење у заблуду наведене институције итд.) и да схватају да у супротном могу бити подвргнути законом предвиђеним казнама. Суд је утврдио да су нешто касније Лоујер и Саики променили мишљење и поднели петицију коју су сами потписали да они буду повучени са патентне молбе као подносиоци захтева за патент, што им је било и удовољено.

„Промега” је на суђењу (које је које је трајало 4 недеље), у фебруару 1999. године, успела да докаже да је „Цетус” добио патент на превару. Суд је утврдио да је патент добијен тако што је патентни биро био доведен у заблуду. Ово је произашло као резултат тога што су патентном бироу подносиоци захтева дали погрешно интерпретиране податке изостављајући важне чињенице и дајући погрешне податке са циљем да докажу да ензим који су изоловале две наведене групе аутора није исти производ који су они изоловали. Као пример може се навести да су тврдили да различите молекулске тежине ензима којег су они изоловали и оног који су изоловали ранији аутори значе и да су у питању различити производи. „Промегини” стручњаци су доказали да је у питању исти ензим, а да су разлике резултат другачијих метода које су коришћене приликом одређивања молекулске тежине и да су „Цетусови” стручњаци то знали, али су патентни биро довели у заблуду. Они су побили и све друге наводе из патентне пријаве на основу којих је „Цетус” тврдио да се ради о различитим ензимима, и доказали да су „Цетусови” стручњаци свесно доводили патентни биро у заблуду.

Суд је донео пресуду према којој се патент поништава и укидају сва ограничења везана за употребу *Taq* полимеразе у PCR-у. Овим ће „Хофман-Ла Рош” претрпети штету не само због губитка продаје и монопола на овај ензим, већ ће се суочити са новчаним одштетама и другим законским санкцијама.

Поништавање овог патента је врло значајно за научну заједницу јер ће омогућити свим произвођачима биотехнолошких производа да производе *Taq* полимеразу, што ће неминовно довести до повећања понуде и пада цена на тржишту. Ово истовремено може водити ка поништавању патената за овај ензим и у другим државама. Овим је суд исправио неправду нанесену научницима који су пре „Цетуса”

изоловали *Taq* полимеразу и свету је показано ко је заслужан за изоловање ензима важног за ову изузетно значајну хемијску реакцију.

Abstract

POLYMERASE CHAIN REACTION

Danko Obradović

University of Montenegro, School of Sciences, Biology Department, P.O.Box 211, 81000 Podgorica, Yugoslavia.

Molecular biologist often analyzes a DNA molecule sequence. Since 1984, when polymerase chain reaction (PCR) has been innovated by Kary B. Mullis, DNA molecule analysis was greatly simplified. PCR enable amplification of a DNA sequence in very large number of copies (billions or even more). This method has been applied in many fields: diagnostic of infectious diseases, criminology, and analysis of archeological samples (of human, animal and plant origin). It has made tremendous impact on scientific work as well as on everyday life. Kary Mullis became a Nobel Price winner in chemistry in 1993 for developing PCR.

ЛИТЕРАТУРА

- K. B. Möllis, Neobična istorià o tom, kak rodilasø polimeraznaø cepnaø reakciù, V mire nauki 6, (1990) 26-34.
- E. A. Rose, Applications of the polymerase chain reaction to genome analysis. The FASEB journal 5: 1 (1991) 46-54.
- M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, 1990.
- H. A. Erlich, PCR Technology, Stockton Press, New York, 1989.
- A. Chien, D. B. Edgar, J. M. Trela, Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophyle *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. 98 (1976) 1550-1557.
- A. S. Kaledin A. G. Slyusarenko, S. I. Gorodetskii, Isolation and properties of DNA polymerase from the extremely thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*, Biokhimiya 45 (1980) 644-651.
- F. C. Lawyer, S. Stoffel, R. K. Saiki, K. Myambo, R. Drmond, D. H. Gelfand, Isolation, Characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 6427-6437.
- M. A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand, M. A. D. Brow, DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 9436-9440.
- D. W. Leung, E. Chen, D. V. Goeddel, A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction, Technique 1 (1989) 11-15.
- S. Kwok, D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, J. J. Sninsky, Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies, Nucleic Acids Res 18 (1990) 999-1005.
- H. A. Erlich, D. Gelfand, J. J. Sninsky, Recent advances in the polymerase chain reaction, Science 252 (1991) 1643-1650.



БЕЛЕШКЕ

ХЕМИЈСКА ЧИТАНКА

Приредио проф. Живорад Чековић
Завод за уџбенике и наставна средства
Београд, 1999

Недавно се у књиџарским излозима појавила књига под необичним насловом **Хемијска читанка** коју је приредио професор Живорад Чековић са Хемијског факултета а издао Завода за уџбенике и наставна средства. Ова **Хемијска читанка** намењена је професорима и наставницима хемије у гимназијама, средњим и основним школама, али првенствено је намењена ученицима који показују нарочито интересовање за хемију. Садржаји ове **Читанке** могу побудити интересовање и код мање заинтересованих ученика као и код обичних, знатижељних људи, који се могу упознати са савременим достигнућима, могућностима и тајнама хемије.

Приређивач и идејни творац ове књиге, професор Чековић је пажљиво одабрао 37 најактуелнијих области и тема из најразличитијих делова хемије и за сваку тему одабара је најауторитативнијег научника за аутора прилога (35 аутора) да савремене и актуелне теме и материјале прикажу и представе на популаран начин, прикладан како професорима тако и ученицима. Књига је квалитетно штампана на 540 страна у тврдом повезу. Искусни гимназијски професори хемије својим рецензијама потврдилу су популарни карактер књиге и прилагођеност описа појединих тема потенцијалним читаоцима.

Садржај читанке сликовито је назначен на корицама саме књиге, где је симболично приказано да хемија нуди “решења за будућност”, решења многих проблема савременог света, као што су храна, здравље, енергија, лекови, материјали и други хемијски производи. Садржај Хемијске читанке, из најразличитијих области хемије и неких граничних области, толико је богат по савремености и научној и примењеној важности да би требало много простора да се детаљно прикаже. Већина тема није довољно обухваћена или није уопште обухваћена наставним програмима нити описана у постојећим уџбеницима хемије за средње школе.

У уводном поглављу се говори о томе шта је хемија данас и шта су њена савремена стремљенаја и достигнућа, затим у књизи се могу наћи чланци са новијим схватањима о хемијској еволуцији и постан-

ку живота на Земљи, о специфичностима и механизму дејства ензима као “покретача живота”, о хемијском саставу и деловању антибиотика, дрога и хлудиногених једињења. Описан је и хемијски карактер процеса старења живих организама, генетско инжењерство и техника клонирања. Изложена је веза између биологије и неорганске хемије, савремена аналитика у медицини и здравству и увек актуелна тема о биохемији хране и исхране. Дат је приказ о феромонима – једињењима помоћу којих комуницирају инсекти и други живи организми. У посебним поглављима описан је постанак хемијских елемената и синтезе елемената којих нема у природи, затим хемија драгуља, комплексних једињења и њихових примена. Енергетске теме описане су у одвојеним поглављима о хемијским изворима струје, нуклеарном горивом циклусу, о фузији као енергији будућности. У чланцима о материјалима приказани су полимерни материјали, композитни материјали, природна и вештачка влакна, тензиди и површински активне материје, боје, пестициди, легуре лакних метала, зеолити, нафта и експлозивни. Савремено и популарно обрађене су теме из основа хемија, као што су термодинамичка интерпретација хемијских реакција, структура и реактивност молекула, хемијске реакције од епрувете до реактора као и увек актуелне теме о загађењу ваздуха. На крају су приказани научни доприноси најзначајнијих хемичара у Србији.

Ова *Хемијска читанка* није уџбеник већ књига која се чита добровољно, без приморавања. Професор Чековић је њоме желео да хемију приближи сваком читаоцу, да је учини разумљивом и што приступачнијом, желео је да укаже да хемија није баук, већ благотворна и корисна наука, чија достигнућа користимо у најразличитије сврхе у свакодневном животу.

У овој књизи приређивач је настојао да хемију повеже са захтевима и потребама савременог света, да се објасне појмови о којима се често говори, да се представе и објасне материјали које свакодневно користимо. Настојао је да се о савременим појмовима, материјалима, хемијским једињењима, говори са што мање једначина и формула, терминологијом и стилем прихватљивим за професоре и радознале ученике. Професор Чековић је настојао да хемију реално постави усред човековог материјалног живота и да укаже да она није забава и циљ научника већ да је све у нама и око нас и да су вечите промене материје само хемијски процеси.

Снежана Бојовић



ВЕСТИ ИЗ СХД

СВЕЧАНА СКУПШТИНА СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА

Свечана годишња скупштина СХД одржана је у четвртак, 7. децембра 2000. године у Свечаној сали Ректората Универзитета у Београду, Студентски трг 1, са почетком у 11 часова

ПРОГРАМ

Порука Председништва Друштва

- Јован Јовановић: "Пиролитичко уље - димери и тримери индена"
- Уручивање годишњих награда и признања Друштва
- Бранко Дуњић: "Хиралне полиурее као носачи катализатора за асиметричну катализу"
- Из историје Друштва

И ове године наше Друштво доделило је, на Свечаној скупштини, своја традиционална признања студентима и својим члановима који су, својим радом, допринели унапређењу хемијске науке у нас.

Прва група признања била су студентска признања. Она су намењена најбољим дипломираним студентима хемије и хемијске технологије на Универзитетима у Србији, који су, по Правилнику о наградама СХД, дипломирали до краја јунског испитног рока текуће школске године са просечном оценом изнад 9,00.

За ову годину носиоци **специјалног признања СХД** за изванредан успех у студирању су:

- Биљана Шљукић, Факултет за физичку хемију, Београд (9,06)
- Милош Мандић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,06)
- Владимир Томовић, Технолошки факултет, Нови Сад (9,09)
- Петар Радишић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,11)
- Владан Бјелић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,14)
- Милка Игњатовић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,14)
- Милан Ђорђевић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,19)
- Мирослав Ранчић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,26)
- Дејан Анђелковић, Хемијски факултет, Београд (9,30)
- Саша Антонијевић, Хемијски факултет, Београд (9,40)
- Зорана Науновић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,40)
- Слађана Пришић, Хемијски факултет, Београд (9,71)

- Данијела Бубало, Хемијски факултет, Београд (9,73)

Добитници **годишње награде СХД за студенте**, која се додељује петором "најбољих међу најбољима" су:

- Душица Видовић, Природно-математички факултет, Крагујевац (9,43)
- Иван Димитријевић, Технолошко-металуршки факултет, Бгд. (9,43)
- Маја Парац, Факултет за физичку хемију, Београд (9,58)
- Срђан Рончевић, Институт за хемију ПМФ, Нови Сад (9,81)
- Огњен Миљанић, Хемијски факултет, Београд (9,93)

Друга група признања је проглашавање за **заслужног члана СХД**, које се заслужује преданом активносту у Друштву и у некој области хемије. Ове године за заслужног члана Друштва изабрани су:

- Вукадин Леовац
 - Данка Јовановић
 - Убавка Миоч
- Најзад, додељена су научна признања Друштва за допринос развоју хемијске мисли у нас. Од четири могућа признања:

- Медаље за трајан и изванредан допринос науци
- Медаље за прегалаштво и успех у науци
- Медаље за изузетан допринос примени науке у индустрији и
- Медаље за изванредне резултате у настави, ове године додељено је три.

Једно је **Медаља за прегалаштво и успех у науци**, која се додељује младим научним радницима и коју је, својим научним доприносом у области електрохемије, заслужио

- Бранимир Гргур
- Друго је **Медаља за изузетан допринос примени науке у индустрији** коју је, својим остварењима у примени микробиолошке хемије и биотехнологије у конкретним производима, заслужио
- Мирослав М. Врвић

Наше највеће научно признање - **Медаљу за трајан и изванредан допринос науци** - добио је

- Бојан Ђорђевић

за дугогодишњи плодан научни допринос на успостављању ригорозних модела при израчунавању термодинамичких особина бинарних и вишеконтентних једнофазних и вишефазних система.

Очекујемо да ћемо следеће године, у новембру месецу 2001., на Свечаној седници СХД бити у прилици да чујемо предавања данашњих добитника медаља: Бојана Ђорђевића и Бранимира Гргура.

САДРЖАЈ 41. ГОДИШТА ЧАСОПИСА ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

ЧЛАНЦИ:

Живорад Чековић , Један век хемије слободних радикала 1900-2000	4
Данко Обрадовић , Клонирање	12
Весна Медаковић и Снежана Зарић , Улога комплекса метала у еволуцији живота	20
Душанка Милојковић – Опсеница , Сорбенти у хроматографији на танком слоју	39
Олгица Недић , Алцхајмерова болест – протеинске наслаге у мозгу	44
Јован Вучетић, Гордана Гојгић-Цвијовић, Кристина Гончевић, Лидија Израел , Јестиве гљиве – цењени производ исхране	51
Снежана Бојовић , Хемијски кабинети у прошлом веку	64
Слободанка Станковић , Радиохемијски и хемијски аспекти угрожености животне средине	68
Дејан Полети и Јелена Роган , Да ли сте икада размишљали о молу и његовом месту у Међународном систему јединица?	92
Бранислав Чабрић и Ацо Јанићијевић , Зачеће и раст кристала у растопу	99
М. С. Павловић, А. Антић-Јовановић и Д. С. Пешић , Спектроскопија и откриће хемијских елемената. II	101
Вера Дондур, Пастирк Игор , Фемтосекундна спектроскопија прелазног стања (<i>FTS</i>). Нобелова награда за хемију за 1999. годину.	114
Иван Гутман , Прво једињење аргона	120
Ненад Стевановић, Иван Гутман, Бранислав Чабрић , На којој температури кључа вода?	122
Славица Стевановић , примена мембранских техника у методама хемијске анализе, I ДЕО: Развијене технике	122
Данко Обрадовић , Реакција полимеризације ланца (ПЦР)	128

ПРЕВОДИ:

Трикови са нестајањем	46
Канабис- треба ли га забранити или преписивати на рецепт?	77

ВЕСТИ ИЗ ШКОЛА:

Бранислав Чабрић и Тања Деспотовић , Школска апаратура за добијање монокристала	25
Слободан Грујић , Савремена школа – реорганизација школства	56
Тибор Ј. Сабо , Како савладати писање хемијских формула	81
Борис Пејин , Додатна настава	89
Мирјана Миланков , Пројекат часа активне наставе из хемије, (догађај – активност)	106
Драгица Шишовић , Знање хемије на пријемном испиту на Хемијском факултету у Београду	126

ВЕСТИ ИЗ СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА

In Memoriam

Милица Жунић	34
Војка Антонијевић	58
Владимир Рекалић	133
Милан Курепа	134
ДИСКУСИОНИ ФОРУМ	130

БЕЛЕШКЕ

Ида Нодак	60
Решење хемијске слагалице	87
Посвета академику проф. др Слободану Рибникару поводом његовог 70-ог рођендана	110
Барометар	125
Хемијска читанка	141