


МИНОБРНАУКИ РОССИИ

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

Институт Естественных наук
Кафедра химии

Утверждено на заседании кафедры
химии
«16» марта 2020г., протокол №8

Заведующий кафедрой

 В.А. Алферов

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Биополимеры»**

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата**

по направлению подготовки
06.03.01 Биология

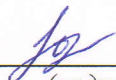
с направленностью (профилем)
Биоэкология

Форма(ы) обучения: очная, очно-заочная, заочная
Идентификационный номер образовательной программы: 060301-01-20

Тула 2020год

Разработчики методических указаний

А.А.Горячева, доцент, к.х.н., доцент
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)


(подпись)

СОДЕРЖАНИЕ

Раздел I. БЕЛКИ	5
Цветные реакции на аминокислоты. Анализ аминокислотного состава белков	6
Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков	6
Работа 2. Хроматографический метод определения аминокислот.....	15
Работа 3. Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Серенсену	18
Физико-химические свойства белков.....	22
Работа 4. Определение изоэлектрической точки казеина	22
Работа 5. Определение температуры коагуляции яичного белка.....	24
Работа 6. Осаждение белков. Денатурация белков.	25
Очистка и разделение белков	27
Работа 7. Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа	27
Работа 8. Отделение белка от низкомолекулярных примесей методом геле-фильтрации.....	29
Работа 9. Разделение смеси белков методом электрофореза в полиакриламидном геле.....	33
Количественное определение белков	40
Работа 10. Количественное определение белка биуретовым методом	40
Работа 11. Количественное определение белка по методу Лоури	43
Работа 12. Количественное определение белка по методу Брэдфорд	45
Работа 13. Рефрактометрическое определение белка в биологических жидкостях	46
Тесты и задачи для самоконтроля	48
Раздел II. УГЛЕВОДЫ.....	52
Работа 14. Качественные реакции на углеводы	52
Работа 15. Энзиматический метод количественного определения глюкозы	59
Работа 16. Колориметрический метод определения сахаров.....	62
Тесты и задачи для самоконтроля	65
Раздел III. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.....	67
Работа 17. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов из гидролиза.....	67
Работа 18. Выделение плазмидной ДНК.....	69
Работа 19. Визуализация препаратов плазмидной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.....	71
Тесты и задачи для самоконтроля	77
Раздел IV. ЛИПИДЫ.....	79
Работа 20. Качественные реакции на липиды	79
Работа 21. Рефрактометрическое определение жира в сливочном масле	82
Работа 22. Сравнение ненасыщенности жиров	83
Работа 23. Определение иодного числа	84
Работа 24. Определение состава биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии.....	85

Тесты и задачи для самоконтроля	89
Приложение 1. Зависимость показателя преломления от концентрации белка в растворе.....	92
Приложение 2. Зависимость показателя преломления от содержания жира в сливочном масле	94
Библиографический список.....	95

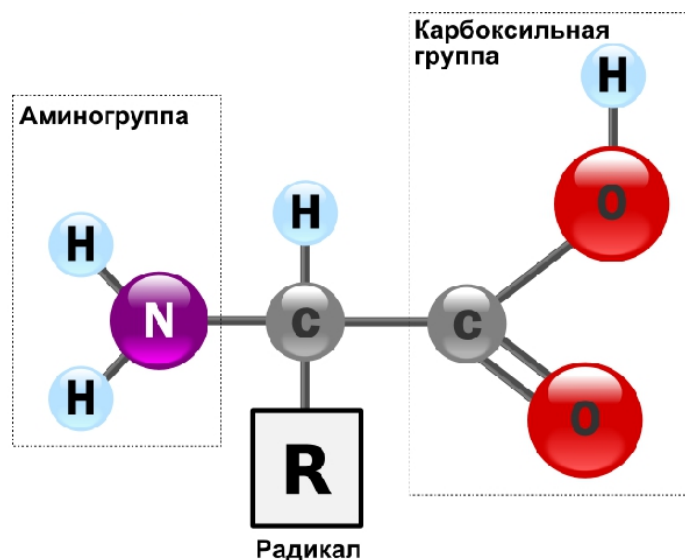
Раздел I. БЕЛКИ

Белки или *протеины* (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие») – это биологические полимеры, состоящие из α -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Белки делятся на простые и сложные. *Простые белки* состоят только из аминокислотных остатков. *Сложные белки* помимо пептидных цепей содержат в своем составе простетические группы – небелковые вещества, различные по химическому строению (нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, ионы металлов и др.).

Белки, количественно преобладают над всеми макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов.

Разнообразие существующих в природе белков определяется аминокислотным составом. Все 20 аминокислот, встречающихся в белках, характеризуются общей структурной особенностью – наличием карбоксильной и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода. Различаются же аминокислоты боковыми цепями (R-группами). Общая формула α -аминокислот:



Белки имеют несколько уровней структурной организации: первичный, вторичный, третичный и в некоторых случаях четвертичный.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков

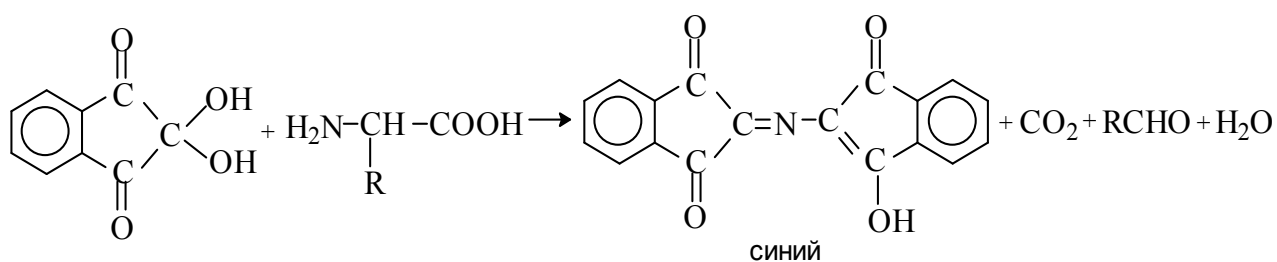
Цель работы – Сравнить питательную ценность различных белков.

Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот. Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты.

Материал исследования: раствор яичного белка, раствор желатина (коллаген).

Опыт 1. *Нингидриновая реакция*

При взаимодействии α -аминокислот с трикетоним – нингидрином происходит одновременное окислительное дезаминирование и декарбоксилирование с образованием альдегида и окрашенного продукта конденсации.



Реактивы и оборудование: 1% раствор нингидрина в 95% ацетоне, водяная баня, пробирки, пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов белков, добавляют по 2 капли раствора нингидрина, содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора
-----------------------	---------------

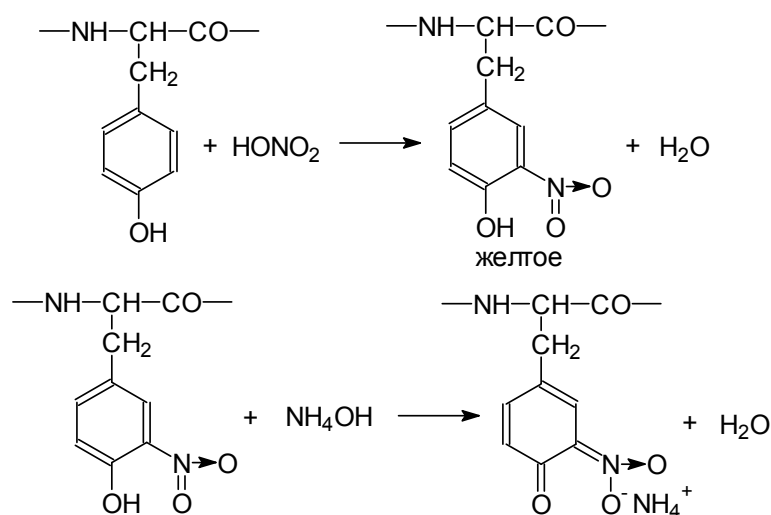
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о наличии аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 2. *Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)*

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии ароматических аминокислот в белках (фенилаланина, триптофана, тирозина), поэтому она является качественной на *ароматические аминокислоты*.

При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание за счет образования нитропроизводных ароматических аминокислот. При подщелачивании раствором аммиака желтое окрашивание переходит в оранжевое (образуются аммонийные соли хиноидной структуры):



Реактивы и оборудование: концентрированная азотная кислота; концентрированный раствор аммиака; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В разные пробирки наливают по 5 капель растворов белков (биологические жидкости), 0,01% раствора тирозина. Во все пробирки добавляют по 3–5 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают. Пробирки охлаждают, к охлажденным растворам осторожно прибавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака.

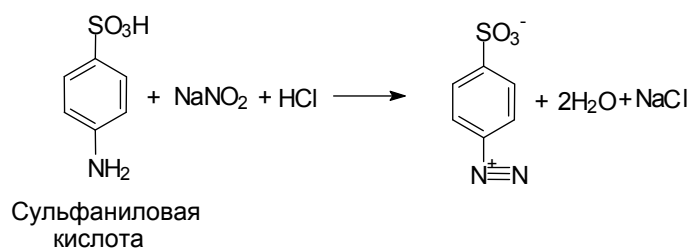
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора			
	Исходный раствор	После добавления HNO ₃	После нагревания	После нейтрализации

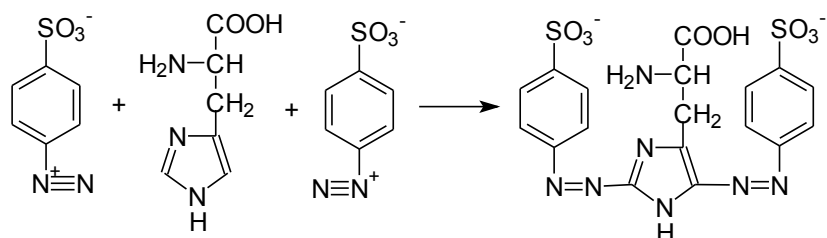
По результатам опыта делают вывод о содержании ароматических аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 3. Реакция на гистидин и тирозин (Паули)

При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота.



При реакции последней с гистидином или тирозином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, пробирки, пипетки.

Ход работы.

1. К 1 мл раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 2 мл раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают (несколько пробирок). Затем в каждую пробирку добавляют 2 мл анализируемых растворов белков, 0,01% раствор гистидина и во все пробирки по 6 мл раствора соды.
2. Описанная выше реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству диазореактива (соотношение компонентов см. выше) добавляют

несколько капель 10% раствора соды и осторожно по стенке пробирки наслаивают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется окрашенное кольцо.

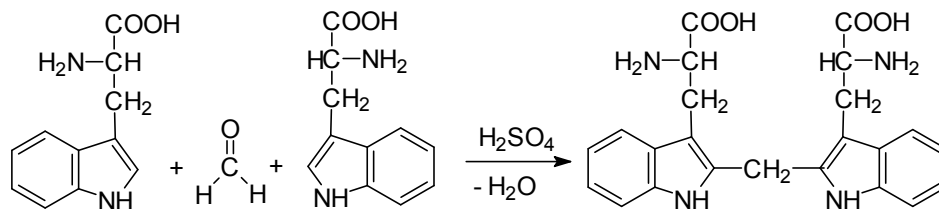
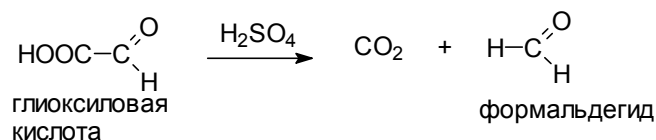
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

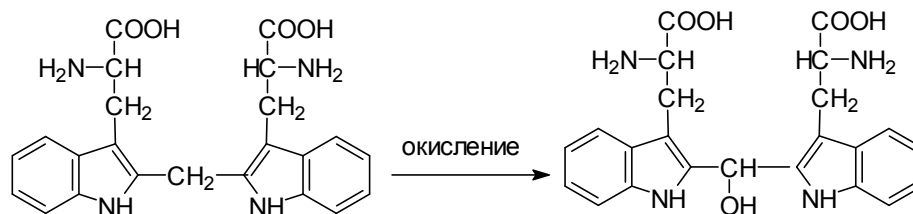
По результатам опыта делают вывод о содержании гистидина или тирозина в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на триптофан (Гопкинса-Коле или Адамкевича)

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты.



Продукт конденсации окисляется, в присутствии минеральных кислот образуются окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).



Реактивы и оборудование: раствор глиоксиловой кислоты¹; 0,04М раствор сульфата меди (II); концентрированная серная кислота; ванночка со льдом; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают 0,5 мл растворов исследуемых белков, 0,01% раствора триптофана. В каждую пробирку добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл раствора глиоксиловой кислоты и по 10 капель раствора сульфата меди, перемешивают, и нагревают до растворения образующегося осадка. Осторожно приливают небольшими порциями по стенкам пробирок 2-3 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешались. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

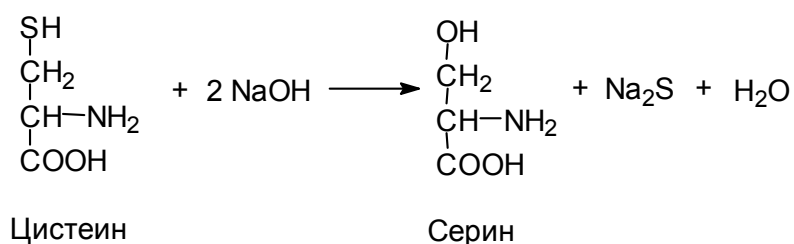
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

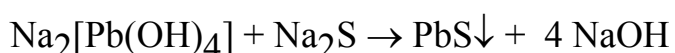
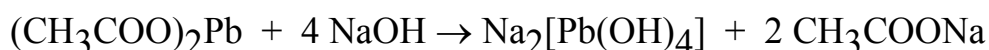
По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 5. Реакция на «слабосвязанную серу» в белке (реакция Фолья)

При кипячении цистеина и цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, образующего сульфид натрия:



Образование сульфид-ионов можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих нерастворимый сульфид PbS черного цвета:



¹ Глиоксиловая кислота. К 2 г магния в порошок, слегка увлажненного, приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного при 0°C насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды. Фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 200 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.

Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия; 1% раствор ацетата свинца; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 5 капель растворов анализируемых белков, 0,01% раствор цистеина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора гидроксида натрия и по 1 капле раствора ацетата свинца и нагревают пробирки на кипящей водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 6. Реакция на триптофан (Ваузена)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.

Реактивы и оборудование: 2,5% раствор формальдегида; соляная кислота (плотность не менее 1,175); 0,5% раствор нитрита натрия; пробирки; пипетки.

Ход работы. К 2 мл раствора исследуемого белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 6 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 10 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

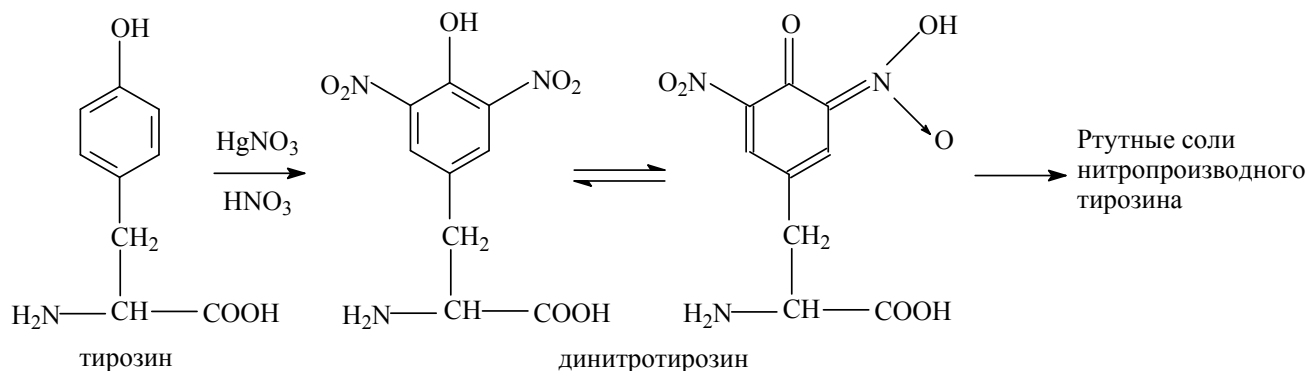
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на тирозин (Миллона)

При нагревании растворов большинства белков с реактивом Миллона (состоящим из смеси азотнокислых и азотистых солей ртути, растворенных в концентрированной азотной кислоте) образуется осадок, окрашенный в красный цвет.



Реакция обусловлена присутствием в белке ароматической аминокислоты тирозина, которая дает ртутную соль своего нитропроизводного. Если реакцию проводить с раствором тирозина, то осадок не образуется, жидкость окрашивается в красный цвет.

Эта реакция широко используется для количественного определения тирозина в гидролизатах белка и для определения некоторых производных тирозина.

Реактивы и оборудование: реактив Миллона²; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают по 5 капель исследуемых растворов белков, 0,01% раствор тирозина. В каждую пробирку добавляют по 2 капли реактива Миллона и осторожно нагревают.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

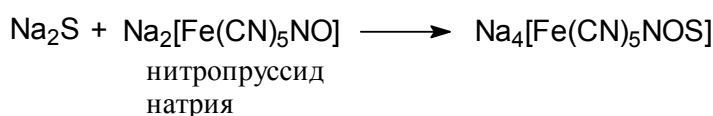
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

² Одну часть ртути растворяют в двойном по массе количестве азотной кислоты (плотность 1,40) сначала на холоде, затем на водяной бане. Полученный раствор разбавляют двойным объемом воды.

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 8. *Нитропруссидная реакция*

Если раствор белка обработать щелочью и после охлаждения добавить свежеприготовленный раствор нитропруссид натрия, жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена присутствием в белке серосодержащих аминокислот, которые при кипячении со щелочью разрушаются с образованием сульфида натрия. Нитропруссид взаимодействует с сульфидом с образованием окрашенного комплекса:



Реактивы и оборудование: 5% раствор нитропруссид натрия; насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 5 капель растворов белков, 0,01% раствор цистеина, приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и 2–3 капли нитропруссид натрия. Затем раствор подщелачивают несколькими каплями крепкого раствора аммиака.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

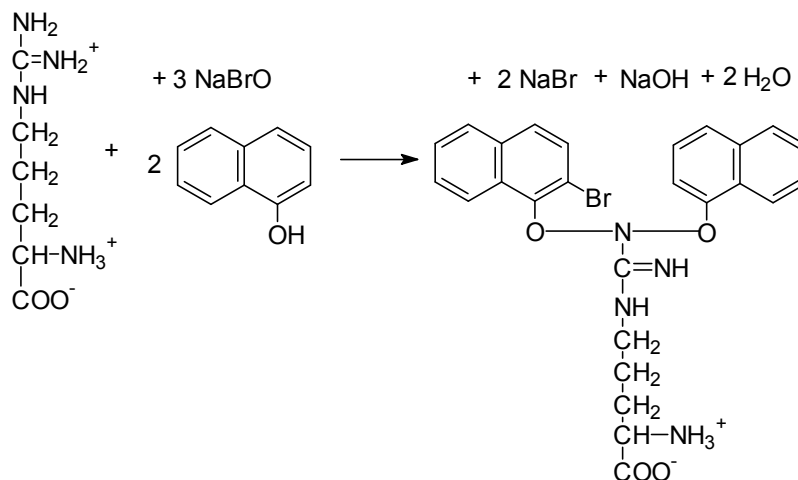
По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Опыт 9. *Реакция на аргинин (Сакагучи)*

При добавлении к раствору белка щелочи, гипобромита и α-нафтола жидкость окрашивается в красный цвет.

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина (гуанидиноаминовалериановой кислоты). В результате реакции образуется соединение красного цвета, представляющее собой продукт конденсации окисленного

аргинина с α -нафтолом. Гипобромит играет роль окислителя и участвует в образовании промежуточного бромамидного соединения аргинина.



Реакция Сакагучи не является строго специфичной. Ее дают и другие монозамещенные гуанидины.

Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия; 0,2% спиртовой раствор α -нафтола; 2% раствор гипобромида натрия³ насыщенный раствор сульфата аммония; концентрированный раствор аммиака; пробирки; пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 5 капель растворов белков и добавляют по 5 капель раствора щелочи, по 3 капли раствора α -нафтола и по каплям раствор гипобромита натрия. Присутствие аммиака и избыток гипобромита мешают реакции.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании аргинина в анализируемых белках.

³ Гипобромид натрия имеет желтую окраску, бесцветный раствор не годится для этой реакции. Раствор следует плотно закрывать пробкой.

Работа 2. Хроматографический метод определения аминокислот

Цель работы – освоить методы разделения аминокислот, основанные на различных физико-химических свойствах аминокислот.

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смеси аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов.

Довольно точным и доступным является метод распределительной хроматографии на бумаге (модификация адсорбционной хроматографии). Метод заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на полоску фильтровальной бумаги, конец которой опускают в подходящий органический растворитель. Растворитель засасывается полоской бумаги и увлекает за собой нанесенные на бумагу аминокислоты. Скорость перемещения аминокислот зависит от химического строения аминокислот и их способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. В качестве подвижного растворителя употребляют, например, водонасыщенный фенол (или бутанол, амиловый спирт и др.) Неподвижным растворителем является вода, пары которой насыщают фильтровальную бумагу (внешне бумага остается сухой). Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в феноле, тем быстрее они движутся вслед за фронтом органического растворителя.

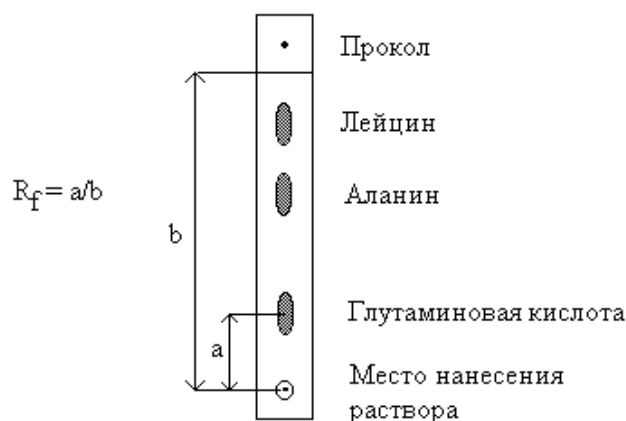


Рис. 1. Хроматограмма аминокислот.

Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином. Реакцию проводят путем опрыскивания из пульверизатора высушенной полоски бумаги 0,1–0,2% спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием ее в сушильном шкафу. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты). Скорость перемещения отдельных аминокислот может быть выражена посредством коэффициента распределения (R_f). Коэффициентом распределения называют отношение пути, пройденного аминокислотой (от места ее нанесения на бумагу до середины пятна на хроматограмме), к расстоянию от места нанесения смеси аминокислот до фронта растворителя:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

где a — расстояние от места нанесения раствора до середины пятна данной аминокислоты, мм; b — путь, пройденный растворителем, мм.

Коэффициент распределения является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.).

Материал исследования: растворы аминокислот 7,5 мг/мл, смесь аминокислот.

Реактивы и оборудование: растворитель (изопропанол:вода=70:30), нингидрин (0,2% раствор в ацетоне), хроматографическая бумага (Silufol UV 254), ножницы, пинцет, капилляры или микропипетки, пульверизатор, хроматографическая камера.

Ход работы

Вырезать пластинку хроматографической бумаги 10 см×10 см. На расстоянии 1 см от нижнего и верхнего края начертить карандашом линию старта и финиша, соответственно. По ширине пластины (на линии старта) наметить 4 точки нанесения аминокислот на равных расстояниях друг от друга.

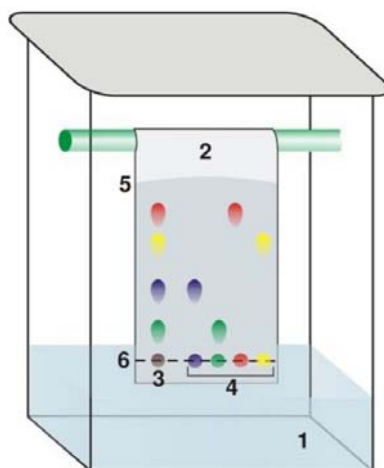


Рисунок. 2. Устройство хроматографической камеры (1 – растворитель, 2 – хроматографическая пластина, 3 – смесь аминокислот, 4 – аминокислоты, 5 – фронт растворителя, 6 – место нанесения растворов).

При использовании пластин для хроматографирования необходимо их предварительно подготовить. Это связано с тем, что адсорбенты пластин при хранении сорбируют не только влагу, но и другие вещества, содержащиеся в воздухе. При использовании неподготовленных пластин в процессе хроматографирования появляется фронт "грязи", который может мешать определению веществ, имеющие большие значения R_f , а некоторые вещества, например вода, могут изменять состав подвижной фазы, изменяя тем самым получаемые значения R_f . Предварительная подготовка пластин заключается в разгонке пластин растворителем на всю высоту пластинки, с последующей сушкой пластины. На подготовленную пластину с помощью капилляра или автоматической микропипетки осторожно наносят по 10 мкл (2 раза по 5 мкл) растворов аминокислот или смесь. После нанесения аминокислот пластину слегка подсушивают на воздухе, затем помещают в хроматографическую камеру и ждут поднятия фронта растворителя до линии финиша. Подсушенную на воздухе пластину об-

рабатывают из пульверизатора раствором нингидрина и высушивают при температуре 95-110°C. Получают хроматограмму аминокислот. Рассчитывают R_f для всех аминокислот.

Оформление работы. Записывают условия проведения эксперимента, зарисовывают хроматограмму, находят R_f всех аминокислот в смеси, сравнивают с литературными данными. Отмечают цвет аминокислот на хроматограмме.

Таблица 1.

Коэффициенты распределения R_f для некоторых аминокислот

Аминокис- лота	изопропиловый спирт	ацетон	фенол, насыщенный водой	н-бутиловый спирт – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:1)
Глицин	0,743	0,983	0,41	0,34
Аланин	0,984	0,455	0,56	0,39
Валин	0,91	0,385	0,76	0,56
Лейцин	0,92	0,507	0,87	0,72
Треонин	0,98	0,843	0,47	0,36
Лизин	0,764	0,902	0,82	0,16
Аргинин	0,656	0,784	0,90	0,18
Метионин	0,306	0,692	0,83	0,58
Фенилаланин	0,808	0,654	0,87	0,66
Тирозин	0,673	0,623	0,63	0,53
Триптофан	0,805	0,733	0,75	0,62
Аспарагино- вая кислота	0,481	0,884	0,15	0,33

Работа 3. Кислотный гидролиз белков и формоловое титрование по Серенсену

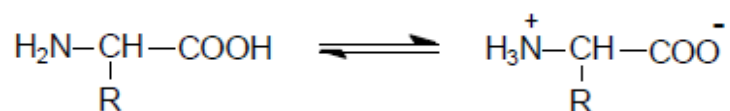
Цель работы – выяснить условия разрушения первичной структуры белков и освоить титрометрический метод определения концевых карбоксильных групп пептидов.

Гидролиз белков является важным методом исследования для расшифровки первичной структуры белков. При кислотном гидролизе разрушаются некоторые аминокислоты: триптофан подвергается полному разрушению, а серин,

треонин, цистеин, тирозин, фенилаланин – частично. Однако процент разрушенных аминокислот невелик. При щелочном гидролизе белка наблюдается более сильное разрушение аминокислот.

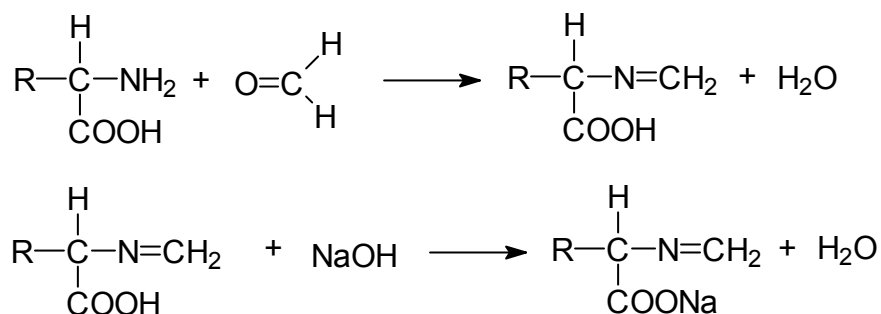
При кислотном гидролизе белки распадаются на высокомолекулярные пептиды, низкомолекулярные пептиды, дипептиды, аминокислоты⁴. Полный гидролиз белка протекает при многочасовом кипячении раствора в круглодонной колбе с воздушным холодильником в присутствии соляной кислоты.

За ходом гидролиза белка позволяет следить метод формолового титрования. Этот метод служит для определения количества карбоксильных групп, которое увеличивается вследствие разрыва пептидных связей в процессе гидролиза. В водных растворах аминокислоты образуют внутримолекулярные соли, например глицин:



Поэтому без предварительного блокирования аминогрупп формальдегидом непосредственно титровать карбоксильные группы аминокислот щелочью невозможно.

В процессе реакции формальдегид блокирует α-аминогруппу. Образовавшееся метиленовое соединение оттитровывается щелочью.



Определяя количество карбоксильных групп титрованием, можно судить и о содержании аминных групп, так как количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминных групп.

⁴ При кислотном гидролизе белка, помимо аминокислот, получают аммиак, сероводород, окрашенные продукты гидролиза – гуминовые вещества и другие соединения.

При полном гидролизе белка количество аминных групп и карбоксильных групп в гидролизате перестает увеличиваться, и биуретовая реакция становится отрицательной.

Материал исследования: яичный белок.

Реактивы и оборудование: концентрированная соляная кислота; 1% и 10% растворы гидроксида натрия; 1% раствор уксусной кислоты; 20% раствор формалина (нейтральный)⁵; 0,5% раствор фенолфталеина; 0,05 н раствор гидроксида натрия (из 0,1 н титра); универсальная индикаторная бумага (нарезают на кусочки 1 см); животный уголь (тщательно измельченный); 5% раствор сульфата меди. Колба круглодонная с воздушным холодильником; стеклянные палочки; конические колбы для титрования; пипетки; микробюретка; макробюретка; цилиндр объемом 25 мл.

Ход работы.

1. Гидролиз белка.

В круглодонную колбу отмеривают 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19), колбу закрывают воздушным холодильником и закрепляют на штативе с асбестовой сеткой. Содержимое колбы кипятят под тягой в течение 45–90 мин с начала кипения (по указанию преподавателя).

2. Формоловое титрование.

2.1. Титрование карбоксильных групп в растворе белка до гидролиза.

Отмеривают в колбочку 1 мл раствора яичного белка, приливают 5 капель 20% нейтрального раствора формалина и 3 капли 0,5% раствора фенолфталеина. Титруют из микробюретки 0,05 н раствором гидроксида натрия до устойчивой бледно-розовой окраски.

2.2. Титрование карбоксильных групп после гидролиза белка.

Снимают холодильник, а в колбочку всыпают (на кончике шпателя) животный уголь для обесцвечивания буроватого раствора, взбалтывают и кипятят

⁵ Формальдегид содержит примесь муравьиной кислоты, которая образуется при стоянии, поэтому формальдегид перед употреблением следует нейтрализовать. Для этой цели 10 мл раствора формалина титруют 0,05 н. Раствором щелочи с 2 каплями фенолфталеина до слабо-розовой окраски.

5 мин. Затем гидролизат охлаждают, выливают в цилиндр, доводят объем жидкости до 25 мл дистиллированной водой и фильтруют. Отмеривают в колбочку 1,25 мл гидролизата, добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и нейтрализуют 10% раствором гидроксида натрия из макробюретки до слабо-розовой окраски (объем раствора щелочи не учитывают). Если при нейтрализации окраска становится ярко-красной, то добавляют до обесцвечивания 1% раствор уксусной кислоты по каплям. Затем приливают 5 капель нейтрального 20% формалина и обесцвеченный раствор титруют 0,05 н раствором гидроксида натрия до бледно-розовой окраски и точно отмеряют объем затраченной щелочи. Проводят расчет азота аминокрупп по количеству затраченной щелочи, исходя из ее нормальности. Нормальному раствору щелочи соответствует 14 г азота в 1 л или 14 мг в 1 мл; 1 мл 0,05 н раствора соответствует 0,07 мг азота.

3. Открытие промежуточных продуктов распада белка в гидролизате при помощи биуретовой реакции.

В пробирку наливают 5 капель гидролизата белка и нейтрализуют 10% раствором щелочи по универсальной индикаторной бумаге (рН 9). После нейтрализации гидролизата проводят биуретовую реакцию, прибавляя 2 капли раствора сульфата меди. Появляется фиолетовое окрашивание. При полном гидролизе белка биуретовая реакция отрицательная.

Оформление работы.

Записывают ход работы, все расчеты, заполняют таблицу.

Время гидролиза, мин	Содержание азота аминокрупп, мг/мл	Полнота гидролиза (биуретовая реакция)

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Работа 4. Определение изоэлектрической точки казеина

Цель работы – Выявить зависимость поверхностного заряда белков от pH раствора. Усвоить понятие изоэлектрической точки белка.

Все белки обладают электрическим зарядом. Величина заряда определяется количеством ионогенных групп аминокислот, входящих в состав белка. Суммарный заряд белка изменяется в зависимости от pH и при определенном значении pH (изоэлектрическая точка, pI) равен 0. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы и белки легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение pI белка может быть сведено к определению pH раствора, при котором наблюдается наибольшее помутнение раствора белка. Нахождение изоэлектрической точки для отдельных белков позволяет подобрать условия осаждения для них и разделить белки с разными изоэлектрическими точками при их очистке.

Материал исследования: $\approx 0,4\%$ -ный раствор казеина в 0,2 моль/л растворе ацетата натрия⁶.

Реактивы и оборудование: 0,2 моль/л раствор уксусной кислоты; дистиллированная вода; пробирки; пипетки.

Ход работы. Для приготовления буферных растворов с определенным значением pH наливают последовательно в 6 сухих пробирок реактивы в количествах, указанных в таблице.

⁶ Взвешивают 1 г немного подсушенного на воздухе казеина и растворяют его в 100 мл 0,2 моль/л раствора ацетата натрия.

№ пробы	Состав пробы, мл			рН смеси
	CH ₃ COOH, 0,2 М	H ₂ O	Раствор казеина в 0,2 М CH ₃ COONa	
1	1,6	0,4	0,2	3,8
2	0,8	1,2	0,2	4,1
3	0,4	1,6	0,2	4,4
4	0,2	1,8	0,2	4,7
5	0,1	1,9	0,2	5,0
6	0,06	1,94	0,2	5,3

После этого смесь в пробирках встряхивают и измеряют оптическую плотность раствора при 590 нм относительно воды. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл этилового спирта и снова измеряют оптическую плотность.

Оформление работы. Результаты работы оформить в виде графика зависимости значения рН раствора от оптической плотности до и после добавления этилового спирта.

рН	Оптическая плотность раствора казеина	
	до добавления спирта	после добавления спирта
3,8		
4,1		
4,4		
4,7		
5,0		
5,3		

В выводе отметить изоэлектрическую точку казеина. Сравнить с литературными данными.

Работа 5. Определение температуры коагуляции яичного белка

Цель работы - Освоить метод определения температуры коагуляции белка.

При увеличении температуры белки *денатурируют* (т.е. теряют свою третичную и вторичную структуру), как правило, необратимо. Температура денатурации белков различается. Однако большинство белков животного происхождения денатурируют при температуре выше 40°C, именно поэтому температура 42°C является критической для человеческого организма.

Материал исследования: яичный белок.

Реактивы и оборудование: прибор для определения температуры плавления; пробирка (диаметр 3–4 мм, высота 2–3 см); капилляр или капиллярная пипетка.

Ход работы. Неразбавленный яичный белок вносят в пробирку капилляром или капиллярной пипеткой в таком количестве, чтобы его высота достигла 1 см. Пробирку прикрепляют к термометру прибора для определения температуры плавления и монтируют его в прибор (рис. 3).

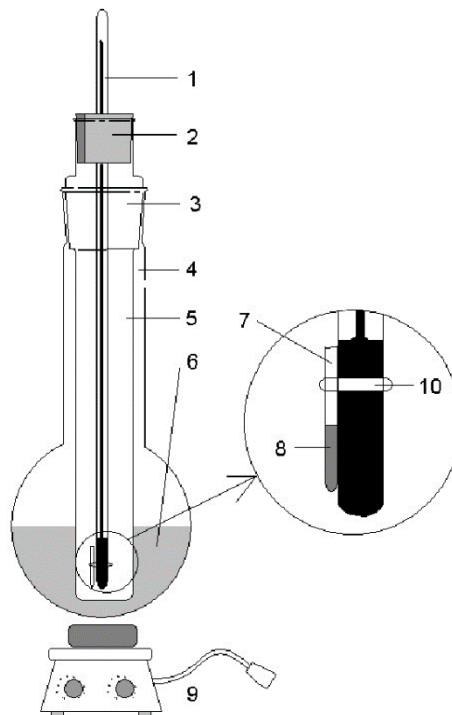


Рис. 3. Прибор для определения температуры плавления.

1 – термометр; 2 – пробка для крепления термометра с отверстием для сообщения внутреннего пространства колбы и пробирки с атмосферой; 3 – пробка для

крепления пробирки; 4 – круглодонная колба; 5 – пробирка; 6 – теплоноситель (глицерин, серная кислота, силиконовое масло, дибутилфталат); 7 – капилляр; 8 – вещество; 9 – колбонагреватель; 10 – резиновое колечко или проволока

Прибор нагревают, отмечают температуру, при которой начинается помутнение белкового раствора, и температуру, при которой происходит полное свертывание белка.

Оформление работы. Полученные данные заносят в лабораторный журнал. Делают выводы.

Работа 6. Осаждение белков. Денатурация белков.

Белки могут быть высажены из раствора не только под действием сильных электролитов, но и с помощью других методов, например: добавлением к раствору белка солей тяжелых металлов, минеральных кислот, а также при нагревании.

Осадочные реакции на белки применяются для обнаружения и количественного определения белков в различных субстратах.

Опыт 1. *Осаждение белков солями тяжелых металлов*

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 10 % раствор ацетата свинца, штатив с пробирками.

Ход работы. В пробирку к 5 каплям раствора белка прибавить 1 каплю раствора ацетата свинца. Происходит помутнение раствора.

Опыт 2. *Осаждение белков при нагревании*

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, штатив с пробирками, спиртовки.

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного альбумина.

1. В первую пробирку добавляют 1-3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется.

2. К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает хлопьевидный осадок. Это объясняется тем, что при добавлении к коллоидному раствору белка кислоты мицеллы теряют заряд, белок при этом находится в изоэлектрическом состоянии.

3. Содержимое третьей пробирки нагревают до помутнения раствора.

4. В четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется.

5. В пятую пробирку добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают. Выпадает осадок белка.

Оформление работы. Результаты опытов занести в таблицу. Объяснить наблюдаемые явления.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения
1	$Pb(CH_3COO)_2$	
2	Кислая (10% раствор CH_3COOH)	
3	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)	
4	Нейтральная	
5	Щелочная (10% раствор $NaOH$)	
6	Кислая (10% раствор CH_3COOH) + насыщенный раствор $NaCl$	

ОЧИСТКА И РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Осадки белка, полученного при высаливании, обычно очищают от примесей солей методом *диализа* или *гель-фильтрации*. В основе этих методов лежит различие в молекулярной массе белка и соли.

Работа 7. Обессоливание раствора яичного альбумина методом диализа

Цель работы – освоить методы очистки белка от низкомолекулярных примесей. Провести обессоливание белка методом диализа.

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных веществ и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран (целлофана, пергамента и др.). Обладая бóльшим диаметром, белковые молекулы не способны проникать через такие мембраны, в то время как частицы низкомолекулярных веществ легко проходят через них. Способ диализа положен в основу аппарата «искусственная почка», которая применяется для очищения крови от шлаков и токсических веществ.

Материал исследования: 1%-ный раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: сульфат аммония, хлорид натрия, раствор нитрата серебра, раствор хлорида бария, нингидрин, водяная баня, стакан вместимостью 300 мл, целлофан, стеклянная трубочка диаметром 10 мм, стеклянные палочки, нитки, ножницы, пипетки, пробирки.

Ход работы.

1. Из целлофана вырезают круг диаметром 20 см и делают диализный мешочек, собрав края вырезанной фигуры вокруг стеклянной трубочки и обвязав их ниткой.

2. Диализный мешочек привязать к палочке и опускают в стакан с дистиллированной водой (рис. 4).

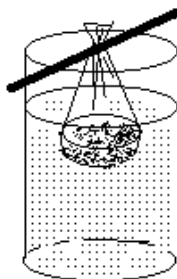


Рисунок 4. Диализатор в рабочем состоянии

3. Через трубочку заполняют мешочек раствором белка, так чтобы уровень жидкости в мешочке был ниже уровня воды в стакане. К раствору белка в мешочке добавляют немного соли NaCl (или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

4. Через 1 час от начала диализа берут в две пробирки по 1 мл жидкости из стакана и проделявают две реакции:

а) на присутствие ионов Cl^- (или SO_4^{2-}): добавляют в первую пробирку раствор AgNO_3 (или соответственно BaCl_2). Наблюдают образование белого осадка.

б) на присутствие белка: добавляют во вторую пробирку кристаллик нингидрина, нагревают на водяной бане при 70°C , отмечают результат.

5. Жидкость из мешочка разделяют на две пробирки: в одной, проделявают нингидриновую реакцию, в другой, реакцию на присутствие Cl^- (или SO_4^{2-}) ионов.

Оформление работы. В лабораторный журнал зарисовывают диализатор, кратко записывают ход выполнения работы и сделанные реакции.

Результаты оформляют в виде таблицы, отметив знаками «плюс» и «минус» наличие реакции:

Определяемые компоненты	До диализа		После диализа	
	внешняя жидкость	внутренняя жидкость	внешняя жидкость	внутренняя жидкость
Белок				
SO_4^{2-}				

В выводах отметить, какое свойство белка демонстрирует метод диализа.

Работа 8. Отделение белка от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации

Цель работы – освоить хроматографические методы очистки и разделения белков. Очистить белок от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации.

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить достаточно быстро и полно с помощью гель-фильтрации. Разделение веществ этим методом основано на различии в размерах молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, в то время как небольшие молекулы попадают через поры в гранулы, вследствие этого задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью. Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принципу молекулярного сита.



Рис. 5. Колонка для отделения белков от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой. Например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название – сефадексы). При изготовлении сефадексов полисахаридные цепи декстрана соединяются поперечными сшивками. Существует несколько типов сефадекса, различающихся как размером и количеством, так и величиной гранул.

Это позволяет применять их для разделения веществ с разными размерами молекул. Благодаря высокому содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше способность геля к набуханию, тем больше номер сефадекса.

Сефадексы отличаются степенью сшивки молекул декстрана друг с другом. Это находит выражение в различной набухаемости гранул сефадекса и пределах эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена их классификация (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика некоторых видов сефадексов

Марка сефадекса	Предел эксклюзии, в единицах молекулярной массы	Поглощение воды, мл/г	Удельный объем в колонке, см ³ /г	Время полного набухания при комнатной температуре, ч	Диапазон фракционирования белков по молекулярной массе, тыс.
G-25	5000	2,5±0,2	4 – 6	3	1,0 – 5,0
G-50	10000	5,0±0,3	9 – 11	3	1,5 – 30
G-75	50000	7,5±0,5	12 – 15	24	3,0 – 75
G-100	100000	10,0±1,0	15 – 20	48	4,0 – 150
G-150	150000	15,0±0,5	20 – 30	72	5,0 – 300
G-200	200000	20,0±2,0	30 – 40	72	5,0 – 600

Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25.

Применение сефадексов для фракционирования сложных белковых смесей типа тех, что характерны для биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа беспозвоночных и т. п.) или экстрактов, полученных из животных и растительных тканей, малоэффективно: удастся лишь разделить смесь белков на несколько групп. Тем не менее, в ряде случаев это первая стадия при выделении индивидуальных белков. Сефадексы применяют также на заключительных этапах очистки белка от примеси сопутствующего белка, если последний достаточно резко отличается от первого по величине молекулярной массы.

В последнее время сефадексы применяют для определения молекулярной массы белков путем сопоставления величин свободного (т. е. не занятого гранулами сефадекса) и элюируемого (т. е. необходимого для выноса белка из колонки) объемов колонки.

Материал исследования: яичный альбумин (1%-ный раствор в 0,5%-ном растворе бихромата калия), голубой декстран 1%-ный раствор.

Реактивы и оборудование: биуретовый реактив, колонка размером 1×25 см с гелем сефадекса G-25 (4 г в 200 мл дистиллированной воды), дистиллированная вода, штативы с пробирками, пипетки.

Ход работы.

1. Заполнение колонки.

4 г сефадекса предварительно заливают 200 мл 0,09 М раствора хлорида натрия в литровом стакане, хорошо перемешивают и оставляют на 24 часа. Через сутки набухший сефадекс промывают 5 раз 0,09 М раствором хлорида натрия путем декантации. Затем стакан с гелем сефадекса помещают в большой вакуум эксикатор и в течение 1,5 часов деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, после чего гель готов для заполнения колонки. Заполнение гелем колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет его от захвата пузырьков воздуха.

2. Определение объема водной фазы колонки V_0 .

Открывают зажим на колонке и сливают 0,09 М раствор NaCl, находящийся над гелем. Зажим закрывают и на поверхность геля очень аккуратно, по стенке, с помощью пипетки наносят 0,5 мл раствора голубого декстрана. Открывают зажим и вытекающую из колонки жидкость собирают в мерный цилиндр и сохраняют до конца опыта. Наблюдают за проникновением нанесенного раствора в гель (поверхность геля не должна оставаться сухой, поэтому по мере вытекания жидкости из колонки раствор NaCl доливают в колонку либо подсоединяют к колонке склянку с раствором).

Заранее готовят пять чистых пробирок. Как только из колонки начнет вытекать окрашенный (голубой) раствор, в эти пробирки собирают окрашенные

фракции, по 0,5 мл в каждую пробирку. Элюат из этих пробирок от начала ряда, включая пробирку с самой интенсивной окраской, сливают в цилиндр, где уже собраны предыдущие (неокрашенные) фракции. Объем остальных пробирок, в которых окраска начинает ослабевать, не учитывается. Таким образом, объем элюата от начала опыта до появления наиболее яркой голубой окраски составляет объем водной фазы колонки (V_0).

Закончив определение, колонку отмывают от следов голубого декстрана.

3. Обессоливание белкового раствора методом гель-фильтрации.

Перед нанесением раствора белка открывают кран и наблюдают за уменьшением столбика воды над слоем сефадекса. Как только над поверхностью геля останется слой жидкости толщиной 1–2 мм, кран закрывают и аккуратно пипеткой наносят на гель 1 мл раствора белка, в который предварительно добавляют 5 мг $K_2Cr_2O_7$. Кран открывают и следят за проникновением раствора в гель. Снова закрывают кран и ополаскивают стенки колонки 1 мл дистиллированной воды, открывают кран и позволяют жидкости впитаться в гель. Затем кран закрывают и аккуратно добавляют 4–6 мл дистиллированной воды.

В 20 пробирок отмеряют 0,5 мл биуретового реактива. Собирают фракции с колонок по 20 капель (1 мл) в пробирки, содержащие биуретовый реактив. При этом не забывают добавлять в колонку дистиллированную воду. Наблюдают за изменением окраски в порциях элюата.

Гель в колонке отмывают водой до полного удаления $K_2Cr_2O_7$.

Оформление работы. Описывают принцип метода и результаты заносят в таблицу. Делают выводы.

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Белок												
$K_2Cr_2O_7$												

Работа 9. Разделение смеси белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Цель работы – освоить методы ПААГ-электрофореза для характеристики белков.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле – метод разделения смеси белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью (функцией длины полипептидной цепочки или молекулярной массы, а также укладки белковой молекулы, посттрансляционных модификаций и других факторов). Данный способ фракционирования белков и пептидов широко применяют в современной молекулярной биологии, биохимии, генетике.

Разработано большое количество модификаций электрофореза белков в полиакриламидном геле для решения разных задач и для различных белков и пептидов.

Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле зависит от ряда параметров. Скорость миграции пропорциональна заряду молекулы, и в свободной жидкости молекулы с одинаковым удельным зарядом мигрируют с равной скоростью. В случае разделения в среде, имеющей жесткую пространственную матрицу, происходит сегрегация за счет трения о гель. Сила трения зависит от пространственной конфигурации молекулы, в том числе от её размера. Таким образом, в случае электрофоретического разделения нативных белков будет наблюдаться сложная картина их распределения в зависимости от вышеприведенных факторов.

9.1. Нативный ПААГ электрофорез

Материал исследования: растворы белков с концентрацией 1 мг/мл (бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глюкозооксидаза, алкоголь-оксидаза, пероксидаза хрена или другие белки) и раствор, содержащий смесь перечисленных белков с концентрацией 1 мг/мл каждого белка, белковые маркеры.

Реактивы и оборудование:

Трис (трис(гидроксиметил)аминометан (далее tris-base), трис-гидрохлорид (далее tris-HCl), глицин, акриламид (далее AA), бисакриламид (далее BIS), персульфат аммония (далее PSA), тетраметилэтилендиамин (далее TEMED), глицерин, кумасси ярко голубой G-250, 95% этанол, ледяная уксусная кислота, бромфеноловый синий, 2% раствор агарозы.

Приготовление рабочих растворов

1. 1M Tris-Cl (pH 6,8)

2,46 г tris-HCl и 10,26 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

2. 1M Tris-Cl (pH 8,8)

14,56 г tris-HCl и 0,94 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

3. 30 % акриламид

Приготовление 30%-ного акриламида:

Реактивы \ Объем 30% акриламида	100 мл	150 мл	200 мл
AA	29,0 г	43,5 г	58,0 г
BIS	1,0 г	1,5 г	2,0 г
H ₂ O	70 г / 70 мл	105 г / 105 мл	140 г / 140 мл

4. 10% PSA

Раствор персульфата аммония готовят в день проведения электрофореза. 0,1 г персульфата аммония, 900 мкл воды.

5. Раствор для окрашивания

0,5 г кумасси ярко голубого G-250, 80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

6. Раствор для проявления-1 при окрашивании кумасси G-250

80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

7. Раствор для проявления-2 при окрашивании кумасси G-250

10 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 176 мл воды.

8. 1x трис-глициновый электродный буфер (pH = 8,8)

Смешать 3,10 г tris-base с 19,3 г глицина и растворить в 1 л воды.

9. 4X загрузочный буфер для нативных образцов

Приготовление 10 мл буфера для нативных образцов:

Tris-HCl (pH 6,8)	2,00 мл
H ₂ O	4,00 мл
Бромфеноловый синий	~1 мг
Глицерин	4,00 мл / 5,0 г

!Все растворы хранить не более 1 месяца при +4⁰C!

Приготовление гелей для электрофореза нативных белков

1. Разрешающий гель

Приготовление 10 мл разрешающего геля с концентрацией AA 7,5%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	2.5 мл
H ₂ O	3.65 мл
Tris-Cl (pH 8,8)	3,75 мл
PSA	0,10 мл
TEMED	15 мкл

2. Концентрирующий гель

Приготовление концентрирующего геля с концентрацией AA 5%

Рабочие растворы	5 мл	10 мл
AA, 30%	0,85 мл	1,71 мл
H ₂ O	3,40 мл	6,80 мл
Tris-Cl (pH 6,8)	0,66 мл	1,31 мл
PSA	80 мкл	160 мкл
TEMED	10 мкл	20 мкл

Ход работы.

Электрофоретическая установка представлена на рис. 6.

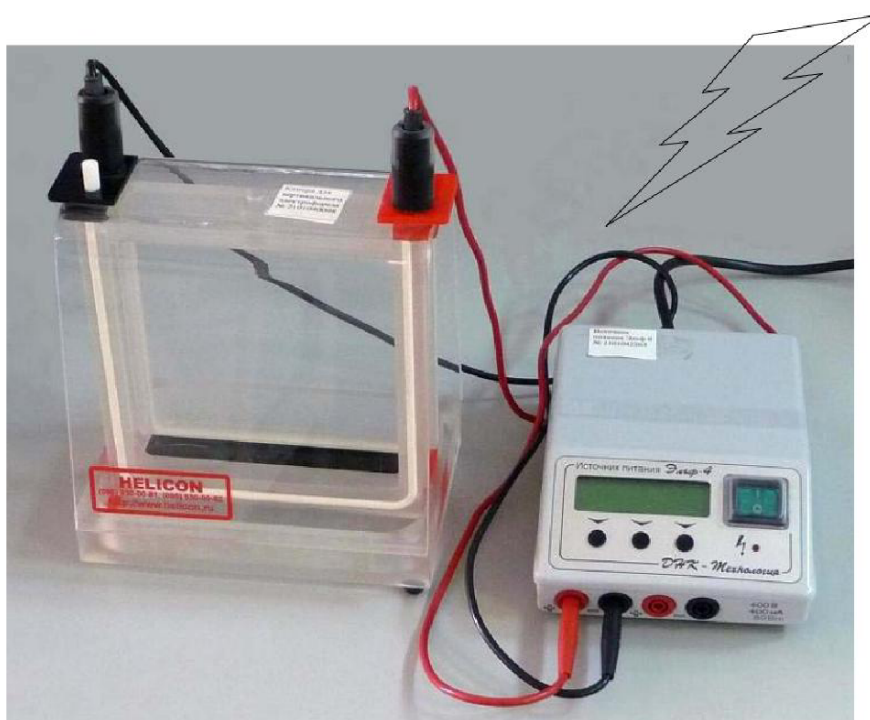


Рис. 6. Электрофоретическая установка для вертикального электро- форе-
реза VE – 2М от фирмы «Helicon» (Москва) с размером стекол слэба (кассе-
ты) 150x122 мм², источник питания «Эльф-4».

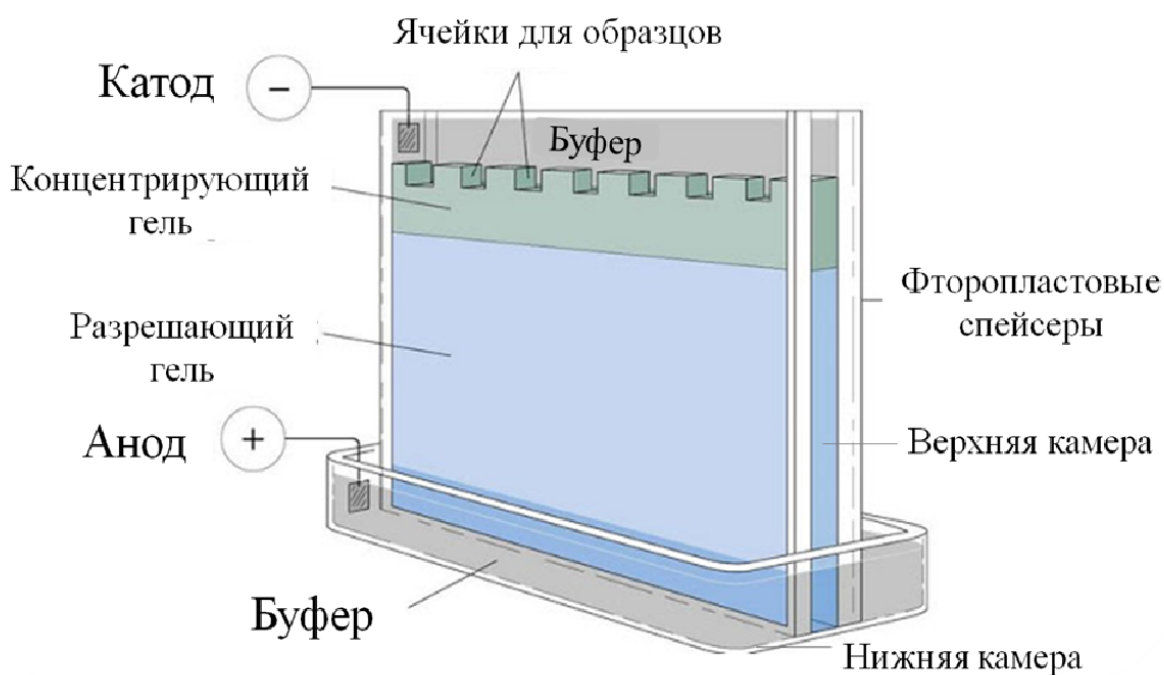


Рисунок 7. Камера для вертикального электрофореза

1. Верхнюю камеру установить на ровную горизонтальную поверх-
ность. Слэб из стекол с вырезом и без выреза со вставленными вдоль его кромок

спейсерами (фторопластовые пластинки) выровнять по основанию ячейки и по боковым граням, затем закрепить зажимами. Стекло с вырезом должно находиться с внутренней (обращённой в верхний буфер) стороны слэба. Затем, если нет необходимости использования двух гелей одновременно, вместо второго слэба ставят заглушку из оргстекла.

2. Провести герметизацию слэбов при помощи расплавленного 2%-ного раствора агарозы вдоль кромок и нижнего торца слэба. Для этого удобно пользоваться пастеровской пипеткой и заливочным столиком.

3. Отметить маркером уровень, отстоящий от верхнего торца слэба на 2,5 – 3 см (верхний уровень разрешающего геля). Залить свежеприготовленный 7,5% разрешающий гель до метки (акриламид полимеризуется за 5 – 10 мин), сверху наслоить ~200 мкл воды (для определения времени конца полимеризации полезно оставить немного раствора акриламида в пробирке).

4. Отсосав наслоенную воду шприцем, до конца заполнить слэб концентрирующим гелем, вставить гребенку и дождаться конца полимеризации, после чего аккуратно извлечь гребенку из установки.

5. Вставить верхнюю ячейку в нижнюю и заполнить обе ячейки электродным буфером.

6. Образцы растворов белков смешать с 4X загрузочным буфером для нативных образцов в соотношении 2:1.

7. В образовавшиеся после извлечения гребенки лунки нанести 30 мкл смеси растворов белков с загрузочным буфером (около 20 мкг белка в лунке).

8. Подключить блок питания к установке для электрофореза. Электрофорез проводить при силе тока 40 – 45 мА и напряжении 175 – 200 В. При этом мощность потребляемая установкой составляет 7 – 9 Вт.

9. Электрофорез проводят до длины пробега фронта красителя 6 – 6,5 см от границы разрешающего геля (70 – 90 мин.).

10. Отключают блок питания и извлекают гель из установки.

11. Помещают гель в раствор для окрашивания на 1 час, затем перекладывают его последовательно в раствор для проявления-1 (на ночь) и раствор для проявления-2 до полного вымывания красителя.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести рисунок или фотографию электрофореграммы в тетрадь. Сделать выводы.

9.2. SDS ПААГ электрофорез

Материал исследования: растворы белков с концентрацией 1 мг/мл (бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глюкозооксидаза, алкоголь-оксидаза, пероксидаза хрена или другие белки) и раствор, содержащий смесь перечисленных белков с концентрацией 1 мг/мл каждого белка, белковые маркеры.

Реактивы и оборудование: Трис (трис(гидроксиметил)аминометан (далее tris-base), трис-гидрохлорид (далее tris-HCl), глицин, акриламид (далее AA), бисакриламид (далее BIS), персульфат аммония (далее PSA), тетраметилэтилендиамин (далее TEMED), глицерин, кумасси ярко голубой G-250, 95% этанол, ледяная уксусная кислота, бромфеноловый синий, β -меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), 2% раствор агарозы.

Приготовление рабочих растворов

Растворы 1-7 готовить аналогично 9.1

8. 10 % SDS

Растворить 10 г SDS в 90 мл воды.

9. 5x Tris-глициновый буфер, pH8.3, (хранить основной сток при +4°C, рабочий сток – при NT).

Смешать 15,1 г tris-base с 93,8 г глицина, добавить 50 мл 10% SDS и растворить в 1 л воды. Перед использованием разбавить в 5 раз.

10. 4X загрузочный буфер для образцов

Приготовление 10 мл буфера:

Tris-HCl (pH 6,8)	2,00 мл
β -меркаптоэтанол (14,5M)	280 мкл
SDS, 10%	4,00 мл
Бромфеноловый синий	~1 мг
Глицерин	4,00 мл / 5,0 г

Приготовление гелей для SDS-электрофореза белков

3. Разрешающий гель

Приготовление 10 мл разрешающего геля с концентрацией AA 10%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	33,3 мл
H ₂ O	2,72 мл
1M Tris-Cl (pH 8,8)	3,75 мл
10 % PSA	0,10 мл
SDS, 10%	100 мкл
TEMED	15 мкл

4. Концентрирующий гель

Приготовление концентрирующего геля с концентрацией AA 5%

Рабочие растворы	5 мл	10 мл
AA, 30%	0,85 мл	1,71 мл
H ₂ O	3,40 мл	6,80 мл
1M Tris-Cl (pH 6,8)	0,63 мл	1,26 мл
PSA	50 мкл	100 мкл
SDS, 10%	50 мкл	100 мкл
TEMED	15 мкл	30 мкл

Пункты 1-5, 7-11 выполнять аналогично 8.1. 6. Образцы растворов белков смешать с 4X загрузочным буфером в соотношении 3:1, прокипятить при 99° С в течение 10 мин, центрифугировать 2 мин при 14000 об./мин.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести рисунок или фотографию электрофореграммы в тетрадь. Сделать выводы.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков в биологических жидкостях чаще всего используются спектральные методы исследования: *фотоколориметрия и спектрофотометрия*, а также – *рефрактометрический метод*.

Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина.

Прямой спектрофотометрический метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200-220 нм и при 280 нм (зона поглощения ароматических аминокислот).

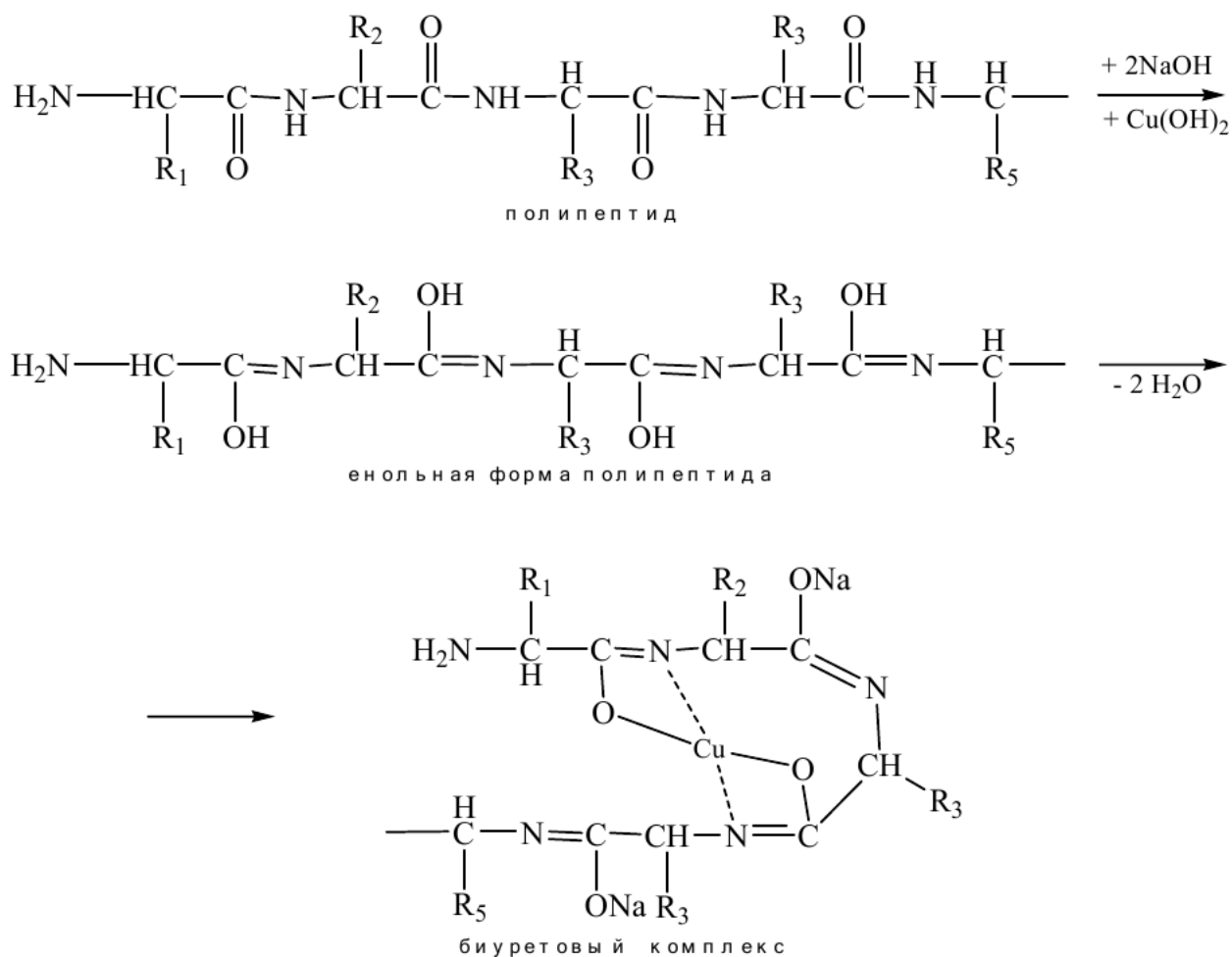
Рефрактометрический метод основан на изменении показателя преломления раствора в зависимости от концентрации белка в нем.

Работа 10. Количественное определение белка биуретовым методом

Цель работы – освоить метод определения белков в биологических жидкостях, применяемый в клинической биохимии.

В основе метода лежит биуретовая реакция. Все белки обладают способностью в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание. Окраска обусловлена образованием комплексов ионов меди с пептидными группами белка. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе. Биуретовую реакцию дают все белки, а также олигопептиды, содержащие не менее двух пептидных связей.

Биуретовая реакция белков не отличается высокой чувствительностью. Поэтому она применяется в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже нескольких мг/мл).



Материал исследования: раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: 10% раствор БСА; 0,9% раствор хлорида натрия; биуретовый реактив⁷; фотоэлектроколориметр; кюветы с толщиной слоя 1 см; штатив с пробирками.

Ход работы.

1. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка. Из 10 % стандартного раствора белка готовят в 6 пробирках растворы белка различной концентрации, как показано в таблице:

⁷ Биуретовый реактив. В мерной колбе на 250 мл растворяют последовательно 0,375 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1,5 г сегнетовой соли ($\text{KООС-СНОН-СНОН-СООNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) в 150 мл воды. Затем медленно приливают при перемешивании 75 мл 10% раствора гидроксида натрия и доводят содержимое до 250 мл водой.

№	Стандартный 10% раствор белка, мл	0,9% раствор хлорида натрия, мл	концентрация белка, г/л
1	0,02	0,08	20
2	0,04	0,06	40
3	0,05	0,05	50
4	0,06	0,04	60
5	0,08	0,02	80
6	0,10	-	100

В пробирки добавляют 3,0 мл биуретового реактива. Через 20 минут измеряют оптическую плотность растворов на фотометре относительно раствора сравнения (0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия + 3,0 мл биуретового реактива). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 525нм.

Градуировочный график строят с использованием компьютерных программ (MicrosoftExcel или SigmaPlot). По оси ординат откладывают полученные значения оптических плотностей, а по оси абсцисс – концентрацию белка (в г/л).

2. Определение содержания белка в неизвестной пробе.

В пробирку отмеряют 0,1 мл сыворотки раствора белка с неизвестной концентрацией и 3,0 мл биуретового реактива и через 20 минут измеряют экстинкцию раствора на ФЭК относительно контрольного раствора. Содержание белка находят по калибровочному графику.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести полученные экспериментальные данные в тетрадь. Построить градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации стандартного раствора белка. Пользуясь этим графиком, рассчитать содержание белка в испытуемом растворе и записать результат, рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод.

Работа 11. Количественное определение белка по методу Лоури

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков, научиться определять низкие содержания белков в анализируемых образцах по градуировочному графику.

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наибольшей чувствительностью обладает метод Лоури. Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются, по меньшей мере, две цветные реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакциях восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Вторая реакция не очень специфична, но весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно разбавленных растворах (всего несколько десятков микрограммов от 10 до 200 мкг/мл).

Метод Лоури менее специфичен, чем биуретовый, поскольку на интенсивность окраски влияют многие вещества, которые могут содержаться в тканях или в буферных системах, применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому для получения абсолютных данных градуировочный график следует строить по тому же белку, который необходимо определить в растворе.

Материал исследования: биологические жидкости (в определяемом объеме должно находиться от 10 до 100 мкг белка).

Реактивы и оборудование: стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин), реактив А (2% раствор карбоната натрия в 0,1 н

растворе гидроксида натрия), реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия), реактив Фолина⁸, спектрофотометр или фотоэлектроколориметр.

Ход работы.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В - (раствор С), реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200 мкг/мл, готовят растворы белка с разной концентрацией, как показано в таблице.

№ пр.	станд. 200 мкг/мл раствор БСА, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Содержание белка в пробе, мкг
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	50	50
3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160
5	1,00	-	200	200

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5 мл разведенного в 2 раза реактива Фолина тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37° на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на спектрофотометре при длине волны 700 нм.

По результатам измерений строят градуировочный график с использованием компьютерных программ (Microsoft Excel или SigmaPlot) и определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Описать принцип метода Лоури. Результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь. Рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод по работе.

⁸ Реактив Фолина. В круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ного раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, затем прибавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой и фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Его хранят в темной склянке и перед употреблением разбавляют дистиллированной водой 1 : 1.

Работа 12. Количественное определение белка по методу Брэдфорд

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков для микроколичеств анализируемых образцов.

Определение концентрации белка методом Брэдфорд – один из наиболее популярных методов, используемый для определения концентрации белка в растворе. Этот метод, так же, как и метод Лоури, требует построения стандартной градуировочной кривой перед измерением концентрации неизвестного белка. Метод Брэдфорд основан на сдвиге спектра поглощения кумасси (Coomassie Blue) в сторону значений 595 нм прямо пропорционально концентрации содержащегося в растворе белка. Кумасси образует комплекс с белком; этот комплекс измеряют при длине волны 595 нм. Абсорбционная фотометрия комплекса кумасси/белок имеет очень высокую чувствительность и эффективна даже в случае следовых концентраций белков. Чувствительность методов Лоури и Брэдфорд сопоставима, но реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам, а метода Брэдфорд – к альбуминам.

Материал исследования: раствор белка неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: стандартные растворы белка 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, реактив Брэдфорд⁹, фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением концентрат реактива Бредфорд разбавляют в 5 раз. (в пробирку добавляют 1 мл реактива и 4 мл дистиллированной воды).

1. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика применяют растворы белка с концентрацией 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, для построения графика готовят растворы белка согласно таблице:

⁹ Реактив Брэдфорд. 100 мг кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр.

Внимание! Реагент очень чувствителен к белку (1–2 мг/мл). Все должно быть абсолютно чистым и посуда, и бумажный фильтр, и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и придет в негодность. Чистый реактив Брэдфорд имеет коричневый цвет и синее при наличии белка

№ пр.	Концентрация исходного раствора белка, мг/мл	Объем раствора белка, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Концентрация белка в пробе, мкг/мл
1	0,5	20	80	100
2	0,5	50	50	250
3	0,5	75	25	375
4	1,0	50	50	500
5	1,0	75	25	750
6	1,0	100	0	1000

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют по 5 мл реактива Бредфорд. Выдерживают пробирки 15 минут в темном месте и измеряют экстинкцию растворов на спектрофотометре против контрольного раствора (реактив Бредфорд). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 595 нм.

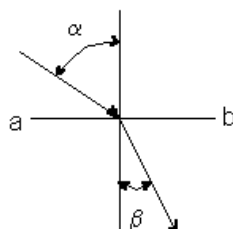
2. По построенному градуировочному графику определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Охарактеризовать принцип метода Бредфорд, результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь.

Работа 13. Рефрактометрическое определение белка в биологических жидкостях

Цель работы – освоить количественный метод определения белков биологических жидкостей животных и насекомых.

Коэффициентом рефракции (или показателем преломления) называют отношение синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления.



$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}, \text{ где}$$

n – показатель преломления;

α - угол падения;

β - угол преломления;

ab – граница раздела двух сред.

Между показателем преломления и концентрацией вещества в растворе для многих соединений характерна прямо пропорциональная зависимость. Пользуясь специальными таблицами, можно найти содержание вещества в растворе по его показателю преломления. Разработан подобный метод и для количественного определения белков. Этот метод особенно удобен для определения концентрации белка в жидкостях биологического происхождения – сыворотки крови животных, гемолимфе насекомых и т.д. Этот метод лучше не использовать для определения белка в сыворотке крови человека, так как он требует непосредственного и длительного контакта с сывороткой.

Яичный белок представляет собой 10%-ный водный раствор нескольких белков. Почти 70% яичного белка составляет яичный альбумин, который легко отделить от глобулиновой фракции путем 10-кратного разведения яичного белка водой. В этом случае белки глобулиновой фракции выпадают в осадок и их легко отделить от раствора фильтрованием. Яичный альбумин остается в растворе.

Материал исследования: раствор яичного альбумина¹⁰.

Реактивы и оборудование: рефрактометр; фильтровальная бумага; спирт; дистиллированная вода.

Ход работы.

Работают с рефрактометром следующим образом: раскрывают камеру с призмами, тщательно ополаскивают водой, промокают фильтровальной бумагой и окончательно осушают, протирая призмы ватой, смоченной спиртом. Стеклян-

¹⁰ Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают в скорлупе яйца отверстия с двух концов и выливают белок во взвешенный стаканчик и добавляют в 4 раза больше дистиллированной воды по объему разбавляют в 5 раз). Тщательно перемешивают белок в воде, при этом наблюдают выпадение белых хлопьев глобулинов в осадок. Через 10 мин раствор фильтруют через бумажный фильтр. Доказывают наличие белка в фильтрате качественной реакцией на белок. Полученный раствор используют для дальнейших опытов.

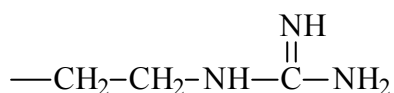
ной палочкой наносят на нижнюю призму 2 капли дистиллированной воды и закрывают камеру. Устанавливают рефрактометр и зеркала так, чтобы его призмы и шкала были ярко освещены. Если граница тени окрашена или расплывчата, то поворотом рукоятки ахроматора добиваются четкости и бесцветности границы. Поворотом соответствующей рукоятки доводят границу темного поля к перекрестку нитей окуляра. Делают отсчет по шкале. При температуре 20°C отсчет должен быть 1,333 (показатель преломления воды при 20°C). Это означает, что прибор установлен и работает нормально. После этого вновь осушают призмы. На нижнюю призму наносят 2 капли раствора белка, закрывают камеру. Делают отсчет, как описано выше. По показателю преломления, пользуясь специальной таблицей¹¹, находят процентное содержание белка в растворе.

Рассчитывают концентрацию альбумина в яичном белке, учитывая разбавление, и определяют массу альбумина в данном яйце.

Оформление работы. Описать принцип метода. Результаты измерений и найденное содержание белка в испытуемом растворе занести в рабочую тетрадь.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. На рисунке представлен радикал аминокислоты. Определите, к какой группе аминокислот она относится:



1. гидрофобные
 2. полярные незаряженные
 3. заряженные положительно
 4. заряженные отрицательно
2. Биполярный ион моноаминомонокарбоновой кислоты заряжен:
 1. отрицательно
 2. положительно
 3. электронейтрален

¹¹ См. приложение 1.

3. Единственная аминокислота, содержащая замещенную α -аминогруппу. Дестабилизирует вторичную структуру белков. Эта аминокислота влияет на процесс свертывания белков, так как служит местом вынужденного изгиба полипептидной цепи.
4. Выберите те типы связей, которые стабилизируют третичную структуру белка:
 1. Водородная связь между пептидными группами
 2. Связь между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот
 3. Водородные связи между радикалами аминокислот
 4. Гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот
 5. Ковалентные связи между радикалами цистеина
 6. Электростатическое притяжение между противоположно заряженными боковыми группами аминокислот
5. Укажите аминокислоты, боковые радикалы которых вероятнее всего расположены на поверхности молекулы белка:
 1. Аспарагиновая кислота
 2. Фенилаланин
 3. Лизин
 4. Аланин
6. Четвертичная структура белка:
 1. пространственная структура, образованная связями, возникающими между атомами боковых заместителей аминокислотных остатков;
 2. порядок чередования аминокислот, соединенных пептидными связями;
 3. пространственная структура, образованная слабыми взаимодействиями между контактными поверхностями протомеров;
 4. пространственная структура, образованная водородными связями, возникающими между атомами пептидного остова.
7. Какова функция миоглобина в организме?
 1. Транспорт кислорода от легких к тканям
 2. Компонент буферной системы крови

3. Резервный источник кислорода в мышцах

4. Компонент соединительной ткани

8. Установите соответствие.

- | | |
|------------------------------|--|
| А. Первичная структура белка | 1. Стабилизируется водородными связями между атомами пептидного остова |
| Б. Вторичная структура белка | 2. В ее формировании принимают участие гидрофобные взаимодействия радикалов аминокислот |
| В. Третичная структура белка | 3. Стабилизируется ковалентными связями между α -амино- и α -карбоксильными группами аминокислот |

9. Напишите структурную формулу трипептида, состоящего из аминокислот: тирозина, аргинина и валина. Укажите N- и C-концы пептида, назовите трипептид.

10. Дайте определение первичной структуре белка.

11. Между остатками треонина и глутамина при формировании третичной структуры белка возникает:

1. ионная связь
2. водородная связь
3. дисульфидная связь
4. гидрофобное взаимодействие

12. Напишите все возможные ионные формы указанной аминокислоты лизина при изменении pH среды от сильнокислой к сильнощелочной. Рассчитайте изоэлектрическую точку аминокислоты. Приведите расчеты.

13. Напишите структурные формулы трипептидов Glu-Asp-Pro и Ala-Cis-Gly. Какой из этих трипептидов лучше растворим в воде?

14. Электрофорез аминокислот на бумаге. Каплю раствора, содержащего смесь трех аминокислот (треонин, валин, тирозин), нанесли на полоску бумаги, предварительно смоченную буфером с $\text{pH}=6$, и к концам полоски приложили электрическое напряжение. Какая аминокислота будет двигаться:

1. к аноду;
2. к катоду;
3. останется на стартовой точке?

Раздел II. УГЛЕВОДЫ

Углеводы – это природные соединения, имеющие в подавляющем большинстве состав $C_n(H_2O)_m$. Их подразделяют на низкомолекулярные углеводы и продукты их поликонденсации.

Моносахариды – мономеры, из остатков которых состоят углеводы более сложного строения.

Олигосахариды – олигомеры, содержащие от 2 до 10 моносахаридных остатков.

Полисахариды – полимеры, включающие до нескольких тысяч моносахаридных звеньев.

Работа 14. Качественные реакции на углеводы

Цель работы – доказать наличие определенных функциональных групп у углеводов в соответствии с их химическими свойствами.

МОНОСАХАРИДЫ – полигетерофункциональные соединения, в молекуле которых одновременно содержится одна карбонильная группа (альдегидная или кетонная) и несколько гидроксильных групп. Моносахариды, содержащие альдегидную группу, называются альдозами; моносахариды, содержащие кетонную группу (обычно у C_2) – кетозами. За счет внутримолекулярного взаимодействия альдегидной (или кетонной) и гидроксильной групп по механизму нуклеофильного присоединения образуется циклический полуацеталь. Между циклической и линейной формами существует равновесие. Моносахариды вступают в реакции, характерные для многоатомных спиртов. Молекулы в циклической форме подвергаются дегидратации с образованием замещенных фурфуролов. Для альдоз характерны реакции окисления.

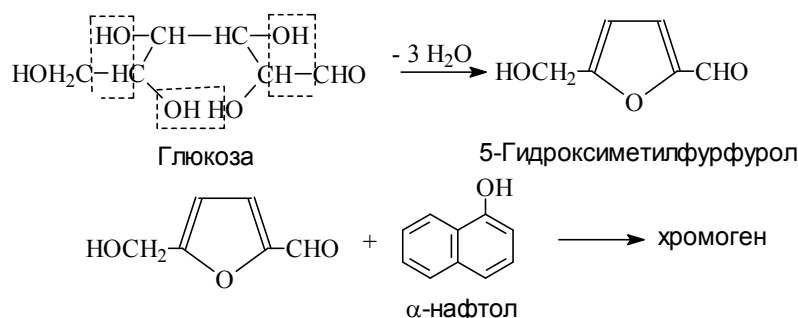
Материал исследования: 5%-ные растворы глюкозы, фруктозы, лактозы, мальтозы и сахарозы, 1%-ный раствор крахмала.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостаты (40°C и 70°C), кипящая водяная баня. 1% раствор крахмала; 1% рас-

твор сульфата меди; раствор Люголя¹²; реактив Барфреда¹³; 25- и 36%-ные растворы соляной кислоты; кристаллический резорцин; концентрированная серная кислота.

Опыт 1. Реакция Победова-Молиша с α -нафтолом

Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфированного α -нафтола, дают триметилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение:



Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, 10%-ный раствор α -нафтола в спирте; концентрированная серная кислота.

Ход работы. В пробирку помещают 1 мл раствора глюкозы или фруктозы, добавляют 2 капли 10% спиртового раствора α -нафтола и по стенке пробирки осторожно без встряхивания приливают 2 мл концентрированной серной кислоты. Серная кислота опускается на дно пробирки и на границе раздела двух фаз образуется кольцо красно-фиолетового цвета.

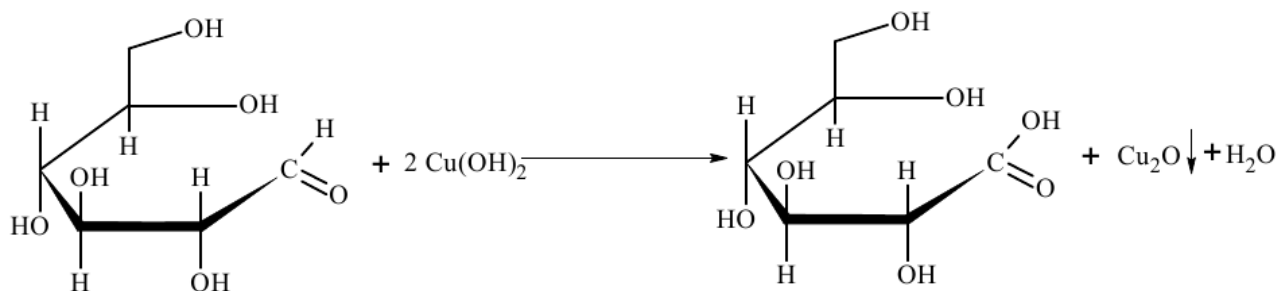
Опыт 2. Реакция Троммера

Моносахариды, благодаря свободной альдегидной группе в линейной форме, способны окисляться, одновременно восстанавливая соли металлов. В щелочной среде происходит изомеризация кетоз в альдозы, поэтому кетозы также способны восстанавливать ионы металлов, но в более жестких условиях. Это свойство используется для ряда качественных и количественных реакций.

¹² Раствор Люголя - 1 г иода и 2 г KI в 300 мл воды.

¹³ Реактив Барфреда. 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды. Фильтруют и к фильтрату прибавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

Растворы глюкозы или фруктозы в щелочной среде восстанавливают при нагревании гидроксид меди (II) в оксид меди (I):



Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы. В пробирку к 3 мл 5% раствора глюкозы добавляют 1 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия и 5 капель 5%-ного раствора сульфата меди. Выпадает осадок гидроксида меди (II), который при перемешивании растворяется, и раствор приобретает голубой цвет. При его осторожном нагревании в пламени горелки до кипения наблюдается выпадение желтого осадка гидроксида меди (I) или красного осадка оксида меди (I).

Опыт 3. Реакция серебряного зеркала

Свободные альдегидные группы способны окисляться, восстанавливая ионы Ag^+ до свободного металла Ag.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, термостат (50–60°C), 1–2%-ный раствор нитрата серебра; 5%-ный раствор аммиака.

Ход работы. В чистую, промытую щелочью и сполоснутую дистиллированной водой пробирку вливают 1–2 мл 1–2%-ного раствора азотнокислого серебра и по каплям добавляют 5%-ный раствор аммиака до растворения первоначально выпавшего осадка. Затем добавляют 1 мл 1%-ного раствора глюкозы. Пробирку со смесью нагревают термостате (50–60°C) в течение нескольких минут. При этом наблюдается выделение на стенках пробирки восстановленного серебра в виде зеркала.

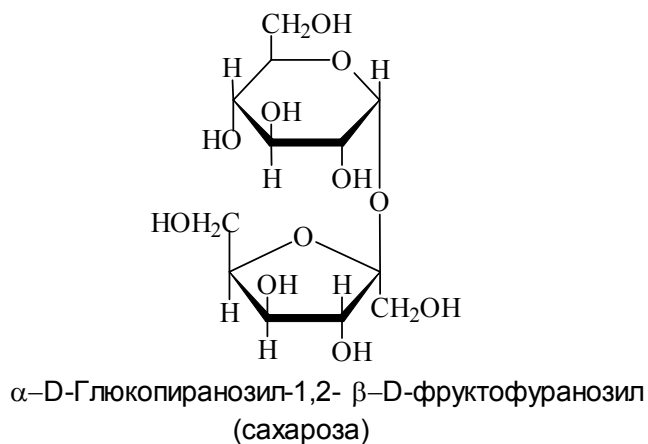
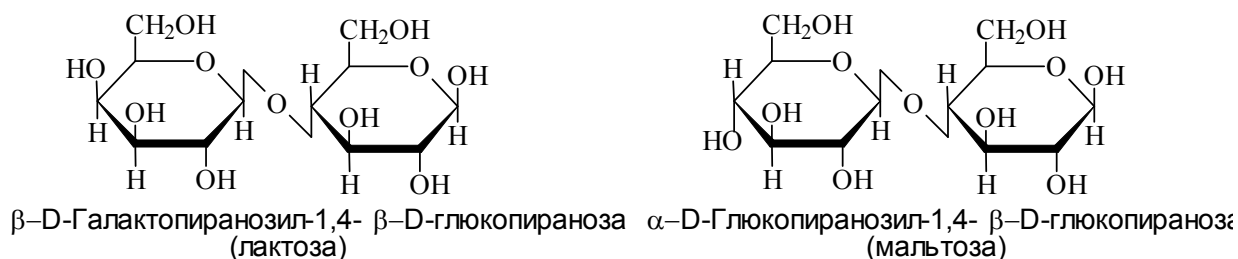
Опыт 4. Реакция Селиванова на кетозы

При нагревании фруктозы или других кетоз с соляной кислотой образуется 5-гидроксиметилфурфурол, который с резорцином образует соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, термостат (40°C), 25-ный раствор соляной кислоты; кристаллический резорцин.

Ход работы. В пробирку помещают 5 мл 5%-ного раствора фруктозы, 1 мл 25%-ного раствора соляной кислоты и несколько кристалликов резорцина. Смесь нагревают на водяной бане ($t^{\circ}=40^{\circ}\text{C}$) до появления вишнево-красного цвета.

ДИСАХАРИДЫ. Восстанавливающие дисахариды (например, лактоза, мальтоза) способны окисляться до соответствующих кислот, восстанавливая соли металлов, участвующие в реакциях. Однако, невосстанавливающие дисахариды (например, сахароза) в такие реакции не вступают. Наиболее широко для обнаружения подобных дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов до моносахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза – моносахаридов.



Опыт 5. *Восстанавливающая способность лактозы*

Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекулах лактозы и мальтозы эти дисахариды обладают восстанавливающими свойствами и способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. Они дают положительную реакцию Троммера.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы. В пробирку наливают 2 мл раствора лактозы, затем вносят 1 мл 5% раствора гидроксида натрия и 5 капель 5% раствора сульфата меди. Пробирку осторожно нагревают в пламени горелки до появления красного осадка.

Опыт 6. *Определение восстанавливающей способности сахарозы и гидролиз сахарозы*

В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счет двух гликозидных гидроксильных групп. Сахароза не обладает восстановительными свойствами и не дает реакцию Троммера. После гидролиза сахарозы образуются моносахариды, которые можно обнаружить с помощью реакции Троммера.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, газовая горелка, 5%-ный раствор гидроксида натрия; 5%-ный раствор сульфата меди, концентрированная серная кислота.

Ход работы. В две пробирки наливают по 3 мл 5% раствора сахарозы. В одну добавляют 2 капли концентрированной соляной кислоты и нагревают на водяной бане (100°C) в течение 15 минут для гидролиза сахарозы. Вторая пробирка содержит контрольный раствор сахарозы. Затем в первую пробирку добавляют 1,5 мл 5% раствора гидроксида натрия для нейтрализации и создания щелочной среды. Во вторую приливают 1 мл 5% раствора гидроксида натрия для создания щелочной среды. К содержимому этих пробирок добавляют по 5 капель 5% раствора сульфата меди. Затем нагревают на кипящей водяной бане (проводят реакцию Троммера).

Опыт 7. *Реакция Барфреда*

Проба Барфреда отличается от всех предыдущих реакций восстановления того или иного реагента тем, что окисление сахара протекает не в щелочной среде, а в среде, близкой к нейтральной. В этих условиях редуцирующие дисахариды в противоположность моносахаридам практически не окисляются, что позволяет отличить их от моносахаридов.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня, реактив Барфреда¹⁴.

Ход работы. В две пробирки наливают по 1 мл реактива Барфреда и прибавляют несколько капель раствора лактозы в одну пробирку и несколько капель раствора глюкозы в другую. Смесь нагревают на водяной бане в течение 10 мин.

ПОЛИСАХАРИДЫ отличаются друг от друга:

- а) химической природой повторяющихся моносахарных единиц;
- б) характером связи между отдельными моносахарными единицами;
- в) длиной цепи;
- г) степенью разветвления.

Полисахариды не содержат свободных альдегидных и кетогрупп, поэтому не обладают восстанавливающей способностью. Полный гидролиз полисахаридов в присутствии кислот или специальных ферментов приводит к образованию моносахаридов, обладающих восстанавливающими свойствами.

Опыт 8. *Реакция крахмала с йодом*

При взаимодействии крахмала с йодом образуются комплексные адсорбционные соединения, окрашенные в синий цвет. При нагревании разрушается пространственная структура молекул крахмала, и комплекс разрушается, окраска исчезает, но появляется вновь при охлаждении, так как образование строго определенной пространственной структуры молекул крахмала – процесс

¹⁴ Реактив Барфреда. 13,3 г ацетата меди растворяют в 200 мл горячей воды. Фильтруют и к фильтрату прибавляют 1,9 мл ледяной уксусной кислоты.

самопроизвольный. Обесцвечивание происходит также и при добавлении щелочи. Исчезновение окраски при добавлении щелочи объясняется тем, что в образовании комплекса принимает участие молекулярный иод.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня; 1% раствор крахмала; раствор Люголя¹⁵; 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы. В две пробирки помещают по 2 мл 1% раствора крахмала и вносят по 1-2 капли раствора Люголя. Содержимое пробирок перемешивают и наблюдают образование синего окрашивания. Затем в одну пробирку добавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и наблюдают обесцвечивание. Другую пробирку нагревают на водяной бане до исчезновения окраски, затем охлаждают и наблюдают вновь появление окраски.

Опыт 9. Гидролиз крахмала

При нагревании раствора крахмала с минеральными кислотами происходит гидролиз крахмала с образованием глюкозы, которую можно обнаружить характерными реакциями на моносахариды.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, кипящая водяная баня; 1% раствор крахмала; концентрированная соляная кислота, 1%-ный раствор сульфата меди; 5%-ный раствор гидроксида натрия.

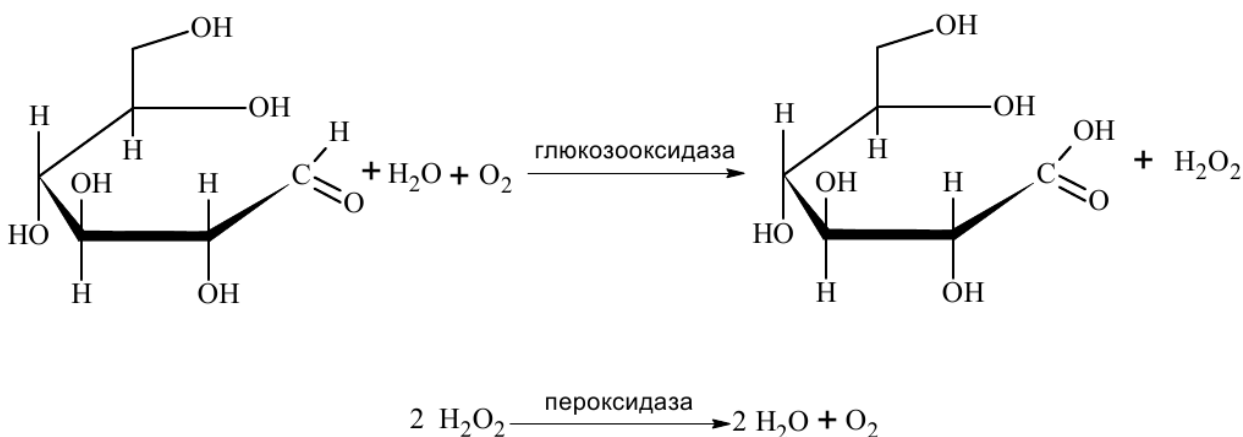
Ход работы. В две пробирки помещают по 3 мл 1% раствора крахмала. В одну из них вносят 3–4 капли концентрированной соляной кислоты и кипятят на водяной бане 15 минут. Вторая пробирка – контрольная. Затем в пробирку с гидролизатом добавляют 1,5 мл 5% раствора гидроксида натрия для нейтрализации и создания щелочной среды, а в пробирку с контрольным раствором добавляют 1 мл 5% раствора гидроксида натрия. В обе пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди осторожно нагревают на водяной бане.

¹⁵ Раствор Люголя - 1 г иода и 2 г KI в 300 мл воды.

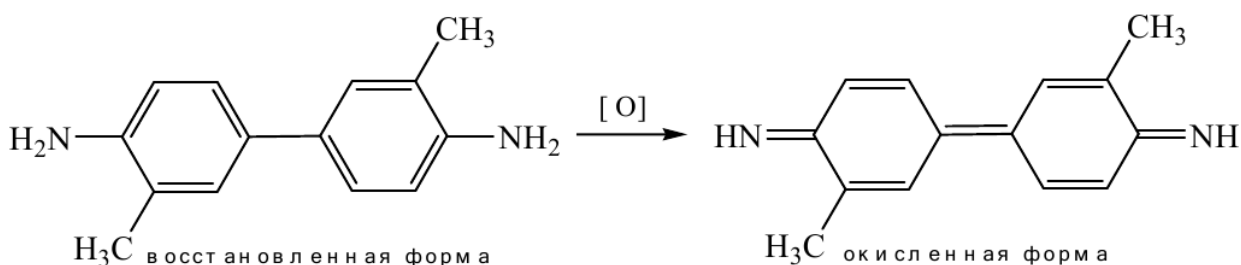
Работа 15. Энзиматический метод количественного определения глюкозы

Цель работы – освоить ферментативные методы анализа на примере определения содержания глюкозы в соках.

Метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ не углеводной природы. Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы, ускоряющей окисление β -D-глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты. Глюкозооксидаза ($M=152\,000$) относится к флавопротеинам. При окислении глюкозы в ее присутствии образуется пероксид водорода в эквимольном количестве:



Пероксид водорода разлагается ферментом пероксидазой, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор. В качестве такового применяют *o*-толидин:



Количественное определение глюкозы сводится к измерению экстинкции образовавшейся в опыте окисленной формы красителя и сравнению ее с таковой при использовании стандартного раствора глюкозы. Прямая зависимость между

содержанием глюкозы и интенсивностью окраски сохраняется в пределах от 50 до 400 мг/л.

Реактивы и оборудование: фотометр «Эксперт-003»; секундомер; пипетки; пробирки; 1%-ный раствор перекристаллизованного в абсолютном этаноле *о*-толидина; 0,25 н ацетатный буфер pH=4,8 (4 части 0,25 н уксусной кислоты смешивают с 6 частями 0,25 н ацетата натрия); стандартные растворы глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), приготовленные на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом¹⁶.

В ходе реакции развивается окраска, интенсивность которой постепенно возрастает и достигает своего максимума при комнатной температуре через несколько минут после прибавления рабочего реактива (в зависимости от активности препарата глюкозооксидазы). Поэтому предварительно определяют время, необходимое для развития *максимальной* синей окраски по стандартным растворам глюкозы с концентрациями 50 и 400 мкг/мл. Для этого регистрируют изменение во времени экстинции раствора глюкозы соответствующей концентрации после добавления рабочего реактива на спектрофотометре при длине волны 670 нм (кювета шириной 10 мм). Сначала экстинция увеличивается, далее остается неизменной в течение нескольких минут, а затем начинает медленно уменьшаться. В соответствии с полученными данными принимают время развития окраски во всех остальных пробах.

В пробирки, содержащие по 1 мл раствора глюкозы (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл), и в пробирку с анализируемым раствором, поочередно (в определенной последовательности с точным интервалом в 2 минуты), прили-

¹⁶ *Рабочий реактив для определения глюкозы энзиматическим методом.* К 70-80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (pH=4,8) добавляют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1%-ного раствора *о*-толидина и доводят объем пробы до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1 – 2 ч до употребления. Он может храниться в холодильнике в темных закрытых склянках в течении 1–1,5 месяцев.

вают 3 мл рабочего реактива. Фотометрируют полученные растворы таким образом, что бы каждый раствор с рабочим реактивом был выдержан в течение заданного времени.

На основании полученных величин оптической плотности (экстинкции) для всех стандартных растворов глюкозы строят градуировочную зависимость. По построенной градуировочной зависимости рассчитывают количество глюкозы в исследуемых пробах.

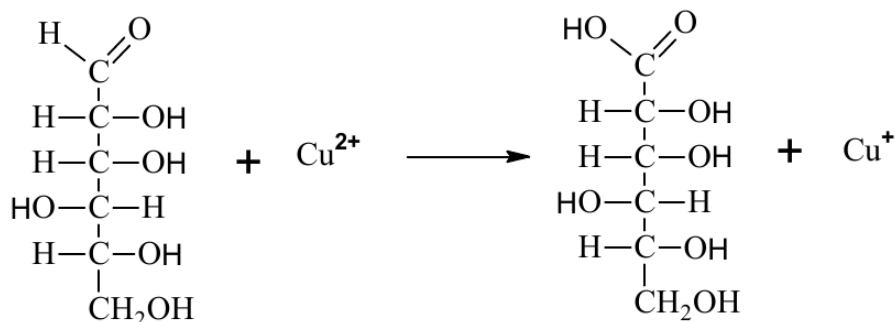
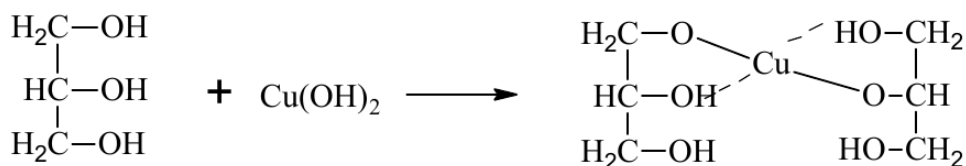
№	Стандартный (400 мкг/мл) раствор глюкозы, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мкг/мл
1	0,125	0,875	50
2	0,250	0,750	100
3	0,375	0,625	150
4	0,500	0,500	200
5	0,625	0,375	250
6	0,750	0,250	300
7	0,875	0,125	350
8	1,000	-	400

Оформление работы. Описать принцип метода. Результаты измерений и найденное содержание глюкозы в испытуемом растворе занести в рабочую тетрадь.

Работа 16. Колориметрический метод определения сахаров

Все моносахариды (глюкоза, фруктоза и т.д.) и некоторые дисахариды, в том числе мальтоза и лактоза, относятся к группе редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, т. е. соединений, способных вступать в реакцию восстановления.

Метод колориметрического определения сахаров основан на восстановлении ионов Cu^{2+} из глицерата меди редуцирующими сахарами до нерастворимого оксида меди(I) (Cu_2O) с изменением окраски с ярко синей до красно-коричневой.



Материал исследования: растительный материал (яблоко, груша, мандарин и т.д.)

Реактивы и оборудование: раствор глицерата меди (готовят перед проведением анализа): к 40 мл раствора NaOH (0,15 г/мл) прибавляют 1 мл чистого глицерина, тщательно перемешивают, затем прибавляют 80 мл раствора сульфата меди (8 г/л); стандартный раствор глюкозы с концентрацией 5 мг/мл; 1 % раствор HCl ; автоматические пипетки переменного объема; фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

1. Построение градуировочного графика:

В пробирки отмеряют 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора глюкозы и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой в соответствии с таблицей.

№	Стандартный раствор глюкозы (5 мг/мл), мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация глюкозы, мг/мл
1	0,2	0,8	1
2	0,4	0,6	2
3	0,6	0,4	3
4	0,8	0,2	4
5	1,0	-	5

Перемешивают и прибавляют во все пробирки по 10 мл раствора глицерата меди, снова перемешивают и нагревают пробирки в кипящей водяной бане ровно 6 мин. Вынимают, охлаждают пробирки в холодной воде до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность прозрачного раствора при длине волны 590 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм.

На основании полученных величин оптической плотности для всех стандартных образцов глюкозы строят градуировочную зависимость.

2. Анализ исследуемого материала.

В ступке со стеклянным песком растирают навеску массой 5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Затем в ступку приливают 50 мл дистиллированной воды с температурой 70 °С и тщательно перемешивают содержимое. Далее проводят анализ на содержание редуцирующих сахаров, а также суммы моно- и дисахаридов в анализируемом объекте следующим образом:

а) для определения редуцирующих сахаров отбирают в пробирку 500 мкл прозрачной вытяжки, прибавляют 500 мкл воды и 10 мл раствора глицерата меди, перемешивают. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане 6 мин, охлаждают до комнатной температуры. После отстаивания отбирают прозрачный раствор и измеряют его оптическую плотность. По градуировочному графику определяют содержание редуцирующих сахаров. Если после кипячения вытяжки полностью произошел переход окраски от синей к красно-бордовой, необхо-

можно отобрать для анализа меньший объем прозрачной вытяжки (100-500 мкл) или провести предварительное разбавление пробы.

б) для определения суммы моно- и дисахаридов 500 мкл прозрачной вытяжки помещают в сухую пробирку, прибавляют 500 мкл 1 % раствора HCl и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем в пробирку добавляют 10 мл глицерата меди и нагревают еще 6 мин. Пробирку охлаждают до комнатной температуры, отстаивают содержимое и измеряют оптической плотностью прозрачного раствора.

Содержание сахаров рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{m_{\text{нав}} \cdot 1000}$$

где а - содержание сахаров, найденное по калибровочному графику, мг;

V - общий объем вытяжки, мл (равен объему прибавленной воды);

m_{нав} - масса навески, г;

100 – коэффициент перевода в проценты;

1000 – коэффициент перевода грамм в миллиграммы.

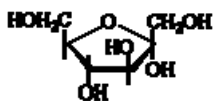
* при расчетах необходимо учесть величину разбавления.

Оформление работы: описать принцип метода и протекающие реакции. Результаты измерений и найденное содержание редуцирующих сахаров и моно- и дисахаридов в испытуемом материале занести в рабочую тетрадь.

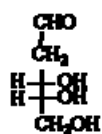
ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Определите, какая структура соответствует фруктозе?

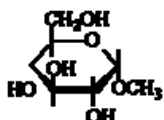
1.



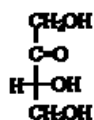
2.



3.



4.



2. Какова функция гликогена?

1. Является компонентом соединительной ткани
2. Резервный источник глюкозы
3. Выполняет рецепторные функции на поверхности мембраны
4. Формирует клеточные стенки бактерий

3. Какое из ниже приведенных утверждений характеризует глюкозу?

1. Обычно находится в фуранозной форме
2. Кетоза
3. Атом углерода 2 является аномерным
4. Является составной частью дисахарида сахарозы

4. Среди перечисленных ниже углеводов выберите полисахарид:

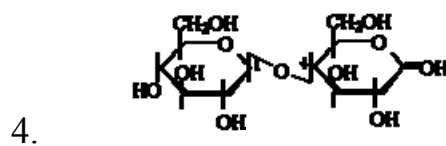
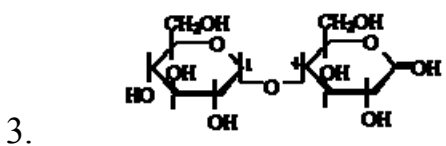
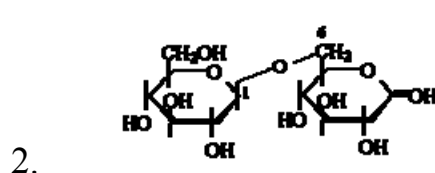
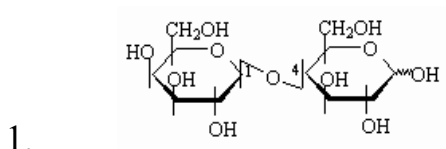
1. Галактоза
2. Лактоза
3. Фруктоза
4. Гликоген

5. Среди перечисленных ниже углеводов выберите дисахарид:

1. Галактоза
2. Лактоза
3. Фруктоза
4. Гликоген

6. Аномеры глюкозы - это:

1. Стереизомеры по 4 атому С
2. Изомеры, являющиеся зеркальным отображением друг друга
3. Изомеры, отличающиеся конфигурацией гликозидного атома углерода
4. Структурные изомеры
7. Среди приведенных структур найдите лактозу:



8. Остатки моносахаридов амилозы:
 1. связаны β -1,4-гликозидными связями
 2. связаны α -1,4-гликозидными связями
 3. являются галактозой
 4. являются галактозой и глюкозой
9. Напишите равновесие между линейными и циклическими формами, устанавливающееся при растворении кристаллической D-галактозы.

Раздел III. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Работа 17. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов из гидролиза

Цель работы – Выделить дрожжевые рибонуклеопротеины и охарактеризовать основные структурные компоненты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеинов. При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белки (гистоны) и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). ДНК и РНК, имея сходное строение, несколько отличаются по составным компонентам. Специфическими реакциями можно выявить основные компоненты нуклеиновых кислот. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие компоненты: гетероциклические основания (пуриновые или пиримидиновые), остатки сахара (рибозу или дезоксирибозу) и остатки фосфорной кислоты.

Материал исследования: свежие пекарские дрожжи.

Реактивы и оборудование: 10% раствор серной кислоты, 0,4% и 10% растворы гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди (II), аммиак концентрированный, молибденовый реактив¹⁷, 1% раствор нитрата серебра, песок, эфир, ступка, пробирки, круглодонные колбы, обратные холодильники, песчаные бани, воронки, фильтры.

Ход работы.

Опыт 1. *Выделение рибонуклеопротеинов (РНП)*

10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями 40-50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают еще 15-20 мин. После этого осадок отфильтровывают или отделяют центрифугированием. Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10%-ную кислоту до слабокислой реакции (5-6 мл).

¹⁷ Молибденовый реактив. Смешивают 15% раствор молибдата аммония с азотной кислотой (конц.) в отношении 110:90.

Полученный осадок нуклеопротеинов отделяют центрифугированием.

Опыт 2. *Гидролиз РНП*

В круглодонную колбу помещают 0,5 г осадка и заливают 4 мл 10% раствора серной кислоты. В колбу вставляют холодильник (стеклянная трубка длиной 25–30 см), и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку. Через 1 ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, дают остыть содержимому колбы и фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов качественными реакциями.

Опыт 3. *Биуретовая реакция на полипептиды*

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и 2-3 капли 1% раствора сульфата меди (II). Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 4. *Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу*

К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 10% раствора гидроксида натрия и 10 капель 1% раствора сульфата меди (II) до появления осадка гидроксида меди (II). Пробирку нагревают до прекращения кипения.

Опыт 5. *Серебряная проба на пуриновые основания*

10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3–5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований, окрашенный в бурый цвет.

Опыт 6. *Молибденовая проба на фосфорную кислоту*

К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2 - 3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорномолибденового аммония:



Оформление работы. Результаты лабораторной работы записывают в тетрадь в виде таблицы.

Компоненты нуклеопroteина	Качественная реакция	Наблюдения

Работа 18. Выделение плазмидной ДНК

Цель работы – освоить методы выделения малых бактериальных плазмид.

Плазмиды - это внехромосомные автономно реплицирующиеся двухцепочечные кольцевые ДНК. Размер плазмид составляют от 0,1 до 5 % размера хромосомы. К малым плазмидам относятся плазмиды размером до 250 т.п.н. Для выделения плазмидной ДНК используют различные методы. Все они включают три основных этапа: рост бактерий; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК. В методах очистки используют два основных различия между хромосомной ДНК и плазмидной ДНК:

- хромосома по размеру много больше ДНК плазмид;
- основная масса хромосомной ДНК выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно-замкнутых кольцевых молекул.

Выделение плазмидной ДНК исследуемых штаммов часто проводят методом щелочного лизиса (метода Бирнбойма-Доли). Для разрушения клеточной стенки используют лизоцим и додецилсульфат натрия (ДДС). Для очистки плазмидной ДНК от белков, полисахаридов, хромосомной ДНК проводят с помощью экстракции фенолом, а затем хлороформом. Осаждение плазмидной ДНК проводят под действием изопропилового спирта.

Материал исследования: бактерии с труднолизируемыми стенками, содержащие малые многокопийные плазмиды биodeградации.

Реактивы и оборудование:

Растворы:

Отмывочный раствор: 50мМ ЭДТА рН8, 1М NaCl, (0.02% деоксихолат, 0.05% лаурилсаркозин)

Растворы №1:	50мМ ЭДТА рН8 с лизоцимом (5-10 мг/мл)
Растворы №2:	1% ДДС, 0.2М NaOH
Растворы №3:	3М раствор ацетата калия рН4.8 (охлажденный)
Растворы №4:	фенол насыщенный 1М трисHCl рН=8.0
Растворы №5:	хлороформ
Растворы №6 (TE):	10мМ трисHCl, 1мМ ЭДТА рН=8.0

Оборудование:

Орбитальная термостатируемая качалка; микроцентрифуга «Eppendorf 5415» шейкер-центрифуга; термостат; автоматические дозаторы с варьируемым объемом.

Ход работы.

Для одного опыта необходимо 50мл бактериальной культуры, выращенной до экспоненциальной стадии роста. 50 мл культуру в 50мл центрифужной пробирке осаждают на центрифуге в течение 10 мин при 10 000 об/мин (угловой ротор) при температуре 4-10°C. Осадок биомассы после декантирования культуральной среды над осадком последовательно замораживают и оттаивают (-20°C / +37°C). К оттаявшей биомассе добавляют 20 мл отмывочного раствора, тщательно ресуспендируют на шейкере и центрифугируют 10 мин при 10 000 об/мин, супернатант декантируют. Осадок тщательно ресуспендируют в 3 мл раствора №1, выдерживают в термостате при 37°C 10-15 мин, добавляют 3 мл раствора №2, аккуратно (**осторожно**) перемешивают и снова выдерживают в термостате при 37°C 10-15 мин (до полного лизиса клеток, раствор должен стать совершенно прозрачным). Затем добавляют 3 мл раствора №3, аккуратно перемешивают до тех пор, пока не образуется занимающий почти весь объем раствора белый ко-

мочек, состоящий из хромосомной ДНК и белков. Оставляют пробирку на ледяной бане в течение 5 минут, затем, центрифугируют 20 мин при 10 000 об/мин до образования плотного белого осадка. Фильтруют супернатант через двойной слой марли и сливают в новую 50 мл пробирку. К раствору добавляют 5 мл хлороформа и тщательно перемешивают на шейкере, центрифугируют 20 мин, 8 мл верхней водной фазы (с помощью обрезанного носика дизатора) аккуратно (стараясь не захватить интерфазу) отбирают в новую пробирку и добавляют 6 мл изопропанола. Тщательно перемешивают и оставляют на ледяной бане в течение 5 мин. Пробирку центрифугируют 20 мин, выливают супернатант, и затем тщательно отбирают оставшуюся водную фазу. Осадок тщательно ресуспендируют в 500 мкл ТЕ, переносят в центрифужную микропробирку на 1.5 мл и добавляют 250 мкл фенола, перемешиваем на шейкере, затем добавляют 250 мкл хлороформа и тщательно перемешивают до образования равномерной белой мути. Осадок отфуговывают в течение 5 минут, супернатант отбирают в новую центрифужную пробирку, добавляют 50 мкл раствора №3 и равный объем изопропанола (или двойной объем этанола), центрифугируют в течение 5 мин. Полученный осадок промывают 70% спиртом и ресуспендируем в 50 мкл ТЕ. Полученный препарат плазмидной ДНК хранят при температуре -20°C. Визуализацию препарата проводят методом электрофореза в агарозном геле (лабораторная работа № 20).

Оформление работы.

Записывают ход работы, разрабатывают и изображают блок-схему метода выделения плазмидной ДНК.

Работа 19. Визуализация препаратов плазмидной ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Цель работы – освоить метод электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле — стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например центрифугированием в градиенте плотности. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы ДНК в геле можно окрашивать флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем — бромистым этидием в низкой концентрации. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК. Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами: размером молекул ДНК, концентрацией агарозы, конформацией ДНК, напряженностью электрического поля, составом оснований ДНК и температурой.

Размер молекул ДНК. Молекулы линейной двухцепочечной ДНК перемещаются в геле предположительно одним концом вперед со скоростями, обратно пропорциональными десятичному логарифму их молекулярных масс

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК данного размера перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Между логарифмом электрофоретической подвижности ДНК μ и концентрацией геля существует прямая зависимость. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

Таблица. Выбор концентрации агарозного геля для разделения молекул ДНК в зависимости от размеров

Содержание агарозы, %	0,3	0,6	0,7	0,9	1,2	1,5	2,0
Область эффективного разделения линейных молекул ДНК, т.п.н.	60-1	20-1	10–0,8	7-0,5	6-0,4	4-0,2	3-0,1

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Относительная подвижность трех указанных форм зависит главным образом от концентрации агарозы в геле, а также и от таких факторов, как сила тока, ионная сила буфера или плотность сверхспиральных витков в форме I. В одних условиях форма I перемещается быстрее, а в других - медленнее, чем форма III. Чтобы однозначно определить конформацию ДНК, необходимо провести ее электрофорез в присутствии возрастающих концентраций бромистого этидия. С увеличением концентрации красителя число его молекул связанных с ДНК растет. При этом отрицательные сверхспиральные витки в молекулах формы I постепенно исчезают, а скорость движения ДНК в геле уменьшается. При некоторой критической концентрации свободных молекул красителя, когда в ДНК больше не остается сверхспиральных витков, скорость движения формы I достигает минимальной величины. Последующее добавление новых порции бромистого этидия приводит к образованию положительных сверхспиральных витков, в результате чего подвижность формы I начинает быстро возрастать. Подвижности формы II и формы III в описанных условиях снижаются, хотя и по-разному, вследствие нейтрализации зарядов и увеличения жесткости молекул ДНК под влиянием бромистого этидия. Для большинства препаратов ДНК, находящейся в форме I, критическая концентрация бромистого этидия находится в области 0,1—0,5 мкг/мл.

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально

возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5В/ см.

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях (в отличие от поведения в полиакриламидных гелях) слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30 °С изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре. Однако следует отметить, что гели, содержащие менее 0,5% агарозы, очень мягкие, поэтому с ними лучше работать при 4°С — в этих условиях они становятся более плотными.

Приспособления для проведения электрофореза в геле

За годы, прошедших после изобретения электрофореза в агарозном геле, было предложено множество конструкций электрофорезных аппаратов. В настоящее время чаще всего используют гели в виде горизонтальных пластинок. Эта система имеет по крайней мере четыре преимущества: 1) можно применять низкие концентрации агарозы в связи с тем, что весь гель поддерживается снизу; 2) можно готовить гели в виде пластинок самых разных размеров; 3) хранение и разливка гелей, а также последующие манипуляции с ними достаточно просты; 4) для постановки электрофореза в гелях можно применять прочные и недорогие аппараты.

При проведении электрофореза в горизонтальном геле используются разнообразные кюветы. Большинство из них представляет собой модификации прибора, предложенного Шефнером, в котором гель размещается на отдельной стеклянной пластинке. Пластинку устанавливают на платформе таким образом, что гель находится под самой поверхностью электрофорезного буфера. Сопротивление геля проходящему электрическому току мало отличается от сопротивления буфера, поэтому по гелю проходит значительная доля тока.

Буферные растворы

Для электрофореза обычно применяют буферы, содержащие трис-ацетат, трис-борат или трис-фосфат в концентрации 50 мМ и имеющие рН 7,5—7,8. Чаще всего их готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре. Чаще других буферных растворов используют трис-ацетатный раствор, хотя его буферная емкость довольно низка, и при продолжительных электрофорезах он истощается (анод становится щелочным, а катод — кислотным). В связи с этим обстоятельством рекомендуется предусмотреть возможность рециркуляции буфера между катодным и анодным резервуарами.

Таблица. Буферы, используемые при электрофорезе

Буферный раствор	Состав рабочего раствора	Содержание компонентов в концентрированном растворе (на 1 л)
Трис-ацетатный (ТАЕ)	0,04 М трис-ацетат 0,002 М ЭДТА	(50х) рН 8,0: 242 г трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА
Трис-фосфатный (ТРЕ)	0,08 М трис-фосфат 0,008 М ЭДТА	(10х) рН 8,0: 108 г трис, 15,5 мл 85% фосфорной кислоты (ρ 1,679), 40 мл 0,5 М ЭДТА
Трис-боратный (ТВЕ)	0,089 М трис-борат 0,089 М борная кислота 0,0002 М ЭДТА	(5х) рН 8,0: 54 г трис, 27,5 г борной кислоты, 20 мл 0,5 М ЭДТА

Трис-фосфатный и трис-боратный буферы обеспечивают хорошее разделение фрагментов ДНК в равной степени и имеют значительно более высокую буферную емкость, чем трис-ацетатный. Рециркуляция этих буферов необязательна. Дополнительное, хотя и не особенно важное преимущество трис-фосфата состоит в том, что гели, приготовленные на нем, растворимы в хаотропных агентах, таких, как перхлорат натрия или йодид калия. Это свойство лежит в основе метода (теперь мало используемого) выделения фрагментов ДНК из гелей.

Материал исследования: плазмидная ДНК в ТЕ-буфере (лабораторная работа № 19)

Реактивы:

Концентрированный трис-боратный буфер (ТБЕ):

Трис(оксилметил)аминометан – 108 г/л

Борная кислота - 55 г/л

0.5М ЭДТА рН8 – 40мл/л

Агарозный гель:

Агароза для электрофореза – 8 г/л

Концентрированный ТБЕ буфер – 5мл/л

Бромистый этидий – 1 г/л

Оборудование: источник постоянного тока BioRad model 200/2.0; камера для электрофореза BioRad; трансиллюминатор LKB 2011, автоматические дозаторы.

Ход работы.

Для приготовления агарозного геля необходимое количество агарозы кипятят в ТБЕ, дают остыть до 40-50°C и затем заливают гель в формах с соответствующей гребенкой. Наносят на гель 5-10 мкл препарата ДНК с краской для нанесения. Электрофорез проводится в разбавленном в 20 раз буфере ТБЕ, при напряжении 1-5 В/см, в течение 0.5-4 часов. Агарозный гель осторожно вынимают из

камеры и помещают в камеру транлюминатора, наблюдают в УФ-свете результат разделения, снимок сохраняют в компьютере.

Оформление работы.

Записывают ход работы, распечатывают и вклеивают в лабораторную тетрадь снимок электрофореграммы, рассчитывают подвижность выделенной ДНК, делают выводы о размерах молекул плазмид.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Установите соответствие.

Функция:

- | | |
|--|----------|
| 1. Структурные компоненты рибосом | А. и-РНК |
| 2. Матрица для синтеза белка | Б. т-РНК |
| 3. Матрица для синтеза и-РНК | В. р-РНК |
| 4. Перенос аминокислот к месту синтеза белка на рибосомы | Г. ДНК |

2. Из перечисленных пар азотистых оснований выберите комплементарные пары, обеспечивающие формирование вторичной структуры РНК:

1. гуанин – урацил
2. аденин – урацил
3. гуанин – цитозин
4. тимин – аденин

3. Молекулы ДНК:

1. Построены из дезоксирибонуклеотидов
2. Состоят из двух антипараллельных цепей
3. Содержат равное количество азотистых оснований аденина и урацила
4. Содержат равное количество азотистых оснований цитозина и гуанина
5. Содержат остатки рибозы

4. Установите соответствие.

При формировании вторичной структуры в нуклеиновых кислотах образуются комплементарные пары:

1. А=У	А. ДНК
2. А=Т	Б. РНК
3. Г≡Ц	В. Характерно для ДНК и РНК
4. Ц=А	Г. Не характерно для нуклеиновых кислот

5. Свойства генетического кода:

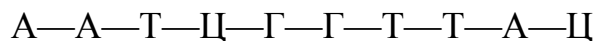
1. Каждый кодон шифрует одну аминокислоту
2. Каждую аминокислоту шифрует только один кодон
3. Одну аминокислоту могут кодировать несколько кодонов

6. Напишите структурную формулу дезоксицитидин-3'-фосфата.

7. Сравните состав нуклеотидов ЦМФ и дГМФ:

- | | |
|------------|-------------------------------------|
| 1. ЦМФ | А. Содержит пуриновое основание |
| 2. дГМФ | Б. Содержит пиримидиновое основание |
| 3. Оба | В. Содержит пентозу |
| 4. Ни один | Г. Содержит пирофосфат |

8. Дана цепь ДНК - достройте вторую цепь.



9. Заполните таблицу.

Сравнительная характеристика ДНК и РНК.

Признаки	ДНК	РНК
1. Количество цепей		
2. Азотистые основания в нуклеотидах		
3. Пентозы		
4. Нахождение в клетке		
5. Функции		

Раздел IV. ЛИПИДЫ

Работа 20. Качественные реакции на липиды

Цель работы – качественно охарактеризовать пищевые липиды.

Липиды – это входящие в состав живых организмов жироподобные вещества, плохо растворимые в воде и хорошо растворимые в неполярных органических растворителях. Под этим названием объединяют разные по химическому строению и биологическим функциям вещества, которые извлекают из растительных и животных тканей путем экстракции неполярными органическими растворителями.

В зависимости от способности к гидролизу с образованием солей высших жирных кислот (мыл) липиды делят на *омыляемые* и *неомыляемые*.

Омыляемые липиды состоят из двух или более структурных компонентов, на которые они расщепляются при гидролизе под действием кислот, щелочей или ферментов липаз. Основными структурными компонентами омыляемых липидов являются спирты и высшие жирные кислоты. Омыляемые липиды более сложного строения могут содержать остатки фосфорной кислоты, аминокспиртов, а также остатки моно- и олигосахаридов.

К неомыляемым относят липиды, которые не являются производными жирных кислот и не способны к гидролизу. Известны две основные группы неомыляемых липидов: *терпены* и *стероиды*.

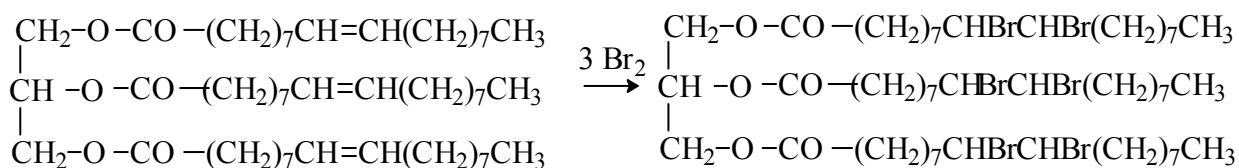
Материал исследования: растительное масло (свежее и прогорклое).

Реактивы и оборудование: 30% раствор гидроксида натрия; раствор Люголя; бромная вода; смесь ледяной уксусной кислоты с хлороформом (2:1); 2% раствора йодида калия; раствор крахмала; смесь концентрированной серной кислоты с формалином (50:1); уксусный ангидрид; гидросульфат калия (безводный); аммиачный раствор оксида серебра; фуксинсернистая кислота;

фильтровальная бумага; дистиллированная вода; краситель судан III или осмиевая кислота; пробирки; пипетки; микроскоп; штатив с лапками; газоотводная трубка; газовая горелка.

Опыт 1. Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в подсолнечном масле

При добавлении бромной воды к подсолнечному маслу желтая окраска брома исчезает. Реакция обусловлена наличием в растительном масле ненасыщенных жирных кислот.

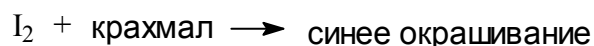
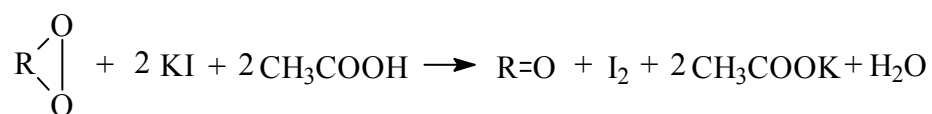


Ход работы. К 3 каплям подсолнечного масла добавляют 2 капли бромной воды, встряхивают. Следят за изменением окраски.

Опыт 2. Открытие перекисных соединений в растительном масле

При взбалтывании растительного масла в хлороформе в кислой среде с раствором йодистого калия, жидкость приобретает желтую окраску, которая при добавлении крахмала переходит в синюю.

Реакция обусловлена наличием в масле перекисных соединений, которые окисляют йодистый калий с образованием молекулярного йода:



Реакция может быть использована для количественного определения перекисного числа, которое является показателем несвежести масла.

Ход работы. В одну пробирку берут 2 капли свежего подсолнечного масла, в другую – несвежего. Во все пробирки добавляют по 10 капель смеси ледяной уксусной кислоты с хлороформом (2:1), по 5 капель 2% раствора йодида

калия и встряхивают. Во все пробирки добавляют по каплям 0,5% раствора крахмала. Наблюдают за изменением окраски в пробирках. Результаты работы записывают в форме таблицы.

Масло подсолнечное	Окраска жидкости после добавления	
	Йодистого калия	Крахмал
Свежее		
Несвежее		

Опыт 3. *Обнаружение стероидов в растительном масле*

Эти реакции не являются строго специфичными только для холестерина: их дают и другие вещества стероидной природы.

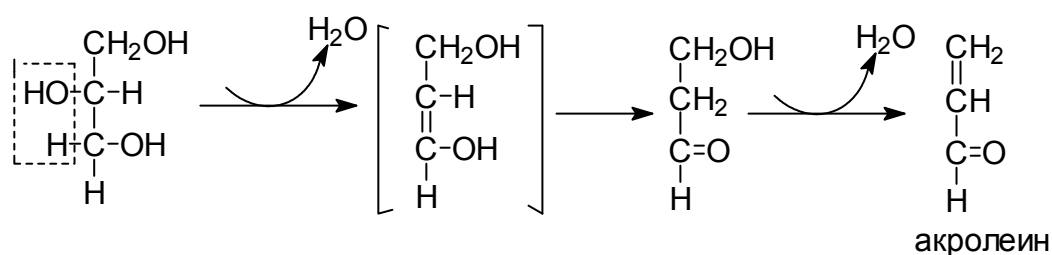
Ход работы. В сухую пробирку вносят 2 капли подсолнечного масла и 20 капель хлороформа. К раствору масла добавляют 20 капель смеси концентрированной серной кислоты с формалином (50:1) и взбалтывают. Раствор разделяется на два слоя: хлороформный вишневого цвета и слой серной кислоты красно-коричневого цвета с зеленой флюоресценцией. Из верхнего хлороформного слоя отбирают 5-6 капель в сухую пробирку и добавляют 1-2 капли уксусного ангидрида. Наблюдают изменение окраски.

Опыт 4. *Омыление жира*

К 0,5 мл подсолнечного масла приливают 0,5 мл 30% раствора гидроксида натрия и смесь осторожно кипятят 5-6 мин. Омыление считают законченным, если взятая стеклянной палочкой капля жидкости полностью растворится в дистиллированной воде с образованием обильной пены при встряхивании.

Опыт 5. *Акролеиновая проба*

Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании глицерина в присутствии водоотнимающих агентов (гидросульфат калия, борная кислота, сульфат магния) происходит образование непредельного альдегида – акролеина:



Липиды, не содержащие глицерина (воска, стероиды) акролеиновой пробы не дают.

Ход работы. В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира) и прибавляют пятикратное количество гидросульфата калия. Нагревают пробирку осторожно, но сильно (в вытяжном шкафу) до появления белых паров. Вносят в пробирку кусочки фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором оксида серебра и фуксинсернистой кислотой. Отмечают изменение цвета.

Опыт 6. Качественная реакция на жиры и масла в тканях

При добавлении осмиевой кислоты к капле масла, масло окрашивается в черный цвет. Кроме осмиевой кислоты применяют краситель судан III, который окрашивает масла в различные оттенки красного. Эти реактивы пригодны для микрохимических определений. Срезы тканей смачивают одним из них и наблюдают под микроскопом: капли масла в тканях, окрашенные в черный или красный цвет.

Ход работы. Готовят срезы животных и растительных тканей. Наносят на срезы растворы красителей, наблюдают окрашенные срезы под микроскопом. Наблюдаемую картину зарисовывают в тетради.

Работа 21. Рефрактометрическое определение жира в сливочном масле

Цель работы – ознакомиться с аналитическим методом определения жира в сливочном масле.

Метод основан на измерении показателя преломления раствора молочного жира в растворителе с известным (более высоким, чем для жира) показателем преломления. Показатель преломления жидкого молочного жира находится в пределах 1,4600–1,4640. В качестве растворителя жира применяют α -монобромнафталин – малолетучее соединение, показатель преломления которого равен 1,6580.

Материал исследования: сливочное масло.

Реактивы и оборудование: α -монобромнафталин; сульфат натрия; пипетки; стеклянные палочки.

Ход работы. В стеклянном пузырьке взвесить 1 г сливочного масла. Пипеткой добавить 0,5 мл α -монобромнафталина, содержимое слегка нагревают, чтобы растопить масло. Для обезвоживания масла прибавляют 0,3 г сульфата натрия. Смесь тщательно растирают стеклянной палочкой в течение 2-3 минут. После того как белок осядет на дно пузырька, 2-3 капли прозрачной жидкости с помощью капилляра наносят на призму рефрактометра. И измеряют показатель преломления.

Содержание жира (%) находят по таблице (см. Приложение 2).

Оформление работы. Описать принцип метода. Результаты измерений и найденное содержание жира в сливочном масле занести в рабочую тетрадь.

Работа 22. Сравнение ненасыщенности жиров

Цель работы – сравнить степень ненасыщенности различных жиров и масел.

Ненасыщенность жира зависит от присутствия в его составе непредельных жирных кислот. Ненасыщенные соединения легко присоединяют галогены.

Материал исследования: растительные масла, сливочное масло, животные жиры, маргарин.

Материалы и оборудование: весы, микробюретка, пробирки, пипетка на 3 мл, хлороформ (200 мл), иод (0,001 н) в хлороформе.

Ход работы. Отвешивают в пробирки по 0,5 г жиров. Растворяют каждый жир в 3 мл хлороформа и титруют из микробюретки 0,001 н раствором иода в хлороформе до отчетливо розовой окраски.

Оформление работы. Коротко описать принцип метода. Результаты измерений занести в рабочую тетрадь. Расположить жиры по увеличению ненасыщенности.

Работа 23. Определение иодного числа

Обычно степень ненасыщенности жиров определяют иодным числом. Иодное число измеряют массой йода (г), которое присоединяется к 100 г жира.

Иодное число является одним из наиболее важных химических показателей для масел (жиров). Оно позволяет судить о степени ненасыщенности жира, о склонности его к «высаханию», прогорканию и другим изменениям, а также о пищевой ценности жира.

Материал исследования: растительное масло (подсолнечное, оливковое, кукурузное и др.).

Материалы и оборудование: весы, пробирки, пипетка градуированная на 10 мл, колбы конические на 250 мл с пробками (4 шт), бюретка с красным (25 мл), цилиндр мерный на 100 мл, этиловый спирт (400 мл – по 100 мл на каждый опыт + раствор йода), 0,2 н. раствор йода в спирте (96%)¹⁸, раствор гипосульфита (0,1 н.); крахмал (1%).

Ход работы.

В сухую коническую колбу емкостью 250 мл с пришлифованной пробкой помещают исследуемое масло. Навеску масла берут на аналитических весах следующим образом: взвешивают склянку с маслом и пипеткой отбирают из нее в колбу 3–4 капли масла и снова взвешивают. По разности масс определяют массу навески. В колбу добавляют 25 мл спирта. Если масло плохо растворяется, колбу можно погреть на водяной бане. Во второй колбе ставят «холостой опыт» (контроль), т.е. берут в нее 25 мл спирта. В каждую колбу (опыт и контроль) прибавляют по 12,5 мл 0,2 н. спиртового раствора йода (из бюретки), смешивают, приливают по 100 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают, закрыв пробкой. Через 5 мин содержимое колб оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата сначала до появления слабо желтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

¹⁸ 5,08 г свежеприготовленного йода переносят в мерную колбу на 200 мл и растворяют в спирте.

Разность между количеством 0,1 н. раствора тиосульфата, затраченного на титрование опыта и контроля, является показателем количества иода, связанного навеской масла.

Оформление работы.

Иодное число (в г) вычисляют по формуле:

$$I = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0127 \cdot 100}{a},$$

где V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата, пошедшего на титрование контроля, мл;

V_2 – объем 0,1 н раствора тиосульфата, пошедшего на титрование опытной пробы, мл;

0,0127 – титр тиосульфата по иоду;

a – навеска жира, г.

Расхождения в параллельных опытах допускаются лишь в десятых долях получаемых иодных чисел.

Оформление работы. Коротко описать принцип метода. Результаты измерений занести в рабочую тетрадь.

Работа 24. Определение состава биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии

Цель работы – охарактеризовать бактериальные биоПАВ гликолипидной природы методом тонкослойной хроматографии.

Биосурфактанты (био-ПАВ) – это поверхностно-активные вещества биологического происхождения. Продуцентами биосурфактантов являются микроорганизмы, растения и животные. По химическому строению поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные молекулы, имеющие тенденцию к образованию конгломератов и активно взаимодействовать с поверхностями различной полярности. Основным химическим свойством ПАВ является дифильность молекулы: одна часть молекулы – гидрофобная или неполярная – обычно представлена углеводородным радикалом, не обладающим сродством к

воде; другая часть молекулы – гидрофильная или полярная, обладает высоким сродством к воде.

Таблица 1.

Классификация биосурфактантов

Тип биосурфактанта		Микроорганизмы-продуценты
Низкомолекулярные	Гликолипиды	Рамнолипиды
		<i>Pseudomonas</i>
		Трегалоллипиды
		<i>Rhodococcus</i>
	Гликопептиды	Софоролипиды
		<i>Candida</i>
		Орнитин- и серинсодержащие
Полимерные	—	<i>Flavobacterium, Rhodopseudomonas, Serratia, Pseudomonas</i>
		Сурфактин, грамицидин, полимиксин
		<i>Bacillus</i>
	Прочие	Вискозин, путисолвин
		<i>Pseudomonas</i>
		Жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды
—	—	<i>Corynebacterium, Acinetobacter, Micrococcus, Rhodococcus, Candida, Penicillium, Aspergillus</i>
		Эмульсан
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
—	—	Аласан
		<i>Acinetobacter radioresistens</i>
—	—	Липосан
		<i>Candida lipolytica</i>

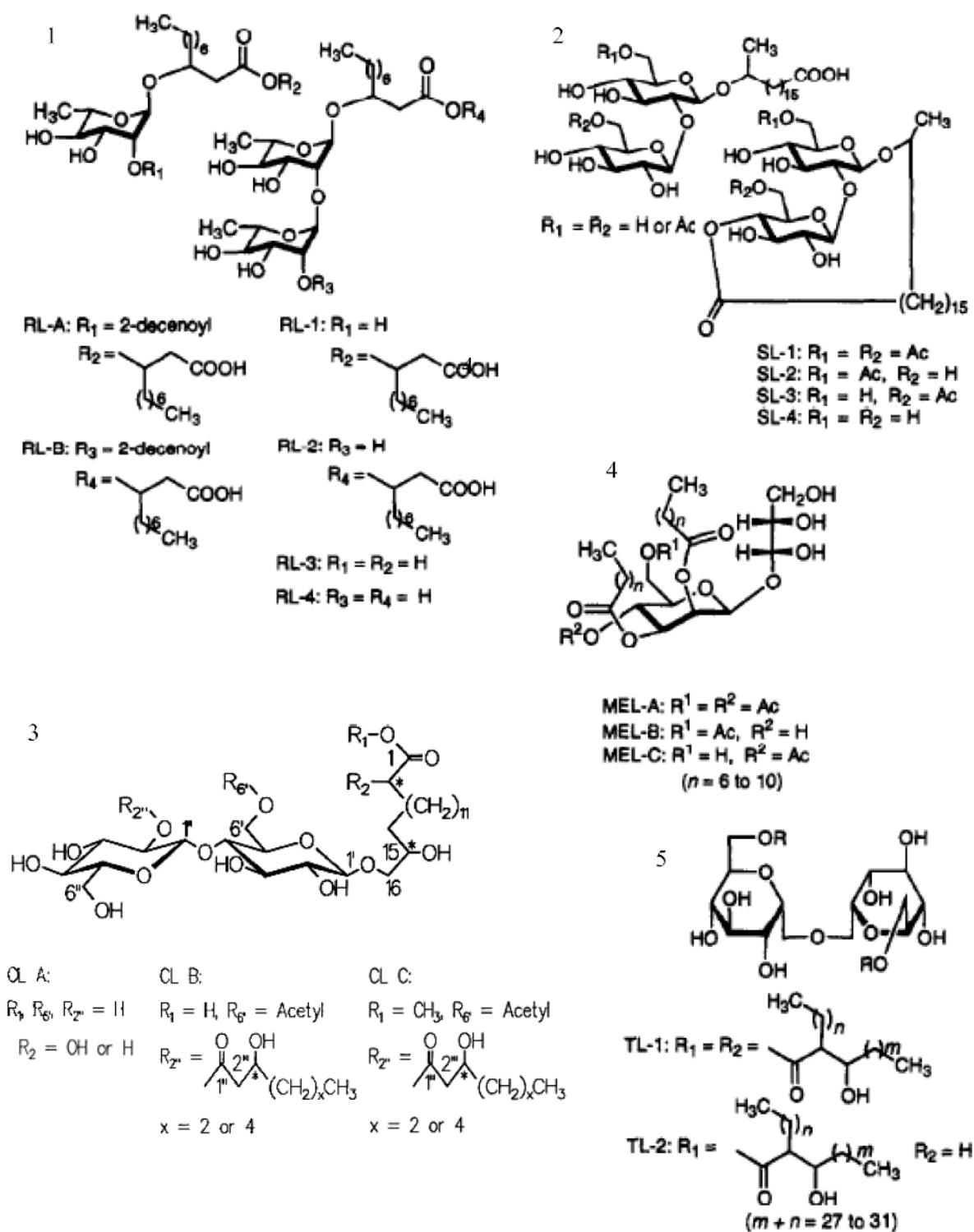


Рис. 3. Химическая структура гликолипидных биосурфактантов

1 – Рамнолипиды RL-1, RL-2, RL-3 и RL-4 из *Pseudomonas aeruginosa*;
 2 – софоролипиды SL-1, SL-2, SL-3 и SL-4 из *Candida bombicola*;
 3 – целлобиозолипиды CL-A, CL-B и CL-C из *Ustilago maydis*; 4 – маннозил-эритритоллипиды MEL-A, MEL-B и MEL-C из *Pseudozyma antarctica*;
 5 – трегалозолипиды TL1 и TL2 из *Rhodococcus erythropolis*.

Реактивы и оборудование: капилляры, хроматографическая камера, установка для проявления хроматограмм нагреванием, стеклянные емкости для приготовления систем хроматографирования и проявления, пинцет, стеклянные чашки Петри, силуфол или другие хроматографические пластины; система для разделения: хлороформ-метано-вода (60-25-4); системы для проявления: 1) концентрированный раствор перманганата калия, 2) система для проявления углеводов¹⁹; экстракты биосурфактантов; стандарты – растворы трегалозы и рамнозы.

Ход работы.

1. На хроматографической пластине карандашом по линейке на 1 см выше нижнего края пластины отмечают линию нанесения образцов. Капиллярами наносят растворы анализируемых веществ по линии разметки на расстоянии 0,7 - 1 см друг от друга. Высушивают растворитель и помещают пластину в заранее подготовленную камеру с системой растворителей, оставляют пластину до тех пор, пока растворители не поднимутся до верхнего края пластины. Пластины высушивают и проявляют.

2. Для обнаружения непредельных соединений пластину пинцетом опускают в раствор перманганата калия, а затем промывают под струей водопроводной воды.

3. Для обнаружения углеводных компонентов в анализируемых соединениях используют специфический обнаружитель - α -нафтол.

4. Хроматограмму опрыскивают раствором α -нафтола до увлажнения слоя силикагеля, высушивают на воздухе и слегка опрыскивают раствором серной кислоты. Нагревают в сушильном шкафу при 120°C до максимального проявле-

¹⁹ **Реагенты.** α -Нафтол. В 100 мл смеси метанол-вода (1:1) растворяют 0.5 г α -нафтола, перекристаллизованного из смеси гексан-хлороформ.

Серная кислота. Концентрированную серную кислоту разбавляют водой в соотношении 10:90 (по объему).

ния окраски. Гликолипиды (цереброзиды, сульфатиды, ганглиозиды, гликозилдиглицериды и т.д.) проявляются сине-фиолетовыми, другие полярные липиды - желтыми, а холестерин - серо-красными пятнами.

ТЕСТЫ И ЗАДАЧИ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Жирные кислоты имеют следующие точки плавления: стеариновая ($+69,6^{\circ}\text{C}$), олеиновая ($+13,4^{\circ}\text{C}$), линолевая (-5°C), линоленовая (-11°C). Какими структурными особенностями определяется та или иная температура плавления этих кислот?
 1. Разным числом атомов углерода в молекулах кислот
 2. Разной степенью ненасыщенности радикалов жирных кислот
 3. Наличием разных функциональных групп
 4. Разветвленностью углеродного скелета
2. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула сфингозина, молекула линоленовой кислоты, фосфорная кислота, холин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
3. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула стеариновой кислоты, молекула линолевой кислоты, молекула глицерина, молекула фосфорной кислоты, этаноламин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицеролы, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
4. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула сфингозина, молекула олеиновой кислоты, фосфорная кислота, этаноламин. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфогицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).

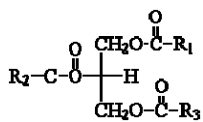
5. В результате гидролиза молекулы липида образовались: молекула стеариновой кислоты, две молекулы линолевой кислоты, молекула глицерина. Написать структурную формулу липида и определить, к какому классу липидов он относится (триацилглицеролы, фосфоглицериды, фосфосфинголипиды или гликолипиды).
6. Выберите незаменимую жирную кислоту:
1. стеариновая
 2. пальмитиновая
 3. олеиновая
 4. линоленовая
7. Среди перечисленных жирных кислот выберите насыщенные:
1. масляная
 2. олеиновая
 3. арахидоновая
 4. пальмитиновая
8. Среди перечисленных жирных кислот выберите ненасыщенные:
1. стеариновая
 2. олеиновая
 3. линоленовая
 4. пальмитиновая
9. 1 моль триацилглицерида может присоединить 3 моль брома. Укажите триацилглицериды, удовлетворяющие этому условию:
1. триолеиноилглицерин
 2. дипальмитоиллиноленоилглицерин
 3. тристеароилглицерин
 4. трипальмитоилглицерин
10. При полном гидролизе омыляемого липида образовались: глицерин, пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, фосфорная кислота и этаноламин. К какому классу омыляемых липидов он относится:
1. гликолипиды
 2. фосфосфинголипиды

3. триацилглицериды

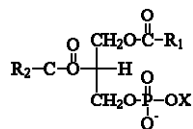
4. фосфоглицериды

11. Укажите структуру, соответствующую гликолипидам:

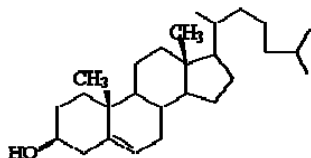
1.



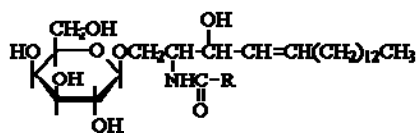
2.



3.



4.



Приложение 1. Зависимость показателя преломления от концентрации белка в растворе

Показатель преломления с точностью до тысячной	Концентрация белка (в %) при показателе преломления с точностью до десятитысячной									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,36	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	1,94	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,52	2,63	2,69	2,75	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,10	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,68	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,26	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,84	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,43	5,54	5,60	5,66	5,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,01	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,59	6,70	6,76	6,82	6,88	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,17	7,29	7,34	7,40	7,46	7,52
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,75	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,33	8,46	8,51	8,57	8,62	8,68
1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,91	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26

1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,50	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,08	10,19	10,25	10,31	10,37	10,43
1,354	10,48	10,54	10,60	10,66	10,66	10,77	10,83	10,89	10,95	11,01
1,355	11,06	11,12	11,18	11,23	11,23	11,35	11,41	11,47	11,52	11,58
1,356	11,64	11,70	11,76	11,81	11,81	11,93	11,99	12,05	12,10	12,16
1,357	12,22	12,28	12,34	12,39	12,45	12,51	12,57	12,63	12,68	12,74
1,358	12,80	12,86	12,92	12,97	13,03	13,09	13,15	13,21	13,26	13,32
1,359	13,38	13,44	13,50	13,55	13,61	13,67	13,73	13,79	13,84	13,90
1,360	13,96	14,02	14,08	14,13	14,19	14,25	14,31	14,37	14,42	14,48

**Приложение 2. Зависимость показателя преломления от содержания
жира в сливочном масле**

Показатель преломления	Содержание жира (%)	Показатель преломления	Содержание жира (%)	Показатель преломления	Содержание жира (%)
1,5285	90,5	1,5360	76,7	1,5440	64,7
1,5290	89,5	1,5370	75,0	1,5445	64,0
1,5295	88,5	1,5375	74,3	1,5450	63,3
1,5300	87,5	1,5380	73,4	1,5455	62,7
1,5305	86,6	1,5385	72,6	1,5460	62,0
1,5310	85,6	1,5390	71,9	1,5465	61,4
1,5315	84,6	1,5395	71,1	1,5470	60,8
1,5320	83,7	1,5400	70,0	1,5475	60,4
1,5325	82,8	1,5405	69,6	1,5480	59,4
1,5330	81,9	1,5410	68,9	1,5485	58,9
1,5335	81,0	1,5415	68,1	1,5490	58,3
1,5340	80,0	1,5420	67,4	1,5495	57,7
1,5345	79,2	1,5425	66,7	1,5500	57,1
1,5350	78,3	1,5430	66,0	1,5505	56,5
1,5355	77,5	1,5435	65,2		

Библиографический список

Основная литература

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1998. – 704 с.
2. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1998. – 479 с.
3. Кольман, Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – М. : Мир, 2000. – 469 с.
4. Биохимия человека : в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Радзуэлл. – М. : Мир, 1993.
5. Николаев, А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. – М., 1998. – 496 с.
6. Ленинджер, А. Основы биохимии : в 3 т. / А. Ленинджер. – М. : Мир, 1983.
7. Страйер, Л. Биохимия : в 3 т. / Л. Страйер. – М. : Мир, 1984.
8. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Агар, 1999. – 512 с.

Дополнительная литература

9. Белки и пептиды : в 2 т. Т. 1. – М. : Наука, 1995. – 448 с.
10. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Элиот, У. Элиот, К. Джонс. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
11. Мецлер, Д. Биохимия : в 3 т. / Д. Мецлер. – М. : Мир, 1980.
12. Овчинников, Ю. В. Биоорганическая химия / Ю. В. Овчинников. – М. : Наука, 1987. – 815 с.
15. Сингер М. Гены и геномы : в 2 т. / М. Сингер, П. Берг. – М. : Мир, 1998.
16. Степанов, В. М. Молекулярная биология. Структура и функции белков : учебник для биол. спец. вузов / В. М. Степанов ; под. ред. А. С. Спирина. – М. : Высш. шк., 1996. – 335 с.
17. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. – 288 с.