

ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ
ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ІВАНА ФРАНКА

Галина Клепач

Експериментальні методи дослідження в біології

Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу
(для студентів ОКР “Магістр” спеціальності “ПМСО. Біологія”)

??????

2010

УДК 577.2

ББК 28

К 48

Рекомендовано до друку вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка (протокол № 4 від 18.03. 2010 р.)

Відповідальний за випуск:

Волошанська Світлана Ярославівна – кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

Рецензенти:

Гончар Михайло Васильович – доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України;

Монастирська Світлана Семенівна – кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

К 48 **Клепач Галина. Експериментальні методи дослідження в біології. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу (для студентів ОКР “Магістр” спеціальності “ПМСО. Біологія”): навч.-метод. пос. [для студентів вищ. навч. закл.]. / Галина Миколаївна Клепач.** – Дрогобич: Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного університету ім. Івана Франка, 2010. – 66 с.

Методичні вказівки є навчальним посібником, написаним відповідно до програми навчальної дисципліни “Експериментальні методи дослідження в біології” для підготовки фахівців освітньо-кваліфікаційного рівня “Магістр” спеціальності “ПМСО. Біологія”, затвердженої вченою радою Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка. Вказівки містять пояснювальну записку, перелік робіт, лабораторні роботи з короткими теоретичними відомостями, практичними і теоретичними завданнями, додатки.

УДК 577.2
ББК 28

ВСТУП

Курс “Експериментальні методи дослідження в біології” у системі підготовки фахівців освітньо-кваліфікаційного рівня “Магістр” у педагогічному університеті є профілюючим курсом. Мета даного курсу – формування знань про сучасні експериментальні методи, які використовуються у наукових, а також біохімічних і клінічних лабораторіях. Лабораторні роботи при вивченні цього курсу спрямовані на вивчення і пізнання суті біологічних явищ, механізмів і властивостей біологічно важливих речовин клітин та організмів.

Експериментальні методи дослідження в біології ознайомлюють із логікою і принципами проведення дослідів, із плануванням, підготовкою та ходом виконання досліджень, перевіркою та аналізом отриманих результатів на основі відповідних знань та методів із цитології, біохімії, мікробіології, генетики, молекулярної біології та ін. Тому цілісне формування поглядів сучасного біолога було б неповним без наукових знань про потенційні можливості практичного використання методів експериментальної біології для пізнання біологічних механізмів, які функціонують у клітині, в організмі.

Курс “Експериментальні методи дослідження в біології” також ознайомлює з історією становлення і розвитку сучасних експериментальних методів для отримання достовірних результатів у різних напрямках біології, з появою і розвитком нових підходів, мета яких – отримати нові практично цінні результати, які знаходять застосування у біології, медицині, діагностиці, сільському господарстві та ін., а також аналізує внесок українських і зарубіжних учених у розробку сучасних експериментальних методів біології.

Важливими завданнями курсу “Експериментальні методи дослідження в біології” є:

- формування знань про експериментальні відкриття та факти, явища і процеси, методи біології, співвідношення теорії і практики у розвитку сучасної біології;
- формування поглядів на можливості біологічних методів, скерованих виявляти біологічні явища і процеси;

- розкриття потенційних можливостей сучасних молекулярно-біологічних методів, завданнями яких є аналіз структури і властивостей біологічно-важливих речовин;
- формування вмінь самостійно здобувати знання, спостерігати і пояснювати наукові дані, а також умінь користуватися навчальною та довідковою літературою;
- формування вмінь використовувати відомі факти і явища для побудови експерименту.

Методика проведення усіх видів навчальних занять (лекцій і лабораторних) враховує сучасні потреби майбутнього магістра – викладача біології.

Лекційний курс супроводжується демонстраціями, які мають допомогти студентам краще засвоїти новий матеріал.

При виконанні лабораторних робіт від студентів вимагається, щоб вони чітко розуміли мету і завдання дослідів, володіли знаннями з теми заняття, коректно і правильно виконували досліди, розуміли суть методу дослідження і вміли не тільки розуміти одержані результати, а й оцінити ступінь їх достовірності.

На лабораторних заняттях студенти ознайомлюються з деякими експериментальними методами, які широко застосовуються в науково-дослідних та клінічних лабораторіях. Роботи, які пропонуються у вказівках, дають можливість студентам освоїти методи визначення біомаси клітин мікроорганізмів, способи їх руйнування, ферментативні методи кількісного аналізу деяких речовин, спектральні й оптичні методи аналізу речовин, хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу й очистки білків.

Викладання курсу “Експериментальні методи дослідження в біології” базується на знаннях з біохімії, біофізики, біоорганічної хімії, молекулярної біології, отриманих студентами раніше, коли вони ознайомились із фізико-хімічними властивостями біологічно-важливих речовин, біологічними процесами, механізмами та явищами.

Викладання курсу “Експериментальні методи дослідження в біології” і контроль досягнутих успіхів студентів здійснюється із застосуванням модульно-рейтингової системи: програма

складається з одного модуля; модульна атестація охоплює теоретичні питання програми та успіхи студентів при виконанні і захисті лабораторних робіт.

У робочій програмі навчальної дисципліни “Експериментальні методи дослідження в біології” вказуються питання, що виносяться на самостійне опрацювання.

I. МЕТОДИЧНІ ПОРАДИ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ І ОФОРМЛЕННЯ ЗВІТУ

1. Оформлювати лабораторні роботи потрібно у вигляді звітів, у яких вказувати порядковий номер лабораторної роботи, тему, мету, матеріали та обладнання, завдання, хід виконання та результати роботи, висновки.

2. Результати роботи подавати у вигляді таблиць, графіків, детальних розрахунків, у деяких роботах зарисувати схему експерименту, користуватися графітовим олівцем (при необхідності кольоровими олівцями). Підписувати рисунки внизу, відповідно пояснюючи. Рисунки повинні бути чіткими, визначених розмірів, розміщуватися на сторінках раціонально.

3. За контрольними запитаннями до лабораторної роботи підготувати теоретичний матеріал для допуску, а потім до її захисту.

4. У кінці кожної виконаної роботи після виконання усіх завдань потрібно зробити висновок.

5. При захисті лабораторної роботи потрібно знати відповіді на запропоновані запитання.

***Примітка.** Див. додаток (зразок звіту про виконання лабораторної роботи).*

II. ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Лабораторна робота 1. Визначення біомаси мікроорганізмів.
Методи руйнування клітин.

Лабораторна робота 2. Спектральні методи досліджень.
Адсорбційна спектрофотометрія.

Лабораторна робота 3. Ферментативні методи визначення
вмісту речовин.

Лабораторна робота 4. Визначення концентрації білків.

Лабораторна робота 5. Визначення активності ферментів.

Лабораторна робота 6. Хроматографічні методи очищення
білків. Іонообмінна хроматографія.

Лабораторна робота 7. Електрофоретичні методи аналізу білків.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

ВИЗНАЧЕННЯ БІОМАСИ МІКРООРГАНІЗМІВ. МЕТОДИ РУЙНУВАННЯ КЛІТИН

Мета: ознайомитися із прямими і непрямими методами визначення біомаси клітин дріжджів-сахароміцетів та методами руйнування клітин мікроорганізмів.

Матеріали та обладнання: культура дріжджів-сахароміцетів, мірний циліндр (250 мл), аналітичні ваги, пробірки, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатор змінного об'єму, насадки для дозатора, стаканчики, вода дистильована, піпетман, фотоелектроколориметр (ФЕК), центрифуга, фарфорові чашки, камера Горяєва, оптичний мікроскоп.

Теоретичні відомості. Біомаса – це загальний термін, який використовується для позначення сукупності мікроорганізмів у культурі. Під іншими термінами (мікроорганізми, міцелій, плазмодій) слід розуміти певний тип біомаси. Термін “біомаса” відображає ступінь інтенсивності росту; він є дуже важливим виробничим параметром, таким само, як економічний коефіцієнт, метаболічний коефіцієнт, питома швидкість росту тощо.

Основою методів, які використовуються для визначення біомаси мікроорганізмів, є вимірювання восьми параметрів: ваги, об'єму і лінійних розмірів, маси деяких компонентів біомаси (білка, ДНК, РНК), маси використаного субстрату чи використаного продукту, швидкості метаболізму, світлорозсіювання, прямий підрахунок клітин чи органел, результати фарбування. Вибір методу визначення біомаси має вирішальне значення для успішного розв'язання проблеми дослідження росту культур. Обмеження, властиві кожному методу, часто утруднюють цей вибір. На його вибір впливають такі фактори: 1) властивості біомаси; 2) властивості культуральної рідини; 3) потрібна точність; 4) потрібна чутливість і 5) потрібна швидкість вимірювання. Властивостями біомаси, які впливають на вибір, є її гомо- чи гетерогенність, вміст у ній ниткоподібних структур чи частинок, легкість

відокремлення біомаси від середовища, вік біомаси тощо. Відокремлення клітин бактерій від суспензії – процедура достатньо трудомістка, яку можна полегшити за допомогою хімічних методів шляхом осадження клітин чи їх флокуляції.

На результати визначення біомаси впливають такі фактори, як густина і колір культури, наявність твердої чи розчинної речовини, яка реагує подібно до біомаси, наявність у клітинах запасних речовин, таких як глікоген чи полі- β -оксимасляна кислота. Усі методи значно відрізняються один від одного за своєю чутливістю, витратністю часу, точністю. Порівняння найбільш поширених методів щодо їх чутливості наведено у додатку 1. Як видно з таблиці, найменш чутливий метод – визначення маси сухої біомаси, найбільш чутливий – підрахунок кількості клітин.

Дуже часто для отримання з клітин біологічно активних речовин використовують різноманітні методи їх руйнування, що зумовлено різноманітністю типів клітин. Більшість клітин характеризуються певними особливостями, які потрібно враховувати при їх руйнуванні. Наприклад, клітинна мембрана тваринних клітин широко варіює за своєю міцністю, порівняно з легко руйнованими еритроцитами, деякі з них містять жорсткий колагенвмісний матеріал, як, наприклад, у кровноносних судинах та інших тканинах, що містять гладенькі м'язи. Рослинні клітини здебільшого важче руйнуються, ніж тваринні (у зв'язку із наявністю в них целюлозної оболонки). Серед бактерій є достатньо крихкі організми, які легко руйнуються травними ферментами чи дією осмотичного шоку, і більш стійкі з товстою клітинною стінкою; для руйнування останніх потрібен сильний механічний вплив, який не може бути надмірним, оскільки при цьому можуть інактивуватися лабільні ферменти. У додатку 2 наводиться перелік методик та ілюстрації (див. додаток 3) до них. Ці методи використовуються для руйнування клітин і екстракції ферментів. Якщо фермент локалізований в органелах, то метод може бути використаний тільки за умови, що мембрана органел також буде зруйнована. З іншого боку, використовуються м'які методи, які забезпечують збереження цілісності органел, що дасть змогу уникнути забруднення цитоплазматичними білками перед наступною екстракцією ферменту з органел.

Передчасне розчинення поверхневих колагенових і целюлозних структур препаратами гідролітичних ферментів дає змогу в подальшому руйнувати клітини більш м'якими способами, зберігаючи цілісність органел. Вихід очищених органел може бути дуже низьким, тому у багатьох випадках рекомендується зруйнувати всю тканину, а потім виділяти потрібний фермент зі складної суміші білків екстракту. Наприклад, ферменти мітохондрій і хлоропластів часто отримують із тканинного гомогенату, а не з виділених органел.

Хід роботи

Завдання 1. Прямий метод визначення біомаси клітин дріжджів-сахароміцетів. Біомасу виданої Вам культури дріжджів-сахароміцетів добре збовтати, відібрати 100 мл та осадити клітини шляхом центрифугування при 5 тис. об./хв. упродовж 15 хв. Осад клітин тричі відмити водою (зливати воду максимально акуратно, без клітин!) від компонентів середовища шляхом центрифугування. Процедуру відбору клітин із наступним їх “відмиванням” зробити у трьох повторях (для достовірності результату).

Отримані осадки клітин шпателем перенести на суху фарфорову чашку, попередньо зваживши її з точністю до 0,001 г, і сушити у сухо-повітряній шафі при 105 ± 2 °C до стабільної ваги. Суху біомасу клітин дріжджів-сахароміцетів разом із фарфоровою чашкою зважити на вагах із точністю до 0,001 г.

Визначити кількість клітин (у мг сухої біомаси на 1 мл суспензії) у виданій Вам культурі дріжджів-сахароміцетів (усереднити результат трьох повторів).

Завдання 2. Непрямий (оптичний) метод визначення біомаси клітин дріжджів-сахароміцетів. Біомасу виданої Вам культури дріжджів-сахароміцетів добре збовтати та провести серію розведень: $\times 25$, $\times 50$, $\times 100$, $\times 500$ і $\times 1000$ разів. Визначити оптичну густину розведених суспензій шляхом їх фотометрування на приладі ФЕК КФК-3 при 540 нм у кюветі ($l = 3$ мм).

Результати вимірювань занесіть у таблицю:

Розведення	D_{540}	Біомаса клітин у суспензії, мг/мл

Побудувати калібрувальний графік залежності оптичної густини при 540 нм (D_{540}) від біомаси клітин у суспензії (в мг абсолютної маси на 1 мл суспензії). Провести розрахунок калібрувального коефіцієнта k , виходячи з отриманого графіка, який надалі використовувати для розрахунку біомаси дріжджів-сахароміцетів, користуючись формулою:

$$C = \frac{D_{540} \cdot n}{k}$$

де D_{540} – оптична густина при 540 нм;

n – розведення вихідної суспензії;

k – коефіцієнт перерахунку, визначений при калібруванні гравіметричним методом (при виконанні завдання 1).

Завдання 3. Прямий метод визначення кількості клітин дріжджів-сахароміцетів. Біомасу виданої Вам культури дріжджів-сахароміцетів добре збовтати та провести серію розведень: $\times 100$, $\times 200$ і $\times 500$ разів. Визначити кількість клітин у розведених суспензіях шляхом прямого підрахунку, користуючись камерою Горяєва та оптичним мікроскопом (15×8).

Обрахунок клітин проводиться так. Підраховують усі клітини, які містяться як усередині великого квадрата, так і на граничних лініях, якщо клітини більшою половиною містяться у даному квадраті. Клітини, більша половина яких міститься в іншому квадраті, не підраховуються. У тому випадку, коли клітини пересікаються граничною лінією пополам, рахують тільки на двох суміжних сторонах квадрата, наприклад на нижній і на лівій. Рекомендується рахувати клітини у 10 великих квадратах у кожній краплі з п'ятитикратною повторністю, тобто у 50 великих квадратах. Об'єм 50 великих квадратів складає $1/5 \text{ мм}^3$. Якщо у 50 великих квадратах, тобто в $1/5 \text{ мм}^3$, було підраховано 530 клітин, тоді в 1 мм^3 буде $530 \times 5 = 2650$, а у 1 мл – $2650 \times 1000 = 2650000$ клітин. Надмірно густі суспензії

рахувати важко, тому їх краще розводити водою, і користуватися такими розведеннями, при яких кількість клітин в одному великому квадраті не перевищує 16.

Результати підрахунків занесіть у таблицю:

Розведення	К-сть клітин у 50 великих квадратах	К-сть клітин у мл суспензії

Завдання 4. Зробіть висновки та подайте розрахунки у формі звіту.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. Охарактеризуйте прямі методи, які використовуються для визначення біомаси мікроорганізмів. З'ясуйте їх переваги та недоліки.

2. Що таке суха біомаса? Сира біомаса? Об'ємна біомаса?

3. Охарактеризуйте оптичний метод, який використовується для визначення біомаси мікроорганізмів, та фактори, що впливають на кількість розсіяного клітинами світла.

4. Назвіть економічні коефіцієнти, які використовуються для визначення біомаси.

5. Охарактеризуйте методи визначення біомаси, які базуються на визначенні маси клітинного компонента.

6. Охарактеризуйте методи фарбування, які використовуються для визначення біомаси мікроорганізмів.

7. Ознайомтеся з будовою та принципом роботи фотоелектрокалориметра.

8. Охарактеризуйте підходи, які використовуються для руйнування рослинних клітин.

9. Охарактеризуйте підходи, які використовуються для руйнування тваринних клітин.

10. Охарактеризуйте підходи, які використовуються для руйнування клітин мікроорганізмів.

Література

1. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. – М.: Мир, 1967. – С. 11 – 45.
2. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – С. 26 – 34.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. – М.: Ид-во Моск. ун-та, 1976. – С. 275 – 281.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – С. 34 – 46.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

СПЕКТРАЛЬНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. АДСОРБЦІЙНА СПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ

Мета: ознайомитися зі спектральними методами досліджень, їх видами та практичним використанням у біологічних дослідженнях.

Матеріали та обладнання: спектрофотометр, аналітичні ваги, різноважки, мірні колби на 1000 та 100 мл, піпетки на 1, 2, 5 та 10 мл, штатив із пробірками, кювети для спектрофотометричних досліджень, лійки, бойки для розбивання ампул, дозатор змінного об'єму, насадки для дозатора, стаканчики на 50 мл, вода дистильована, насадка на піпетки, амінокислоти (марки хч або чда): триптофан, тирозин, фенілаланін, цистеїн, фіксанали соляної, сульфатної кислот та гідроксиду калію або натрію.

Теоретичні відомості. Залежність імовірності поглинання речовини від довжини хвилі називається **спектром поглинання**. Завдання адсорбційної спектроскопії полягає у накопиченні та аналізі даних спектрів поглинання речовин.

Визначення речовин за їхніми спектрами поглинання вважають одним із найпоширеніших методів дослідження. Використання цього методу в біології значно полегшує спостереження за ходом перетворень речовин безпосередньо у клітинах, тканинах, не порушуючи їхньої цілісності. Оскільки поглинання світла пов'язане з електронними переходами між енергетичними рівнями в молекулах, виміри спектрів поглинання дають змогу судити про будову молекул, стан речовини у біологічних структурах та про їхнє оточення.

Довжини хвиль, при яких відбувається поглинання, і ступінь поглинання залежать від структури і від оточення молекули, тому адсорбційна спектроскопія є корисним інструментом для характеристики макромолекул різного розміру. Вимірювання спектрів поглинання речовин проводять у видимій та ультрафіолетовій областях, здебільшого для визначення оптичної густини D і коефіцієнта молярної екстинкції ϵ . Імовірність

переходу при одній довжині хвилі характеризується молярним коефіцієнтом поглинання при цій довжині хвилі. Довжина хвилі, яка відповідає максимуму поглинання, називається $\lambda_{\text{макс}}$, і саме при цій довжині хвилі здебільшого визначають ϵ . Спектр поглинання хромофора визначається насамперед хімічною структурою молекули. Проте $\lambda_{\text{макс}}$ і ϵ зазнають помітних змін і під впливом оточення – рН середовища, полярності розчинника чи сусідніх молекул і відносної орієнтації сусідніх хромофорів. Саме ці фактори є основою використання адсорбційної спектроскопії для характеристики макромолекул.

Вимірювання спектрів поглинання амінокислот проводять в ультрафіолетовій ділянці; у видимій ділянці амінокислотні залишки не поглинають. У ближньому ультрафіолетовому діапазоні спектра поглинають лише деякі з амінокислот, зокрема ароматичні – триптофан, тирозин, фенілаланін, які, крім головного максимуму в дальньому ультрафіолетовому діапазоні спектра (210 – 220 нм), мають інший, специфічний для кожної з даних амінокислот, у ділянці 260 – 280 нм. У ближньому ультрафіолетовому діапазоні розміщені також характерні смуги поглинання сірковмісних амінокислот: цистеїну та цистину. Незважаючи на сильне перекривання спектрів окремих амінокислот у ближньому ультрафіолетовому діапазоні, вони все ж помітно відрізняються за положенням максимумів, півшириною смуг, коефіцієнтами екстинкції. Завдяки цьому, користуючись певними параметрами, можна визначити концентрацію амінокислоти в розчині, а також передбачити, в якому оточенні перебуває досліджувана речовина.

Показано, що ароматичні амінокислоти мають коефіцієнти молярної екстинкції ϵ , в цілому істотно більші, ніж сульфурвмісні (див. додаток 4). Окремі ароматичні амінокислоти також відрізняються коефіцієнтом молярної екстинкції. Наприклад, для триптофану ϵ є в чотири рази більшим, ніж для тирозину.

Деякі амінокислоти у вільному стані містять, крім вільних карбоксильних та аміногруп, ще й групи бічного ланцюга, здатні до іонізації, внаслідок чого їхні спектри поглинання можуть змінюватися за умов зміни рН середовища. Так, у тирозині за умов підлужнення середовища відбувається зміна іонізації

фенольної групи, в результаті чого зсувається положення максимуму поглинання та змінюється коефіцієнт молярної екстинкції: якщо в 0,1 М НСІ $\lambda_{\text{макс}} = 275$ нм і, відповідно, $\epsilon = 1300$, то в 0,1 М NaOH $\lambda_{\text{макс}} = 293$ нм, а $\epsilon = 2400$ моль⁻¹·см⁻¹·л.

Хід роботи

Завдання 1. Із фіксаналів кислот та лугів у мірних колбах на 1000 мл приготуйте їх розчини на дистильованій воді, попередньо знявши з ампул фіксаналів етикетки і змивши їх дистильованою водою. Для приготування основних розчинів амінокислот розраховують кількість кожної з них, беручи до уваги, що кінцева концентрація досліджуваної амінокислоти повинна відповідати поданим у таблиці 1 значенням.

Таблиця 1

Амінокислота	Кінцева концентрація, мкг·мл ⁻¹	Розчинник, моль·л ⁻¹	
Триптофан	14,7	H ₂ SO ₄ (9,5 М)	
		НСІ 0,1	NaOH 0,1
Тирозин	53	НСІ 0,1	NaOH 0,1
Фенілаланін	352	НСІ 0,1	NaOH 0,1

З основних розчинів амінокислот приготуйте їх робочі розчини в 0,1 М НСІ, 9,5 М H₂SO₄ та 0,1 М NaOH, розводячи їх до потрібної концентрації. На спектрофотометрі перевіряють при $\lambda = 280$ нм значення екстинкції, щоб воно не перевищувало 1. При потребі розчини амінокислот повторно розводять, а коефіцієнт розведення записують і використовують у розрахунках.

Завдання 2. Запишіть спектри амінокислот на спектрофотометрі в ультрафіолетовій ділянці спектра (210 – 400 нм). Одержані результати порівняйте і зробіть висновки щодо спостережуваних ефектів.

Завдання 3. Розрахуйте істинну концентрацію амінокислот у розчинах, знаючи їхні коефіцієнти молярної екстинкції (див. додаток 3).

Завдання 4. Зробіть висновки та подайте у формі звіту графіки і розрахунки.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. У чому полягає суть закону Бугера-Ламберта-Бера?
2. Поясніть фізичний зміст коефіцієнту молярного поглинання речовини.
3. Яке практичне застосування має коефіцієнт молярної екстинкції?
4. Яке значення має дослідження електронних спектрів речовин?
5. Охарактеризуйте фактори, які впливають на адсорбційні властивості хромофора.
6. Назвіть та наведіть приклади практичного застосування адсорбційної спектроскопії.
7. Які групи називають “репортерними” і для чого їх використовують в адсорбційній хроматографії?
8. Поглинання розчину, що містить 32 мкг/мл речовини з молекулярною масою 423, складає 0,27 при 540 нм в 1 см-кюветі. Чому дорівнює коефіцієнт молярного поглинання при 540 нм (якщо закон Бера за даних умов зберігається)?
9. Молярний коефіцієнт поглинання даної речовини дорівнює 348 при 482 нм. Розчин даної речовини має $D_{482} = 1,6$. При розведенні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 і 1:6 величини D_{482} складають 1,52, 1,42, 1,05, 0,84, 0,7 і 0,61 відповідно. Яка молярність вихідного розчину?
10. Розчин речовини А має $D_{260} = 0,45$ і $D_{450} = 0,03$. Розчин другої сполуки В має $D_{260} = 0,004$ і $D_{450} = 0,81$. 2 мл розчину А змішали з 1 мл розчину В. Сумарна оптична густина суміші $D_{260} = 0,3$ і $D_{450} = 0,46$. Вкажіть, чи є взаємодія між А і В? Яке припущення потрібно зробити, щоб підтвердити цей висновок?

Лігература

1. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983. – С. 170 – 278.
2. Практикум по физико-химическим методам в биологии / Под ред. Литвина Л.И.. – М.: Ид-во Моск. ун-та, 1981. – С. 55 – 63.
3. Фрайфелдер Д. Физическая химия. – М.: Мир, 1980. – С. 383 – 413.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РЕЧОВИН

Мета: ознайомитися з ферментативними підходами при кількісному визначенні етанолу і глюкози у дослідних зразках за використання діагностичних наборів “Алкотест” і “Діаглюк-2”.

Матеріали та обладнання: діагностичні набори “Алкотест” і “Діаглюк-2”, 0,8 М соляна кислота, вода дистильована, мірний 100-мл циліндр, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатор змінного об’єму (20 – 200 мкл), дві термостійкі 100-мл колби, два термостійкі стаканчики, штативи з пробірками, піпетман, ваги торсійні, плита електрична, спектрофотометр.

Теоретичні відомості. Ферментативні методи аналізу базуються на використанні ферментів та належать до кількісних методів аналізу речовин у розчинах. За їх допомогою визначають речовини, які беруть участь у біохімічних реакціях, що каталізуються ферментами, а також такі, які є їх активаторами чи інгібіторами. Ферментативні методи аналізу характеризуються високою чутливістю і специфічністю, оскільки ферменти каталізують перетворення речовин із високою швидкістю і високою вибірковістю, навіть якщо аналізована сполука є в суміші з іншими близькими за хімічною будовою речовинами.

Про вміст аналізованої сполуки судять або за кількістю кінцевого продукту ферментативної реакції, або (частіше) за початковою швидкістю процесу, закладеного в основу методики визначення. Для спостереження за швидкістю ферментативної реакції використовують інструментальні методи, переважно люмінесцентні, спектрофотометричні, електрохімічні. Перевагами ферментативних методів аналізу є висока чутливість, зумовлена активністю ферментів, природою індикаторних реакцій (за допомогою яких визначають речовину) і способами детекції аналітичного сигналу; висока селективність і м’які умови проведення аналізу.

Аналізованою речовиною у ферментативному аналізі можуть бути субстрати (речовини, перетворення яких каталізує

фермент); ферменти, коферменти (речовини, які потрібні для здійснення каталітичної дії ферменту) та ефектори (сполуки, які змінюють каталітичну активність ферменту – активатори, інгібітори). Серед коферментів – НАД і НАДН (відповідно нікотинамідаденіндинуклеотид і його відновлена форма), НАДФ і НАДФН (відповідно нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат і його відновлена форма), АТР (аденозинтрифосфат) та ін. Діапазон виявлення, нижня і верхня межа визначення вмісту компонентів залежать від кінетичних характеристик використовуваної індикаторної ферментативної реакції, і насамперед від каталітичної активності ферменту.

При визначенні субстрату ферментативної реакції до аналізованої проби вносять фермент та інші компоненти, потрібні для нормального перебігу реакції. Після закінчення реакції тим чи іншим зручним методом у розчині визначають вміст продукту реакції. Наприклад, визначення етанолу у розчині за допомогою ферменту алкогольдегідрогенази (АДГ) здійснюється за участю коферменту АДГ – НАД. Останній у ході ферментативної реакції кількісно перетворюється у НАДН, який, на відміну від окисленої форми, має здатність до поглинання УФ-світла при довжині хвилі 340 нм. Вимірюючи це поглинання, можна встановити концентрацію відновленого НАД і розрахувати концентрацію етанолу. Метод дає змогу визначити 1мкг спирту в 1мл розчину.

Багато ферментативних методів аналізу базується на визначенні кислотності розчину у ході ферментативної реакції. Наприклад, ефіри карбонових, фосфорної та інших кислот можна визначити за допомогою специфічних ферментів, які каталізують їх гідроліз. Оскільки при гідролізі утворюються відповідні кислоти, результат їх титрування після закінчення реакції дає змогу розрахувати концентрацію відповідного ефіру.

У ферментативних методах аналізу часто використовують комбінацію (спряження) декількох ферментативних реакцій. Наприклад, концентрація глюкози може бути визначена за допомогою ферментів глюкозооксидази (ГО) і пероксидази (ПО). Під дією ГО глюкоза перетворюється у глюконову кислоту та утворює гідроген пероксид, який у наступній пероксидазній реакції окислює орто-діанізидин (чи толідин), у результаті чого

розвивається забарвлення. Вимірюючи інтенсивність забарвлення розчину, можна розрахувати вихідну концентрацію глюкози (чутливість методу – 5 мкг у пробі). Цей метод використовується для швидкого визначення глюкози у сечі у хворих на діабет за допомогою індикаторного папірця, просоченого вказаними реактивами.

Різновидами ферментативних методів аналізу є кінетичні методи, які базуються на визначенні залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації аналізованих речовин, якими можуть бути субстрати, активатори чи інгібітори ферментів. Знаючи характер цієї залежності, можна, вимірюючи швидкість ферментативної реакції, розрахувати концентрацію аналізованої речовини. Наприклад, кількісне визначення фосфорорганічних інсектицидів, які є сильними інгібіторами ферменту холінестерази, здійснюється шляхом визначення активності цього ферменту за наявності чи відсутності інгібітора. Чутливість методу визначення, наприклад діетил-паранітрофенілфосфату, складає 0,015 мкг у пробі, йонів магнію (за їх активуючим впливом на фермент, який окислює ізолимонну кислоту) – 0,1 мкг.

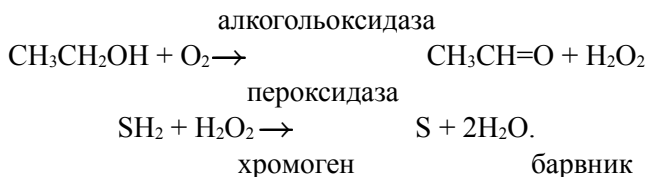
Значного поширення набули ферментативні методи аналізу, які базуються на використанні ферментів, іммобілізованих на твердих носіях – полімерах, неорганічних сорбентах, гелях. Такі іммобілізовані ферменти, поміщені на електрохімічні датчики (скляні, платинові та ін. електроди), являють собою ферментні електроди, які слугують інструментами для визначення швидкості ферментативної реакції у розчині аналізованої речовини. За допомогою ферментних електродів визначають сечовину, амінокислоти, пеніцилін, глюкозу та ін. з чутливістю 0,1 – 0,01 мкг у пробі.

Хід роботи

Завдання 1. Проведіть аналіз вмісту етанолу алкогольоксидазно-пероксидазним (АОП) методом з використанням набору “Алкотест”.

Набір слугує для кількісного аналізу етанолу в біологічних рідинах (бродильних рідинах, цільній крові, плазмі, сироватці) і призначений для використання у клініко-діагностичній та науково-дослідній практиці.

Принцип методу ґрунтується на тому, що етанол при дії алкогольоксидази окислюється киснем повітря до ацетальдегіду та гідроген пероксиду. Останній у супряженій пероксидазній реакції окислює хромоген до кольорового продукту, який визначається фотометрично:



До складу набору входять такі реактиви: “хромоген” (суха суміш хромогену зі складниками фосфатного буферу), “ферменти” (стабілізована суспензія алкогольоксидази і пероксидази в сульфаті амонію), “стандарт” (калібрувальний розчин етанолу, 1,25 об.% або 10 г/л), а також потрібен додатковий реактив: 0,8 М НСІ (концентровану соляну кислоту розводять у 15 разів водою: 10 мл кислоти + 140 мл води).

1.1. Перед початком роботи приготуйте робочий реагент (на 20 аналізів). Для цього 490 мг “хромогену” із вмісту флакона 1 перенесіть у термостійкий стакан або колбу на 100 мл, додайте 56 мл дистильованої води і нагрійте до початку кипіння. Отриманий розчин охолодіть до кімнатної температури, доведіть до 56 мл, внесіть 0,1 мл збовтаної суспензії ферментів із флакона 2 і добре розмішайте.

1.2. Приготуйте 0,025 об. % робочий розчин етанолу: стандартний розчин етанолу “стандарт” розведіть у 50 разів водою (0,2 мл + 9,8 мл H_2O) до концентрації 0,025 об.%.

1.3. Побудуйте калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації етанолу. Для цього у 12 сухих чистих пробірок розлийте по 2,8 мл розчину реагенту та запустіть реакцію внесенням у пробірки згідно з часовою послідовністю (з інтервалом, наприклад, 15 сек) 25, 50, 100, 150 і 200 мкл робочого розчину етанолу (дослідні проби), а у дві пробірки – 200 мкл дист. води замість етанолу (“сліпі” проби). Проби перемішайте та доведіть об’єм кожної з них дист. водою до 3,0 мл.

Інкубуйте проби 10 – 15 хв при кімнатній температурі та зупиніть реакцію додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М HCl у тій самій часовій послідовності, що й при внесенні робочого розчину етанолу (реакційна суміш перед додаванням кислоти має блакитне забарвлення, яке в кислому середовищі переходить у жовте).

Дослідні проби фотометрують при 450 нм проти “сліпої”. На основі отриманих значень оптичних густин дослідних проб будують калібрувальний графік залежності оптичної густини від вмісту етанолу у пробі. На основі калібрувального графіка роблять розрахунки коефіцієнта кореляції, достовірності, похибки експерименту.

1.4. Визначте вміст етанолу в алкоголевмісних напоях. Видані Вам зразки алкоголевмісних напоїв (вино, пиво тощо) розведіть дистильованою водою у 500 – 1000 разів. У 10 сухих чистих пробірок (при наявності двох зразків алкогольних напоїв) розлийте по 2,8 мл розчину реагенту та запустіть реакцію внесенням у пробірки згідно з часовою послідовністю (з інтервалом, наприклад, у 15 сек) 100 і 200 мкл алкоголевмісного напою (дослідні проби), у дві інші – 100 мкл розведеного зразка робочого розчину етанолу (калібрувальні проби), і ще у дві пробірки – 200 мкл дист. води замість етанолу (“сліпі” проби). Проби перемішайте та доведіть об’єм кожної з них дист. водою до 3,0 мл.

Інкубуйте проби 10 – 15 хв при кімнатній температурі та зупиніть реакцію додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М HCl у

тій самій часовій послідовності, що й при внесенні алкоголевмісних зразків.

Проби фотометрують при 450 нм проти “сліпої”.

Розрахунок концентрації алкоголю (в об. %) проводять за своєю калібрувальною пробєю відповідно до формули:

$$C = \frac{E_d \times 0,025 \times n}{E_{кл}},$$

де E_d і $E_{кл}$ – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб відповідно, виміряні проти “сліпої” проби;

n – фактор розведення (25 або 50);

0,025 – робоча концентрація етанолу, 0,025 об. %.

Завдання 2. Аналіз вмісту глюкози глюкозооксидазно-пероксидазним (ГОП) методом з використанням набору „Діаглюк-2”.

Набір слугує для кількісного аналізу глюкози в біологічних рідинах (сиропах, соках, винах, цільній крові, плазмі, сироватці) і призначений для використання у клініко-діагностичній та науково-дослідній практиці.

Принцип методу базується на тому, що глюкоза при дії глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти та гідроген пероксиду. Останній у супряженій пероксидазній реакції окислює хромоген до кольорового продукту, який визначається фотометрично.

До складу набору входять такі реактиви: “реагент” (суха суміш глюкозооксидази, пероксидази, хромогену зі складниками фосфатного буферу (2,75 г); “стандарт” (калібрувальний розчин глюкози, 10 ммоль/л (стабілізований). Додатково потрібно приготувати 0,8 М HCl (концентровану соляну кислоту розводять у 15 разів водою: 10 мл кислоти + 140 мл води).

2.1. Перед початком роботи приготуйте робочий реагент (на 20 аналізів): 550 мг із вмісту флакона 1 „реагент” розчиніть у 66 мл дистильованої води. Мутність розчину не заважає ходу аналізу і зникає після обробки проб соляною кислотою. Розчин реагенту можна зберігати при 0 – +8°C у затемненому місці до

3-х діб. Поява блакитного відтінку в розчині реагенту не знижує його якості.

2.2. Приготуйте 2 ммоль/л робочий розчин глюкози: стандартний розчин глюкози “стандарт” розведіть у 5 разів дистильованою водою (0,5 мл + 2,0 мл H₂O) до концентрації 2 ммоль/л.

2.3. Побудуйте калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації глюкози. Для цього у 12 сухих чистих пробірок розлийте по 3,3 мл розчину реагенту та запустіть реакцію внесенням у пробірки згідно з часовою послідовністю (з інтервалом, наприклад, у 15 сек) 25, 50, 100, 150 і 200 мкл робочого розчину глюкози (дослідні проби), а у дві інші пробірки – 200 мкл дистильованої води замість етанолу (“сліпі” проби). Проби перемішайте та доведіть об’єм кожної з них дистильованою водою до 3,5 мл.

Інкубуйте проби 10 – 15 хв при кімнатній температурі та зупиніть реакцію через 10 хв додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М HCl у тій самій часовій послідовності, що й при внесенні робочого розчину глюкози (реакційна суміш перед додаванням кислоти має блакитне забарвлення, яке в кислому середовищі переходить у жовте).

Проби фотометрують при 450 нм проти “сліпої”. На основі отриманих значень оптичних густин побудуйте калібрувальний графік залежності оптичної густини від вмісту глюкози у пробі.

На основі отриманого калібрувального графіка зробіть розрахунки коефіцієнта кореляції, достовірності, похибки експерименту.

2.4. Визначте вміст глюкози у дослідних зразках. Видані Вам дослідні зразки (вино, напої) розведіть у 10, 100 і 1000 разів. У 12 сухих чистих пробірок (при наявності двох зразків) розлийте по 3,3 мл розчину реагенту та запустіть реакцію внесенням у пробірки (у двох повторях) згідно з часовою послідовністю (з інтервалом, наприклад, у 15 сек) по 100 і 200 мкл розведених зразків (дослідні проби), у дві інші – 100 мкл розведеного розчину глюкози (калібрувальні проби), і ще у дві інші пробірки – 200 мкл дист. води замість глюкози (“сліпі” проби). Проби перемішайте та доведіть об’єм кожної з них дист. водою до 3,5 мл.

Інкубуйте проби 10 – 15 хв при кімнатній температурі (20 - 25°C) та зупиніть реакцію додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М НСІ у тій самій послідовності, що й при внесенні дослідних зразків.

Проби фотометрують при 450 нм проти “сліпої”.

Розрахунок концентрації глюкози (в ммоль/л) у кожній серії проводять за своєю калібрувальною пробою згідно з формулою:

$$C = \frac{E_d \times 2}{E_{кл}},$$

де E_d і $E_{кл}$ – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб, відповідно, виміряні проти „сліпої” проби;
2 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині,
2 ммоль/л.

Завдання 3. Зробіть висновки та подайте у формі звіту графіки і розрахунки.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. Чим відрізняється кінетичний метод від методу “кінцевої точки” у ферментативному аналізі?
2. Охарактеризуйте метод спряжених реакцій у ферментативному аналізі. Наведіть приклади.
3. Головні вимоги при побудові калібрувальних графіків.
4. Яка порогова чутливість визначення етанолу в алкогольдегідрогеназній реакції, якщо мілімолярний коефіцієнт екстинкції НАДН становить $6,23 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$?
5. Охарактеризуйте флуорометричний метод визначення гідроген пероксиду.

Література

1. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983. – С. 170 – 278.
2. Гончар М.В., Корпан Я.І., Сибірний А.А. Кількісний фотометричний аналіз етанолу з використанням очищеної алкогольоксидази та мутантних клітин метилотрофних дріжджів // Укр. біохім. журн. – 1991. - Т. 63 – № 6. – С. 62 – 67.
3. Гончар М.В. Оксидазно-пероксидазний метод определения алкоголя в крови с помощью отечественного набора “Алкотест” // Лаб. диагностика. – 1999. – № 2. – С. 55 – 58.
4. Гончар М.В. Традиционные и ферментативные методы определения алкоголя в биологических жидкостях // Лаб. диагностика. – 1999. – № 1. – С. 45 – 49.
5. Гончар М.В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об’єктах // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70. – № 5. – С. 157 – 163.
6. Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів: Вид. центр ЛНУ, 2007. – С. 252 – 257.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКІВ

Мета: ознайомитися з методами визначення концентрації білків, які використовуються у науково-дослідній практиці та у клінічних лабораторіях.

Матеріали та обладнання: розчин альбуміну сироватки бика (1 мг/мл), реактив А (2 % Na_2CO_3 у 0,1 М NaOH), реактив В (0,5% CuSO_4 в 1%-ному розчині виннокислого або лимоннокислого натрію), соляна кислота (конц.), вода дистильована, штатив з пробірками, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатор змінного об'єму, насадка на піпетки, насадки для дозатора, 250-мл колби, 50-мл стаканчики.

Теоретичні відомості. Для визначення концентрації білків у біологічних рідинах, зразках розроблені різні методи їх аналізу. Серед них – рефрактометричний метод, біуретовий метод, метод Лоурі, за вмістом азоту, мінералізація, за поглинанням в ультрафіолеті. Залежно від властивостей досліджуваного білка, мети та наявності належної апаратури, в лабораторії використовують той чи інший метод його аналізу.

Для визначення загального білка рефрактометричним методом 1 – 2 краплі досліджуваного розчину сироватки крові чи екстрактів тканин наносять між призми та щільно їх закривають. Проводять визначення коефіцієнта заломлення за використання рефрактометра. Процентний вміст білка обчислюють за таблицею Рейса (додаток 5). Наприклад, якщо знайдений показник заломлення дорівнює 1,34947, то за таблицею встановлюють, що концентрація білка дорівнює 7,85 %

Визначення концентрації білка за допомогою біуретової реакції базується на здатності розчинів білків утворювати з купрумом комплексні сполуки. Поява червоно-фіолетового забарвлення при біуретовій реакції зумовлена утворенням комплексної сполуки купруму з білком або пептидом, в утворенні якої беруть участь пептидні зв'язки. За інтенсивністю забарвлення колориметрично визначають вміст білка у розчині.

Цей метод є низькочутливим, тому не набув широкого використання. Для надійного визначення потрібно використати декілька міліграмів зразка. Проте такий метод відрізняється точністю, оскільки вихід за забарвленням мало змінюється від білка до білка. Це пов'язано з тим, що реактив взаємодіє з пептидним ланцюгом, а не з боковими групами.

Основою визначення концентрації білка за методом Лоурі є поєднання біуретової реакції на пептидні зв'язки та здатність мідних похідних білка відновлювати реактив Фоліна з утворенням забарвлених продуктів реакції. Детекцію останніх проводять колориметрично. Метод часто використовується не тільки для визначення концентрації білка у біологічних рідинах, а й для серійних аналізів фракцій на вміст білка після розділення складних сумішей хроматографічними методами та набув широкого використання у науково-практичних дослідженнях. Даний метод відрізняється достатньо високою чутливістю, оскільки дає інтенсивне забарвлення з білками, концентрація яких складає $0,1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ і менше. Речовини, які заважають проведенню аналізу (ті, що використовуються для виділення білків), виявляться настільки розведеними, що їх вплив на кінцевий результат стає незначним.

Для визначення концентрації білка за вмістом азоту досліджувану речовину мінералізують нагріванням із сірчаною кислотою. При цьому нітроген органічних сполук переходить в амоній сірчаноокислий, із якого витісняють міцним лугом аміак та переганяють його в титрований розчин кислоти. За кількістю зв'язаної кислоти обчислюють вміст аміаку й азоту. Основою розрахунків є припущення, що білки містять у середньому 16 % нітрогену, тому одержану величину для нітрогену множать на коефіцієнт $100/16$, тобто 6,25. Це припущення певною мірою умовне, тому що вміст нітрогену в різних білках неоднаковий і коливається від 14 до 19 % та залежить від амінокислотного складу. Проте порівняно з іншими методами визначення концентрації білка за нітрогеном дає постійні та надійні результати і часто використовується для перевірки інших методів визначення концентрації білка.

Метод визначення концентрації білка за поглинанням в ультрафіолеті базується на тому, що у білках наявні

амінокислоти, що мають ароматичні ядра. До них належать, головню, тирозин, триптофан, фенілаланін. Ядра цих амінокислот є основними угрупованнями, що поглинають в ультрафіолеті з такими максимумами поглинання: тирозин – 278 нм; триптофан – 260 – 300 нм; фенілаланін – 260 нм. Якщо знехтувати незначним поглинанням фенілаланіну та зробити поправку на поглинання, не пов'язане з ароматичними залишками, то поглинання розчину білка можна віднести за рахунок суміші тирозину і триптофану в ділянці 278 – 280 нм. Поглинання білків найчастіше вимірюють у ділянці 280 нм. Цей метод широко використовується для серійних аналізів елюатів при розділенні білків та пептидів. Суть визначення зводиться до знаходження оптичної густини розчину в ультрафіолетовій ділянці при 280 нм. Для цього беруть проби із прозорими розчинами білка, у разі їх мутності просвітлюють центрифугуванням. Далі проби фотометрують та за даними оптичної густини знаходять концентрацію білка у пробі, користуючись калібрувальною кривою.

Завдання роботи

Завдання 1. Визначення концентрації білка за методом Лоурі. Для визначення вмісту білка приготуйте реакційну суміш (реактив С) шляхом змішування (перед аналізом) 49 мл реактиву А (2 %-ний розчин Na_2CO_3 у 0,1 М NaOH) і 1 мл реактиву В (0,5 % CuSO_4 в 1 %-ному розчині виннокислого або лимоннокислого натрію). Реактив С розлийте по 3 мл у дослідні і “сліпу” проби. Калібрувальним стандартом слугує альбумін сироватки бика (1 мг/мл).

У “контрольну” пробу внесіть 0,5 мл води, у дослідні – по 0,5 мл розведеного у 1 – 10 разів розчину білка. Проби енергійно перемішайте та витримайте 10 хв при кімнатній температурі. Потім внесіть у кожену пробу по 0,3 мл реактиву Фоліна. Знову енергійно перемішайте і залиште на 30 – 40 хв при кімнатній температурі.

Проби фотометруйте при 750 нм проти “сліпої” та побудуйте калібрувальний графік залежності оптичної густини від вмісту

білка у фотометрованих пробах, яким користуються при визначенні вмісту білка у дослідних зразках.

Визначте калібрувальний коефіцієнт, виходячи з калібрувального графіка, та виведіть формулу обрахунку білка C_6 (концентрація білка за Лоурі у препараті, мг/мл).

Завдання 2. Визначення концентрації білка за поглинанням в ультрафіолеті. Побудуйте калібрувальну криву залежності оптичної густини при 280 нм від концентрації білка у пробі. Для цього приготуйте 10 мл 0,1 %-ного розчину білка (наприклад, альбуміну, тобто 1 мг/мл) та проведіть серію розведень за нижче наведеною схемою:

0,1 %-ний розчин білка, мл	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Вода, мл	3,5	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	-
Кінцева конц. білка, мг/мл	0,125	0,250	0,275	0,500	0,625	0,750	0,875	1,0

Розведення для кривої зроблені з розрахунку, що при концентрації білка 1 мг/мл величина оптичної густини (для кювети 1 см) при 280 нм дорівнює 1,0. При користуванні цим методом слід пам'ятати, що він не строго кількісний, тому що коефіцієнти екстинкції білків значно варіюють залежно від вмісту в них ароматичних амінокислот.

Завдання 3. Зробіть висновки та подайте у формі звіту графіки і розрахунки.

Завдання для самостійної роботи

1. Охарактеризуйте фізико-хімічні властивості білків.
2. Опишіть формування вторинної, третинної та четвертинної структур білків.
3. Які зв'язки стабілізують вторинну і третинну структуру білка?
4. Охарактеризуйте рефрактометричний метод визначення вмісту білка.
5. Охарактеризуйте біуретовий метод визначення вмісту білка.
6. Охарактеризуйте метод визначення вмісту білка, який базується на мінералізації.

Література

1. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983. – С. 170 – 278.
2. Мисак В.Я., Сухомлинов Б.Ф. Посібник з методів білкової хімії. – Л.: В-во Львів. ун-ту, 1973. – С. 21 – 28.
3. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – С. 310 – 315.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Мета: ознайомитися з методами визначення активності ферментів.

Матеріали та обладнання: препарати ферментів алкогольоксидази, пероксидази, каталази, 0,5 М фосфатний буфер (рН 7,0), 0,5 М фосфатний буфер, рН 7,5, 1 %-ний альбумін, 0,3 мМ розчин *o*-діанізидину у 0,5 М фосфатному буфері (рН 7,0), 0,2 М метанол, розчин пероксидази (RZ 0,4 – 0,6) (1 мг/мл), розчин альбуміну сироватки бика (1 мг/мл), розчин метанолу (0,2 М), 0,059 М H₂O₂ у 0,5 М фосфатному буфері, рН 7,0, соляна кислота (конц.), вода дистильована, пробірки, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатор змінного об'єму, насадка на піпетки, насадки для дозатора, 250-мл колби, 50-мл стаканчики.

Теоретичні відомості. Ферменти є високоспецифічними білковими молекулами і володіють високою каталітичною активністю. Здебільшого вони підвищують швидкість реакції щонайменше у 10⁷ разів. Ферменти не зсувають рівноваги реакції, а виконують функцію каталізаторів шляхом зниження енергії активації хімічних реакцій. Кінетичні параметри деяких ферментів описуються моделлю Міхаеліса-Ментен. Згідно з цією моделлю, фермент (E) з'єднується із субстратом (S), утворюючи фермент-субстратний комплекс (ES), який або даліше перетворюється у продукт (P) реакції, або дисоціює на E і S:



Швидкість (*V*) утворення продуктів описується рівнянням Міхаеліса-Ментен:

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

де V_{\max} – швидкість реакції при повному насиченні ферменту субстратом,

K_M – константа Міхаеліса, що дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість реакції становить половину від максимальної.

Максимальна швидкість V_{\max} дорівнює добутку k_3 на загальну концентрацію ферменту. Кінетична константа k_3 , яка називається числом оборотів ферменту, показує, скільки молекул субстрату перетворилось у продукт реакції за одиницю часу в одному каталітичному центрі при повному насиченні ферменту субстратом. Для більшості ферментів число оборотів перебуває в межах від 1 до 10^4 за 1с.

Ферментативна активність залежить від концентрацій субстрату (субстратів), активаторів та інгібіторів, специфічних для даного ферменту, і від неспецифічних впливів таких сполук, як солі і компоненти буферу, а також від рН, йонної сили і температури, а іноді від взаємодій з іншими білками чи компонентами мембран, які можуть бути наявні в реакційній суміші.

Кількість ферменту у даному розчині чи екстракті тканини можна визначити, виходячи із каталітичної дії цього ферменту. Для цього потрібно знати: 1) сумарне рівняння каталізованої реакції; 2) який аналітичний підхід найбільш годиться для визначення витраченого субстрату чи утворення продуктів реакції; 3) чи потребує фермент таких кофакторів, як йони металів чи коферменти; 4) залежність активності ферменту від концентрації субстрату, тобто величину K_M для даного субстрату; 5) оптимум рН ферменту і 6) температурний інтервал, у якому фермент стабільний і володіє високою активністю. Звичайно активність ферментів визначають при оптимальному значенні рН, будь-якій певній у тому чи іншому відношенні температурі (як правило, в інтервалі від 25 до 38 °С) і при концентрації субстрату, близькій до насичуючої. За цих умов початкова швидкість реакції зазвичай пропорційна концентрації ферменту, щонайменше в заданому діапазоні концентрацій ферменту.

Згідно з міжнародним договором, за одиницю активності ферменту береться така його кількість, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату (1 мкмоль = 10^{-6} моля) за 1 хв при 25 °С за оптимальних умов дії ферменту.

Активність ферментів виражають об'ємною і питомою активностями. Об'ємну активність виражають у мкмоль субстрату (продукту), витраченого (утвореного) за 1 хв у перерахунку на 1 мл препарату ферменту за стандартних умов

реакції (мкмоль·хв⁻¹·мл⁻¹). Питомою активністю називається число одиниць ферментативної активності у розрахунку на 1 мг білка. Питому активність ферментів виражають у мкмоль субстрату (продукту), витраченого (утвореного) за 1 хв в перерахунку на 1 мг білка за стандартних умов реакції (мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹). Питома активність – це міра чистоти ферментного препарату: вона збільшується у процесі очистки ферменту і стає максимальною та постійною, коли фермент перебуває у “чистому вигляді”. Розрахунок активності ферментів проводять за такими формулами:

$$A_{\text{об.}} = \frac{A \cdot V \cdot n}{\epsilon_{\text{мм}} \cdot V_{\text{Е}} \cdot t} \quad (\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1});$$

$$A_{\text{шт.}} = \frac{A \cdot V \cdot n}{\epsilon_{\text{мм}} \cdot V_{\text{Е}} \cdot t \cdot c} \quad (\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}), \text{ де}$$

A – оптична густина кінцевого фотометрованого розчину;

V – загальний об’єм кінцевої фотометрованої реакційної суміші, мл;

n – розведення вихідного препарату ферменту перед внесенням у реакційну суміш;

$\epsilon_{\text{мм}}$ – мілімолярний коефіцієнт екстинкції субстрату, продукту чи їх хімічної

похідної, мМ⁻¹·см⁻¹;

$V_{\text{Е}}$ – об’єм аліквоти екстракту (суспензії клітин), взятої для аналізу, мл;

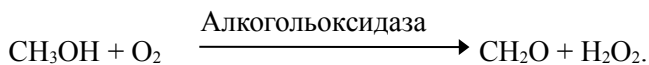
t – час ферментативної реакції, хв;

c – концентрація білка за Лоурі, мг/мл.

Хід роботи

Завдання 1. Аналіз активності алкогольоксидази.

Алкогольоксидаза (O₂: оксидоредуктаза) (КФ 1.1.3.13) каталізує окиснення метанолу у дріжджів, яке здійснюється за рівнянням:



Алкогольоксидаза (АО) синтезується у клітинах метилотрофних дріжджів у великій кількості – до 37 – 40 % від сумарного клітинного білка при рості на метанолі, причому при повній локалізації ферменту в пероксисомах. Цей фермент є флавопротеїном, що містить ФАД як простетичну групу, пов'язану з апоферментом нековалентними зв'язками. Нативний білок є октамером, що складається з 8 ідентичних ФАД-вмісних субодиниць із загальною молекулярною масою близько 600 кДа. Білок має відносно низьку ізоелектричну точку: наприклад, рІ АО з *C. pastoris* складає 5,7.

Активність АО визначають за кількістю утвореного гідроген пероксиду за 1 хв у перерахунку на 1 мг білка або клітин. Гідроген пероксид аналізують фотометрично за утворенням кольорового продукту пероксидазного окислення *o*-діанізидину.

Вимірювання АО проводять методом “фіксованої точки”.

Для визначення активності АО у виданих Вам препаратах ферменту готують реакційну суміш.

Реакційна суміш (на 10 аналізів): перед аналізом змішують 25 мл 0,3 мМ розчину *o*-діанізидину у 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,0) і 2 мл пероксидази RZ 0,4 – 0,6 (1 мг/мл). Розливають у пробірки по 2,7 мл.

До кожної проби (дослідні пробірки) вносять по 0,15 мл препарату АО, розведеного попередньо у 100, 500 і 1000 разів (за винятком “контрольної”, у котру вносять 0,15 мл води), та інкубують 10 хв при 30 °С.

Реакцію у пробах (контрольна і дослідні) запускають додаванням 0,15 мл 0,2 М метанолу (реагент) у точно фіксований час з інтервалом, наприклад у 30 с.

Зупиняють реакцію через 10 – 20 хв (залежно від розвитку забарвлення) додаванням до всіх проб по 0,8 мл соляної кислоти (конц.) у тій самій часовій послідовності, що й при внесенні реагенту.

Проби фотометрують при 525 нм на спектрофотометрі у 1-см кюветах проти контрольної. Реакційна суміш перед додаванням кислоти має коричневе забарвлення, яке у кислому середовищі переходить у малинове. Розрахунок питомої активності АО проводять за формулою:

$$\text{П.А.} = \frac{A \cdot 0,284 \cdot n}{V_E \cdot t \cdot C_6} \quad (\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}), \text{ де}$$

A – оптична густина кінцевого фотометрованого розчину;

0,284 – калібрувальний коефіцієнт (це кількість мкмоль пероксиду водню, яка генерується у дослідній пробі при стандартних умовах визначення активності ферменту та оптичній густині 1,0);

n – розведення вихідного препарату ферменту перед внесенням у реакційну суміш;

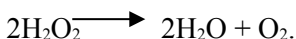
V_E – об'єм аліквоти препарату ферменту, взятої для аналізу, мл;

t – час ферментативної реакції, хв;

C_6 – концентрація білка за Лоурі у препараті ферменту, мг/мл.

Завдання 2. Аналіз активності каталази (К.Ф. 1.11.1.6).

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ оксидоредуктаза) каталізує реакцію:



Каталазна активність притаманна майже всім тваринним клітинам і органам та аеробним мікроорганізмам. Подібно до пероксидази, каталаза є гемопротейном і утворюється за умов наявності пероксиду водню. Каталаза сироватки бика має молекулярну масу 250,000 (Kiseler *et al.*, 1967). Оптимальне значення рН ферменту перебуває в області 7,0, рІ – при рН 5,4.

Активність каталази (за *Worthington*) визначають як описано Beers and Sizer (1952) спектрофотометрично при 240 нм за кількістю розкладеного пероксиду водню. За одиницю ферменту

приймають таку його кількість, яка розкладає 1 мкмоль H_2O_2 за 1 хв при 25 °С при рН 7,0 за відповідних умов реакції.

Для визначення активності каталази у виданих Вам препаратах ферменту або дослідних зразках готують реакційну суміш.

Реакційна суміш (на 10 проб): перед аналізом змішують 19 мл дистил. води і 10 мл 0,059 М H_2O_2 у 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,0, розливають у пробірки по 2,9 мл реакційної суміші та інкубують 5 хв при 25 °С.

Реакцію у пробах (дослідні проби) запускають додаванням 0,1 мл робочого розчину ферменту (вихідний препарат ферменту перед проведенням аналізу розводять у 10, 50, 500 і 1000 разів 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,0).

Вимірювання каталази проводять у кінетичному режимі: дослідна проба з реакційною сумішшю, що не містить розчину ферменту, слугує контролем (“сліпа” проба), проти якого виставляється “нуль” при 240 нм. У дослідну пробу вноситься 0,1 мл робочого розчину ферменту і записують значення оптичної густини кожні 10 сек упродовж 2 – 3 хв.

Розрахунок питомої активності ферменту проводять за формулою:

$$\text{П.А.} = \frac{A_{240/\text{хв}} \cdot 1000}{43,6 \cdot C_6} \quad (\text{мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}), \text{ де}$$

$A_{240/\text{хв}}$ – оптична густина фотометрованого розчину за 1 хвилину;

43,6 – калібрувальний коефіцієнт (це кількість мкмоль пероксиду водню, яка розкладається у дослідній пробі при стандартних умовах визначення активності ферменту та оптичній густині 1,0);

C_6 – концентрація білка за Лоурі у препараті ферменту, мг/мл.

Завдання 3. Зробіть висновки та подайте розрахунки у формі звіту.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. Основні типи аналізу низькомолекулярних речовин.
2. Ферментативний аналіз низькомолекулярних речовин. Аналітичні параметри. Застосування.
3. Чим відрізняється кінетичний метод від методу „кінцевої точки” у ферментативному аналізі?
4. Як графічно визначити константу Міхаеліса K_M ферменту?
5. Які фактори впливають на швидкість ферментативної реакції?
6. При якій концентрації субстрату фермент, для якого максимальна швидкість перетворення субстрату складає 30 мкмоль/хв·мг, а величина K_M – 0,005 М, буде працювати зі швидкістю, що дорівнює $\frac{1}{4}$ максимальної?
7. Визначте, яку частку V_{max} буде становити швидкість реакції при концентраціях субстрату, що дорівнюють $\frac{1}{2} K_M$, $2K_M$ і $10 K_M$?

Література

1. Березов Т. Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – С. 114 – 165.
2. Ленинджер А. Основы биохимии. – Том 1. – М.: Мир, 1985. – С. 226 – 269.
3. Павлішко Г., Гайда Г., Гончар М. Алкогольоксидаза та її біоаналітичне використання // Вісник Львів. університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 35. – С. 3 – 22.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – С. 277 – 310.
5. Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів: Вид. центр ЛНУ, 2007. – С. 237 – 252.
6. Фрайфелдер Д. Физическая химия. – М.: Мир, 1980. – С. 383 – 413.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ ОЧИЩЕННЯ БІЛКІВ. ІОНООБМІННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Мета: ознайомитися з різними хроматографічними методами очищення білків, освоїти метод очистки алкогольоксидази *Hansenula polymorpha* за використання іонообмінної хроматографії.

Матеріали та обладнання: хроматографічна колонка, штатив з пробірками, лапка, градієнтний елюатор, хроматографічний колектор, магніти, магнітомішалка, секундомір, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатори на 0,02, 0,05, 0,1 і 0,5 мл, насадки для дозатора, колба, 50-мл стаканчики, діалізний мішечок, аніоніт ДЕАЕ-целюлоза, препарат ферменту алкогольоксидази ($3 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка), 500, 50 і 10 мМ фосфатний буфер (pH 7,0), 0,3 мМ о-діанізидин у 50 мМ фосфатному буфері (pH 7,0), 0,2 М метанол, розчин пероксидази RZ 0,4 – 0,6 (1 мг/мл), соляна кислота (концентрована), 100 %-ний (від насичення при 0°C) амоній сульфат, pH 7,0, реактиви для визначення білка за Лоурі, вода дистильована.

Теоретичні відомості. Основою хроматографічних методів дослідження є явище хроматографії, відкрите російським ученим М.Цветом у 1904 р. при дослідженні ним пігментів зеленого листка. М.Цвет розробив основні положення цього методу і правильно оцінив його значення для розділення та аналізу забарвлених і безколірних речовин.

Хроматографія – розділення речовин за допомогою сорбційних процесів при напрямленому русі однієї з фаз. Це фізико-хімічний метод аналізу, основою якого є різні за механізмом та неодноразові повторення явищ сорбції та десорбції, що зумовлює високу ефективність хроматографії як методу розділення складних сумішей речовин із близькими властивостями. За технікою виконання хроматографії поділяються на колонкові, капілярні, паперові, тонкошарові. Ця класифікація умовна, оскільки часто здійснюється поєднання кількох методів, наприклад, для виділення й очистки різних компонентів сумішей хроматографічний метод часто об'єднують

із методом електрофорезу. Хроматографію застосовують для виділення вітамінів, білків, гормонів, амінокислот, антибіотиків та інших природних сполук.

Сьогодні хроматографічні методи класифікують за такими критеріями:

1. Залежно від атомно-молекулярної взаємодії компонентів суміші з нерухомою фазою: адсорбційна хроматографія; іонообмінна хроматографія; осадкова хроматографія; розподільна хроматографія; афінна хроматографія; гель-хроматографія.

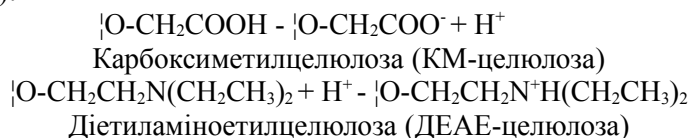
2. За агрегатним станом фаз:

Нерухома фаза	Рухома фаза	Назва методу	Можливі варіанти
тверда	рідка	адсорбційна, іонообмінна, осадкова	окисно-відновна, адсорбційно-комплексна, тонкошарова
тверда	газоподібна	газова, адсорбційна	хроматермографія, теплодинамічний метод
рідка	рідка	рідинна, розподільна	колонкова, паперова, електрофоретична, тонкошарова
рідка	газоподібна	газорідинна, розподільна	капілярна, ступінчаста, вакантна, газорідинна

3. За методикою проведення: проявна; елюентна; фронтальна; замісна хроматографія.

Іонообмінна хроматографія (ІОХ) – це метод розділення білків чи інших заряджених молекул, який ґрунтується на різниці в їх електростатичній взаємодії з іоногенними групами нерозчинного сорбента – іоніту. Білки відрізняються як загальним зарядом, що визначається співвідношенням катіонних і аніонних бокових груп амінокислот (тобто ізоелектричною точкою білка pI), так і їх розподілом на поверхні білка, що впливає на ефективність зв'язування білків з іонітом. Іоніти для ІОХ побудовані на гідрофільних носіях (матрицях) і мають у

своєму складі або аніоногенні групи (наприклад, карбоксильні або фосфатні залишки), або катіоногенні (наприклад, амініні залишки):



КМ-целюлоза в іонній формі є негативно зарядженою – отже, зв’язує білки в катіонній формі (при $pH < pI$), а ДЕАЕ-целюлоза, навпаки, – позитивно заряджена – отже, зв’язує білки в аніонній формі (при $pH > pI$). Відповідно до цієї характеристики, перший іоніт називають **катіонітом**, а другий – **аніонітом**.

Оскільки рК карбоксильної групи близька до 4, а рК ДЕАЕ-групи – 9,5, то КМ-целюлоза як іоніт найбільш ефективна при $pH \leq 5$, а ДЕАЕ-целюлоза – при $pH \leq 9$. Реальне значення рН буферної системи для ІОХ підбирають із урахуванням як цього правила, так і значення рІ білка та його стабільності в обраній ділянці рН.

ІОХ проводять, як правило, в колонковому режимі, коли іоніт слугує нерухомою фазою у рівновазі з рухомою (проточною) буферною системою. Сорбцію білка проводять у буфері порівняно з невисокою іонною силою (при цьому з колонки вимиваються “баластні” компоненти, не здатні зв’язуватися із сорбентом). Елюцію (десорбцію) цільового білка проводять у ступінчастому або градієнтному режимі з використанням буферних розчинів із підвищеною іонною силою (вища концентрація буфера або внесення у стартовий буфер NaCl, KCl), або зі зміненим значенням рН.

Хід роботи

Робота виконується упродовж двох занять

Заняття 1. Іонообмінна хроматографія алкогольоксидази

Завдання 1. Діаліз препарату алкогольоксидази (АО).

Виданий Вам препарат АО* (у вигляді суспензії за наявності 70 %-ного від насичення амоній сульфату і 2 мМ ЕДТА) осадіть шляхом центрифугування при 10 тис. об./хв. і 5 °С упродовж 10 хв. Ресуспензуйте осад у мінімальному об'ємі 10 мМ фосфатного буферу, рН 7,0. Перенесіть отриманий розчин ферменту у діалізний мішечок, зафіксуйте його з обох боків затискачами та помістіть в 1 л-стакан з охолодженим (до 5 °С) 10 мМ фосфатним буфером, рН 7,0. Зафіксуйте діалізний мішечок із розчином ферменту на скляній паличці та проводьте діаліз упродовж 1 год при помірному перемішуванні (при 5 °С) за допомогою магнітомішалки.

Завдання 2. В отриманому діалізованому розчині АО визначте вміст білка за Лоурі, об'ємну і питому активність ферменту, кількість одиниць АО та нанесіть на колонку (1,6 x 23 см) з аніонітом ДЕАЕ-целюлозою, зрівноважену 0,05 М фосфатним буфером, рН 7,0. Промийте колонку стартовим буфером до п'яти об'ємів колонки (при швидкості 1 мл/хв.). Вимийте з колонки баластні білки зростаючими концентраціями фосфатного буферу від 0,05 М до 0,25 М, рН 7,0. Фермент елюуйте 0,5 М фосфатним буфером.

Заняття 2. Аналіз хроматографічних фракцій алкогольоксидази

Завдання 3. У зібраних фракціях елюату визначте об'ємну і питому активність ферменту та кількість одиниць АО. Кожну фракцію АО осадіть 100 %-ним розчином (від насичення) амоній сульфату (до 70 % насичення), що містить 2 мМ ЕДТА. Через 1 – 2 год. фермент можна осадити шляхом центрифугування фракцій

* Джерелом АО є безкаталазний штам метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* K-105 (*gcr1 catX*) – зі знятою катаболітною репресією (конститутивний синтез АО при рості на глюкозному середовищі).

(10 тис об./хв, 10 хв, 5 °С). Отриманий осад ферменту ресуспензувати у цьому ж розчині та зберігати при – 10 °С.

Завдання 4. Обрахуйте питому ємкість сорбенту колонки, виразивши кількісно адсорбцію 1 мг білка на 1мл сорбента.

Завдання 5. Зробіть висновки.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. Назвіть методи очищення ферментів.
2. Дайте визначення афінної хроматографії.
3. У чому полягає принцип методу гель-фільтрації?
4. Яким є принцип іонообмінної хроматографії?
5. Суміш білків (20 мг) нанесли на колонку з ДЕАЕ-целюлозою. Відомо, що 30 % білка складає фермент X. Після елюції з колонки загальна кількість білка у всіх фракціях склала 18,9 мг. При цьому не було виявлено активності, яка відповідає ферменту X. Поясніть, по можливості, втрату ферментативної активності.

Література

1. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983. – С. 5 – 70.
2. Павлішко Г., Гайда Г., Гончар М. Алкогольоксидаза та її біоаналітичне використання // Вісник Львів. університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 35. – С. 3 – 22.
3. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – С. 91 – 196.
4. Федоренко В.О., Остах Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів: Вид. центр ЛНУ, 2007. – С. 245 – 247.
5. Фрайфелдер Д. Физическая химия. – М.: Мир, 1980. – С. 172 – 220.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ БІЛКІВ

Мета: ознайомитися з електрофоретичними методами аналізу білків, освоїти методику проведення електрофорезу за нативних умов.

Матеріали та обладнання: прилад для вертикального електрофорезу, пробірки, дозатор змінного об'єму на 0,002 – 0,02 мл, насадки для дозатора, колба, стаканчики, діалізний мішечок, препарати ферменту алкогольоксидази різного ступеня очистки, 0,3 мМ бензидин у 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,0), 0,7 мМ бензидин, 0,1 М трис-НСl, рН 8,1, 0,375 М трис-НСl, рН 8,9, 0,15 М трис-НСl, рН 6,8, 40 %-ний гліцерин, 1 %-ний бромфеноловий синій, поліакриламід, 0,2 М метанол, розчин пероксидази RZ 0,4 – 0,6 (1 мг/мл), 0,03 %-ний бромфенол синій, соляна кислота, реактиви для визначення білка за Лоурі, вода дистильована.

Теоретичні відомості. Явище спрямованого переміщення частинок дисперсної фази в електричному полі називають **електрофорезом**. Рухливість частинок в електричному полі зумовлена тим, що при накладанні на таку систему зовнішньої різниці потенціалів відбувається розрив подвійного електричного шару по площині “ковзання”. Внаслідок цього частинка одержує певний заряд і переміщується до електрода із зарядом, **який протилежний** цій частинці. При цьому протіони дифузійного шару переміщуються до протилежно зарядженого електрода. Швидкість руху частинок дисперсної фази пропорційна величині їх ζ -потенціалу. Отже, спостерігаючи електрофоретичний рух частинок, визначають знак заряду і величину ζ -потенціалу. При електрофорезі можна безпосередньо вимірювати швидкість руху частинок.

Електрофорез – це розділення заряджених частинок в електричному полі. Різна молекулярна маса речовин зумовлює швидкість пересування частинок, що дає можливість їх диференціювання. Швидкість руху іонів підвищується зі збільшенням електрофоретичного заряду, сили електричного поля, але зменшується зі збільшенням радіуса частинок, які рухаються, та зі збільшенням густини середовища. На швидкість

руху заряджених частинок впливає температура, з підвищенням якої зростає швидкість руху іонів.

Розрізняють такі типи електрофорезу: фронтальний; зональний; ізоелектричне фокусування; імуноелектрофорез; електрофорез в агаровому гелі; електрофорез у крохмальному гелі; електрофорез у поліакриламідному гелі; електрофорез на папері; електрофорез на ацетат целюлозі. Усі ці види електрофорезу проводять за допомогою спеціального приладу для електрофорезу. Розрізняють вільний і зональний електрофорез (на середовищах-носіях).

Вільний електрофорез – класичний метод Тизеліуса та його модифікація – потребує складної дорогої апаратури, що утруднює його застосування.

Фронтальний електрофорез – це розділення речовин у гомогенному розчині без стабілізації зон розподілу. Методи зонального електрофорезу дають змогу отримувати стабільні зони розподілу, їх класифікують залежно від середовища, на якому проводять розділення. Для цього типу електрофорезу як середовище використовують порошки та інші пористі матеріали (крохмаль, целюлозу, полівінілхлорид), гелі (крохмальний, агаровий, поліакриламідний), смуги паперу та інших волокнистих матеріалів.

Зональний електрофорез залежно від джерела живлення і камери поділяють на горизонтальний і вертикальний (диск-електрофорез).

Імуноелектрофорез належить до найбільш чутливих і сучасних методів імунологічного аналізу. За допомогою цього методу можна визначити кількість компонентів суміші, а також ідентифікувати ці компоненти за їх електрофоретичною рухливістю, імунологічною специфічністю, а іноді за хімічною природою. За допомогою цього електрофорезу можна виявити компоненти, які здатні вступати в реакцію преципітації з антитілами (наприклад, білки чи вуглеводи).

Електрофорез в агаровому гелі. За допомогою методу отримують більш чітке розділення фракцій, ніж на папері. Недоліком цього виду електрофорезу є складніша процедура приготування гелю і неможливість його тривалого зберігання в готовому вигляді.

Електрофорез у крохмальному гелі. Для електрофорезу білків застосовують приблизно 15 %-ний гель із розчинного крохмалю.

Електрофорез у поліакриламідному гелі. Порівняно з крохмальним гелем, поліакриламідний має багато переваг: він більш прозорий, механічно міцніший, термостабільніший. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі можна розділити близько 30 фракцій білків.

Електрофорез на папері. Принцип методу полягає в тому, що у разі нанесення сироватки на спеціальний фільтрувальний папір, змочений буферним розчином, і пропускання крізь нього електричного струму білки рухаються в електричному полі з різною швидкістю.

Електрофорез на ацетат целюлозі. Порівняно з електрофорезом на папері, цей метод має низку переваг: хімічна однорідність ацетату й однаковий розмір пор дають змогу збільшити чіткість зразка; час, необхідний для розділення, значно менший, ніж під час проведення електрофорезу на папері (40 хв.); для отримання чіткої фореграми достатньо 0,1 – 0,3 мкл досліджуваного зразка; фон, який отримують після фарбування, легко змивається; адсорбція білка плівкою – мінімальна.

Хід роботи

Робота виконується упродовж двох занять

Заняття 1. Ступінчастий нативний електрофорез у ПААГ (за Орнстейном і Девісом у лужній області)

Особливістю цієї системи є полімеризація в одній пластині двох гелів: нижнього робочого (“розділяючого”, дрібнопористого) і безпосередньо над ним – “формуючого” (“концентруючого”, крупнопористого). Крім пористості, ці два гелі відрізняються за значенням рН і молярністю буферів, у яких проводять полімеризацію. У формуючому гелі (1 – 3 см) розділення білків не відбувається. Навпаки, призначення цього гелю – сконцентрувати білки в одну вузьку зону незалежно від об’єму нанесеного зразка перед входженням білків у

розділюючий гель. Таке концентрування різко підвищує розділну здатність електрофоретичного фракціонування. Оскільки у формуючому гелі білки не повинні розділятися, то його концентрацію вибирають мінімальною ($T=2,5 - 3 \%$). Формуючий гель полімеризують у такому ж за складом буфері, що й робочий гель, але за концентрацією буфера і рН вони відрізняються: буфер формуючого гелю, як правило, майже нейтральний, а буфер робочого гелю – лужний або кислий.

Завдання 1. Підготуйте гелі. Робочий гель – 5 % ПААГ, формуючий – 3 % ПААГ, для обох гелів $C = 2,6$. Робочий гель полімеризуйте на висоту 10 см, а формуючий – на 1 – 2 см. Буфером робочого гелю слугує 0,375 М трис-НСІ, рН 8,9. Для формуючого гелю використайте буфер 0,0625 М трис-НСІ, рН 6,8. Для формування лунок у гелі, призначених для нанесення зразків, використайте відповідну гребінку, яку вносять у формуючий гель під час його полімеризації.

Завдання 2. Приготуйте верхній електродний буфер – 5 мМ трис, відтитрований до рН 8,3 додаванням гліцину (до концентрації 38 мМ).

Завдання 3. Приготуйте нижній електродний буфер – 0,1 М трис-НСІ, рН 8,1.

Завдання 4. Приготуйте “завантажувальний” буфер – 0,15 М трис-НСІ, рН 6,8, 40 %-ний гліцерин, 1 %-ний бромфеноловий синій. Цим буфером розводять розчини білкових зразків (як правило, у співвідношенні 1:4).

Завдання 5. Згідно з інструкцією до відповідного приладу для вертикального електрофорезу, зберіть камеру і підготуйте гелі.

Завдання 6. Вийміть гребінку і додайте електрофоретичний буфер у верхню камеру до рівня, що покриває верхню межу гелю.

Завдання 7. Під буфер у лунки внесіть білкові зразки (по 25 – 50 мкл) за допомогою дозатора з видовженим на кінці носиком. *(З метою оцінки ефективності використаної схеми очистки АО, рекомендується використати як досліджувані зразки препарати АО на різних етапах очистки: вихідний препарат АО та елюати АО після ІОХ).*

Завдання 8. Наповніть нижній резервуар відповідним електродним буфером, слідкуючи, щоб нижній рівень гелю був покритий розчином без бульбашок повітря.

Завдання 9. Закрийте кришку приладу, під'єднайте електричне живлення і встановіть рекомендований в інструкції до камери режим електрофорезу (як правило, 25 мА на 1 гелеву пластинку або 50 мА – на комплект 2-х пластинок).

Завдання 10. Закінчіть електрофорез, коли лідерний барвник (бромфеноловий синій) досягне рівня на 1 см від кінця гелю. Напругу відключіть, від'єднайте контакти, вивільніть гель та помістіть у посудину з водою (≈ 100 мл).

Завдання 11. Промийте гель тричі водою по 5 хв, відмітьте зону бромфенолового синього і залийте гель фарбуючим розчином (на білок) або інкубуйте в суміші для проявлення розділених білкових зон на відповідну ферментативну активність. Процес фарбування проводьте упродовж однієї і більше годин.

При необхідності проводять обидва проявлення, використовуючи дві гелеві пластинки або ж розрізаючи гель на дві половини (в останньому випадку планують відповідну схему нанесення зразків із треками-дублікатами).

Виявлення і локалізацію білкових зон найчастіше проводять за допомогою реакції зв'язування з барвниками. Зони проявляються як забарвлені смужки різної інтенсивності залежно від вмісту в них білка. Оскільки процес дифузії барвника в гель є досить повільним, для запобігання розмивання білкових зон часто проводять первинну обробку гелю 10 %-ною трихлороцтовою кислотою (ТХО), а вже потім виконують операцію фарбування. Обидва процеси можна сумістити, готуючи розчин барвника з додаванням оцтової кислоти і метанолу або ТХО.

Фарбуюча суміш I: 0,1%-ний Кумасі діамантовий блакитний R-250 у 9 %-ній оцтовій кислоті і 40 %-ний метанол.

Фарбуюча суміш II: 0,1%-ний Кумасі діамантовий блакитний R-250 у 25 %-ній трихлороцтовій кислоті.

Фарбуюча суміш III. 0,04%-ний колоїдний розчин Кумасі діамантового блакитного G-250 у 3,5 %-ній хлорній кислоті

(HClO₄). При готуванні розчинів барвників їх обов'язково фільтрують. Чутливість методу з використанням барвника R-250 – 10 мкг білка на смугу. Барвник G-250 дає вищу чутливість виявлення білка – 1 мкг на зону.

Завдання 12. Відмийте гель від надлишку барвника за допомогою 5 %-ної оцтової кислоти. Профарбований гель скануйте і денситограму зберігайте у формі відповідного файла у комп'ютері.

Заняття 2. Проявлення ферментативної активності АО в гелі після електрофорезу

Завдання 13. Промитий водою гель після електрофорезу помістіть у посудину з 50 мл інкубаційного розчину такого складу: 50 мМ фосфатний буфер, рН 7,0; 0,6 мМ бензидин; пероксидаза хрому (RZ = 0,5÷1,0; 0,05 мг/мл); 10 мМ метанол. Гель інкубуйте в термостаті при 30 °С до появи рожево-коричневої зони. Розчин злийте, а гель промийте кілька разів водою. Гель скануйте і денситограму запишіть у формі відповідного файла у комп'ютері. (*Цю операцію виконують у захисних рукавичках*).

Завдання 14. На підставі аналізу електрофореграм різних препаратів АО – починаючи від грубоочищеного препарату АО і закінчуючи елюатами АО після IOX – проаналізуйте ефективність очистки.

Завдання 15. Зробіть висновки.

Питання і завдання для самостійної роботи

1. Чому електрофорез проводять у розчинах із низькою концентрацією солей?
2. Охарактеризуйте суть і принципи проведення фронтального електрофорезу.
3. Охарактеризуйте суть і принципи проведення зонального електрофорезу.
4. Охарактеризуйте суть і принципи проведення диск-електрофорезу.
5. Охарактеризуйте суть і принципи проведення ізоелектричного фокусування у градієнті значень рН.

Література

1. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико-химические методы в биохимии. – К.: Вища школа, 1983. – С. 170 – 278.
2. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул – М.: Мир, 1982. – С. 11 – 211.
3. Павлішко Г., Гайда Г., Гончар М. Алкогольоксидаза та її біоаналітичне використання // Вісник Львів. університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип. 35. – С. 3 – 22.
4. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – С. 316 – 330.
5. Федоренко В.О., Осташ Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів: Вид. центр ЛНУ, 2007. – С. 247 – 250.
6. Фрайфелдер Д. Физическая химия. – М.: Мир, 1980. – С. 223 – 274.

III. ДОДАТКИ

Зразок оформлення звіту про виконання лабораторної роботи

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РЕЧОВИН

Мета: ознайомитися з ферментативними підходами при кількісному визначенні етанолу у дослідних зразках за використання діагностичного набору “Алкотест”.

Матеріали та обладнання: діагностичний набір “Алкотест”, 0,8 М соляна кислота, вода дистильована, мірний 100-мл циліндр, піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл, дозатор змінного об’єму (20 – 200 мкл), дві термостійкі 100-мл колби, два термостійкі стаканчики, штативи з пробірками, піпетман, ваги торсійні, плита електрична, спектрофотометр.

Хід та виконання роботи

Завдання 1. Проведення аналізу вмісту етанолу алкогільоксидазно-пероксидазним (АОП) методом за використання набору “Алкотест”

1.1. Приготування робочого реагенту (на 20 аналізів): 490 мг “хромогену” із вмісту флакона 1 перенесли у термостійку колбу на 100 мл, додали 56 мл дистильованої води і нагріли до початку кипіння. Отриманий розчин охолодили до кімнатної температури, довели до 56 мл, внесли 0,1 мл збовтаної суспензії ферментів із флакона 2 і добре розмішали.

1.2. Приготування робочого розчину етанолу: стандартний розчин етанолу “стандарт” розвели у 50 разів водою (0,2 мл + 9,8 мл H₂O) до концентрації 0,5 г/л (0,0625 об. %).

1.3. Побудова калібрувального графіка залежності оптичної густини від концентрації етанолу. Для цього у 20

сухих чистих пробірок розлили по 2,8 мл розчину реагенту та запустили реакцію внесенням у пробірки згідно з часовою послідовністю (з інтервалом, наприклад, 15 сек) 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 і 200 мкл робочого розчину етанолу (дослідні проби), а у дві пробірки – 200 мкл дистильованої води замість етанолу (“сліпі” проби). Проби перемішали та доводили об’єм кожної з них дистильованою водою до 3,0 мл.

Інкубували проби 10 хв при кімнатній температурі та зупинили реакцію додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М НСІ у тій самій часовій послідовності, що і при внесенні робочого розчину етанолу (реакційна суміш перед додаванням кислоти мала блакитне забарвлення, яке в кислому середовищі перейшло у жовте).

Дослідні проби фотометрували при 450 нм проти “сліпої” проби. Результати вимірювань занесли в таблицю.

№ з/п	V, мкл	Концентрація етанолу, мг/л	D ₄₅₀
1	0	0	0
2	25	3,571	0,120; 0,125
3	50	7,142	0,250; 0,255
4	75	10,713	0,375; 0,370
5	100	14,284	0,485; 0,505
6	125	17,855	0,620; 0,615
7	150	21,426	0,750; 0,745
8	175	24,997	0,875; 0,867
9	200	28,568	0,987; 0,993

На основі отриманих значень оптичних густин дослідних проб побудували калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації етанолу у пробі (рис. 1).

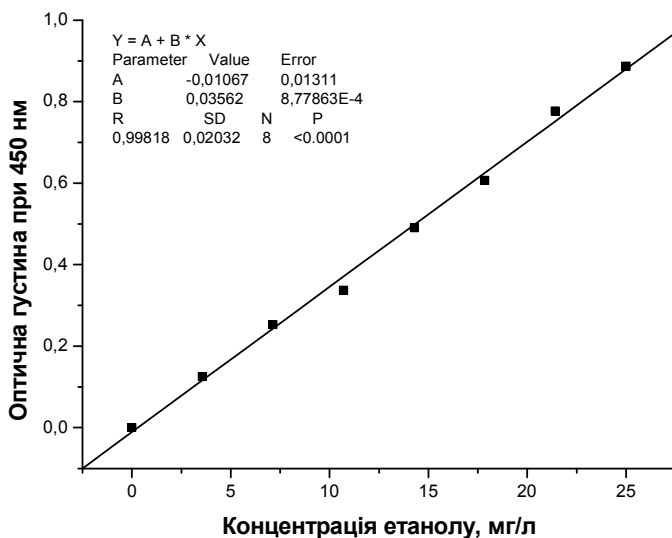


Рис. 1. Калібрувальний графік для визначення вмісту етанолу оксидазно-пероксидазним методом за використання набору “Алкотест”

На основі калібрувального графіка зробили розрахунки коефіцієнта кореляції – $R = 0,998$ і достовірності $p = 0,0001$.

1.4. Визначення вмісту етанолу в алкоголевмісних напоях. Видані зразки алкоголевмісних напоїв (вино „Мадера”) розвели дистильованою водою у 1000 разів, горілку “Немирів” – у 1500 разів. У 10 сухих чистих пробірок розлили по 2,8 мл розчину реагенту та запустили реакцію внесенням у проби згідно з часовою послідовністю (з інтервалом 15 сек) 100 і 200 мкл алкоголевмісного напою (дослідні проби), у дві інші – 100 мкл розведеного зразка робочого розчину етанолу (калібрувальні проби), і ще у дві пробірки – 200 мкл дист. води замість етанолу (“сліпі” проби). Проби перемішали та довели об’єм кожної з них дист. водою до 3,0 мл.

Інкубували проби 10 – 15 хв при кімнатній температурі та зупинили реакцію додаванням до всіх проб по 0,5 мл 0,8 М НСІ у тій самій часовій послідовності, що й при внесенні алкоголевмісних зразків.

Проби фотометрують при 450 нм проти “сліпої”. Результати визначення занесли у таблицю та провели розрахунки концентрації алкоголю (в об.%) за своєю калібрувальною пробою і за формулою:

$$C = \frac{E_d \times 0,0625 \times n}{E_{кл}}$$

де E_d і $E_{кл}$ – оптичні густини дослідної та калібрувальної проб відповідно, виміряні проти “сліпої” проби;
 n – фактор розведення (25 або 50);
 0,0625 – робоча концентрація етанолу, 0,0625 об.%.

Таблиця 1

№ проби	V, мкл	D ₄₅₀	Концентрація етанолу,	
			г/л	об.%.
1. Калібрувальна проба (0,5 г/л)	50	0,250; 0,255	0,5±0,03	0,06±0,03
2. Калібрувальна проба(0,5 г/л)	100	0,485; 0,505	0,5±0,03	0,06±0,03
3. Дослідна проба – вино “Мадера” (n=1000)	100 200	0, 150 0,310	152,5±0,5	19,82±0,05
4. Дослідна проба – горілка “Немирів” (n=1500)	100 200	0,250 0,480	367,5±0,7	47,77±0,07

Висновки. Освоєно колориметричний метод аналіз вмісту етанолу оксидазно-пероксидазним методом за використання набору “Алкотест” в алкоголевмісних напоях – у вині “Мадера” вміст етанолу складає 19,82±0,05 об.%, у горілці “Немирів” – 47,77±0,07 об.%.

Додаток 1

Порівняння чутливості деяких методів визначення бактерійної біомаси

Досліджуваний параметр	Мінімум сухої біомаси бактерій, потрібної для визначення з похибкою, <2%, мг
Маса	50
Білок (за біуретовою реакцією)	1,0
ДНК	1,0
Білок (за реакцією Фоліна-Чіокальто)	0,1
Оптична густина	0,1
Підрахунок клітин	10^{-5}

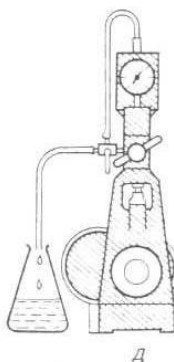
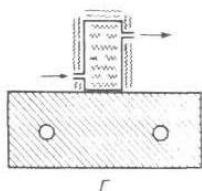
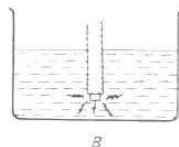
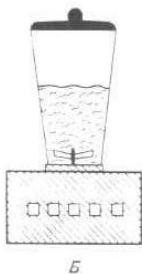
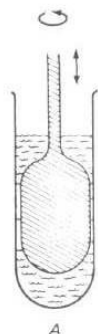
Додаток 2

Методи руйнування клітин

Метод	Приклад	Принцип
<i>М'який вплив:</i>		
Лізис клітин	Еритроцити	Осмотичне руйнування клітинної мембрани (КМ).
Руйнування під дією ферментів	Обробка бактерій лізоцимом	Руйнування клітинної стінки (КС) веде до осмотичного руйнування клітинної мембрани.
Хімічна солюбілізація та автоліз	Екстракція дріжджів толуолом	КС і КМ частково розчиняється під дією хімічних речовин, вивільнені при цьому літичні ферменти завершують процес.
Гомогенізація ручна	Тканини печінки	Клітини протискають через вузьку щілину, що призводить до руйнування КМ.
Подрібнення (розтирання)	М'язова тканина та ін.	Клітини руйнуються у процесі подрібнення тканини під дією сили зсуву.
<i>Вплив середньої сили:</i>		
Лопатевий гомогенізатор (типу Уорінга)	М'язова тканина, більшість тваринних клітин, рослинні тканини	Відбувається механічне руйнування великих клітин і відокремлення одна від одної дрібних клітин.
Розтирання з абразивом (піском чи алюміній оксидом)	Рослинні тканини, бактерії	Руйнування КС відбувається завдяки наявності на частинках абразиву мікрочершавості.
<i>Сильний вплив:</i>		
Прес Френча	Бактерії, рослинні клітини	Клітини протискають через маленький отвір під дуже сильним тиском; вони руйнуються під дією сили зсуву.
Ультразвук	Суспензії клітин	Ультразвукові хвилі створюють високий локальний градієнт тиску; у результаті чого клітини руйнуються під тиском

		зсуву і кавітації.
Кульовий млин	Суспензії клітин	Руйнування КС відбувається під дією швидкої вібрації скляних кульок.
Гомогенізатор Ментона-Гауліна	Суспензії клітин	Так само, як прес Френча, проте дає змогу обробляти великі кількості матеріалу.

Додаток 3



Апаратура, яка використовується для руйнування клітин при отриманні екстракту:

А. Ручний чи механічний скляний гомогенізатор. Б. Лопатевий змішувач (побутовий міксер). В. Ультразвуковий гомогенізатор. Г. Вібраційний кульовий млин. Д. Клітинний дезінтегратор Ментона-Гауліна.

Додаток 4

Максимуми поглинання $\lambda_{\text{макс}}$ і молярні коефіцієнти поглинання ε деяких амінокислот при нейтральному рН

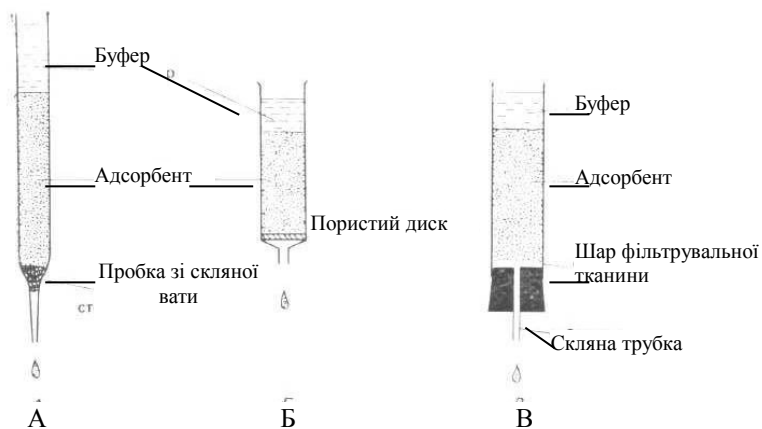
Амінокислоти	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	Коефіцієнт поглинання ε , (ммоль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л) при $\lambda_{\text{макс}}$
Триптофан	280	5,6
	219	47,0
Тирозин	274	1,4
	222	8,0
	193	48,0
Фенілаланін	257	0,2
	206	9,3
	188	60,0
Гістидин	211	5,9
Цистеїн	250	0,3

Додаток 5***Показники заломлення та процент білка (за Рейсом)***

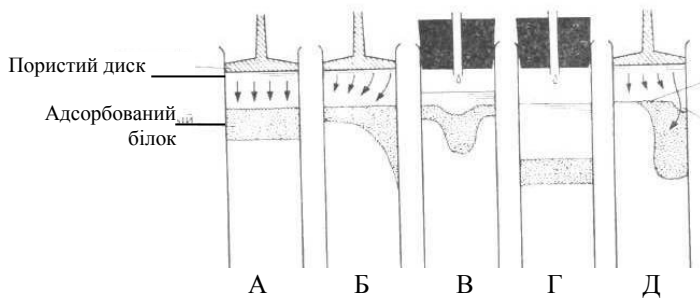
Показник заломлення, n	Білок у %	Показник заломлення, n	Білок у %
1,33705	0,63	1,34575	5,68
1,33743	0,86	1,34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33858	1,52	1,34724	6,55
1,33934	1,74	1,34761	6,77
1,33972	1,91	1,34798	6,98
1,33996	2,18	1,34836	7,20
1,34000	2,40	1,34873	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34126	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34338	4,38	1,35205	9,35
1,34350	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

Додаток 6

Види хроматографічних колонок



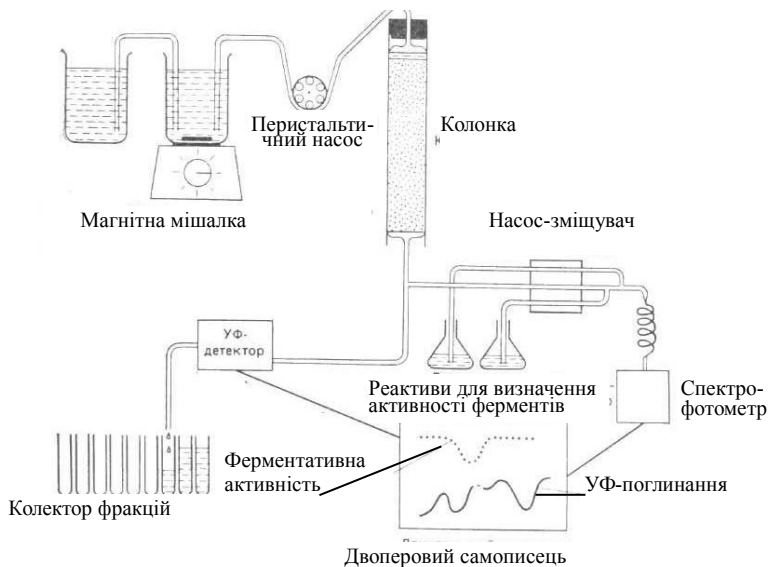
Найпростіші колонки: пастерівська піпетка (А), шприц (Б), скляна трубка (В).
Усі колонки пристосовані для колонкової хроматографії.



Деякі труднощі пов'язані із нанесенням зразка на колонку. **А.** Ідеальний випадок: рідина рівномірно розподіляється по поверхні. **Б.** Із-за невеликої щілини на боковій поверхні пористого аплікатора велика частина рідини проходить через цю щілину, що веде до нерівномірного розподілу зразка по поверхні адсорбенту. **В.** Розчин, який витікає краплями із трубчастого аплікатора, вибиває в адсорбенті ямку, що веде до надмірного току рідини у центрі колонки. **Г.** Щоб уникнути ситуації, зображеної на рис. В, над поверхнею адсорбенту створюють великий пласт буферу. **Д.** Частинки, які містяться у зразку, закупорюють поверхню адсорбенту. У разі утворення невеликої ямки на одній стороні адсорбенту увесь потік рідини може проходити через неї, і тому адсорбція буде нерівномірною. Щоб не допустити цього, зразок потрібно відцентрифугувати чи профільтрувати перед нанесенням на колонку.

Додаток 7

Схема розміщення всієї системи для колонкової хроматографії, включаючи автоматичний збір елюату за допомогою колектора фракцій і безперервне вимірювання ферментативної активності.



ЗМІСТ

Вступ.....	3
I. Методичні поради до виконання лабораторних робіт і оформлення звіту.....	6
II. Лабораторні роботи.....	7
Лабораторна робота 1. Визначення біомаси мікроорганізмів. Методи руйнування клітин.....	8
Лабораторна робота 2. Спектральні методи досліджень. Адсорбційна спектрофотометрія.....	14
Лабораторна робота 3. Ферментативні методи визначення вмісту речовин.....	19
Лабораторна робота 4. Визначення концентрації білків.....	28
Лабораторна робота 5. Визначення активності ферментів.....	33
Лабораторна робота 6. Хроматографічні методи очищення білків. Іонообмінна хроматографія.....	40
Лабораторна робота 7. Електрофоретичні методи аналізу білків.....	45
III. Додатки.....	52
Зразок оформлення звіту про виконання лабораторної роботи.....	52
Додаток 1. Порівняння чутливості деяких методів визначення бактерійної біомаси.....	56
Додаток 2. Методи руйнування клітин.....	57
Додаток 3. Апаратура, яка використовується для руйнування клітин при отриманні екстракту.....	59
Додаток 4. Максимуми поглинання $\lambda_{\text{макс}}$ і молярні коефіцієнти поглинання ϵ деяких амінокислот при нейтральному рН.....	60
Додаток 5. Показники заломлення та процент білка (за Рейсом).....	61
Додаток 6. Види хроматографічних колонок.....	62
Додаток 7. Схема розміщення всієї системи для колонкової хроматографії.....	64

Навчально-методичне видання

Галина Клепач

Експериментальні методи дослідження в біології

Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу
(для студентів ОКР “Магістр”
спеціальності “ПМСО. Біологія”)

*Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного
педагогічного університету імені Івана Франка*

Головний редактор
Ірина Невмержицька

Редактор
Ніна Хом'як

Технічний редактор
Роман Дмитришин

Коректор
Світлана Бецко

Здано до набору 07.04.2010 р. Підписано до друку 16.06.2010 р.
Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура. Times. Наклад 300 прим.
Ум. друк. арк.3,83. Зам. № 265

Редакційно-видавничий відділ Дрогобицького державного педагогічного

університету імені Івана Франка. (Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 2155 від 12. 04. 2005 р.)
82100, Дрогобич, вул. І.Франка, 24, к.43, тел. 2-23-78