

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов

БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

**Часть 1. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
И ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ**

Учебное пособие

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

Санкт-Петербург

2015

УДК 577.1
ББК 28 072
С 427

Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум: Часть 1. Методические основы и правила работы в лаборатории биохимии: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО; ИХиБТ, 2015. – 70 с.

Изложены основы лабораторных и инструментальных методов анализа – колориметрии, спектрометрии, хроматографии и электрофореза. Описаны приемы подготовки образцов растительных и животных тканей для биохимических исследований.

Рекомендуется в качестве руководства для самостоятельной работы студентов бакалавриата и магистратуры всех форм обучения по направлениям: 19.03.01; 19.04.01 Биотехнология; 19.03.02; 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03; 19.04.03 Продукты питания животного происхождения; 18.03.02; 18.04.02 Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии по дисциплинам «Биохимия»; «Основы биохимии и молекулярной биологии»; «Энзимология»; «Химия природных органических веществ»; «Биоконверсия пищевых веществ» и др.

Рецензенты: кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета (доктор биол. наук, проф. Н.Д. Ещенко); доктор техн. наук, проф., зав. кафедрой Л.А. Забодалова (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики)

Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015

© Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н., 2015

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия, или биохимия – наука, изучающая химический состав биологических клеток и тканей, а также реакции, составляющие основу жизнедеятельности. Важной частью предмета биохимии в программе подготовки биотехнологов является изучение состава пищевого сырья и биохимических процессов, происходящих при переработке и хранении сырья. Неотъемлемым структурным компонентом учебно-методического комплекса для изучения биологической химии служит лабораторный практикум.

Главная задача данного практикума – использование и закрепление полученных студентами теоретических знаний по биологической химии, а также формирование практических навыков работы в биохимической лаборатории при исследовании биологического материала. К каждому разделу практикума прилагается краткий теоретический материал. Рассматриваются основы лабораторной техники и статистического анализа, строение, свойства, биологическое значение и методы качественного и количественного определения основных биогенных веществ – белков, ферментов, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и витаминов.

Большое внимание уделяется правилам безопасности при работе в химической лаборатории и оформлению протокола лабораторной работы, включая фиксирование результатов и формулировку выводов. С целью систематизации и контроля знаний, умений и навыков в конце каждой лабораторной работы даются теоретические задания и вопросы для самоконтроля. Для самостоятельной теоретической подготовки приведён список литературы по основам биохимии и современным методам исследования.

Лабораторный практикум может быть использован в качестве учебного пособия и методического руководства в учебной и научно-исследовательской работе при подготовке бакалавров, магистрантов, аспирантов и других научных работников. Приведённые в практикуме методики исследования применимы не только в биохимии, но и в смежных дисциплинах, таких как пищевая химия, энзимология, молекулярная биология и др.

При отборе включённого в практикум материала авторы руководствовались Государственными стандартами подготовки специалистов разных уровней, а также собственным опытом преподавания биохимии в университетах Санкт-Петербурга

1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ

В биохимической лаборатории необходимо на всём протяжении занятия находиться в лабораторном халате. Длинные волосы должны быть аккуратно собраны и закреплены во избежание их попадания в пламя горелок.

В помещениях лаборатории категорически запрещается принимать пищу, пить, а также класть пищевые продукты на рабочие столы.

Большинство реактивов, используемых в лаборатории биохимии, так или иначе вредны для человеческого организма. Их применение требует внимания и осторожности. После использования все флаконы с реактивами должны быть возвращены на те столы или полки, откуда они были взяты.

Запрещается оставлять емкости с реактивами на лабораторных столах, преподавательском столе и в других, не предназначенных для этого местах. При попадании реактивов (кроме концентрированных кислот) на кожу необходимо вымыть это место с мылом. Если случайно на стол был пролит какой-либо раствор, этот участок должен быть сначала вытерт сухой, а затем влажной тряпкой.

После окончания выполнения лабораторной работы необходимо вымыть руки во избежание сохранения на них остатков реактивов, которые могут привести к отравлению.

1.1. Правила техники безопасности при работе со стеклянной посудой

Необходимо осторожно обращаться со стеклянной посудой, которая может разбиться и стать причиной травм.

Шлифы в местах соединения колб с холодильниками или холодильников с аллонжами смазывают вазелином и соединяют осторожно, без излишних усилий.

Резиновые шланги без приложения большого усилия надевают на стеклянные трубки после смазывания их глицерином.

Шланги с концов стеклянных трубок не снимают, а при необходимости срезают ножницами или ножом.

Если случайно разбилась стеклянная посуда, надо немедленно сообщить об этом преподавателю или лаборантам, затем аккуратно собрать осколки и выбросить их в мусорное ведро.

1.2. Правила техники безопасности при работе с нагревательными приборами

Для нагревания пробирок нужно использовать водяную баню. Колбы можно нагревать, закрепив их над асбестовой сеткой, обогреваемой пламенем горелки. Перемещать горелку можно только удерживая её за основание. Желательно пользоваться при этом перчатками.

При нагревании пробирки или колбы её горловина должна быть направлена не в сторону самого экспериментатора или других людей. Нагреваемый сосуд должен быть наполнен не более чем на $\frac{2}{3}$ своего объема. Нагреваемые пробирки должны выниматься из бани с помощью специального держателя. При извлечении их руками можно получить ожог.

Для нагревания водяных бань необходимо пользоваться только исправными газовыми горелками. Нужно постоянно следить за уровнем воды в бане, чтобы он составлял не менее $\frac{1}{4}$ высоты бани.

Пламя горелки не должно представлять опасности для имущества лаборатории и находящихся в ней людей.

При появлении запаха газа горелку необходимо погасить, перекрыв газовый вентиль, и сообщить об этом преподавателю.

Запрещается:

- нагревать пробирки и колбы на открытом пламени;
- прикасаться к верхней части горелки в процессе работы горелки.

1.3. Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами

Необходимо пользоваться только исправными электрическими розетками и электроприборами. Перед включением электроприбора в розетку необходимо проверить состояние розетки, шнура и вилки

электроприбора. Если при эксплуатации электроприбора появляется дым или запах гари, то прибор необходимо немедленно отключить от электросети и сообщить об этом преподавателю.

Запрещается:

- пользоваться оплавленными или искрящими розетками и вилками электроприборов;
- эксплуатировать электроприборы с поврежденной изоляцией провода электропитания;
- пользоваться электроприборами, внутри которых происходит искрение;
- включать и выключать приборы без разрешения преподавателя.

1.4. Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами

Концентрированные кислоты следует хранить в толстостенной посуде в вытяжном шкафу. Розлив концентрированных кислот производят только в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты (резиновые перчатки, халат, защитные очки).

При разбавлении серной кислоты следует медленно и осторожно лить кислоту в воду, направив горловину пробирки или колбы в противоположную от себя и от других людей сторону.

Такого же осторожного обращения требуют концентрированные растворы щелочей. При работе с сухими щелочами должны использоваться средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, халат, защитные очки).

В случае попадания раствора кислоты на кожу необходимо **немедленно** промыть пораженный участок большим количеством проточной воды. Для нейтрализации кислоты используется 10 %-й раствор гидрокарбоната натрия (питьевой соды).

При попадании раствора щёлочи на кожу необходимо **немедленно** промыть этот участок большим количеством проточной воды. Для нейтрализации щёлочи необходимо использовать 2 %-й раствор уксусной кислоты.

Запрещается:

- переносить флаконы с концентрированными кислотами на другие столы;

- вливать воду или растворы в сосуды, где находится концентрированная кислота;
- использовать резиновые и полимерные шланги в качестве сифонов при переливании концентрированных кислот;
- выполнять работы с кислотами и щелочами без средств индивидуальной защиты.

1.5. Правила техники безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями

Огнеопасные и легковоспламеняющиеся жидкости – один из основных источников пожарной опасности в лаборатории наряду с нагревательными приборами. К используемым в лаборатории биохимии реактивам относятся этиловый спирт, ацетон, бутанол, петролейный эфир. Реже применяются предельные углеводороды, такие как гексан и гептан, а также диэтиловый эфир.

Все огнеопасные и легковоспламеняющиеся жидкости должны храниться в специально отведенных для этого местах. Емкости небольшого объема с этими жидкостями (до 1 л) могут храниться в лаборатории под тягой, емкости большего объема должны находиться в негорячем металлическом шкафу. В вытяжном шкафу запрещается скапливать большое количество емкостей с различными горючими жидкостями. После вливания этих жидкостей в колбу для хранения необходимо сразу же плотно закрыть емкость во избежание интенсивного испарения и возникновения в лаборатории высокой концентрации опасных паров.

Емкости с пожароопасными и легковоспламеняющимися жидкостями необходимо немедленно возвращать после использования в места постоянного хранения.

Работы с пожароопасными жидкостями, кроме этилового спирта, должны проводиться вдали от действующих нагревательных приборов и в вытяжном шкафу. Если требуется нагревать колбу с такой жидкостью, необходимо использовать водяную или иную (например, песчаную) баню. Во избежание утечки паров растворителя в воздух лаборатории необходимо также использовать обратный холодильник, присоединенный к колбе.

Нагревать колбы с диэтиловым эфиром можно только на бане с горячей водой без использования нагревательного прибора, добавляя в баню по мере остывания горячую воду.

Все остатки горючих и легковоспламеняющихся жидкостей после проведения экспериментов необходимо сливать в специальные емкости, которые должны располагаться в вытяжном шкафу либо возле раковины, предназначенной для мытья посуды.

О любых случаях разлива или возгорания пожароопасных жидкостей необходимо немедленно сообщить преподавателю. Тушить разлившиеся горючие жидкости можно только песком или с помощью огнетушителя. Вода используется только для тушения этилового спирта или ацетона.

1.6. Первая медицинская помощь

Для оказания первой медицинской помощи в лаборатории используются такие средства, как:

- стерильные бинты;
- вата;
- 3 %-й раствор йода;
- 2 %-й раствор уксусной кислоты;
- 2–10 %-й раствор двууглекислого натрия (питьевой соды).

В случае получения **термического ожога** необходимо промыть обожженный участок кожи большим количеством холодной воды, а затем обработать это место 96 %-м этиловым спиртом. Рекомендуются примочки из свежеприготовленных растворов 2 %-й питьевой соды или 5 %-го марганцово-кислого калия. **Если ожог серьезный и причиняет сильную боль, то необходимо наложить сухую стерильную повязку и обратиться к врачу.**

Если кто-либо в лаборатории получил **удар электрическим током**, то необходимо немедленно освободить его от действия напряжения и **вызвать скорую медицинскую помощь.**

В случае возникновения в лаборатории **возгорания** надо немедленно сообщить об этом преподавателю, а если необходимо, то **перекрыть поступление природного газа к горелкам** и организовано покинуть помещение лаборатории. Ни в коем случае нельзя поддаваться панике и создавать в дверях давку.

При порезе осколками разбитой стеклянной посуды или другими острыми предметами необходимо обработать края раны тампоном со спиртом или раствором перманганата калия и наложить стерильную повязку. Если в ране остались осколки стекла или другие предметы, которые невозможно извлечь самостоятельно, необходимо наложить чистую недавящую повязку и обратиться за медицинской помощью.

Обо всех нарушениях правил техники безопасности, повлекших за собой причинение вреда здоровью студентов, немедленно сообщить преподавателю.

Вопросы для самопроверки

1. Перечислите правила безопасности:
 - а) при работе в биохимической лаборатории;
 - б) при работе со стеклянной посудой;
 - в) при работе с нагревательными приборами;
 - г) при работе с электрическими приборами.
2. Какие действия запрещены при работе с электроприборами?
3. Перечислите меры безопасности при работе с кислотами.
4. Перечислите меры безопасности при работе со щелочами.
5. Какие действия выполняются:
 - а) при работе с кислотами и щелочами;
 - б) при оказании первой медицинской помощи при химических ожогах;
 - в) при оказании первой медицинской помощи при термических ожогах.

2. ПРАВИЛА ПОДГОТОВКИ И ОФОРМЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

2.1. Форма протокола лабораторных работ

1. Дата выполнения.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода.
5. Химизм реакций.
6. Схема установки или рисунок прибора.
7. Последовательность проводимых операций.

8. Результаты экспериментальных наблюдений и измерений.
9. Метод расчёта.
10. Выводы.

2.2. Порядок подготовки к выполнению лабораторной работы

Студент должен иметь специальную тетрадь (рабочий журнал) для лабораторных работ.

При подготовке к занятию требуется изучить теоретические основы соответствующей темы, используя лекции и источники, указанные в списке литературы. В теоретическом введении к разделам практикума раскрываются основные понятия биохимии биомолекул, при этом *ключевые слова* выделены жирным шрифтом. Для успешного усвоения изучаемой темы студенты должны выполнить задания и ответить на вопросы, которые приведены в соответствующем разделе практикума.

Далее студент должен внимательно ознакомиться с методикой выполнения лабораторной работы, изложенной в практикуме, и заполнить пункты 1–6 протокола по прилагаемому образцу.

Теоретические вопросы по теме и особенности выполнения предстоящей работы обсуждаются преподавателем и студентами непосредственно на занятии перед проведением работы.

После обсуждения со студентами протокол (раздел 7 «Последовательность проводимых операций») может быть дополнен.

Завершив подготовку, можно получить реактивы, лабораторную посуду и приступить к самостоятельному выполнению работы.

2.3. Порядок оформления экспериментальных результатов

Результаты экспериментальных наблюдений и измерений при проведении лабораторной работы заносят в протокол (пункт 8). По полученным экспериментальным данным проводят необходимые расчёты (пункт 9). Лабораторная работа считается выполненной только после выводов, полученных по результатам работы (пункт 10). Выводы должны содержать краткий анализ наблюдаемых изменений

и полученных результатов. В протоколах некоторых работ могут отсутствовать отдельные пункты (например, пункт б) или могут быть дополнительно внесены объяснения, таблицы или графики.

Образец оформления протокола лабораторной работы

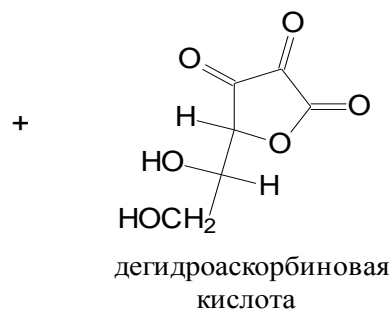
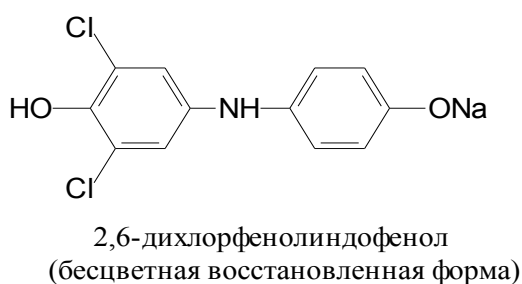
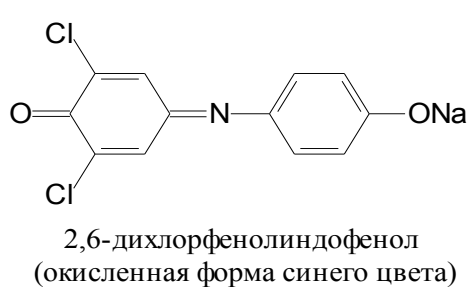
1. **Дата выполнения.** «__» _____

2. **Название работы.** Количественное определение аскорбиновой кислоты в продуктах растительного происхождения.

3. **Цель работы.** Определение титриметрическим методом содержания аскорбиновой кислоты в картофеле.

4. **Принцип метода.** Аскорбиновая кислота восстанавливает окисленную форму красителя 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса) синего цвета до бесцветной восстановленной формы. Точку эквивалентности определяют по образованию не исчезающего в течение 30 с слабо-розового окрашивания титруемого раствора, которое появляется при первой избыточной капле раствора титранта – краски Тильманса.

5. Химизм реакций:



6. **Схема установки или рисунок прибора** (не требуется для данной работы).

7. Последовательность проводимых операций:

- 1) взвешивание картофеля (капусты и т. д.);
- 2) измельчение навески;
- 3) гомогенизация навески растиранием в ступке с небольшим количеством кварцевого песка и 5 %-м раствором соляной кислоты;
- 4) количественный перенос жидкой кашицы в мерную колбу емкостью 100 мл;
- 5) доведение содержимого колбы до метки дистиллированной водой;
- 6) перемешивание осторожным встряхиванием;
- 7) фильтрование через складчатый бумажный фильтр;
- 8) отбор пипеткой в колбу для титрования аликвоты прозрачного фильтрата;
- 9) титрование 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

8. **Результаты экспериментальных наблюдений и измерений** (заполнение табл. 1):

Таблица 1

№ операции	Показатель	Вес (г)	Объём (мл)	Наблюдения
1	Навеска картофеля (<i>b</i>)	10		После измельчения – однородная мелко-дисперсная масса
4, 5	Объём экстракта V_1		100	Экстракт – мутная суспензия растительных клеток
8	Объём аликвоты V_2		10	Фильтрат прозрачный, фильтрование шло медленно
9	Объём титранта <i>a</i>		0,95	Титровали до слабо-розового окрашивания

9. Метод расчёта.

Содержание аскорбиновой кислоты в продукте в мг % (мг на 100 г продукта) вычисляют по формуле

$$C = (a \cdot 0,088 \cdot V_1 \cdot 100) / (b \cdot V_2) = a \cdot 8,8,$$

где a – объём раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг (титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола устанавливается по аскорбиновой кислоте); b – навеска продукта; V_1 – объём приготовленного экстракта (100 мл); V_2 – объём фильтрата (аликвота), взятого для титрования (10 мл).

$$C = 0,95 \cdot 8,8 = 8,36 \text{ мг \%}.$$

10. Выводы.

Содержание аскорбиновой кислоты в анализируемом картофеле составило 8,36 мг % (мг/100 г продукта).

По литературным данным, эта величина может достигать 20 мг %. Полученное значение можно считать удовлетворительным, так как при хранении содержание витамина С понижается.

ВНИМАНИЕ!

После выполнения работы и проверки полученных результатов студент обязан:

- вымыть и сдать лаборанту посуду;
- убрать свое рабочее место;
- представить преподавателю тетрадь с протоколом.

Работа считается выполненной после подписания протокола преподавателем.

Усвоение материала занятия контролируется преподавателем путем устного опроса, компьютерного тестирования или письменного контроля знаний студентов.

2.4. Статистическая обработка экспериментальных данных

2.4.1. Проверка однородности выборки. Исключение выпадающих значений

Термин «выборка» обозначает совокупность статистически эквивалентных результатов (вариантов). Отдельные значения выборки, состоящей из n вариантов, обозначены через X_i (значения i изменяются от 1 до n) и расположены в порядке возрастания:

$$X_1; X_2; \dots X_i; \dots X_{n-1}; X_n. \quad (1)$$

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут однородны в том случае, если эта выборка не содержит грубых ошибок, допущенных при измерении или расчёте. **Такие варианты должны быть исключены из выборки перед окончательным вычислением её статистических характеристик.**

Среднее значение X_{cp} рассматриваемой величины вычисляют как среднее арифметическое всех вариантов:

$$X_{\text{cp}} = (\sum_1^n X_i) / n, \quad (2)$$

где X_i – i -е значение определяемой величины; n – количество проведенных измерений.

Разброс варианта X_i вокруг среднего значения X_{cp} характеризуется величиной **стандартного отклонения** s . В химическом анализе величина s , как правило, рассматривается как оценка случайной ошибки, свойственной данному методу анализа. Квадрат этой величины s^2 называют **дисперсией**. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости результатов выборки. Дисперсию и стандартное отклонение определяют по формулам 3 и 4:

$$s^2 = \sum_1^n X_i^2 - n X_{\text{cp}}^2 / (n - 1); \quad (3)$$

$$s = \sqrt{s^2}. \quad (4)$$

Стандартное отклонение среднего результата рассчитывают по уравнению

$$s_{X_{\text{cp}}} = s / \sqrt{n}. \quad (5)$$

Значения величин X_{cp} , s^2 , s и $s_{X_{\text{cp}}}$ могут быть признаны достоверными, если выборка однородна.

2.4.2. Определение величины доверительного интервала

Если случайная однородная выборка конечного объема n получена в результате последовательных измерений некоторой величины X , имеющей истинное значение μ , то среднее этой выборки X_{cp} следует рассматривать лишь как приближенную оценку X .

Достоверность этой оценки характеризуется величиной **доверительного интервала** $X_{cp} \pm \Delta X_{cp}$, для которого с заданной **доверительной вероятностью** α выполняется условие (6):

$$(X_{cp} - \Delta X_{cp}) \leq \mu \leq (X_{cp} + \Delta X_{cp}). \quad (6)$$

Таким образом, **доверительный интервал** – это интервал значений параметра X , совместимых с опытными данными, и не противоречащий им.

Доверительная вероятность α связана с двухсторонней (верхней и нижней) границей разброса среднего значения выборки и выражается числом от 0 до 1 – реже в процентах от 0 до 100.

Доверительная вероятность задаётся исследователем в соответствии с требуемым уровнем надежности результатов и показывает допустимость того, что действительное значение исследуемой переменной X будет лежать в определенных пределах. Доверительная вероятность определяется с использованием распределения Стьюдента и, как правило, принимает значение 0,95 для биохимических исследований.

Расчет граничных значений доверительного интервала проводят по уравнению (7):

$$(X_{cp} \pm \Delta X_{cp}) = X_{cp} \pm (t(P, f) s) / \sqrt{n}. \quad (7)$$

Здесь $t(P, f)$ – табличное значение коэффициента Стьюдента (табл. 2).

Таблица 2

Значения коэффициентов Стьюдента для доверительной вероятности 0,95 и числа измерений n от 2 до 10

n	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\alpha = 0,95$	12,72	4,33	3,20	2,77	2,57	2,45	2,36	2,31	2,26

2.4.3. Абсолютная и относительная погрешность измерений

Абсолютная погрешность – ΔX является оценкой абсолютной ошибки измерения. Величина этой погрешности зависит от способа её вычисления, который, в свою очередь, определяется распределением случайной величины X_{meas} . При этом равенство

$$\Delta X = | X_{true} - X_{meas} |,$$

где X_{true} – истинное значение, а X_{meas} – измеренное значение, должно выполняться с некоторой вероятностью, близкой к 1,0 (0,95).

Если случайная величина X_{meas} распределена по нормальному закону, обычно за абсолютную погрешность принимают её средне-квадратичное отклонение S^{\wedge} :

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n X_i - X^2 / (n - 1)}.$$

Абсолютная погрешность измеряется в тех же единицах измерения, что и сама величина.

Относительная погрешность – это отношение абсолютной погрешности ΔX к среднему значению X_{cp} , которое принимается за истинное X : $\delta_x = \Delta X / X_{cp}$.

Относительная погрешность является безразмерной величиной либо измеряется в процентах.

3. МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Приготовление растворов заданной концентрации

Растворы – это гомогенные системы, состоящие из двух или более компонентов. Относительное содержание компонента в растворе характеризуется его концентрацией. При этом преобладающий компонент, имеющий то же агрегатное состояние, что и раствор, обычно называют растворителем, остальные компоненты – растворенными веществами.

В зависимости от концентрации растворенного вещества различают растворы концентрированные и разбавленные; в зависи-

мости от природы растворителя выделяют водные и неводные растворы; по уровню концентрации ионов H^+ и OH^- – кислые, нейтральные и щелочные (основные). Способы выражения концентрации растворов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Способы выражения концентрации растворов

Обозначение	Название и определение
m	Молярная весовая концентрация (моляльность) – число молей растворённого вещества, приходящееся на 1000 г растворителя
C_M	Молярная объёмная концентрация (молярность) – число молей растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
C_N	Нормальность – число грамм-эквивалентов растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
T	Титр – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 1 мл раствора
P	Весовой процент (процентная концентрация) – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 100 г раствора

Существует удобная программа определения массы вещества для приготовления раствора с заданной концентрацией и объемом. В окно программы вводится нужная концентрация раствора (массовая или молярная) и объем в миллилитрах. В результате выводится количество вещества в граммах. Код доступа: http://www.himgos.ru/img/Screen_rastvor.jpg

Для приготовления растворов определенной концентрации и точного измерения объемов применяют мерную посуду: *мерные колбы, пипетки и бюретки* (рис. 1).

Мерные колбы – тонкостенные плоскодонные сосуды с длинным узким горлом, на котором нанесена метка в виде кольцевой черты, означающей границу отмеряемого объема (см. рис. 1, в). На каждой колбе обозначены ее емкость и температура, при которой эта емкость измерена. Вместимость мерных колб колеблется в пределах от 5 мл до 2 л. На каждой колбе указана вместимость (в мл) и температура, при которой проводилась ее калибровка, обычно

это 20 °С. Мерные колбы калибруются на вливание, т. е. объем жидкости до метки соответствует вместимости колбы. Мерные колбы могут иметь шлифованные стеклянные пробки, а также резиновые, фторопластовые или полиэтиленовые пробки.

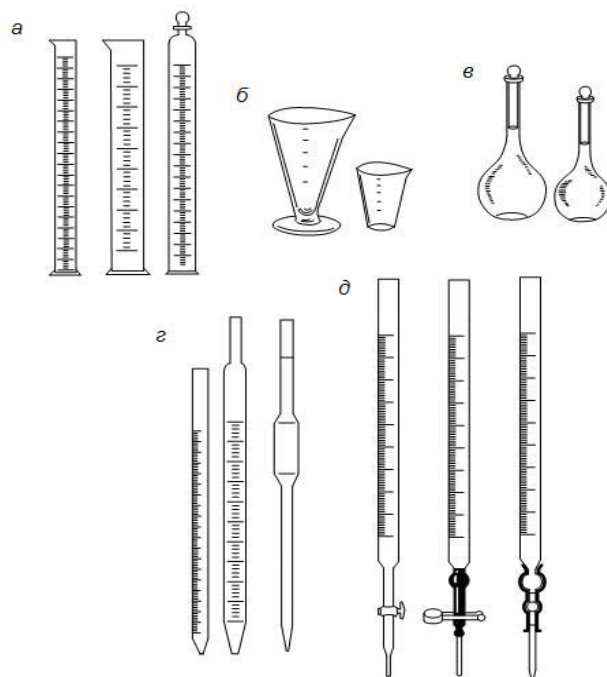


Рис. 1. Мерная посуда:

а – цилиндры; б – мензурки; в – мерные колбы; г – пипетки; д – бюретки

Для приготовления раствора нужной концентрации в мерную колбу сначала насыпают или наливают через воронку растворяемое вещество, а затем колбу до половины наполняют растворителем и осторожно встряхивают круговыми движениями, придерживая рукой колбу за дно. Перемешивание продолжают до полного растворения вещества. После этого колбу оставляют на 5–10 мин для выравнивания ее температуры с окружающей средой, затем приливают растворитель, не доводя до метки на 5–10 мм, и высушивают горло над меткой свернутым в трубочку куском фильтровальной бумаги. Наконец доливают растворитель по каплям до метки, стараясь не замочить внутреннюю часть горла. Наполненную колбу закрывают пробкой и осторожно перемешивают содержимое, переворачивая колбу; при этом держать ее следует двумя руками: левой за осно-

вание, а правой – за горло с пробкой (для точных измерений колбу следует термостатировать при температуре 20 °С).

Для отбора определенного объема пробы жидкости используют *пипетки* (рис. 1, г). Пипетки Мора представляют собой стеклянные трубки с расширением посередине. Нижний конец оттянут в капилляр, на верхнем конце нанесена метка, до которой следует набирать измеряемую жидкость. На пипетке указан ее рабочий объем. Широко применяют также градуированные пипетки различной емкости, на наружной стенке которых нанесены деления.

Для наполнения пипетки нижний конец ее опускают в жидкость и втягивают последнюю при помощи груши или специального приспособления. Жидкость набирают так, чтобы она поднялась на 2–3 см выше метки, затем быстро закрывают верхнее отверстие указательным пальцем правой руки, придерживая в то же время пипетку большим и средним пальцами. Затем ослабляют нажим указательного пальца, в результате чего жидкость будет медленно вытекать из пипетки. В тот момент, когда нижний мениск (уровень) жидкости окажется на одном уровне с меткой, палец снова прижимают. Введя пипетку в сосуд, отнимают указательный палец и дают жидкости стечь по стенке сосуда. После того как жидкость вытечет, пипетку держат еще 5 с прислоненной к стенке сосуда, слегка поворачивая вокруг оси.

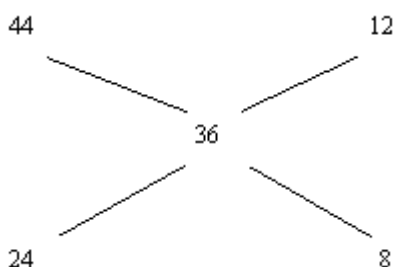
При титровании для измерения точных объемов применяют *бюретки* (рис. 1, д). Объемные бюретки – это стеклянные трубки с несколько оттянутым нижним концом или снабженным краном. На наружной стенке по всей длине бюретки нанесены деления – 0,1 мл. К оттянутому концу бескрановой пипетки с помощью резиновой трубки закладывают стеклянную бусинку. Бюретку заполняют жидкостью через воронку. Затем открывают кран и зажим, чтобы заполнить раствором часть бюретки, расположенной ниже крана или зажима, до нижнего конца капилляра. Бюретку заполняют так, чтобы вначале уровень жидкости был несколько выше нулевого деления шкалы. Затем, осторожно приоткрывая кран, устанавливают уровень жидкости на нулевое деление. Каждое титрование следует начинать только после заполнения бюретки до нулевой отметки.

Для менее точного измерения объемов жидкости используют мерные цилиндры и мензурки (рис. 1, а, б).

Примеры приготовления растворов:

а. Приготовление раствора определенной концентрации из двух имеющихся растворов

При приготовлении растворов определенной концентрации или из двух имеющихся растворов того же вещества часто пользуются **правилом креста**:



В левый угол воображаемого прямоугольника следует поместить более высокую концентрацию – 44, в нижний левый – меньшую концентрацию – 24, а в центр – концентрацию получаемого смешанного раствора – 36. Затем надо вычесть по диагонали из большего числа меньшее (принцип правила креста):

$$\begin{aligned}44 - 36 &= 8 \\36 - 24 &= 12\end{aligned}$$

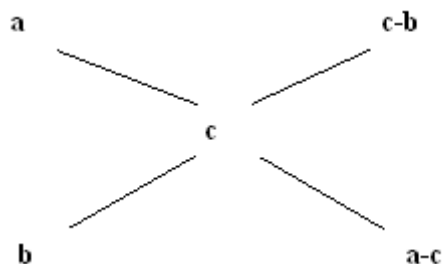
Отношение разностей $12 : 8 = 3 : 2$ покажет, в каком **весовом соотношении** следует смешать исходные растворы для получения раствора заданной концентрации.

Так, для получения 100 г 36 %-го раствора достаточно смешать 60 г 44 %-го раствора и 40 г 24 %-го раствора. Определив по таблице плотности исходных растворов – $1,285 \text{ г/см}^3$ (для 24 %-го раствора) находим, что объемы их соответственно составляют:

$$\frac{60}{1,285} = 46,7 \approx 47 \quad 47 \text{ мл } 44 \text{ \% -го раствора } \text{H}_3\text{PO}_4$$

$$\frac{40}{1,14} = 35,1 \approx 35 \quad 35 \text{ мл } 24 \text{ \% -го раствора } \text{H}_3\text{PO}_4$$

В общей форме "правило креста" имеет вид:



Здесь a и b – соответственно большая и меньшая исходные концентрации; c – концентрация смешанного раствора; $\frac{c-b}{a-c}$ показывает, в каком весовом соотношении следует смешать исходные растворы.

б. Разбавление раствора чистым растворителем (табл. 4):

Таблица 4

Правила разбавления растворов-1

Исходные растворы	Концентрация исходных растворов, %	Требуемая концентрация %	Принцип правила креста	Следует смешать
Раствор	96	40	$40 - 0 = 40$	40 весовых частей
Чистый растворитель	0		$96 - 40 = 56$	56 весовых частей

в. Получение более концентрированного раствора (табл. 5):

Таблица 5

Правила разбавления растворов-2

Исходные растворы	Концентрация исходных веществ, %	Требуемая концентрация %	Принцип правила креста	Следует смешать
Твердое вещество	100	55	$55 - 35 = 20$	20 весовых частей
Раствор	35		$100 - 55 = 45$	56 весовых частей

3.2. Кислотность растворов: способы оценки и поддержания

3.2.1. Количественный показатель кислотности – рН раствора

Кислотность – одна из важнейших количественных химических характеристик раствора. Скорость и направление протекания многих реакций напрямую зависит от кислотности среды. Ещё более зависимы от неё ферменты, многие из которых проявляют высокую активность только в узком диапазоне кислотности.

Под кислотностью водного раствора, как правило, понимается концентрация в нём водородных ионов (протонов). Количественным показателем кислотности является равновесная концентрация протонов $[H^+]$ или (чаще) её отрицательный десятичный логарифм, обозначаемый рН:

$$pH = -\lg[H^+]$$

В воде постоянно происходят процессы диссоциации, при которой в равных количествах образуются катионы гидроксила (протоны) и анионы гидроксила:



В чистой воде интенсивность этого процесса очень невелика. При температуре 25 °С устанавливается равновесная концентрация протонов $[H^+] = 10^{-7}$, что соответствует рН = 7.

В присутствии кислот (вещества, активно диссоциирующие с выделением протонов) наряду с диссоциацией воды происходит и процесс расщепления молекулы кислоты:



При этом образуются протоны в большем количестве. Устанавливается равновесная концентрация ионов водорода, большая, чем 10^{-7} , что соответствует рН менее 7. Такой раствор называется кислым.

В присутствии оснований (вещества, активно диссоциирующие с выделением в раствор гидроксильных анионов) в растворе возрастает концентрация анионов гидроксила:



Гидроксильные анионы активно взаимодействуют с протонами с образованием воды, снижая их концентрацию:



В таких условиях концентрация протонов снижается, их концентрация становится меньше 10^{-7} , что соответствует рН более 7. Такой раствор называется щелочным.

Равновесная концентрация протонов и рН могут быть рассчитаны теоретически. В растворах сильных кислот (серная, соляная, хлорная и азотная) равновесная концентрация протонов практически равна концентрации кислоты. Таким образом,

$$[\text{Н}^+] = C_{\text{кислоты}}; \quad \text{рН} = -\lg C_{\text{кислоты}},$$

где C – молярная концентрация эквивалента (нормальность).

В растворах сильных оснований (гидроксиды натрия и калия) равновесная концентрация гидроксильных ионов равна концентрации основания. В этом случае

$$\begin{aligned} [\text{ОН}^-] &= C_{\text{основания}}; \\ \text{рОН} &= -\lg C_{\text{основания}}; \\ \text{рН} &= 14 - \text{рОН}. \end{aligned}$$

В растворах слабых кислот и оснований ситуация сложнее. В них концентрация протонов и гидроксильных групп зависит уже не только от концентрации электролита, но и от константы его диссоциации.

Концентрацию протонов в растворах слабых кислот можно приблизительно рассчитать по формуле

$$[\text{Н}^+] = \sqrt{K_{\text{дисс}} \cdot C_{\text{кислоты}}},$$

где $K_{\text{дисс}}$ – константа диссоциации слабой кислоты, табличная величина.

Равновесную концентрацию гидроксильных ионов в растворе слабого основания можно рассчитать аналогично:

$$[\text{OH}^-] = \sqrt{K_{\text{дисс}} \cdot C_{\text{основания}}}$$

Зная концентрации $[\text{H}^+]$ или $[\text{OH}^-]$, водородный показатель pH растворов можно рассчитать путем логарифмирования, как указано выше.

3.2.2. Определение значения pH с помощью индикаторов

Кислотно-основными индикаторами называют органические соединения, способные изменять свою окраску в зависимости от pH раствора, в котором они находятся. Для индикаторов характерно наличие интервала перехода окраски – такого узкого диапазона pH, в котором индикатор изменяет свою окраску. Каждый индикатор обладает двумя различными по строению формами, отличающимися по окраске. Одна из них существует в среде более кислой, чем интервал перехода окраски, другая – в менее кислой (более щелочной) среде. В интервале перехода окраски в растворе существуют обе формы индикатора. Видимая окраска индикатора вблизи интервала перехода окраски зависит от соотношения количеств различно окрашенных форм.

Для приблизительного определения pH растворов чаще всего используется универсальная индикаторная бумага, которая имеет желтоватую окраску в нейтральной среде, красную в кислой и синюю – в щелочной. Интенсивность этой окраски зависит от pH раствора, так что этот показатель можно примерно определить, сравнивая окраску бумаги с цветовой шкалой, напечатанной на этикетке пенала с индикаторными бумажками. Точность такого определения, разумеется, очень невелика.

На практике индикаторная бумага используется следующим образом: в исследуемый раствор опускают чистую и сухую стеклянную палочку, после чего ту небольшую каплю раствора, которая осталась на палочке, наносят на кусочек индикаторной бумаги. Примерно через 10–15 с можно наблюдать изменение окраски. Индикаторную бумагу после определения кислотности выбрасывают, её нельзя использовать повторно.

Существует также большое количество индикаторов, которые применяются в виде водных или спиртовых растворов. Для определения кислотности их смешивают с исследуемым раствором (с полным объемом или его частью). Наиболее распространёнными из них являются метиловый оранжевый (интервал перехода окраски – рН 3,1–4,4), метиловый красный (интервал перехода окраски – рН 4,2–6,2) и фенолфталеин (интервал перехода окраски – рН 8,0–8,9). Эти индикаторы обычно используют при кислотно-основном титровании, которое будет рассмотрено ниже.

3.2.3. Измерение рН с помощью рН-метра

Количественное измерение кислотности с помощью прибора рН-метра (рН-метрии) – это самый известный вариант применения прямой потенциометрии со стеклянным электродом. Потенциал этого электрода зависит от равновесной концентрации водородных ионов в растворе, в который он погружен. Электродом сравнения, как правило, служит каломельный электрод, потенциал которого не зависит от кислотности. Измерение разности потенциалов между стеклянным (индикаторным) и каломельным электродами позволяет точно определить рН раствора, в который они погружены. Как и другие измерительные приборы, рН-метры (рис. 2) нуждаются в регулярной проверке и техническом обслуживании. Для корректной работы стеклянный электрод всегда должен быть заполнен насыщенным раствором хлорида калия и погружен в дистиллированную воду.



Рис. 2. рН-метр

Порядок работы на рН-метре:

1. Включить электропитание прибора.
2. Перевести прибор в режим вывода данных в единицах рН (по умолчанию они обычно выводятся в милливольтгах).
3. Поднять электроды из стаканчика с водой.
4. Вытереть аккуратно электроды фильтровальной бумагой.
5. Опустить электроды в стаканчик с исследуемым раствором так, чтобы они находились вблизи дна, но не касались его.
6. Подождать, когда показания прибора станут постоянными, и записать их.
7. Поднять электроды из раствора и протереть их фильтровальной бумагой.
8. Опустить электроды в стаканчик с дистиллированной водой для их промывания.
9. Поднять электроды, сменить воду в стаканчике на чистую и оставить электроды в воде.
10. Выключить электропитание прибора.

рН-метрия – точный метод определения кислотности, но он не позволяет определить истинную концентрацию кислоты или щелочи в растворе.

3.2.4. Кислотно-основное титрование

Титрование – объемный метод количественного анализа, основанный на стехиометрическом взаимодействии добавляемого по каплям из бюретки раствора реагента точной концентрации (титранта), с определяемым веществом. Полноту вступления определяемого вещества в реакцию определяют обычно по изменению окраски вводимого в реакционную смесь индикатора.

Кислотно-основное титрование представляет собой взаимодействие определяемых веществ, обладающих кислотно-основными свойствами, с растворами сильных кислот и оснований, таких как серная или соляная кислоты, гидроксиды калия и натрия. Слабые электролиты никогда не используются для приготовления титрантов.

В ходе титрования рН раствора постепенно меняется. До тех пор, пока во взаимодействие не вступят 90 % определяемого вещества, это изменение происходит сравнительно плавно. Когда происходит оттитровывание от 90 до 99 % определяемого вещества,

изменение рН происходит более резко. В процессе взаимодействия с титрантом последнего 1 % определяемого основания или кислоты происходит очень резкий скачок кислотности, которая после достижения точки эквивалентности (это момент, когда 100 % определяемого вещества прореагирует с титрантом) уже будет определяться избытком добавленного титранта. Такая зависимость графически описывается кривыми титрования – графиками зависимости рН реакционной смеси от объема добавленного титранта. Интервал перехода окраски индикатора, используемого в конкретной методике титриметрического анализа, должен примерно совпадать с рН в точке эквивалентности. В биохимии чаще всего встречается титрование слабой кислоты сильным основанием. Кривая титрования уксусной кислоты раствором гидроксида натрия с концентрацией 0,1 моль/л показана на рис. 3.

При таком титровании, как правило, в качестве индикатора используют фенолфталеин. При титровании сильной кислотой сильного основания или слабой кислотой слабого основания чаще используется метиловый красный, для титрования слабого основания сильной кислотой – индикатор метилоранж.

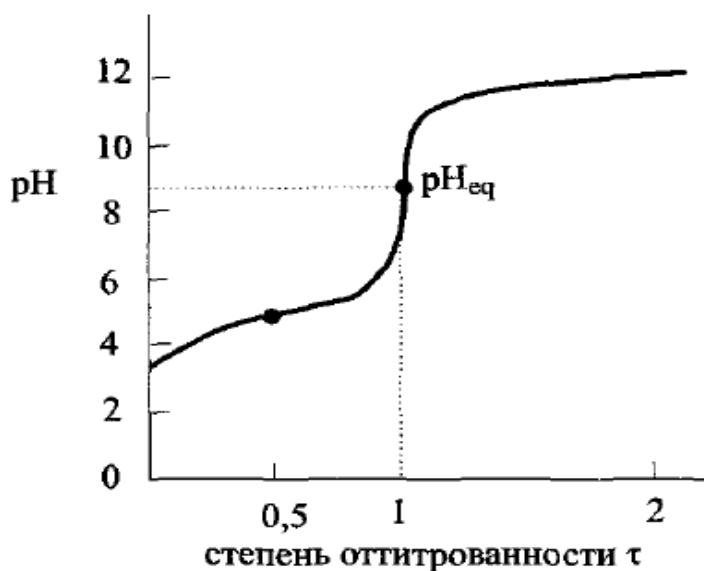


Рис. 3. Кривая титрования уксусной кислоты 0,1 М раствором гидроксида натрия

Титрование делится на прямое и обратное. При прямом титровании титрант непосредственно взаимодействует с определя-

емым веществом. При обратном титровании к определяемому веществу добавляют избыток первого титранта, который взаимодействует с ним, а затем оттитровывается непрореагировавший остаток первого титранта вторым титрантом. Обратное титрование применяют в тех случаях, когда определяемое вещество вступает в реакцию слишком медленно и прямое титрование невозможно.

Расчет результатов титрования:

1. Прямое титрование. Для расчета концентрации определяемого вещества, как правило, используется расчетная формула, выводимая из выражения закона эквивалентов:

$$C_{\text{экв.1}} \cdot V_1 = C_{\text{экв.2}} \cdot V_2;$$
$$C_{\text{экв.X}} = (C_{\text{экв.Т}} \cdot V_{\text{Т}}) / V_{\text{X}},$$

где $C_{\text{экв.X}}$ – молярная концентрация эквивалента определяемого вещества; $C_{\text{экв.Т}}$ – молярная концентрация эквивалента титранта; $V_{\text{Т}}$ – объем титранта, пошедший на титрование (в литрах); V_{X} – объем раствора определяемого вещества, взятый на анализ (в литрах).

Для расчета массы определяемого вещества, как правило, используется формула

$$m_{\text{X}} = (C_{\text{экв.Т}} \cdot V_{\text{Т}} \cdot M_{\text{экв.X}}) / 1000,$$

где m_{X} – масса определяемого вещества (в граммах); $M_{\text{экв.X}}$ – молярная масса эквивалента определяемого вещества; 1000 – коэффициент для пересчета литров в миллилитры.

2. Обратное титрование. Расчеты аналогичны расчетам в прямом титровании, только вместо произведения объема и концентрации титранта подставляется разность произведений объемов и концентраций двух титрантов:

$$C_{\text{экв.X}} = (C_{\text{экв.1}} \cdot V_1 - C_{\text{экв.2}} \cdot V_2) / V_{\text{X}},$$

где $C_{\text{экв.1}}$ и V_1 – концентрация и объем (в литрах) первого титранта; $C_{\text{экв.2}}$ и V_2 – соответственно концентрация и объем (в литрах) второго титранта.

Масса определяемого вещества может быть рассчитана по формуле

$$m_X = ((C_{\text{экв.1}} \cdot V_1 - C_{\text{экв.2}} \cdot V_2) \cdot M_{\text{экв.X}}) / 1000.$$

3.2.5. Буферные растворы

Буферными растворами называются растворы, содержащие слабую кислоту или слабое основание и его соль. В этих растворах концентрация ионов водорода практически не изменяется при разбавлении их и добавлении небольшого количества сильной кислоты или основания.

Такие растворы широко используются в биохимии для поддержания постоянства кислотности среды, что необходимо для успешного протекания многих процессов. Особенно большую роль буферные растворы играют в создании благоприятных условий для ферментативного катализа.

Кислотность буферного раствора, содержащего слабый электролит (слабую кислоту или слабое основание) и его соль, может быть рассчитана по формуле

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{дисс}} + \lg (C_{\text{соли}} / C_{\text{слаб.эл}}),$$

где $K_{\text{дисс}}$ – показатель константы диссоциации слабого электролита; $C_{\text{соли}}$ – молярная концентрация соли; $C_{\text{слаб.эл}}$ – молярная концентрация слабого электролита (кислоты или основания).

Наиболее распространенными в биохимии буферными растворами являются растворы трис-(гидрокси-метил)аминометана («трис»), которые с помощью рН-метра дотитровывают соляной кислотой до необходимого значения рН. «Трис» имеет показатель константы диссоциации $\text{pK}_{\text{дисс}} = 8,08$. С его помощью невозможно охватить весь диапазон рН (особенно малы его возможности в сильнощелочной области). Поэтому наряду с «трисом» используются и другие слабые электролиты для создания буферных растворов.

Другие возможные компоненты буферных растворов приведены в табл. 6.

Компоненты буферных растворов

Кислотный компонент	Основной компонент	Интервал pH (25 °C)
Кислота соляная	Кислота аминокислотная (глицин)	2,2–3,6
Кислота соляная	Калия гидрофталат	2,2–4,0
Кислоты лимонной моногидрат	Калия гидрофосфат	2,6–7,6
Кислоты лимонной моногидрат	Натрия цитрат	3,0–6,2
Кислота уксусная	Натрия ацетат	3,7–5,6
Кислота янтарная	Натрия гидроксид	3,8–6,0
Калия гидрофталат	Натрия гидроксид	4,1–5,9
Натрия дигидрофосфат	Натрия гидрофосфат	5,8–8,0
Калия гидрофосфат	Натрия гидроксид	5,8–8,0
Кислота соляная	Имидазол	6,2–7,8
Кислота соляная	2,4,6-триметил пиридин	6,4–8,3
Кислота соляная	N-этилморфолин	7,0–8,2
Кислота соляная	ТРИС (гидроксиметил-аминометан)	7,1–8,9
Кислота соляная	2-амино-2-метилпропандиол-1,3	7,8–9,7
Кислота соляная	Натрия тетрабората декагидрат (бура)	8,1–9,0
Кислота аминокислотная (глицин)	Натрия гидроксид	8,6–10,6
Натрия гидрокарбонат	Натрия карбонат	9,2–10,8
Натрия тетрабората декагидрат (бура)	Натрия гидроксид	9,3–10,7
Натрия гидрокарбонат	Натрия гидроксид	9,7–10,9
Натрия гидрофосфат	Натрия гидроксид	11,0–11,9

3.3. Инструментальные методы анализа

3.3.1. Колориметрия и спектрофотометрия

Колориметрия (от лат. *color* – цвет и греч. μέτρον – измеряю) – физический метод химического анализа для количественного определения содержания веществ в растворах с помощью приборов, которые называются колориметрами.

Возникновение колориметрии и фотометрии связано с именем Роберта Бойля, который использовал экстракт дубильных орешков, чтобы различить железо и медь в растворе. Бойль заметил, что, чем больше железа содержится в растворе, тем более интенсивна окраска последнего. Это был первый шаг к колориметрии. Первые инструменты для колориметрии появились в 1870 г. (колориметры Дюбоска). Колориметрия широко применяется в аналитической химии, в том числе для количественного анализа содержания биогенных веществ в растворах, для измерения рН, в медицине, а также в промышленности при контроле качества продукции.

Колориметрия может быть использована при количественном определении всех веществ, которые дают окрашенные растворы или могут с помощью химической реакции дать окрашенное растворимое соединение. Колориметрические методы позволяют оценить не только количество вещества, но и активность фермента, если в ходе ферментативной реакции образуются или расходуются окрашенные продукты.

Колориметрические методы основываются на сравнении интенсивности окраски раствора исследуемого вещества с окраской эталонного раствора, содержащего определенное количество данного вещества.

Колориметрический анализ базируется на сравнении качественного и количественного изменения потоков видимого света при их прохождении через исследуемый раствор и раствор сравнения. Определяемый компонент при помощи химико-аналитической реакции переводится в окрашенное соединение, после чего измеряется интенсивность окраски полученного раствора. Интенсивность окраски является мерой концентрации анализируемого вещества. Основной закон колориметрии – закон Бугера–Ламберта–Бера – записывается следующим образом:

$$D = \lg I_0/I = \varepsilon C l,$$

где D – оптическая плотность раствора; I_0 и I – интенсивность светового потока, попадающего на раствор (I_0) и прошедшего через раствор (I); ε – коэффициент светопоглощения – величина, постоянная для данного окрашенного вещества ($\text{л} \cdot \text{г-моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$); C – концентрация окрашенного вещества в растворе, г-моль/л; l – толщина поглощающего свет слоя раствора (длина оптического пути).

Поскольку (по закону Бугера–Ламберта–Бера) концентрация раствора обратно пропорциональна толщине его слоя, можно вычислить концентрацию окрашенного соединения C в исследуемом растворе, зная его концентрацию в калибровочном растворе:

$$C = D/\varepsilon \cdot l.$$

Измерение интенсивности окраски проб с помощью прибора фотоэлектроколориметра (ФЭК) называется **фотоколориметрическим методом**. На ФЭК измеряют величину пропускания света в определенном интервале длин волн света (λ). Контроль (обычно дистиллированная вода или исходный материал без добавления реагентов) используется для калибровки устройства.

При таком способе оптическую плотность растворов-проб определяют из комплекта ФЭК в стеклянных кюветах с длиной оптического пути 1–2 см. Спектральный диапазон ФЭК обычно составляет от 400 до 750 нм (в комплекте имеются светофильтры с эффективной длиной волны λ 425, 458, 515, 540, 570, 610, 700 нм). Все измерения с помощью ФЭК проводят при использовании светофильтра, соответствующего тому участку спектра, который наиболее интенсивно поглощается исследуемым веществом. В каждом конкретном случае при выборе светофильтра снимают оптическую характеристику раствора, так как необходимо знать зависимость его оптической плотности от эффективной длины волны светофильтра.

Приборное колориметрирование позволяет существенно повысить точность анализа, однако требует большей тщательности и квалификации в работе, а также предварительного построения **калибровочного графика**, так как показания ФЭК не дают непосредственных значений концентрации веществ.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный МКМФ-1

Однолучевой фотоколориметр МКМФ-1 (рис. 4) предназначен для измерения пропускания, оптической плотности и концентрации окрашенных растворов в области спектра 315–980 нм. Весь спектральный диапазон разбит на спектральные интервалы, выделяемые с помощью светофильтров. Пределы измерения пропускания от 100 до 5 % (оптической плотности от 0 до 1,3). Основная абсолютная погрешность измерения пропускания не более 1 %.

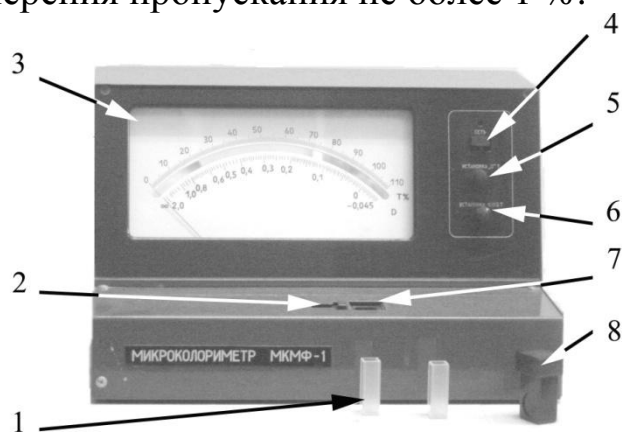


Рис. 4. Фотоколориметр МКМФ-1:

1 – кюветы с толщиной слоя раствора 1 см; 2 – отделение для кювет;
3 – шкала пропускания (T) и оптической плотности (D); 4 – кнопка включения питания прибора; 5 – рукоятка установки нулевого пропускания; 6 – рукоятка установки 100 %-го пропускания; 7 – отделение для светофильтра;
8 – светофильтр

Порядок работы на колориметре

1. Включите колориметр в сеть за 15 мин до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто (при этом шторка перед фотоприемником перекрывает световой пучок).

2. Введите рабочий светофильтр.

3. Установите минимальную чувствительность колориметра. Для этого ручку "ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ" установите в положение «1», ручку "УСТАНОВКА 100 ГРУБО" – в крайнее левое положение.

4. Стрелку колориметра вывести на нуль с помощью потенциометра «НУЛЬ».

5. В световой пучок поместите кювету с контрольным раствором.

6. Закройте крышку кюветного отделения.

7. Ручками "ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ" и "УСТАНОВКА 100 ГРУБО" и "ТОЧНО" установите стрелку микроамперметра на деление «100» шкалы пропускания.

8. Поворотом рукоятки кюветной камеры поместите в световой поток кювету с исследуемым раствором.

9. Снимите показания по шкале колориметра в соответствующих единицах ($T\%$ или D).

10. После окончания работы отключите колориметр от сети, очистите и протрите насухо кюветную камеру.

Определение концентрации вещества в растворе с помощью МКФ-1.

Определение концентрации вещества в растворе с помощью калибровочного графика осуществляется в четыре приёма:

1) выбор светофильтра;

2) выбор кюветы;

3) построение калибровочного графика;

4) измерение оптической плотности исследуемого раствора и определение его концентрации при использовании калибровочного графика.

Выбор светофильтра. В видимой части спектра воспринимаемый цвет есть результат избирательного поглощения определенного участка спектра белого света. Цвет раствора является дополнительным к цвету поглощения излучения. Поэтому измерение поглощения следует проводить в дополнительной для цветной реакции области спектра. Так, если раствор окрашен в сине-зеленый цвет, то требуется измерять поглощение этим раствором красного цвета (табл. 7).

Для более точного выбора светофильтра измеряют величину поглощения одного и того же раствора при различных светофильтрах и выбирают такой, при котором она достигает максимального значения.

Выбор кюветы. Предварительный выбор кюветы проводится визуально исходя из интенсивности окраски раствора. Если раствор интенсивно окрашен (темный), следует пользоваться кюветами с

малой длиной оптического пути (1–5 мм). При слабоокрашенных растворах измерения проводят в кюветах с большой длиной оптического пути (20–50 мм).

Таблица 7

Соответствие цветопоглощения и цветоотражения

Интервал длин волн поглощенного излучения, λ , нм	Цвет поглощенного излучения	Наблюдаемый цвет
400–450	Фиолетовый	Желто-зелёный
450–480	Синий	Желтый
400–550	Сине-зеленый	Оранжевый
500–560	Зеленый	Красно-пурпурный
400–610	Сине-зелено-желтый	Красный
450–650	Зелено-желто-красный	Пурпурный
625–750	Красный	Сине-зеленый

Построение калибровочного графика. Для этого готовят растворы с точно известными концентрациями (калибровочные растворы) и измеряют значения их оптической плотности D . Результаты оформляют графически (рис. 5).

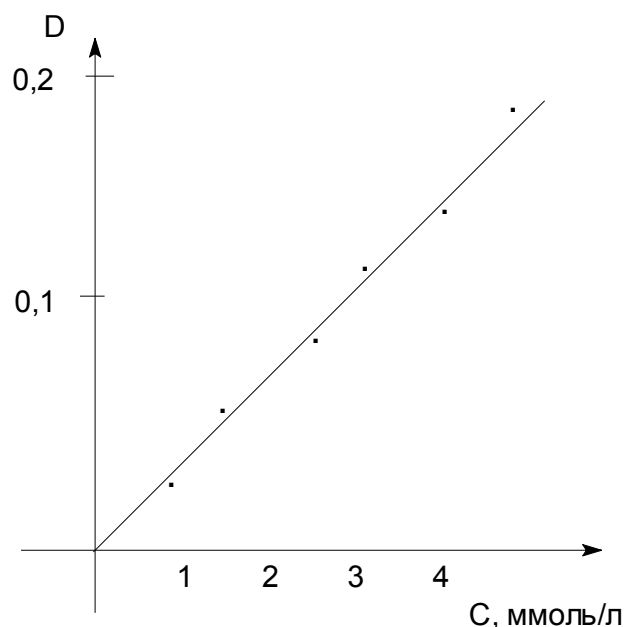


Рис. 5. Калибровочный график

На оси ординат откладывают по показаниям ФЭК значения величин поглощения (оптической плотности D), а по оси абсцисс – концентрацию вещества в растворе. Для получения хорошего калибровочного графика нужно не менее пяти точек. Калибровочный график должен иметь вид прямой линии, выходящей из начала координат. Нижние границы определяемых концентраций варьируют от 10^{-3} до 10^{-8} моль/л.

Спектральные приборы для измерений в видимой и УФ-области

Аналогичные правила действуют при работе на более совершенных приборах – *спектрофотометрах*. Основное отличие от ФЭК состоит в возможности пропускать через исследуемый раствор световой поток любой требуемой длины волны. Спектрофотометры могут работать в различных диапазонах длин волн – от ультрафиолетового (УФ) до инфракрасного (ИК).

В спектрофотометрах в качестве источников света используют лампы накаливания (для измерений в видимой области света от 380 до 750 нм) или дейтериевые (водородные) – для измерений в ближней УФ-области спектра (190–380 нм). Свет от источника проходит через оптическую систему – монохроматор, который разлагает белый цвет на цветовые компоненты и выделяет из спектра источника света излучение заданной длины волны. Спектральные приборы для измерений в УФ-области отличаются тем, что вместо стеклянных оптических деталей применяют аналогичные кварцевые (реже флюоритовые или сапфировые), которые не поглощают УФ-излучение.

Современный спектрофотометр СФ-56 работает под управлением персонального компьютера, как и все спектральные лабораторные приборы высокого класса. Программное обеспечение спектрофотометра СФ-56 является полноценным приложением Windows и имеет интуитивно понятный оконный интерфейс. Сохранение результатов производится в текстовом формате файловой структуры Windows, есть всплывающие подсказки и встроенная система помощи.

В управляющей программе предусмотрены различные режимы работы:

- сканирование;
- поточечное определение оптической плотности/пропускания;
- получение кинетических кривых;
- определение концентраций.

В любом режиме измерительная процедура на спектрофотометре СФ-56 (рис. 6) может быть гибко настроена под запросы пользователя. К примеру, можно управлять включением источников излучения (отключая их для экономии), выбирать ширину щели, шаг дискретизации, тип автоматического подбора экспозиции, работать при ручном и автоматическом типе перемещения кювет.



Рис. 6. Спектрофотометр СФ-56

В отличие от любых сколь угодно совершенных встроенных систем ввода и отображения информации управляющий компьютер обеспечивает полную свободу и удобство выбора параметров измерения и алгоритмов обработки полученных данных.

При нажатии кнопки «Обработка» откроется новое окно, предоставляющее пользователю возможность производить различные математические операции с полученным спектром, а также автоматически или вручную производить поиск характерных точек и соответствующих им длин волн.

Использование компьютера в качестве управляющей системы значительно облегчает процедуру передачи данных в специализированные программные пакеты обработки информации.

3.3.2. Рефрактометрия

Рефрактометрия (от лат. refractus – преломленный и греч. metreo – измеряю) – метод исследования веществ, основанный на определении показателя преломления n (коэффициент рефракции) и некоторых его функций. Применяется для идентификации химических соединений, количественного и структурного анализа, определения физико-химических параметров веществ, а также для контроля качества и состава различных продуктов в химической, фармацевтической, пищевой и многих других отраслях промышленности.

Для жидкостей и твердых тел n определяют, как правило, относительно воздуха, для газов – относительно вакуума. Значения n зависят от длины волны света λ и температуры, которые указывают в подстрочном и надстрочном индексах. Например, показатель преломления при $20\text{ }^\circ\text{C}$ для D -линии спектра натрия ($\lambda = 589\text{ нм}$) записывают как n_D^{20} . Часто используют также линии C ($\lambda = 656\text{ нм}$) и F ($\lambda = 486\text{ нм}$) спектра водорода.

Показателем преломления (n) называют отношение синуса угла падения света к синусу угла преломления при прохождении света из вакуума в данный раствор (рис. 7).

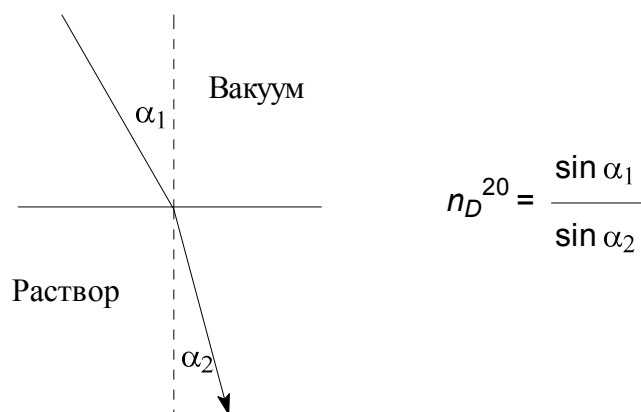


Рис. 7. Углы падения и преломления света и показатель преломления в рефрактометрии

Обычно n жидких и твердых тел определяют с точностью до 0,0001 на **рефрактометрах** путем измерения предельных углов полного внутреннего отражения. Наиболее распространены рефрактометры с призмными блоками и компенсаторами дисперсии Аббе,

позволяющие определять n_D в «белом» свете по шкале или цифровому индикатору.

Для рефрактометрии растворов в широких диапазонах концентраций пользуются таблицами или эмпирическими формулами, важнейшие из которых (для растворов сахарозы, этанола и др.) утверждаются международными соглашениями и лежат в основе построения шкал специализированных рефрактометров для анализа промышленной и сельскохозяйственной продукции.

На практике показатели преломления жидкостей измеряют на границе раздела между воздухом и жидкостью с помощью рефрактометра ИРФ-454 (рис. 8). При этом в качестве стандартной длины волны света берется желтая линия натрия (обозначается символом D), а измерения проводятся при стандартной температуре $20\text{ }^\circ\text{C}$, так как показатель преломления сильно зависит от температуры.

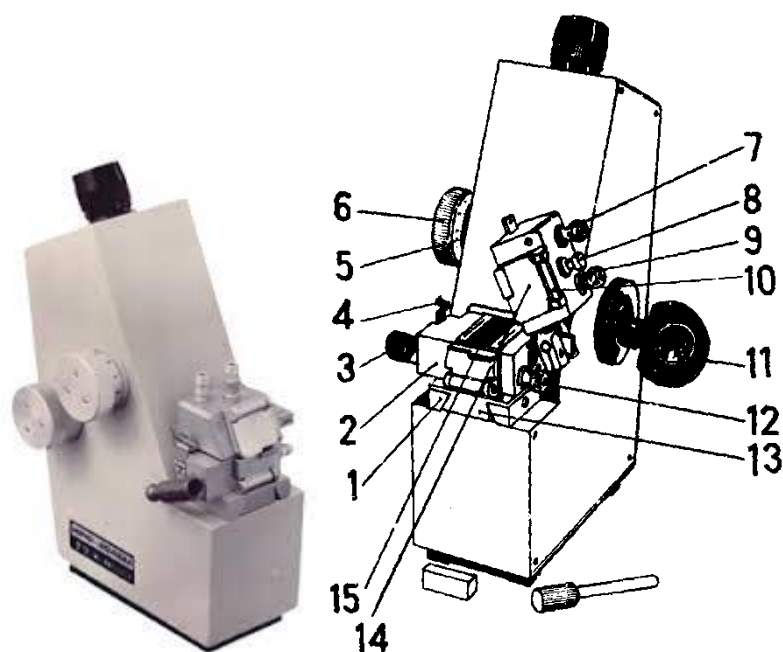


Рис. 8. Рефрактометр ИРФ-454:

1 – направляющая; 2 – блок рефрактометрический; 3, 7, 9, 12 – шурупы;
4 – крючок; 5 – шкала; 6 – нониус; 8 – рукоятка; 10 – шарнир; 11 – зеркало;
13 – направляющая; 14 – заслонка; 15 – зеркало

Например, для чистой воды $n_D^{20} = 1,3330$. Известно, что повышение температуры водных растворов на $1\text{ }^\circ\text{C}$ приводит к падению показателя в среднем на $0,0001$. Это позволяет производить

его пересчет на стандартную температуру, если измерения проводятся при других условиях. Для анализа содержания в растворе глюкозы или лактозы используется практически линейный характер зависимости показателя преломления от массовой процентной концентрации. Однако следует заметить, что показатель преломления зависит и от наличия в растворе других компонентов, в том числе неуглеводной природы, поэтому в случае анализа многокомпонентных смесей данный метод является лишь ориентировочным.

Для проведения измерений на чистую полированную поверхность измерительной призмы с помощью пипетки осторожно, не касаясь поверхности призмы, наносят 2–3 капли исследуемого раствора глюкозы или лактозы, опускают осветительную призму и, вращая ручку компенсатора, обозначают границу между светлой и темной частями поля зрения максимально четко, без радужных полутонов. Затем вращением основного маховика наводят эту границу на перекрестье в поле зрения прибора и считывают значение показателя преломления по основной шкале прибора с точностью до четвертого знака. Затем рассчитывают концентрацию глюкозы или лактозы C в процентах по массе по следующей формуле:

$$C = (n_D^{20} - 1,3330) / 0,0014.$$

Если нет возможности термостатирования призмы, производят расчет концентрации, учитывая температуру воздуха в помещении (t , °C), где производилось измерение

$$C = (n_D^t - 1,3330 + 0,0001 (t - 20)) / 0,0014.$$

После завершения измерения открывают измерительный блок и несколько раз промывают дистиллированной водой поверхность измерительной призмы с помощью пипетки, после чего осторожно, без нажима, протирают ее мягкой салфеткой или ватой и просушивают на воздухе.

3.3.3. Электрофорез

Наиболее широкое применение электрофорез получил для анализа и очистки белков и нуклеиновых кислот, хотя этот метод может быть использован и для других заряженных биологических

молекул, таких как сахара, аминокислоты, пептиды, нуклеотиды. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причём эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности. Принцип электрофоретического разделения молекул состоит в их движении с различной скоростью в постоянном электрическом поле

Для фракционирования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов в настоящее время используют почти исключительно гель-электрофорез. Наиболее широко используются полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию – путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. В качестве других «носителей» жидкой фазы широко используют пленки из ацетата целлюлозы, фильтровальную бумагу, тонкие слои силикагеля, целлюлозы, сефадекса и др. В некоторых случаях, например для разделения низкомолекулярных веществ, эти системы имеют свои преимущества.

Знак и величина электрического заряда молекул, а значит, направление и скорость их движения при электрофоретическом разделении зависят от значения рН и ионной силы среды. Кроме того, скорость движения определяется молекулярной массой молекул, ионным окружением (составом и концентрацией буфера), приложенным напряжением и другими факторами. В связи с этим для получения сопоставимых данных электрофорез должен осуществляться при строго определенных значениях указанных параметров. Например, в буферном растворе с рН = 8,6 или 8,9 и ионной силой 0,08–0,15 моль/л белки сыворотки крови приобретают отрицательный заряд и движутся от катода к аноду, причем дальше всего уходят альбумины, имеющие меньшую молекулярную массу, затем располагаются а₁-, а₂-, b- и g-глобулины. Результаты электрофореза зависят от подготовки пробы и мастерства персонала лаборатории, а качество «картинки» – от навыков исследователя в проведении анализа.

Аппараты для электрофореза

Для электрофореза используются различные аппараты – как ручные, так и полуавтоматические. Современные комплексы оснащены микропроцессорными блоками питания и управляются компьютером; в большинстве систем на последней стадии исследования окрашенных мембран или гелевых пластинок (определения относительного количества белков в каждой фракции) используется электронный цветной сканер или миниатюрная фотокамера, что существенно повышает точность и воспроизводимость результатов.

Программное обеспечение дает возможность усредненного расчета оптической плотности отдельных фракций путем автоматического определения границ «дорожек» и многократного сканирования каждой из них в нескольких «разрезах», что позволяет исключить ошибки из-за локальных микродефектов и неровного положения носителя, а также до определенной степени нивелировать искривление дорожки и влияние окрашенного фона при неполной отмывке.

На экран дисплея и на принтер выводится график-денситограмма (рис. 9) с рассчитанным содержанием отдельных белковых фракций. При необходимости маркеры границ фракций на графике можно скорректировать, при этом будет произведен автоматический пересчет их показателей. В компьютере, как правило, создается архив электрофореграмм, их можно в любое время извлечь и просмотреть.



Рис. 9. Денситограф

Электрофорез в полиакриламидном геле

Полиакриламидный гель (ПААГ) в виде поддерживающей среды при проведении электрофореза использовали в 1959 г. Раймонд и Вейнтрауб (S. Raymond and L. Weintraub). Теорию метода разработали Орнштейн (L. Ornstein, 1964) и Дэвис (B. Davis, 1964).

Полимеризация полиакриламидного геля

Для получения полиакриламидного геля используют акриламид и какой-либо агент, образующий поперечные сшивки – обычно N,N'-метиленабисакриламид (сокращенно – бисакриламид).

Реакция полимеризации протекает по свободнорадикальному механизму и требует наличия свободных радикалов акриламида. В качестве инициаторов реакции полимеризации используют вещества, разрушающиеся с образованием свободных радикалов, которые затем взаимодействуют с молекулами акриламида и запускают (инициируют) полимеризацию.

Наиболее широко в качестве инициатора процесса полимеризации используют персульфат аммония ($\text{NH}_4\text{--SO}_4\text{--SO}_4\text{--NH}_4$) или калия, образующий в водном растворе за счет гомолитического разрыва связи радикалы ($\text{NH}_4\text{--SO}_4^\bullet$).

Поскольку реакция полимеризации акриламида – медленный процесс, то для ускорения в качестве катализатора обычно используют N,N,N',N' – тетраметилэтилендиамин $(\text{CH}_3)_2 = \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N} = (\text{CH}_3)_2$ (ТЕМЭД).

Плотность геля (размер пор)

Для характеристики полиакриламидного геля необходимо указывать процентное содержание мономеров. Стандартно используют следующие обозначения: T – процентное отношение суммарной массы обоих мономеров к объему раствора; C – процентное отношение массы бисакриламида к общей массе обоих мономеров.

$$T = (a + b) / m \cdot 100 \%;$$

$$C = b / (a + b) 100 \%,$$

где a – количество акриламида; b – количество мономера бисакриламида, образующего сшивки; m – объем буфера, мл.

Значение T обычно варьируется в пределах от 3 до 30 %, а C – от 1 до 5 %. Выбор значений C и T определяется диапазоном фракционирования макромолекул и ограничивается механическими и адсорбционными свойствами геля. Для крупнопористых гелей необходимо увеличивать степень сшивки (повышать C до 3–5 %), для мелкопористых гелей величина C не должна превышать 1–2 %.

Чем выше концентрация полимерного акриламида, тем меньше размер пор в геле:

$$p = 1,5 d / \sqrt{C},$$

где p – размер пор в ангстремах; C – объемная концентрация акриламида; d – диаметр молекулы акриламида.

Чем больше содержание акриламида (а величина T , в основном, определяется им), тем гуще нити полимера, меньше промежутки между ними и сильнее удерживание. Увеличение содержания «сшивки» (C) сначала повышает жесткость геля, так как средняя длина свободных участков нитей уменьшается. Удерживание при этом увеличивается, а миграция биополимеров в геле замедляется. Однако экспериментально показано, что с увеличением C выше 10 % тормозящий эффект геля (при одних и тех же значениях T) ослабляется, поэтому содержание сшивки C в геле должно быть в пределах 2–5 %.

Соотношение между акриламидом и сшивающим агентом определяют механические и физические свойства геля (табл. 7). Для гелей с концентрацией T от 5 до 15 % рекомендуется выбирать C в пределах 2–4 %. Для выбора C была предложена следующая эмпирическая формула:

$$C = 6,5 - 0,3 T (\%).$$

Таблица 7

Концентрация полиакриламидных гелей для разделения макромолекул с различными молекулярными массами (D)

Концентрация геля T , %	Концентрация бисакриламида C , %	Пределы разделения, D
15–20	0,2	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^4$
10–15	0,3	$4 \times 10^4 - 1 \times 10^5$
5–10	2–3	$1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$
5	5	$3 \times 10^5 - 5 \times 10^5$
2–5	6	Выше 5×10^5

Электрофоретическая подвижность макромолекул

Электрофоретическая подвижность – это скорость движения частицы (обычно выражаемая в см/с) при напряженности электрического поля в 1 В/см. Эта величина имеет следующую размерность: $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$, а её знак совпадает со знаком суммарного заряда макромолекулы.

Рассмотрим изолированную частицу, взвешенную в идеальном диэлектрике. Если приложить равномерное электрическое поле, то на частицу будет действовать сила, равная произведению общего заряда частицы на напряженность этого поля. При наложении электрического поля скорость движения частицы (биологической макромолекулы) довольно быстро увеличивается до тех пор, пока электрическую силу, действующую на частицу со стороны электрического поля, не уравновесит сила трения. После этого частица будет двигаться с постоянной скоростью.

Подвижность макромолекул в полиакриламидном геле обратно пропорциональна среднему размеру пор (формула Фергюсона):

$$\lg U = \lg U_0 - K_r T,$$

где K_r – коэффициент задержки; U – подвижность макромолекул в геле; U_0 – подвижность макромолекул в свободном растворе; T – плотность геля (концентрация мономеров).

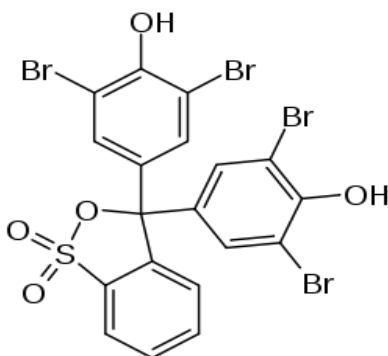
Электрофорез белков в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия

Электрофоретическая подвижность каждого белка зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации, а также от жесткости упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно меняться в зависимости от условий электрофореза. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белков надо исключить влияние всех остальных.

Одним из наиболее популярных методов является электрофорез в ПААГ с использованием додецилсульфата натрия (ДСН), который позволяет фракционировать белки в зависимости от значения только одного параметра – их молекулярной массы.

Основной принцип метода – снижение влияния заряда макромолекулы на ее электрофоретическую подвижность. В этом случае должна наблюдаться пропорциональность между молекулярной массой макромолекулы и ее сопротивлением трения (коэффициентом задержки). Для этого белки обрабатывают избытком ДСН, который примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДСН с 1 мг белка. Избыток остатков сульфокислоты делает несущественным собственный заряд белка, а постоянство соотношения детергент/белок делает практически одинаковым отношение отрицательного заряда к массе для любого белка. Кроме того, при обработке белка ДСН полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жесткого эллипсоида вращения, размер большой оси вращения которого линейно связан с числом аминокислотных остатков, а следовательно, с молекулярной массой белка.

Для наблюдения за ходом электрофореза в исходный препарат вносят краситель, мигрирующий в том же направлении, что и фракционируемые белки. Скорость продвижения красителя по гелю должна быть больше, чем у наиболее быстро мигрирующего белка. Наибольшее распространение получил краситель бромфеноловый синий:



Бромфеноловый синий

Электрофоретическую подвижность жесткого комплекса белок–ДСН принято выражать в значениях величины R_f . Величина R_f равна отношению расстояния, пройденного полосой макромолекулы, от начала рабочего геля к аналогичному расстоянию до полосы красителя в этом геле.

Одновременно с фракционированием исследуемой смеси необходимо провести электрофорез набора белков-«маркеров», молекулярные массы которых точно известны. По окончании фореза, из-

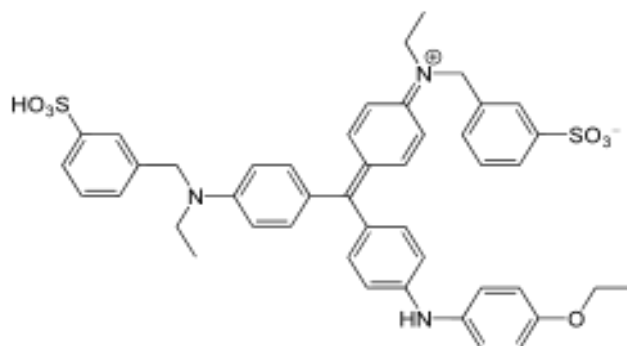
мерив пути миграции лидирующего красителя (бромфенолового синего) и каждого из маркеров, можно рассчитать значения R_f и, зная молекулярные массы маркеров, построить экспериментальную зависимость $\lg M_m$ от R_f . Если пористость геля выбрана удачно, то такая зависимость будет линейной. После определения значения R_f в исследуемом белке из графика можно найти для этого белка величину $\lg M_m$ и рассчитать M_m .

При данной пористости (концентрации) геля описанная выше линейная зависимость имеет место только для белков, молекулярные массы которых лежат в определенном интервале. Для ориентировки можно назвать примерное значение концентрации акриламида (T) в зависимости от молекулярной массы белков:

$T, \%$	5	10	15
$M_m, \text{кДа}$	18–330	10–100	10–60

Локализацию белковых зон после их разделения электрофорезом в ПААГ можно обнаружить в большинстве случаев путем их окрашивания в геле. Зоны проявляются как окрашенные полосы или пятна различной интенсивности в зависимости от содержания в них белка. Для окраски гель вымачивают в растворе красителя, который диффундирует внутрь него и прочно связывается с белками. Процесс диффузии, как правило, занимает несколько часов. Во избежание размывания полос за это время белки иногда предварительно фиксируются при осаждении. Для этого гель сначала вымачивают в 10 %-й или 50 %-й трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Чаще фиксацию совмещают с окрашиванием, используя раствор красителя в смеси уксусной кислоты и этанола или в ТХУ.

В качестве красителя часто используют кумасси ярко-голубой (*Coomassie brilliant blue*, сокращенно СВВ):



CBB R-250

Этот краситель дает лучшую чувствительность и линейную зависимость интенсивности окраски от концентрации белка в более широком ее диапазоне. Краситель выпускают в двух модификациях: R-250 и G-250. Фирма BDH выпускает эти красители под названиями PAGE blue 83 и PAGE blue G-90, соответственно.

Для окрашивания геля применяют, например, 0,25 %-й раствор СВВ R-250 в 9 %-й уксусной кислоте, содержащей 45 % этанола. Гель выдерживают в растворе красителя в течение нескольких часов при комнатной температуре, а затем отмывают в 75 %-й уксусной кислоте. Одновременно с окрашиванием происходит фиксация белков.

Чувствительность метода при окрашивании СВВ R-250 составляет 10 мкг белка. На порядок более высокую чувствительность окраски можно получить с помощью красителя СВВ G-250.

На рис. 10 показан пример результатов ЭФ разделения в ПААГ белков из семян канавалии (*Canavalia ensiformis*), (Follmer et al., 2001; <http://www.biochemj.org/bj/360/0217/bj3600217.htm>).

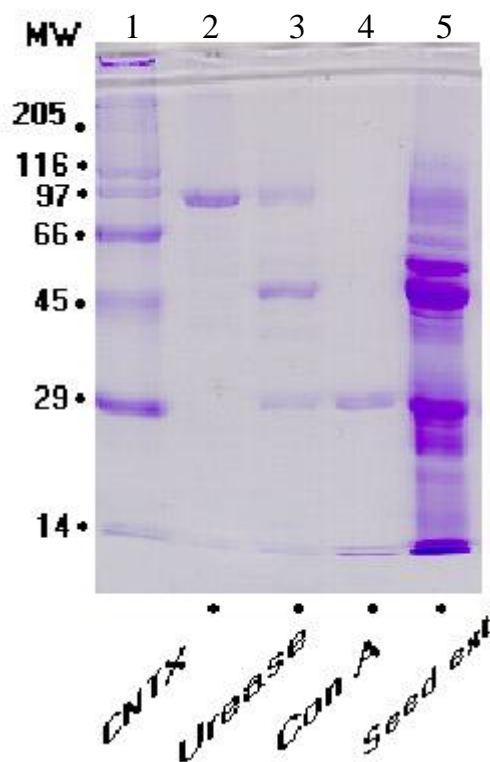


Рис. 10. Электрофореграмма белков из семян канавалии:
 1 – разделение набора белков-маркеров с известной молекулярной массой (MW);
 2 – канатоксин (CNTX); 3 – уреаза (Urease); 4 – конкавалин А (Con A);
 5 – смесь белков экстракта семян (Seed ext)

Чувствительность определения белков многократно увеличивается при использовании флуоресцентных красителей. Многие из них связываются с белками или пептидами, в основном, по концевым аминокетуппам. Их также можно использовать для наблюдения за ходом электрофореза после предварительной обработки исходного препарата.

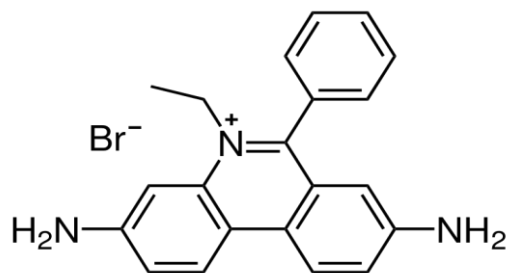
Гель-электрофорез ДНК

Молекулы ДНК отрицательно заряжены, поэтому в электрическом поле они движутся от отрицательного полюса к положительному, сворачиваясь в глобулы. В свободном растворе электрофоретическая подвижность глобул не зависит от их молекулярного веса. Однако в среде геля, состоящей из пор, молекулы ДНК разного размера тратят разное время на преодоление пор, так что скорость их миграции сквозь гель (при напряженности поля, не превышающей 5 В/см) становится обратно пропорциональной логарифму числа нуклеотидных пар в ДНК.

В качестве гельобразующего вещества используют линейный полимер – агарозу или полиакриламид. Агарозные гели готовят путем растворения агарозы в подходящем буфере. Чем выше концентрация агарозы, тем мельче поры геля и тем медленнее движутся сквозь гель молекулы ДНК определенного размера. Более высокая концентрация гелей (1,5 %) агарозы способствует разделению коротких фрагментов ДНК, в свою очередь, низкая концентрация (0,7 %) позволяет разделять длинные фрагменты ДНК. Процесс разделения фрагментов ДНК весьма чувствителен: фрагменты длиной до 500 полинуклеотидов (ПН) разделяются, даже если они отличаются всего на 1,0 нуклеотид. Это позволяет, используя гели различной концентрации, разделять молекулы ДНК в широком диапазоне их размеров, вплоть до 50 тысяч ПН. Процесс разделения прекращается, когда размер глобул превышает максимально возможный размер пор.

Для электрофореза двунитевых молекул ДНК используют обычно 50 мМ трис-боратный буфер (ТВЕ) рН 7,5–7,8.

Для выявления ДНК в препараты добавляют этидиум бромид – химическое вещество из группы фенантридинов (3,8-диамино-6-этил-5-фенилфенантридиумбромид), флуоресцирующее при облучении УФ-светом:



Структурная формула этидиум бромида

Этидиум бромид является интеркалирующим агентом, т. е. веществом, способным встраиваться между основаниями ДНК; его интеркаляция сопровождается раскручиванием суперспирализованных участков ДНК. Этидиум бромид позволяет выявлять до 0,05 мкг двунитевых ДНК в одной зоне.

Оценку размеров ДНК в зонах производят, опираясь на данные о размерах фрагментов (рестриктов) секвенированных молекул ДНК. Как правило, в качестве реперных (маркерных) фрагментов известной длины используют рестрикты ДНК фага X, для которых предназначают одну из дорожек гелевой пластинки. Они позволяют определять размеры рестриктов изучаемой ДНК. Кроме того, зная концентрацию реперной ДНК, можно по степени интенсивности зон сделать оценку количества ДНК в изучаемых препаратах.

Гель-электрофорез используют не только для аналитических, но и для препаративных целей. Известно, что связывание белка с фрагментом ДНК уменьшает его электрофоретическую подвижность, позволяя таким методом изучать особенности взаимодействия белок–ДНК.

Виртуальную лабораторную работу «Электрофорез» можно посмотреть:

1) на WEB-сайте DNA Learning Center, код доступа: <http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>

2) Greg Petersen· 45 видео «Gel loading and electrophoresis» («Приготовление геля и электрофорез») код доступа:

3) <http://www.youtube.com/watch?v=Wwgs-FjvWlw&NR=1>
 Gel_Electrophoreis_Lab_Activity_CAES_UGA.ppt
www.gaaged.org/.../Gel_Electrophoreis_Lab. -

3.4. Центрифугирование

Выпавший осадок вещества, например белка, можно отделить от раствора центрифугированием. Для этого пользуются центрифугами. Частицы осажденного вещества под действием центробежной силы оседают на дне центрифужных стаканов и сжимаются в плотный осадок, с которого оставшийся раствор (надосадочная жидкость, или супернатант) легко сливается или отсасывается.

Скоростные центрифуги (ультрацентрифуги) создают центробежное ускорение порядка $10^5 g$ (т. е. 10^5 ускорений свободного падения), что позволяет осаждать даже некоторые крупные надмолекулярные агрегаты – рибосомы и вирусы.

Скорость осаждения осадка (скорость седиментации) прямо пропорционально зависит от центробежного ускорения (G), угловой скорости вращения ротора (ω , в рад/с^{-1}) и расстояния между частицей и осью вращения (r , в см):

$$G = \omega^2 r. \quad (8)$$

Поскольку один оборот ротора составляет 2π радиан, то угловую скорость ротора, выраженную в оборотах (мин^{-1}), можно записать так:

$$\omega = (2 \pi \text{ об/мин}) : 60, \quad (9)$$

а центробежное ускорение будет равно

$$G = 4\pi^2 (\text{об/мин})^2 r : 3600. \quad (10)$$

Для сравнения условий центрифугирования на разных центрифугах принято указывать относительное центробежное ускорение (ОЦУ), выраженное в единицах g (гравитационная постоянная, равная 980 см/с):

$$\text{ОЦУ} = 4\pi^2 (\text{об/мин})^2 r / (3600 \cdot 980) = 1,11 \cdot 10^{-5} (\text{об/мин})^2 r. \quad (11)$$

Для перевода значений ОЦУ в величины скорости вращения ротора в об/мин пользуются специальными таблицами или номограммой (рис. 11), составленной Доулом и Котциасом по уравнению (11).

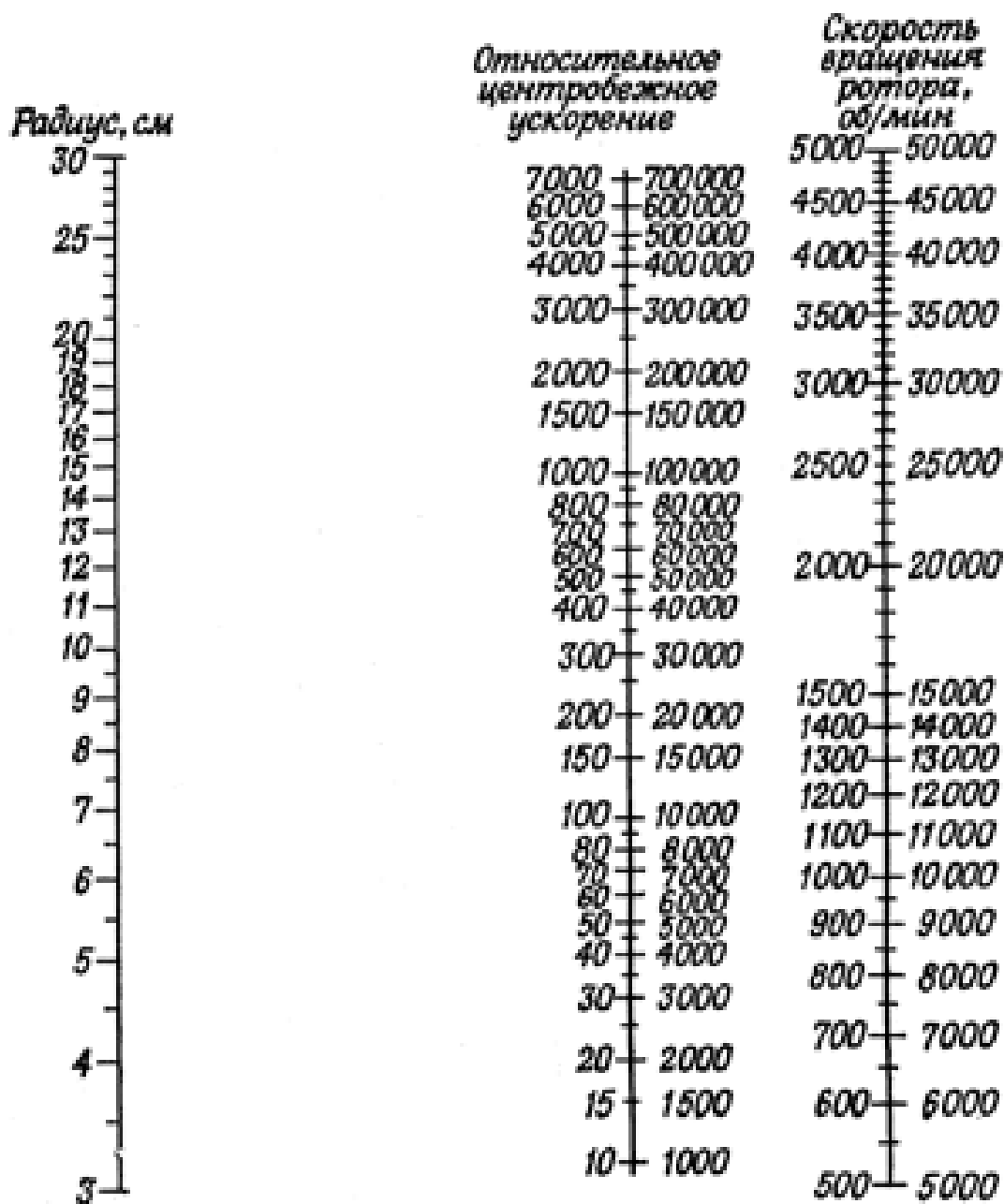


Рис. 11. Номограмма для расчета величины центробежного ускорения g по радиусу и скорости (об/мин) вращения ротора

При пользовании номограммой для определения величины g значения радиуса и скорости вращения ротора на крайних шкалах соединяют прямой линией; точка пересечения этой прямой со средней шкалой даёт искомую величину центробежного ускорения. Правая колонка шкалы ОЦУ соответствует правой колонке цифр скорости вращения ротора, левая – левой.

Центрифугирование можно разделить на препаративное и аналитическое. Препаративное центрифугирование – на низко- (до 20 000 g) и высокоскоростное (свыше 20 000 g). Центрифугирование при скоростях до 2000 g можно проводить в стеклянных пробирках, при более высоких значениях g применяют пробирки из синтетических материалов (полиэтилена, поликарбоната и др.). Основные параметры наиболее часто используемых центрифуг можно найти в справочниках и каталогах фирм производителей центрифуг.

3.5. Хроматографические методы

Хроматография (от древнегреческого χρῶμα – цвет) – это метод разделения смесей веществ и изучения их физико-химических свойств (анализа). Название метода связано с первыми экспериментами по хроматографии, в ходе которых разработчик метода Михаил Семенович Цвет разделял ярко окрашенные растительные пигменты. Первое сообщение о разработке метода хроматографии было сделано М.С. Цветом 30 декабря 1901 г. на XI Съезде естествоиспытателей и врачей в Санкт-Петербурге. Первая печатная работа по хроматографии была опубликована в 1903 г., в журнале *Труды Варшавского общества естествоиспытателей*. Впервые термин *хроматография* появился в двух печатных работах М.С. Цвета в 1906 г., опубликованных в немецком журнале *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*.

Метод основан на распределении веществ между двумя фазами – *неподвижной* и *подвижной*. *Неподвижной* (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют *сорбентом*) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. *Подвижная* фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением. Компоненты анализируемой смеси (*сорбаты*) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль фазы стационарной. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую *колонокой*. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей

степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки. Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов.

Хроматограмма, являющаяся зависимостью сигнала прибора (ось ординат) от времени или объема подвижной фазы (ось абсцисс), представляет собой совокупность пиков разделяемых компонентов. Типичная хроматограмма приведена на рис. 12.

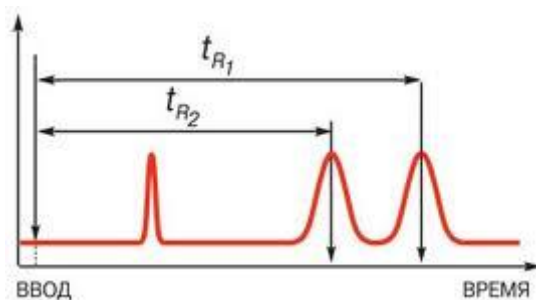


Рис. 12. Хроматографическое разделение смеси веществ
[<http://www.nkj.ru/archive/articles/16710/>]

Время от момента ввода анализируемой пробы в хроматографическую колонку до момента регистрации максимума пика называется **временем удерживания** и обозначается t_R . Значение t_R не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но обусловлено природой вещества (t_{R1} , t_{R2}), типом сорбента, упаковкой сорбента и может меняться от колонки к колонке. По полученной хроматограмме смеси можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров.

На рис. 13 показана стеклянная колонка, снабженная внизу краном для регулирования скорости процесса, которая набита твердой фазой (белого цвета), резервуар сверху наполнен жидким элюентом, в верхней части твердой фазы нанесен образец (желтого цвета) [<http://ru.wikipedia.org/wiki>].

3.5.1. Основные термины

Основные термины и понятия, относящиеся к хроматографии, а также области их применения, были систематизированы и унифицированы специальной комиссией ИЮПАК.

Детектор – устройство для регистрации концентрации компонентов смеси на выходе из колонки.

Колонка – установка, содержащая хроматографический сорбент, выполняющий функцию разделения смеси на индивидуальные компоненты.

Неподвижная фаза – твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе. Твердую основу неподвижной фазы называют матрицей.

Хроматограф – прибор для проведения хроматографии.

Хроматограмма – результат регистрирования зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени удерживания.

Хроматография – наука о межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз, а также метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

Элюент – подвижная фаза: газ или жидкость. В зависимости от агрегатного состояния элюента различают «жидкостную» и «газовую» хроматографию.



Рис. 13.
Установка для ручной колоночной хроматографии

3.5.2. Классификация видов хроматографии

Многочисленные хроматографические методы классифицируются по агрегатному состоянию фаз, механизму разделения и технике проведения разделения.

Адсорбционная хроматография – вид хроматографии, при которой разделение веществ, входящих в смесь и движущихся в потоке подвижной фазы, происходит за счёт их различной спо-

способности адсорбироваться и десорбироваться на адсорбенте с развитой поверхностью, например, силикагеля. Процесс взаимодействия может сопровождаться химическим взаимодействием примесей с неподвижной фазой, т. е. хемосорбцией.

Распределительная хроматография – метод, при котором неподвижная (стационарная) фаза химически связана с поверхностью неподвижного носителя. Подвижной фазой является жидкость, которая служит растворителем, или газ (газовая хроматография). Разделение происходит за счёт различия в полярности разделяемых веществ.

Ионообменная хроматография позволяет разделить молекулы, основываясь на ион-ионных взаимодействиях. Неподвижная (стационарная) фаза имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда. Этот вариант хроматографии классифицируется на два типа – *анионную* и *катионную*.

Анионная ионообменная хроматография задерживает отрицательно заряженные анионы, так как неподвижная фаза имеет положительно заряженные функциональные группы, например, аммонийные $^+N(R)_4$.

Катионная ионообменная хроматография задерживает положительно заряженные катионы, так как неподвижная фаза имеет отрицательно заряженные функциональные группы, например, фосфат (PO_4^{3-}).

Гель-хроматография (гель-фильтрация), или эксклюзионная хроматография, – разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающими в поры. При гель-фильтрации стационарная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует.

Аффинная хроматография (от лат. *affinis* – родственный; биоспецифичная хроматография, хроматография по сродству) – метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем. В качестве лигандов используют соединения, взаимо-

действие которых с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних. Так, при разделении ферментов (для чего преимущественно и применяется аффинная хроматография) лигандами служат их субстраты, ингибиторы, коферменты.

Главная особенность, которая обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии, в том, что разделение фермента основано на различии не физико-химических признаков молекулы (заряда, формы и размера), а на специфических функциональных свойствах, отличающих данный фермент.

Неподвижная фаза в аффинной хроматографии представляет собой специально получаемый сорбент, построенный обычно по схеме носитель – соединяющее звено ("ножка") – специфичный лиганд. Носителем служит чаще всего сефароза – производное агарозы, имеющее поперечные сшивки.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, англ. *HPLC, High performance liquid chromatography*) – один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, широко применяемый как в аналитической химии, так и в химической технологии.

Основой хроматографического разделения является участие компонентов разделяемой смеси в сложной системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (преимущественно межмолекулярных) на границе раздела фаз. Как способ анализа ВЭЖХ входит в состав группы методов, которая, ввиду сложности исследуемых объектов, включает предварительное разделение исходной сложной смеси на относительно простые. Полученные простые смеси анализируются затем обычными физико-химическими или специальными методами, созданными для хроматографии.

Принцип жидкостной хроматографии состоит в разделении компонентов смеси, основанном на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна (элюент).

Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (1,8–5 мкм). Это позволяет эффективно разделять сложные смеси веществ при среднем времени анализа 3–30 мин.

Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, биотехнология, медицина, пище-

вая промышленность, охрана окружающей среды, производство лекарственных препаратов и во многих других.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную и др.

Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное – распределительными, и наоборот. При этом чем большее различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, молекулярной массе, поляризуемости и другим параметрам, тем большая вероятность проявления другого механизма разделения для таких веществ.

В качестве матриц в ВЭЖХ используются неорганические соединения, такие как оксид кремния (силикагель) или оксид алюминия, либо органические полимеры, такие как полистирол (сшитый дивинилбензолом) или полиметакрилат. Силикагель в настоящее время общепризнан.

3.6. Подготовка образцов растительных и животных тканей для биохимических исследований

Процесс разрушения биологических объектов (органы и ткани животных, микроорганизмы, растения) и высвобождение клеточного содержимого называют *гомогенизацией* биологического материала, а полученную суспензию – *гомогенатом*.

Для дезинтеграции тканей применяют разнообразные методы и приборы, однако тщательное измельчение до гомогенного состояния представляет собой скорее искусство, чем науку, так как не поддается стандартизации. Ткани и клетки различных органов отличаются по составу, хрупкости и плотности. При гомогенизации разного рода биологических тканей возникает множество частных проблем, которые разрешаются, в основном, путем проб и ошибок. Достаточную воспроизводимость результатов можно получить лишь при тщательном контроле таких параметров, как температура, продолжительность и скорость разрушения клеток, а также применяемое рабочее давление.

В большинстве случаев разрушение клеток сопровождается выделением тепла. Известно, что при высоких температурах многие

ферменты инактивируются, поэтому все процедуры по разрушению клеток следует проводить, охлаждая клеточные суспензии с помощью льда. Следует учитывать, что некоторые ферменты неустойчивы к холоду и при охлаждении также теряют свою активность.

3.6.1. Способы разрушения тканей и клеток

Для разрушения клеток чаще всего применяют физические методы. Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок. Разрушение клеток производится путем их растирания с твердыми материалами или гидродинамическим разрушением в жидких средах.

Растирание клеток с твердыми материалами. Ткань разрушают растиранием с песком или абразивным порошком в ступке при помощи пестика. В настоящее время метод используют для разрушения растительных и бактериальных клеток. Желательно, чтобы абразивные частицы были как можно более острыми и имели такой же размер, что и разрушаемые клетки. Недостаток метода заключается в том, что при разрушении клеток может нарушаться структура наиболее крупных органелл, таких, например, как хлоропласты.

Клетки бактерий можно разрушать также и путем механического встряхивания микробных суспензий с абразивным порошком с частотой колебаний 300–3000 в мин при помощи встряхивателя Микля, в который добавляются мелкие стеклянные бусинки диаметром от 50 до 500 мкм. Однако возникающая при встряхивании сильная вибрация часто вызывает разрушение клеточных органелл.

Разрушение клеток в жидких средах. Разрушение клеток, находящихся в суспензии, происходит либо при вращении лопастей или поршня (блендеры), либо при поступательном движении поршня или шаров (гомогенизаторов) вверх и вниз.

Блендеры, как правило, имеют режущие лопасти, вращающиеся с большой скоростью. Суспензию клеток помещают в специальный стакан, который имеет по всей высоте раструбы и в поперечном сечении выглядит как клеверный лист. Для поддержания низкой температуры в процессе гомогенизации стакан помещают в лед. Метод достаточно универсален и широко применяется для фракционирования клеток.

Большинство гомогенизаторов представляют собой прибор, состоящий из пестика с ручным (гомогенизаторы Даунса и Тёнбрэка) или механическим (гомогенизатор Поттера–Эльвегёйма) приводом, который вращается или движется вверх и вниз в стеклянном цилиндрическом сосуде. Скорость разрушения клеток зависит не только от скорости вращения пестика, но и от соотношения между радиусами пестика и сосуда: чем меньше расстояние между этими поверхностями, тем выше градиент скорости. Возникающие при высоких скоростях силы достаточны для разрушения довольно тонких мембран животных клеток; растительные и бактериальные клетки при этом не разрушаются.

Эффективность гомогенизации в значительной степени зависит от наличия в измельчаемом материале сосудистой и соединительной ткани, которую следует предварительно удалять как можно более тщательно.

Разрушение с помощью ультразвука. Клетки можно разрушить также с помощью высокочастотных ультразвуковых колебаний. Механизм такого разрушения окончательно не выяснен, однако установлено, что при обработке клеточных суспензий ультразвуком в среде создается высокочастотное изменение давления. Основным недостатком данного метода является то, что в процессе обработки ультразвуком выделяется значительное количество тепла. Чтобы избежать разогревания, сосуд с суспензией помещают в лед. Конструкция сосуда такова, что жидкость непрерывно циркулирует и охлаждается у стенок. Некоторые сосуды помещают в холодильные камеры, однако далеко не всегда удается устранить местное нагревание.

Другие методы дезинтеграции клеток. К ним относятся: разрушение клеток методом осмотического шока; переваривание клеточных стенок ферментами, например лизоцимом, и сложными ферментными препаратами, выделенными из улиток и содержащими ферменты целлюлазу, хитиназу и липазу. Для разрушения клеток некоторых видов успешно применяют замораживание и оттаивание, обработку органическими растворителями, такими как этилацетат и толуол.

Для разрушения микробных клеток используют высокое давление (до $10 \cdot 10^7$ Па), которое создается френч-прессом, сделанным из нержавеющей стали.

3.6.2. Выбор среды суспендирования

Объективных критериев для выбора той или иной среды суспендирования при гомогенизации не существует. Некоторые рекомендации можно почерпнуть из литературы, однако окончательный выбор всегда зависит от результатов предварительных опытов с применением различных сред.

Обычно для создания в среде необходимого осмотического давления, предохраняющего частицы от набухания и разрыва, применяют сахарозу. Если сахароза затрудняет исследование свойств ферментов, ее заменяют маннитом. Существует целый ряд индивидуальных прописей по сохранению целостности частиц и защите ферментов от инактивации. Рекомендуемые растворы различаются по концентрации сахарозы или присутствию таких веществ, как ЭДТА, глутатион, β -меркаптоэтанол и т. д. Иногда вместо солевых растворов используют неионные среды: так, например, в гомогенатах печени солевые растворы вызывают агглютинацию полиморфно-ядерных лейкоцитов и органелл. При работе с гомогенатами селезенки, наоборот, сахароза (0,25 М) обладает более выраженным агглютинирующим действием, чем КС1 (0,2 М).

Чтобы выделить ядра и хромосомы, используют лимонную кислоту, которая обладает способностью подавлять активность нейтральных дезоксирибонуклеаз.

В целях выделения ядер применяют растворы глицерина и этиленгликоля, а для выделения пластид из клеток растений – полимеры этиленгликоля. Хлоропласты обычно выделяют в средах, содержащих не сахарозу, а маннит и сорбит.

Анализ ферментов в растительных экстрактах иногда значительно усложняется в силу того, что в процессе гомогенизации выделяется большое количество фенолов, которые образуют водородные связи с карбонильными группами, участвующими в образовании пептидных связей белков, что, по-видимому, вызывает инактивацию многих ферментов. Во избежание этого к экстрактам добавляют поливинилпирролидон, образующий с фенолами нерастворимый комплекс, который затем удаляют из экстракта фильтрованием.

Гомогенизаторы предназначены для гомогенизации и диспергирования веществ и их смесей в различных технологиях, а именно:

- гомогенизация клеток и клеточных культур;
- гомогенизация макромолекул (ДНК, РНК, белки);
- измельчение вещества;
- гомогенизация вещества (получение однородной смеси);
- получение эмульсий и суспензий;
- подготовка образцов для анализа;
- ультразвуковая чистка.

Так, например, прибор Potter S (рис. 14) предназначен для быстрой и деликатной гомогенизации клеток и ткани, а гомогенизатор, представленный на рис. 15, используется для гомогенизации твердых и замороженных образцов Mikro-Dismembrator U. С помощью такой шаровой мельницы измельчаются семена растений, пигменты, волосы, ногти, кости, хрящи, замороженные ткани и клетки, минералы.



Рис. 14. Potter S



Рис. 15. Шаровая мельница

Основные области применения гомогенизаторов:

- биология; микробиология;
- молекулярная биология;
- биохимия; химия;
- токсикология;
- анализ окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические основы экспериментальной работы в биохимической лаборатории: Учеб.-метод. пособие / Г.П. Диде, Н.Д. Ещенко, И.Е. Красовская, Т.В. Гришина. – СПб., СПбГУ, 2008. – 102 с.
2. Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие / Е.В. Романовская, Т.В. Гришина, И.Е. Красовская и др.; Под ред. Е.В. Романовской, Н.Д. Ещенко. – СПб.: СПбГУ, 2010. – 194 с.
3. **Рабинович В.А., Хавин З.Я.** Краткий химический справочник: Справ. изд. / Под ред. А.А. Потехина и А.И. Ефимова. – 4-е изд., стер. – СПб.: Химия, 1994. – 432 с.
4. Справочник биохимика: Пер. с англ./ Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
5. **Отто М.** Современные методы аналитической химии. 3-е изд. – М.: Техносфера, 2008. – 544 с.
6. "Практическая молекулярная Биология" <http://molbiol.edu.ru>
7. **Остерман Л.А.** Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. – М., 1981. – 286 с.
8. Фотометрические методы анализа
<http://lib.rushkolnik.ru/text/1149/index-1.html?page=6>
9. Follmer et al., Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity, *Biochem. J.* (2001) 360 (217–224) <http://www.biochemj.org/bj/360/0217/bj3600217.htm>);
10. Agarose Gel Electrophoresis of DNA
<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>
11. Приготовление растворов заданной концентрации
http://chem-bsu.narod.ru/umk_chem_webCD/lwork/lr6.htm
12. Техника работы в химической лаборатории
http://ftl.ru/Chem%20block_tehnika-raboti.html
13. Принципы биохимических исследований
<[ahref=http://revolution.allbest.ru/biology/00110445_0.html](http://revolution.allbest.ru/biology/00110445_0.html)>
14. <http://libertydoc.net/books/b.uilyams>
metody_prakticheskoi_biohimii_1.10.1._prigotovleniegomogenatov_tkane_i_kletok

15. <http://www.xumuk.ru/biologhim/005.html>

16. **Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В.** Хроматографические методы анализа: Метод. пособие для спецкурса. – М.: Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2007. Код доступа:

<http://www.chem.msu.su/rus/teaching/analyt/chrom/part1.pdf>

17. Электрофорез белков и пептидов в полиакриламидном геле. Методическая разработка, МГУ-2007, Код доступа <http://old.bioeng.ru>

18. Электрофорез белков http://molbiol.edu.ru/protocol/17_01.html

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ	4
1.1. Правила техники безопасности при работе со стеклянной посудой.....	4
1.2. Правила техники безопасности при работе с нагревательными приборами	5
1.3. Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами	5
1.4. Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами	6
1.5. Правила техники безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями	7
1.6. Первая медицинская помощь	8
2. ПРАВИЛА ПОДГОТОВКИ И ОФОРМЛЕНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ.....	9
2.1. Форма протокола лабораторных работ	9
2.2. Порядок подготовки к выполнению лабораторной работы.....	10
2.3. Порядок оформления экспериментальных результатов.....	10
2.4. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	13
2.4.1. Проверка однородности выборки. Исключение выпадающих значений	13
2.4.2. Определение величины доверительного интервала	14
2.4.3. Абсолютная и относительная погрешность измерений.....	16
3. МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	16
3.1. Приготовление растворов заданной концентрации	16
3.2. Кислотность растворов: способы оценки и поддержания	22
3.2.1. Количественный показатель кислотности – рН раствора.....	22
3.2.2. Определение значения рН с помощью индикаторов.....	24
3.2.3. Измерение рН с помощью рН-метра.....	25
3.2.4. Кислотно-основное титрование.....	26
3.2.5. Буферные растворы.....	29
3.3. Инструментальные методы анализа	31
3.3.1. Колориметрия и спектрофотометрия	31
3.3.2. Рефрактометрия	38
3.3.3. Электрофорез.....	40
3.4. Центрифугирование	51

3.5. Хроматографические методы.....	53
3.5.1. Основные термины.....	54
3.5.2. Классификация видов хроматографии.....	55
3.6. Подготовка образцов растительных и животных тканей для биохимических исследований.....	58
3.6.1. Способы разрушения тканей и клеток.....	59
3.6.2. Выбор среды суспендирования.....	61
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	64

Шлейкин Александр Герасимович
Скворцова Наталья Николаевна
Бландов Александр Николаевич

БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Часть 1. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ

Учебное пособие

Ответственный редактор

Т.Г. Смирнова

Редактор

Р.А. Сафарова

Компьютерная верстка

Н.В. Гуральник

Дизайн обложки

Н.А. Потехина

Подписано в печать 05.10.2015. Формат 60×84 1/16

Усл. печ. л. 4,19. Печ. л. 4,5. Уч.-изд. л. 4,25

Тираж 100 экз. Заказ № С 58

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

