

ЗАНЯТИЕ № 1

ТЕМА: ВВЕДЕНИЕ В БИОЛОГИЧЕСКУЮ ХИМИЮ. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В РАСТВОРЕ

Цель: Повторить знания по биоорганической химии, необходимые для изучения биологической химии. Получить представление о методах биологической химии. Определить количество белка в сыворотке крови, используя клинические методы.

Биологическая химия – наука, изучающая строение, свойства и превращения молекул, входящих в состав живых организмов. Изучение основано на знаниях основных свойств природных органических веществ, поступающих с пищей, образующихся в процессе метаболизма живого организма и используемых для построения биополимеров. Инструментами биологической химии является набор определенных методов, как специфических, так и заимствованных из смежных специальностей. Основными характеристиками биологических методов исследования являются точность, специфичность, воспроизводимость и чувствительность, а также скорость и простота исполнения. Выбор метода определяется поставленными задачами, так, иногда исследователю подходит простой и легкий в исполнении, хотя и малочувствительный метод.

Почти для любого биохимического исследования необходимо измерение в биологическом материале концентрации белка. В клинической практике и научно-исследовательской медицинской работе проводят измерение концентрации белка в крови, моче, спинномозговой жидкости, слюне и экссудатах. Так, в норме содержание белков в сыворотке крови составляет 65–85 г/л. Повышение содержания белков в сыворотке крови называется гиперпротеинемией, а понижение – гипопроотеинемией. Причиной развития гипопроотеинемии может служить снижение процесса биосинтеза белков в печени, голодание или потери белка организмом. Причиной развития гиперпротеинемии может стать сгущение крови из-за потери жидкости, усиленный синтез иммуноглобулинов при инфекционных заболеваниях, появление патологических белков.

Существует несколько методов количественного определения белка, основанных на физико-химических свойствах белков (рефрактометрический и электрофоретический) и на способности белков образовывать окрашенные продукты с различными реагентами (биуретовый и многие другие). Эти методы отличаются по точности, чувствительности и скорости исполнения.

ВОПРОСЫ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ НА ЗАНЯТИИ:

1. Инструктаж по технике безопасности.
2. Введение в биологическую химию.
3. Классификация аминокислот. Строение пептидов.

4. Методы, используемые в биологической химии. Методы выделения и очистки белков. Хроматографические и электрофоретические методы.
5. Методы количественного определения белка в растворе. Принцип методов, техника выполнения, преимущества и недостатки.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Опыт № 1: Количественное определение общего белка сыворотки крови рефрактометрическим методом.

Принцип метода. Метод основан на изменении коэффициента рефракции (преломления) раствора в зависимости от концентрации растворенного в нем вещества.

Техника выполнения. На промытую дистиллированной водой и насухо протертую марлевой салфеткой призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды для проверки нулевой точки прибора. Закрыв камеру, добиваются хорошей освещенности поля зрения рефрактометра при помощи зеркала. Пользуясь рычагом прибора, совмещают границу светотени с точкой перекреста двух линий. Снимают отсчет показателя преломления. Для воды он равен 1,333. Удалив воду, на призму наносят каплю исследуемой сыворотки. Определив ее коэффициент преломления, по таблице находят содержание белка в г/л.

Показатель преломления	1,344	1,345	1,346	1,347	1,348	1,349	1,350	1,351
Концентрация белка в г/л	48,9	55,0	61,1	67,7	71,2	77,2	88,2	87,7

Опыт № 2: Количественное определение общего белка сыворотки крови биуретовым методом.

Принцип метода. Метод основан на способности белка давать с раствором CuSO_4 в щелочной среде фиолетовое окрашивание за счет пептидных связей, интенсивность которого пропорциональна концентрации белка (количеству пептидных групп).

Техника выполнения. В пробирки вносят реактивы по следующей схеме:

Компоненты	Контроль, мл	Эталон, мл	Опытная проба, мл
Сыворотка (задача)	–	–	0,1
Стандартный раствор белка (60 г/л)	–	0,1	–
Дистиллированная вода	0,1	–	–
Биуретовый реактив	5,0	5,0	5,0

Содержимое пробирок тщательно перемешивают, избегая образования пены, выдерживают при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 30 минут и определяют оптическую плотность при длине волны 540 нм (500-560 нм, зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы. Окраска стабильна в течение 1 часа. Расчет содержания белка производят по формуле:

$$C = A_{оп}/A_{эт} \times 60,$$

- где C – содержание белка в опытной пробе, г/л;
 $A_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;
 $A_{эт}$ – оптическая плотность эталона;
 60 – содержание белка в калибровочном растворе, г/л.

Опыт № 3: Электрофорез белков сыворотки крови на бумаге и в полиакриламидном геле (демонстрация).

Электрофорез—это движение заряженных частиц в растворе под влиянием внешнего электрического поля. Существует несколько разновидностей электрофоретического метода разделения белков:

- электрофорез в жидкой среде;
- электрофорез в блоках (крахмальном, агарозном, полиакриламидном);
- электрофорез на бумаге.

Наибольшей разрешающей способностью, под которой понимают число выявленных в анализируемом материале белковых фракций, отличается электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Полиакриламидный гель пористый, обладает значительной механической прочностью, однороден по составу, химически инертен. Он дает возможность исследовать белковые растворы разных концентраций в небольших объемах (0,001 мл) и проводить быстрое разделение (в течение 60–70 мин.). Электрофорез в ПААГ сочетает 2 принципа разделения: по электрофоретической подвижности и на основе эффекта молекулярных «сит», т.е. частицы разделяются не только по своим зарядам, но и «просеиваются» через гель в зависимости от размеров молекулы. Электрофорез белков сыворотки крови в ПААГ позволяет выделить в среднем от 10 до 25 фракций, в то время как электрофорез сыворотки крови на бумаге дает только 5 фракций (альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины).

Необходимо нарисовать схему прибора для электрофореза в ПААГ, и кривую, записанную с этой электрофореграммы денситометром.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА

Заполнить таблицу «Методы, применяемые в биологической химии для выделения белков»

Название метода	Принцип	Краткое описание	Оборудование	Применение в клинике
Избирательное осаждение				
Гель-фильтрация				
Электрофорез				
Ионообменная хроматография				
Аффинная хроматография				

ЛИТЕРАТУРА

- Практическая химия белка./Под ред. Дарбре А.– М., 1989
 - Фрайфелдер Д. Физическая биохимия.– М., 1980
-
-