

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Майкопский государственный технологический университет»**

Кафедра морфологии

Дахужева З.Р., Неровных Л.П.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ ПО КУРСУ
«БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ»**
Для студентов специальностей
31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология,
33.05.01. Фармация

Майкоп - 2020

ББК 577.1(07)

УДК 28.707.2

Д 21

Печатается по решению научно-технического совета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Майкопский государственный технологический университет»

Составители:

канд. техн. наук

Дахужева З.Р.

канд. техн. наук

Неровных Л.П.

Рецензент:

канд.хим.наук

Голованова Т.Н.

Учебно-методическое пособие к лабораторному практикуму по курсу «Биологическая химия» для студентов специальностей 31.05.02 Педиатрия, 31.05.01 Лечебное дело, 31.05.03 Стоматология, 33.05.01. Фармация / З.Р. Дахужева, Л.П. Неровных – Майкоп, 2020. - с.76

Лабораторный практикум, состоящий из 10 лабораторных работ. Каждая лабораторная работа включает теоретический материал, описание методик проведения анализов и вопросы для самоконтроля.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работая в лаборатории, необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

Общие сведения

- Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.
- Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение с реактивами

- Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу.
- Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.
- Наливать или насыпать реактивы следует только над столом.
- Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.
- Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой.
- Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, затем собрать песок лопаткой. Облитое место необходимо облить раствором соды и вытереть тряпкой.
- При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами.
- Наполнение пипеток растворами органических растворителей, кислот, щелочей проводят только при помощи груши.
- Внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду.

– Не ходить по лаборатории с концентрированными кислотами, а наливать их только в определенном, отведенном для этого месте.

– Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).

– В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

Обращение с нагревательными приборами

– Перед тем как зажечь спиртовку – убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.).

– Зажигать спиртовку можно только спичкой.

– В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более $1/3$ объема пробирки.

– Пробирку при нагревании нужно направить в сторону от себя и рядом находящихся людей.

– Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.

– Нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки.

– Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней.

– При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении), не приближать лицо к сосуду, в котором нагревается жидкость.

- После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.
- Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.
- При неосторожной работе могут быть ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцевокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

Тема: «Осаждение клеточных структур»

Цель: ознакомиться с методиками для исследования изолированных отделов клетки. Научиться пользоваться приборами.

Теоретическая часть

Выделение клеточных органелл. Разработан ряд методик для исследования изолированных отделов клетки. Для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем **гомогенизируют** в забуференной среде с использованием гомогенизатора Поттера-Элведжема (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном цилиндре). Это сравнительно мягкий метод, который особенно предпочтителен для выделения лабильных молекул и ультраструктур. Другие методики разрушения клеток включают ферментативный лизис, разрушающий клеточные стенки, или механическое разрушение замороженных тканей (размолот или с помощью вращающихся ножей; под большим давлением; осмотическим шоком; многократным чередованием замораживания и оттаивания).

Для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была *изотонической*, т.е. осмотическое давление буфера должно соответствовать давлению внутри клетки. Если раствор гипотоничен, органеллы будут «впитывать» дополнительную воду и лопнут, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются.

Вслед за гомогенизацией следует **фильтрование** через марлю для удаления интактных клеток и соединительных тканей. Собственно фракционирование клеточных органелл проводится с помощью дифференциального центрифугирования, т.е. центрифугирования при различных скоростях вращения ротора. При этом ступенчатое увеличение центробежной силы приводит к последовательному осаждению различных органелл, т.е. их разделению в соответствии с плотностью и размером.

Ядро седиментирует уже при ускорении, достигаемом с помощью настольных центрифуг. Декантирование супернатанта (надосадочной жидкости) и тщательное повторное ресуспендирование осадка дает фракцию, обогащенную клеточными ядрами. Однако эта фракция все еще содержит другие клеточные компоненты в качестве примесей, например, фрагменты цитоскелета.

Частицы меньших размеров и менее плотные, чем ядро, получают при воздействии на супернатант постепенно увеличивающегося ускорения. Эта операция проводится на более мощных центрифугах, таких, как высокоскоростные центрифуги с охлаждением и ультрацентрифуги. Порядок осаждения фракций следующий: митохондрии, затем мембранные пузырьки (везикулы) и рибосомы. Супернатант последнего центрифугирования представляет собой «цитозоль», т.е. растворимые компоненты клетки, перешедшие при гомогенизации ткани в буферный раствор.

Выделение клеточных органелл обычно проводят при низких температурах (0-5°C) для того, чтобы уменьшить степень деградации материала за счет реакций, катализируемых ферментами; последние высвобождаются в процессе разрушения ткани. Добавление тиолов и хелатирующих агентов необходимо для защиты функциональных SH-групп от окисления.

В процессе фракционирования важно контролировать чистоту фракций. Присутствие в определенной фракции той или иной органеллы и наличие других компонентов определяют с помощью **молекул-маркеров**. Обычно это органеллоспецифичные ферменты (**ферменты-маркеры**). Распределение ферментов-маркеров в клетке отражает локализацию в ней соответствующих каталитических реакций.

Основы метода центрифугирования. Частицы в растворе *осаждаются (седиментация)*, когда их плотность выше плотности раствора, или *всплывают (флотация)*, когда их плотность ниже плотности раствора.

Чем больше разница в плотности, тем быстрее идет распределение частиц. Когда плотности частиц и раствора одинаковые (*изопикнические условия*), частицы остаются неподвижными. При малой разнице в плотности частицы можно разделить только в центрифуге, которая создает центробежную силу, во много раз превышающую силу земного притяжения.

Роторы. Возникающая в центрифуге центробежная сила, которая, создается ускорением, обычно выражается числом, кратным ускорению свободного падения g ($g = 9,81 \text{ м/с}^2$). Величины до $10000g$ получают с помощью простой настольной центрифуги, высокоскоростные рефрижераторные центрифуги позволяют достигнуть $50000g$, а ультрацентрифуги, работающие с охлаждением и в вакууме, — $500000g$. Существуют два типа роторов — *угловые* и *свободно подвешенные*, так называемые бакет-роторы. Последние используются обычно в высокоскоростных центрифугах и ультрацентрифугах.

Скорость седиментации частицы (v) зависит от угловой скорости (ω), эффективного радиуса ротора $r_{\text{эфф}}$ (расстояние от оси вращения) и седиментационных свойств частиц.

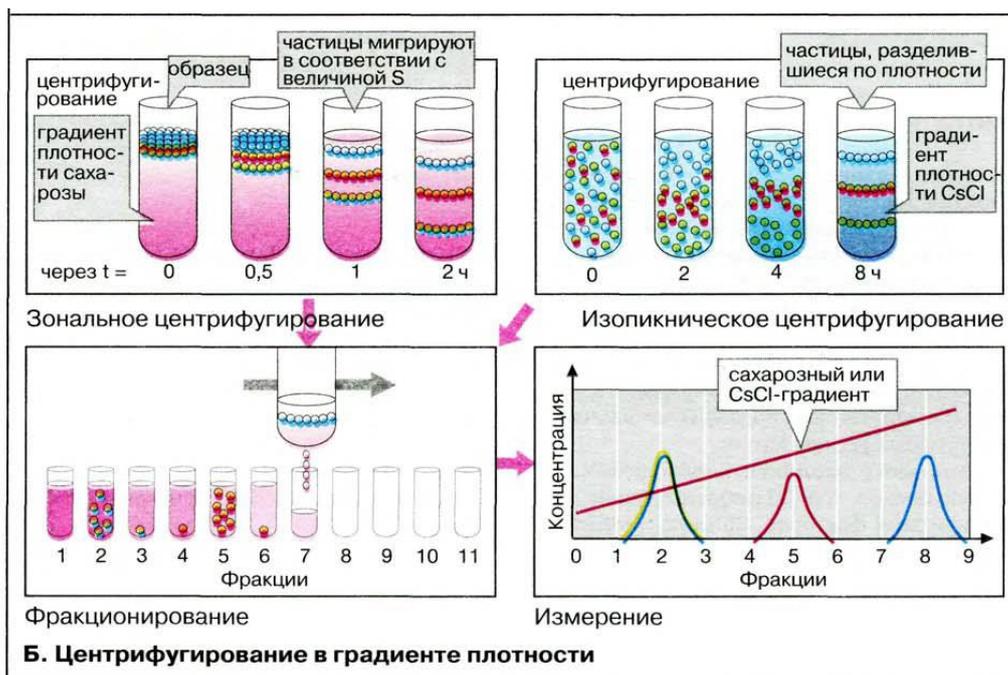
Седиментационные свойства частицы характеризуются **коэффициентом седиментации S** и выражаются в единицах Сведберга ($1S = 10^{-13}\text{с}$). На схеме справа показано соотношение между плотностью и коэффициентом седиментации для различных частиц в растворе хлорида цезия (CsCl). Величина S может колебаться в широких пределах. Для сравнения коэффициентов седиментации в различных средах их обычно корректируют по плотности и вязкости воды при 20°C (S_{20w}).

Коэффициент седиментации зависит от молекулярной массы (M) частицы, ее формы (коэффициент трения f), парциального удельного объема \bar{v} (величина, обратная плотности частицы). Из рисунка видно, что белки, ДНК (DNA) и РНК (RNA) сильно различаются по плотности.

Центрифугирование в градиенте плотности. Макромолекулы или органеллы, незначительно различающиеся по размеру или по плотности, можно разделить центрифугированием в градиенте плотности. Для этих целей используются два метода.

При **зональном центрифугировании** анализируемая проба (например, белки или клетки) наслаивается тонким слоем поверх буферного раствора. В процессе центрифугирования частицы проходят через раствор, так как их плотность выше плотности раствора. Скорость движения зависит от массы и формы частиц (см. формулы на схеме А). Центрифугирование прекращают прежде, чем частицы достигнут дна центрифужной пробирки. Затем дно прокалывают и собирают ряд фракций, содержащих различные частицы. Стабильность градиента плотности в процессе центрифугирования достигается применением растворов углеводов или коллоидного силикагеля, концентрация которых возрастает от поверхности к дну пробирки. Градиент плотности препятствует образованию конвекционных потоков, снижающих качество разделения.

При **изопикническом центрифугировании** пробу (например ДНК, РНК или вирусы) равномерно распределяют во всем объеме раствора (обычно CsCl). В этом случае разделение продолжается значительно дольше, чем при зональном центрифугировании. Градиент плотности создается в процессе центрифугирования за счет седиментации и диффузии. Со временем каждая частица попадает в область, соответствующую ее собственной плавучей плотности. Центрифугирование прекращают, когда устанавливается равновесие. Полученные фракции анализируют, используя подходящую измерительную технику.



Отделить белок от желтка. Добавить к белку 70-100 мл буферного раствора. Затем образец гомогенизируют 2 мин. Отбирают 0,5 мл пробу в эппендорф и центрифугируют 10 мин при скорости 9000 об/мин.

Сделать **вывод** относительно полученных результатов (какие органеллы были седиментированы).

Список литературы:

1. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970433126.html>
2. Биохимия [Электронный ресурс]: учебник / под ред. Е. С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 768 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427866.html>
3. Биологическая химия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / под ред. С.Е. Северина - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.-624 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970430279.html>
4. Биологическая химия. Ситуационные задачи и тесты [Электронный ресурс]: учебное пособие / А. Е. Губарева [и др.]; под ред. А. Е. Губаревой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 528 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970435618.html>
5. Биохимия с упражнениями и задачами [Электронный ресурс]: учебник / Северин Е.С. и др. / под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 384 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970417362.html>
6. Биохимия. Руководство к практическим занятиям [Электронный ресурс]: учебное пособие / Н.Н Чернов и др.; под ред. Н.Н. Чернова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 240 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970412879.html>
7. Клиническая биохимия: учебное пособие / под ред. В.А. Ткачука. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 264 с. - ЭБС «Консультант студента» - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970407332.htm>
8. Вавилова Т.П. Биологическая химия в вопросах и ответах [Электронный ресурс]: учебное пособие / Т.П. Вавилова, О.Л. Евстафьева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 128 с. – ЭБС

СОДЕРЖАНИЕ

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	4
Лабораторные работы	7
Лабораторная работа № 1.	7
Лабораторная работа № 2.	12
Лабораторная работа № 3.	17
Лабораторная работа № 4.	24
Лабораторная работа № 5.	29
Лабораторная работа № 6.	38
Лабораторная работа № 7.	43
Лабораторная работа № 8.	50
Лабораторная работа № 9.	58
Лабораторная работа № 10.	56
Список литературы	76