

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ТЕМА: РАЗДЕЛЕНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Цель: Изучить теоретические основы гель-фильтрации. Приобрести практические навыки работы с гель-фильтрационными колонками.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА:

Реактивы:

- 1) Смесь для разделения:
 1. Фибриноген + голубой декстран
- 2) Фосфатный буфер Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 7.4
- 3) Вода дистиллированная;
- 4) Биуретовый реактив, калибратор Фибриногена;

Оборудование и расходные материалы:

- 1) Фотометр Helios γ ;
- 2) Колонки для гель-фильтрации, мембраны;
- 3) Sephadex G-25, подготовленный для заполнения колонки;
- 4) Пробирки пластиковые: подставки для колонок;
- 5) Дозаторы переменного объема: на 5 мл, 1000 мкл и 200 мкл;
- 6) Наконечники дозаторов: на 5 мл, 1000 мкл и 200 мкл;
- 7) Эппендорфы: для сбора фракций элюата, количественного определения Фибриногена;
- 8) Кюветы измерительные;
- 9) Маркеры;

Выполнение работы.

1. Закрыть дно колонки фильтром. Наполнить колонку заранее подготовленным гелем. Поставить колонку в пробирку на штативе.
2. Нанести на колонку 5 мл фосфатного буфера. Собрать его на выходе из колонки. Отставить (в дальнейшем не используется).
3. Нанести на колонку 250 мкл смеси для разделения.
4. Нанести на колонку 1-2 мл фосфатного буфера pH 7.4. Собирать элюат в эппендорф по 12-15 капель.
5. Наносить на колонку по 1-2 мл фосфатного буфера pH 7.4 и продолжать собирать элюат в эппендорфы до тех пор, пока окрашенная полоса не достигнет нижнего фильтра колонки.
6. Необходимо собрать не менее 10-12 фракций.
7. **Строго фиксировать объем элюента** (буфера), введенный в колонку после нанесения разделяемой смеси, и до окончания выхода фракции Фибриногена.
8. Измерить концентрацию Фибриногена в каждом эппендорфе биуретовым методом. Инкубация при комнатной температуре 30 мин. Измерять против холостой пробы ($\lambda=540$ нм).

$$C=(D_{\text{фракц.}}/D_{\text{калибр}})*60$$

отмерить, мкл	холостая проба	калибровочная проба	контрольная проба	опытная проба
Вода дистилл.	50	-	-	-
Калибратор (б г/л)	-	50	-	-
Фракция Фибриногена (элюат)	-	-	-	50
Биуретовый реактив	2500	2500	2500	2500

9. Построить в MS Excel график зависимости концентрации белка от объема элюента. Сделать вывод о характере связи.