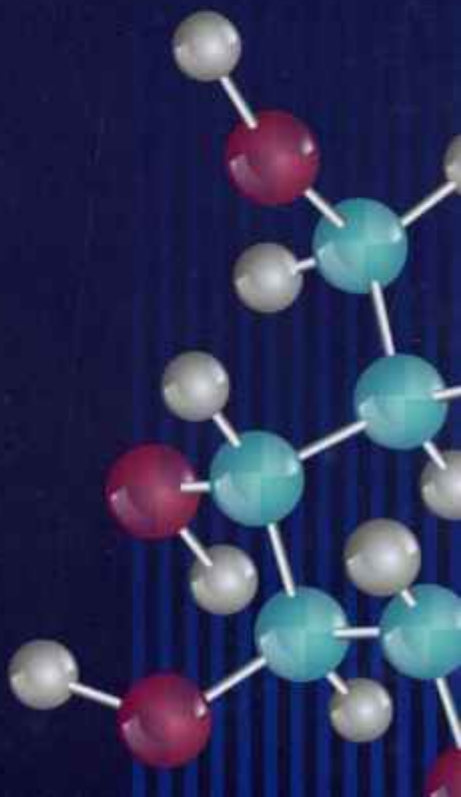


Мирхамидова П., Шахмурова Г.А.,
Туйчиева Д.Х., Махмудова К.Х.

28.070
M75

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

лабораторный практикум



28.01.0
M75

МИНИСТЕРСТВО НАРОДНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ НИЗАМИ

Мирхамидова П., Шахмурова Г.А.,
Туйчиева Д.Х., Махмудова К.Х.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

лабораторный практикум

учебное пособие

60110900-Биология

NIZOMIY NOMIDAGI
TDPU
AXBOROT-RESURS
MARKAZI

У-9570/3

“BOOKMANY PRINT”
ТАШКЕНТ – 2023

УДК: 576.31

КБК: 28.070

М 75

Молекулярная биология лабораторный практикум [Текст]: учебное пособие / П. Мирхамидова, Г.А. Шахмурова, Д.Х. Туйчиева, К.Х. Махмудова. – Ташкент: Издательство “Bookmany print”, 2023. – 278 с.

Данное учебное пособие подготовлено для лабораторных занятий по молекулярной биологии студентам направление 60110900-Биология. При создании лабораторного практикума использована современная концепция преподавания молекулярной биологии, основанная на представлении учебного материала в виде завершенных по содержанию разделов. В нем используется очень широкий ряд биологических, физических и химических методов, как биохимия, физиология, цитология, генетика, и некоторые другие методы которые были созданы в процессе развития для работы с молекулярными объектами.

Материал изложен четко и доступно для восприятия, методические подходы научны. Пособие может быть полезно и магистрантам при выполнении научно-исследовательских работ.

Рецензенты:

Майматаева А.Д. – Заведующая кафедрой биологии, PhD, Казахского Национального педагогического университета им.Абая

Абдуллаева М. – Доктор биологических наук, профессор кафедры биохимия, НУУз им.М.Улугбека

Данное учебное пособие одобрен к изданию на основании решения Совета Ташкентского государственного педагогического университета от 27 июня 2023 года № 11/33.

ISBN 978-9910-9898-4-1

© Мирхамидова П., Шахмурова Г.А.,
Туйчиева Д.Х., Махмудова К.Х.

© Издательство “Bookmany print”, 2023.



Посвящается светлой памяти академику РФ АН доктору биологических наук, профессору - Ильи Борисовичу Збарскому

ВЕДЕНИЕ

Молекулярная биология возникла во второй половине XX века. Название этой науки связывают с именем У.Эстбюри, который в 1939 году назвал себя «Молекулярным биологом». В 1941 году он получил первую рентгенограмму ДНК и тем самым положил начало изучению тонкой структуры самой главной молекулы клетки, впервые выявленной Ф.Мишером в 1869 году. Официальное упоминание о молекулярной биологии, принадлежит У.Уиверу, руководителю отделом естественных наук Рокфеллеровского фонда. Он в 1938 году писал: «В тех пограничных областях, где химия и физика пересекаются с биологией, постепенно возникает новый раздел науки – молекулярная биология, начинающая приоткрывать занавесы под многими тайнами, окутывающими основные элементы живой клетки» [13].

Именно под влиянием генетиков новой формации (Т.Моргана, Н.К.Кольцова, Н.В.Тимофеева-Ресовского) физики-теоретики и экспериментаторы организовали так называемую «фаговую группу» во главе с М.Дельбрюком, которая начала исследования в области молекулярного строения и мутагенеза вирусов и бактериофагов.

К началу 50-х годов в биохимии были получены фундаментальные данные об элементарном строении белков и нуклеиновых кислот, включая сведения о способах организации полипептидных цепей белков, о структуре нуклеотидов и закономерности их количественного содержания в молекулах ДНК и РНК. Также биофизические исследования структуры ДНК Р.Франклином и М.Уилкинсом подвели Дж.Уотсона и Ф.Крика к раскрытию молекулярной природы генов и механизма их воспроизведения (репликации) в составе ДНК.

Создание модели двойной спирали ДНК и открытие принципа комплементарности стали важнейшими событиями современной биологии, вскрывшими фундаментальные принципы функционирования живых систем и определившим дальнейшие направления исследований современной биологии.

Основоположники молекулярной биологии (по датам открытий)

• 1869 г. – Ф.Мишер, впервые выделил ДНК из лейкоцитов и молок лосося.

- 1935 г. – А.Н.Белозёрский, выделил ДНК из растений.
- 1939 г. – В.А.Энгельгард, открыл АТФазную активность миозина.
- 1940 г. – У.Эстрбюри, получил первую рентгенограмму ДНК.
- 1944 г. – О.Т.Эвери, установил, что ДНК является носителем генетической информации (ранее полагали, что носителем генетической информации был белок).
- 1951 г. – Л.Полинг и Р.Кори, обосновали существование основных типов укладки аминокислотных остатков в полипептидных цепях белков (α -спираль и складчатый β -слой).
- 1953 г. – Дж.Уотсон и Ф.Крик, создали модель двойной спирали ДНК на основе рентгенограмм, полученных Р.Франклини и М.Уилкинсоном.
- 1953 г. – Ф.Сангер, расшифровал первичную структуру инсулина быка.
- 1956 г. – А.Корнберг, открыл ДНК-полимеразу.
- 1957 г. П.Н.Белозерский и А.И.Спирин, предсказали существование м-РНК.
- 1960 г. – Дж.Кедрю, впервые описал трехмерную структуру миоглобина кашалота.
- 1960 г. – М.Перутц, впервые описал структуру гемоглобина.
- 1960 г. – Одновременно в нескольких лабораториях был открыт фермент транскрипции – РНК-полимераза.
- 1961 г. – Ф.Жакоб и Дж.Моно, разработали модель оперона.
- 1965 г. – Р.Холли, выяснил первичную структуру аланиновой т-РНК.
- 1967 г. – А.А.Баев, выяснил первичную структуру валииной т-РНК.
- 1966 г. – М.Ниренберг, С.Очао и Х.Г.Корана, расшифровали генетический код.
- 1967 г. – М.Геллерт, открыл ДНК-лигазу – фермент, способный соединять фрагменты ДНК.
- 1970 г. – Г.Темин и Д.Балтимор, открыли обратную транскрипцию в онкогенных вирусах (РНК-зависимую ДНК-полимеразу).
- 1972 г. – П.Бозр, С.Коэн и П.Берг, разработали технологию клонирования ДНК, заложили основы генетической инженерии.
- 1972 г. – Х.Г.Корана, осуществил химический синтез гена аланиновой т-РНК.

- 1975-1977 гг. – Ф.Сингер, А.Максам и У.Гилберт, разработали методы быстрого определения первичной структуры ДНК.
- 1976 г. – Ф.Сингер, расшифровал нуклеотидную последовательность ДНК фага $\phi X174$.
- 1976 г. – У.Гилберт, открыл мозаичное строение генов эукариот.
- 1976 г. – С.Ким, А.Рич и А.Клуг, определили третичную структуру т-РНК.

В результате выдающихся открытий Дж.Уотсона, Ф.Крика, Х.Г.Кораны, А.Корнберга и других, удостоенных Нобелевских премий, в середине 60-годов XX века окончательно утвердился основной постулат молекулярной генетики, формулирующий магистральный путь реализации генетической информации в клетке [13]:

ДНК $\longrightarrow$ РНК $\longrightarrow$ Белок

Позже были детально изучены механизмы репликации ДНК (воспроизведения), транскрипция (биосинтез РНК) и трансляция (биосинтез белка). Также развивались работы по изучению внутриклеточной локализации этих процессов и изучение функционального значения клеточных компонентов, ядра, митохондрий, микросом, рибосом и других. Это дало основание Дж.Уотсону в 1968 году для определения молекулярной биологии: «Молекулярная биология изучает связь структуры биологических макромолекул и основных клеточных компонентов с их функцией, а также основные принципы и механизмы саморегуляции клеток, которые опосредуют согласованность и единство всех протекающих в клетке процессов, составляющих сущность жизни» [12].

Среди наук, находящихся на стыке биологии и химии, принято выделять биохимию, молекулярную биологию, клеточную биологию и физиологию. Биохимия занимается изучением преобразований мономеров, малых молекул и низкомолекулярных соединений, в то время, как молекулярная биология изучает синтез макромолекул и преобразования информации, связанные с ними (рис.1). Предметом изучения клеточной биологии является взаимодействие макромолекул между собой и каскады, а физиологии – строение тканей и межклеточная коммуникация [20].



Рис. 1. Роль молекулярной биологии в современной биологии [4].

Молекулярная биология использует очень широкий ряд биологических, физических и химических методов, как биохимия, цитология, генетика, а некоторые другие методы были созданы в процессе развития для работы с молекулярными объектами. Ниже рассмотрим ряд наиболее широко используемых методов.

I ГЛАВА. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ В ЛАБОРАТОРИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

1.1. Правила техники безопасности работы в лаборатории

В лаборатории молекулярной биологии проводятся анализы по изучению качественного и количественного состава веществ физико-химическими методами. Работы выполняются с применением спектрофотометрических, потенциометрических, микроскопических и других методов исследования. Использование в работах химических реактивов и электрических приборов требует от студентов соблюдения определенных правил техники безопасности.

Меры безопасности при работе с огнеопасными и легковоспламеняющимися жидкостями

Легковоспламеняющиеся вещества должны храниться в специально приспособленном для этого хранилище и использоваться только по мере надобности.

Запрещается хранить лаборатории петролейный эфир, серный эфир, ацетон, метиловый спирт, бензол, толуол и другие жидкие углеводороды с температурой кипения ниже 150°C в количестве, превышающем суточную потребность.

Общее количество горючих веществ в лабораторной комнате с одним вытяжным шкафом не должно превышать 5 л. Эти вещества следует сохранять специально предназначенных железных ящиках, которые располагают на полу, с удобным подходом к ним, вдали от входной двери и радиаторов отопления.

Категорически запрещается:

- держать горючие вещества на рабочем столе при включенных плитках с открытой спиралью;

- держать горючие вещества в вытяжном шкафу во время работы с плитками с открытой спиралью или включенными приборами.

- хранить горючие жидкости в тонкостенных колбах емкостью более 200 мл, а также легко воспламеняющие жидкости рядом с сильными окислителями (азотной кислотой, бромом, перекисью водорода, перекисью натрия, перекисью магния и ртутного сребра);

- сливать горючие вещества в раковину; остатки загрязненных растворителей из отгонных проб должны сливаться в приспособленную тару, установленную в специально отведенном месте;

Меры безопасности при работе с кислотами и щелочами

При проведении лабораторных работ часто используют концентрированные кислоты и щелочи или их растворы. В случае попадания на кожу они могут вызвать тяжелые ожоги, а в глаза - потерю зрения. Поэтому концентрированные кислоты и щелочи следует хранить только в толстостенной посуде под вытяжным шкафом.

Разливают концентрированные кислоты только под тягой при максимально прикрытых дверцах шкафа. При этом лаборант (студент) должен иметь средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, халат). Держать склянку следует осторожно, а горловину и дно. Стекающие по горловине капли снимают кусочками асбеста, а затем вытирают насухо бумагой или тряпкой. Такого же осторожного обращения требуют концентрированные растворы щелочей.

При работе с дымящейся азотной кислотой удельного веса 1,52-1,51, а также с олеумом кроме очков и резиновых перчаток следует надевать длинный фартук из прорезиненной ткани или полиэтиленовой пленки.

Разлив концентрированных кислот производится в защитных очках и резиновых перчатках.

При разбавлении серной кислоты следует лить кислоту в воду, а не наоборот. Необходимо строго соблюдать это правило, так как плотность концентрированной серной кислоты выше плотности воды, поэтому при добавлении серной кислоты к воде она будет растекаться по дну сосуда, что предотвратит появление брызг. Если наливать воду в серную кислоту, то произойдет ее растекание по поверхности серной кислоты. В месте контакта воды с серной кислотой резко повышается температура, что является причиной появления брызг, которые при попадании на кожу способны вызвать ожог.

Меры безопасности при работе с электрооборудованием и электроприборами:

Лабораторные работы проводятся при наличии исправного электрооборудования. При обнаружении дефектов в изоляции

проводов, неисправности пускателей, рубильников, штепселей, розеток, вилок, а также заземления следует немедленно сообщить об этом преподавателю.

Категорически запрещается:

- работать вблизи открытых токопроводящих частей приборов и оборудования;
- загромождать подступы к электрическим устройствам;
- вешать на штепсельные розетки, выключатели и электропровода различные вещи, укреплять провода веревкой или проволокой;
- заменять перегоревшие предохранители пучками проволоки;
- переносить включенные приборы и ремонтировать оборудование под током;
- включать и выключать приборы без разрешения преподавателя.

Первая медицинская помощь

Для оказания первой помощи лаборатории должны быть бинты, гигроскопическая вата, 3%-ный раствор йода, 2% -ный раствор борной кислоты, 3%-ный раствор уксусной кислоты, 3-5%-ный раствор двууглекислого натрия (питьевая сода).

При ранениях стеклом нужно удалить из раны осколки, обработать кожу вокруг нее йодом и перевязать пораненное место.

При термических ожогах первой и второй степени обожженное место можно присыпать двууглекислым натрием (питьевой содой). Хорошо помогают примочки из свежеприготовленных растворов 2%-ной питьевой соды или 5%-ного марганцовокислого калия. Лучшим средством для примочек является абсолютный или 96%-ный этиловый спирт, он оказывает одновременно и обеззараживающее действие.

При более тяжелых или обширных ожогах пострадавшего необходимо немедленно отправить к врачу.

При ожогах кислотами и щелочами пораженный сток кожи быстро промывают большим количеством воды. Затем на обожженное место накладывают примочку: при - из 2% -ного раствора питьевой соды, при ожогах щелочью - из слабого (0,5%) раствора уксусной кислоты [18].

1.2. Ознакомление с основными приборами и оборудованием

Цель работы. Ознакомиться с приборами и оборудованием для практикума по молекулярной биологии и сформировать первоначальные навыки обращения с ними.

Оборудование и материалы: Основные приборы и оборудование, необходимые для выполнения практических работ по молекулярной биологии:

Задания:

1. Используя интернет данные, сделать записи в рабочем журнале о целевом назначении каждого прибора, особенностях работы с ним и технике безопасности.

2. С помощью автоматических дозаторов и наконечников отобрать следующие объемы воды: 1, 3, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 1000, 3000 и 5000 мкл.

Ящик 1. Реактивы. Инструменты



Флаконы с крышками-капельницами (40 мл)	Ножницы хирургические прямые 15 см
Флаконы с крышками для сыпучих материалов (40 мл)	Покровные стёкла - Предметные стёкла
Камера Горяева	Скальпель остроконечный средний
Покровные стёкла к камере Горяева	Препаровальные иглы
Ножницы глазные прямые	Пинцет анатомический 15 см
Спиртовка (30 мл)	Пинцет стоматологический изогнутый

Ящик 2. Лабораторная посуда.



Стакан химический (стекло без шкалы) 50 мл	Фильтры обеззоленные (d90 мм) - упаковка
Пробирки центрифужные не градуированные	Пинцет стоматологический изогнутый
Стакан химический (пластик) 50 мл	Чашка выпарительная №3
Стакан химический (пластик) 100 мл	Тигель фарфоровый №3 низкий
Контейнер для биологических материалов	Тигель фарфоровый №4 с крышкой низкий
Пробирки ПХ-14	Чаша кристаллизационная 100 мл
Стакан химический (стекло) 100 мл	Планшетка с фоновым экраном
Штатив для пробирок на 10 гнезд	Промывалка, Чашка Петри, Лоток
Штатив для пробирок на 4 гнезда	Ступка фарфоровая с пестиком № 3
Мензурка 100 мл, Воронка В-56	Колбы конические 100 мл

Ящик 3. Цифровая лаборатория.

Электронные средства измерения. Набор микропрепаратов.



Цифровая лаборатория по биологии
Набор микропрепаратов (100 шт)
Весы электронные
Секундомер
Электронный термометр ($-50^{\circ} + 300^{\circ}$)

Ящик 4. Средства измерения из стекла



Мерный цилиндр 50 мл
Мерный цилиндр 100 мл
Мерные колбы 25, 50, 100 мл
Воронка делительная 50 мл
Пипетки стеклянные 2 мл, 5 мл,
10 мл
Пипетка медицинская (глазная)
Бюретка 10 мл с краном

Пипетка автоматическая с регулируемым объёмом. (до 100 мкл)

Лупа 4-х, 6-ти кратного увеличения

Рулетка 2м Дозатор для пипеток

Индикаторная бумага Пипетка Пастера

Термометр стеклянный (тип ТС-4М) 0-100 рад.

Наконечник для пипетки автоматической



1.УФ-ВИД спектрофотометр (СФ) Cary 100/300

Метод СФ в УФ и видимом диапазонах спектра занимает одно из ведущих мест в биологии и широко востребован в современных лабораториях. Спектрофотометрия (молекулярная) – физико-химический метод анализа растворов и твёрдых веществ,

основанный на изучении их спектров поглощения в ультрафиолетовой (190 - 400 нм), видимой (400 - 760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях электромагнитного спектра. Применение СФ в УФ и видимой областях спектра основано на поглощении электромагнитного излучения соединениями, содержащими хромофорные (например, $C=C$, $C\equiv C$, $C=O$) и аукохромные (OCH_3 , OH , NH_2 и др.) группы.



2. Стационарный рН-метр

Лабораторный рН-метр применяется для исследований окислительно-восстановительных процессов в химических растворах и образцах. При повседневном использовании в лабораторной практике для получения точных результатов измерений рН-метры обязательно нужно калибровать. Калибровка рН-метра производится при помощи готовых растворов с заданным уровнем рН. В зависимости от модели прибора калибровать можно как по одной, так и нескольким точкам, чем больше точек калибровки, тем точнее будут показания и меньше погрешность измерений прибора



3. Лабораторные весы

Лабораторные весы Ohaus с технологичной электронной начинкой широко применяются в лабораторных измерениях по

всему миру. В линейке весов Ohaus представлен широкий выбор моделей для точных измерений в диапазоне от 0,00001 г до 15 кг. Электронные лабораторные весы различаются по выполняемым функциям, виду калибровки, области применения и наличию возможности автономной работы.



4. Автоклавы

Автоклавы, или паровые стерилизаторы, используют для стерилизации медицинских или лабораторных инструментов, емкостей, биологических образцов, питательных сред и др. Конструктивно автоклав представляет горизонтальную или вертикальную герметичную камеру с давлением выше атмосферного.



5. Водяные термостаты

Водяные термостаты используют для нагрева и мягкого термостатирования проб, образцов или материалов в лабораториях и клиниках различного профиля. Ванная водяной бани выполняется из пластика либо из нержавеющей стали. Кроме этого, некоторые модели термостатов поддерживают внутреннюю или внешнюю циркуляцию, могут иметь функции цифровой регулировки температуры, автозапуска в случае отключения электросети, сигнала о низком уровне жидкости, а также снабжены интерфейсами для подключения к персональному компьютеру.



6. Магнитная мешалка

Магнитная мешалка - прибор, состоящий из двух основных деталей: электродвигателя и магнитных элементов. Широко применяется для лабораторных исследований. Двигатель, вращаясь, приводит перемешивающие элементы в движение. Рабочая платформа у некоторых магнитных мешалок с нагревом. Выпускаются модели с интегрированной системой взвешивания, а также многоместные для одновременного перемешивания до 15 образцов



7. Дозаторы лабораторные

Лабораторные дозаторы используются для точного дозирования жидкостей объемом от 0.1 мкл до 1 литра. Лабораторные дозаторы используются в клинических, биологических и химических лабораториях. Компания Пушинские лаборатории поставяет широкий спектр механических и электронных лабораторных дозаторов для решения любых задач от ведущих мировых производителей производства Thermo Fisher Scientific, Eppendorf, Biohit, Gilson, Ленпипет и других.



8. Центрифуги лабораторные

Лабораторные центрифуги широко применяются в медицинских и химических лабораториях. Принцип действия прибора основан на разделении частиц различной плотности в поле силы тяжести. Центрифуги в лабораторной практике применяются для разделения крови, осаждения клеток, субклеточных органелл, вирусов, белков и нуклеиновых кислот в растворе. При выборе и покупке обратите внимание на скорость вращения, вид установки, тип ротора (угловой или бакет-ротор) и наличие системы охлаждения.



9. Лабораторный дистиллятор

Дистилляторы используют в различных лабораториях для преобразования технической воды в дистиллированную, без присутствия посторонних примесей. Дистилляторы и бидистилляторы применяются при изготовлении реагентов, при подготовке медицинских и биологических образцов, для приготовления буферного раствора, стерилизации и др. Важный показатель данных приборов - это объем получаемой воды за единицу времени.

NIZOMIY NOMIDAGI
TDPU
AXBOROT-RESURS
MARKAZI

4-9570/3



10. Микроскопы

Лабораторный микроскоп применяются практически во всех областях для работы с прозрачными и не прозрачными образцами. Современные микроскопы позволяют производить фото и видео съемку предмета наблюдения через дополнительный объектив и производить выгрузку информации в различных форматах для дальнейшего анализа. Микроскопы выпускаются базовыми для типовых исследований и модульными, когда Вы сами формируете его комплектацию. Опционально можно выбрать различные платформы, количество объективов, тип детекции, кратность увеличения, фокусировку, вид и тип освещения, и т.д.



11. ПЦР боксы

ПЦР боксы с абактериальной воздушной средой для стерильных работ являются необходимым оборудованием для защиты ваших образцов от контаминации частицами, всегда находящимися в воздухе лаборатории. ПЦР боксы оснащаются системами фильтрации для обеспечения абактериальной среды и препятствуют нежелательным загрязнениям, что является

необходимым при проведении полимеразной цепной реакции как в научных, так и в клинических лабораториях. Наиболее эффективными и распространенными средствами деkontаминации в ПЦР-боксе являются УФ обработка воздуха и рабочей поверхности и организация потоков воздуха через HEPA-фильтр. УФ излучение эффективно борется с вирусами, бактериями, дрожжевыми микроорганизмами.



12. Оборудование для электрофореза

Оборудование для электрофореза и детекции белков и нуклеиновых кислот – это комплекс аппаратов и устройств для лабораторных исследований. Образцы исследуемого материала помещаются в агарозные гели, подкрашиваются, обрабатываются в электрофорезных камерах, просматриваются в трансиллюминаторах (УФ-свет); результаты документируются и анализируются.



13. Ламинарный бокс

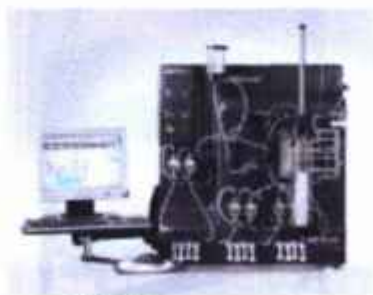
Ламинарный бокс (или ламинарный шкаф) представляет собой закрытый стенд, предназначенный для предотвращения загрязнения биологических образцов в процессе работы, а также

защиты окружающей среды от вредного воздействия исследуемых препаратов. Шкаф с ламинарным потоком закрыт по бокам, в нем поддерживается постоянное положительное давление воздуха для предотвращения проникновения загрязненного воздуха. Воздух проходит через фильтр НЕРА и преобразуется в ламинарный поток. Боксы могут оснащаться бактерицидными лампами для стерилизации внутреннего пространства.



14. Амплификатор

Амплификаторы или термоциклеры - это специальное оборудование для амплификации (увеличения числа копий) фрагментов ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эти приборы обеспечивают циклическое нагревание/охлаждение пробирок по заданным временным и температурным показателям.



15. Хроматограф

Жидкостная хроматография - метод разделения исследуемого вещества, основанный на его распределении между двумя фазами: неподвижной и подвижной. Неподвижная фаза - это сорбент в колонках, через который фильтруется исследуемый образец.

Колоночная хроматография является общей методикой, используемой для выделения отдельных соединений из смеси. Можно использовать колоночную хроматографию как в малом, так и в большом масштабе.



16. Сушильный шкаф

Сушильные шкафы - неотъемлемый элемент лабораторного оборудования в медицинских учреждениях, поскольку там постоянно выполняется стерилизация инструмента и различные аналитические процедуры. Сушильный шкаф лабораторный - это специальное оборудование, востребованное во многих отраслях. Оно предназначается для стерилизации и сушки всевозможных материалов при температуре $+50-500^{\circ}\text{C}$, а также для проведения аналитических мероприятий при $+350^{\circ}\text{C}$ [42].

Правила работы на фотоэлектроколориметре (ФЭК)

Фотоэлектроколориметр - предназначен для измерения оптической плотности или светопропускания жидких растворов по отношению к растворителю или стандартному раствору. В основе работы этого прибора лежит принцип уравнивания интенсивности двух световых пучков, проходящих через оптические среды, при помощи переменной щелевой диафрагмы. Световые лучи от лампы, отразившись от зеркал, проходят через светофильтры, кюветы и попадают на фотоэлементы, которые подключены к гальванометру. ФЭК включить в сеть за 15 минут до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто. Установить необходимый для измерения светофильтр. Установить минимальную чувствительность колориметра, для этого ручку «чувствительность» установить в положение «1», ручку «установка грубо» - в крайнее левое положение. В световой пучок поместить кювету с

контрольным раствором, по отношению к которому производятся измерения, в другое отделение поместить кювету с исследуемым раствором. Закрыть крышку кюветного отделения. Ручками «чувствительность» и «установка грубо и точно» установить отсчет 100 по шкале колориметра.

Ручка «чувствительность» может находиться в одном из трех положений: «1», «2» или «3». Затем, поворотом ручки кювету с контрольным раствором заменить кюветой с исследуемым раствором. Снять отсчет по шкале колориметра, соответствующий коэффициенту пропускания исследуемого раствора в единицах оптической плотности. Измерение проводить 2-3 раза и окончательное значение измеренной величины определить, как среднее арифметическое из полученных значений. Прибор после окончания работы выключить. Осторожно промыть кюветы.



Рисунок 2. Фотоэлектроколориметр КФК-3-01.

Стремительное развитие современной физико-химической биологии тесно связано с усовершенствованием и широким применением таких методов, как центрифугирование, электрофорез, хроматография, полимеразная цепная реакция (ПЦР), а также методов геной инженерии. В связи с этим для выполнения молекулярно-биологических работ на современном уровне требуется соответствующее приборное оснащение. Основными требованиями к оборудованию являются надежность, простота в эксплуатации и эффективность при достижении искомого результата [46].

1.3. Единицы измерения

Длина

1 км (километр) = 10^3 м
1 м (метр)
1 см (сантиметр) = 10^{-2} м
1 мм (миллиметр) = 10^{-3} м
1 мкм (микромметр) = 10^{-6} м
1 нм (наномметр) = 10^{-9} м
1 А (Ангстрем) = 10^{-10} м

Масса

1 кг (килограмм) = 10^3 г
1 г (грамм)
1 мг (миллиграмм) = 10^{-3} г
1 мкг (микрограмм) = 10^{-6} г
1 нг (наногграмм) = 10^{-9} г

Объем

1 л (литр) = $(10^{-1} \text{ м})^3$
1 мл (миллилитр) = 10^{-3} л = $(10^{-2} \text{ м})^3$
= 1 см³
1 мкл (микролитр) = 10^{-6} л = $(10^{-3} \text{ м})^3$
= 1 мм³
1 нл (нинолитр) = 10^{-9} л = $(10^{-4} \text{ м})^3$

Концентрация

1 М (моль) = 1 моль/л =
 $6,02 \times 10^{23}$ молекул/л
1 мМ (миллимоль) = 10^{-3} М
1 мкМ (микромоль) = 10^{-6} М
1 нМ (наномоль) = 10^{-9} М

Используемые константы

1 моль = $6,02 \times 10^{23}$ молекулы
1 кал (калория) = количество теплоты, необходимос для
нагревания 1 г воды на 1⁰С
1 Дж (джоуль) = 0,239 кал
1 ккал (килокалория) = 103 кал = 4,128 кДж (килоджоулей)
1 л воды = 1 кг (при 4⁰С)
1 Да (дальтон) = приблизительно равен массе одного атома
водорода ($1,7 \times 10^{-24}$ г)
1 кДа (килодальтон) = 10^3 Да
Масса Земли = 10^{24} кг
Геном бактерии = 0,5 – 5×10^6 пар нуклеотидов, в зависимости от
организма
Геном человека = 3×10^9 пар нуклеотидов (гаплоиды) [8]

1.4. Приготовление водных растворов

Приблизительные растворы. При приготовлении
приблизительных растворов количества веществ, которые должны
быть взяты для этого, вычисляют с небольшой точностью.
Атомные веса элементов для упрощения расчетов допускается
брать округленными иногда до целых единиц. Так, для грубого

подсчета атомный вес железа можно принять равным 56 вместо точного - 55,847; для серы - 32 вместо точного 32,064 и т. д.

Принципиально расчеты при приготовлении растворов совершенно одинаковы для всех веществ.

Количествоготавливаемого раствора выражают или в единицах массы (г, кг), или в единицах объема (мл, л), причем для каждого из этих случаев вычисление количества растворяемого вещества проводят по-разному.

Пример. Пусть требуется приготовить 1,5 кг 15%-ного раствора хлористого натрия; предварительно вычисляем требуемое количество соли. Расчет проводится согласно пропорции:

$$\frac{100 - 15}{1500 - x} \quad x = \frac{15 \cdot 1500}{100} = 225 \text{ г}$$

то есть, если в 100 г раствора содержится 15 г соли (15%), то сколько ее потребуется для приготовления 1500 г раствора.

Расчет показывает, что нужно отвесить 225 г соли, тогда воды нужно взять $1500 - 225 = 1275$ г.

Если же задано получить 1,5 л того же раствора, то в этом случае по справочнику узнают его плотность, умножают последнюю на заданный объем и таким образом находят массу требуемого количества раствора. Так, плотность 15%-ного раствора хлористого натрия при 15°C равна 1,184 г/см³.

Следовательно, 1500 мл составляет, то есть:

$$1500 \cdot 1,184 = 1776 \text{ г}$$

$$\frac{100 - 15}{1776 - x} \quad x = \frac{15 \cdot 1776}{100} = 266,4 \text{ г}$$

Следовательно, количество вещества для приготовления 1,5 кг и 1,5 л раствора различно.

Расчет, приведенный выше, применим только для приготовления растворов безводных веществ. Если взята водная соль, например $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ то расчет несколько видоизменяется, так как нужно принимать во внимание и кристаллизационную воду.

Пример: Нужно приготовить 2 кг 10%-ного раствора Na_2SO_4 , исходя из $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Молекулярный вес Na_2SO_4 равен 142,041, а $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ равен 322,195, или округленно 322,20.

Расчет ведут вначале на безводную соль:

$$\frac{100 - 10}{2000 - x} \quad x = \frac{10 \cdot 2000}{100} = 200 \text{ г}$$

Следовательно, нужно взять 200 г безводной соли. Количество десятиводной соли находят из расчета:

$$\frac{142,04 - 322,2}{200 - x} \quad x = \frac{200 \cdot 322,2}{142,04} = 453,7 \text{ г}$$

Воды в этом, случае нужно взять: $2000 - 453,7 = 1546,3 \text{ г}$.

Так как раствор не всегда готовят с пересчетом на безводную соль, то на этикетке, которую обязательно следует наклеивать на сосуд с раствором, нужно указать, из какой соли приготовлен раствор, например, 10%-ный раствор Na_2SO_4 или 25%-ный $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

Часто случается, что приготовленный ранее раствор нужно разбавить, т.е. уменьшить его концентрацию; растворы разбавляют или по объему, или по массе.

Пример. Нужно разбавить 20%-ный раствор сернокислого аммония так, чтобы получить 2 л 5%-ного раствора. Расчет ведем следующим путем. По справочнику узнаем, что плотность 5%-ного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ равна $1,0287 \text{ г/см}^3$. Следовательно, 2 л его должны весить $1,0287 \cdot 2000 = 2057,4 \text{ г}$. В этом количестве должно находиться сернокислого аммония:

$$\frac{100 - 5}{2057,4 - x} \quad x = \frac{5 \cdot 2057,4}{100} = 102,87 \text{ г}$$

Теперь можно подсчитать, сколько нужно взять 20%-ного раствора, чтобы получить 2 л 5%-ного раствора.

$$\frac{100 - 20}{x - 102,87} \quad x = \frac{100 \cdot 102,87}{20} = 514,35 \text{ г}$$

Полученную массу раствора можно пересчитать на объем его. Для этого массу раствора делят на его плотность (плотность 20%-ного раствора равна $1,1149 \text{ г/см}^3$), т. е.

$$\frac{514,35}{1,1149} = 461,3 \text{ мл}$$

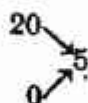
Учитывая, что при отмеривании могут произойти потери, нужно взять 462 мл и довести их до 2 л, т. е. добавить к ним $2000 - 462 = 1538 \text{ мл}$ воды.

Если же разбавление проводить по массе, расчет упрощается. Но вообще разбавление проводят из расчета на объем, так как жидкости, особенно в больших количествах, легче отмерить по объему, чем взвесить.

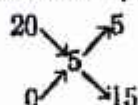
Нужно помнить, что при всякой работе как с растворением, так и с разбавлением никогда не следует выливать сразу всю воду в сосуд. Водой ополаскивают несколько раз ту посуду, в которой проводилось взвешивание или отмеривание нужного вещества, и каждый раз добавляют эту воду в сосуд для раствора.

Когда не требуется особенной точности, при разбавлении растворов или смешивании их для получения растворов другой концентрации можно пользоваться следующим простым и быстрым способом.

Возьмем разобранный уже случай разбавления 20%-ного раствора сернокислого аммония до 5%-ного. Вначале пишется так:

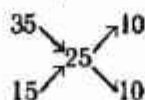


где 20% - концентрация взятого раствора, 0 - вода и 5%-требуемая концентрация. Теперь из 20 вычитаем 5 и полученное значение пишем в правом нижнем углу, вычитая же нуль из 5, пишем цифру в правом верхнем углу. Тогда схема примет такой вид:



Это значит, что нужно взять 5 объемов 20%-ного раствора и 15 объемов воды. Конечно, такой расчет не отличается точностью.

Если смешивать два раствора одного и того же вещества, то схема сохраняется та же, изменяются только числовые значения. Пусть смешением 35%-ного раствора и 15%-ного нужно приготовить 25%-ный раствор. Тогда схема примет такой вид:



то есть, нужно взять по 10 объемов обоих растворов. Эта схема дает приблизительные результаты и ею можно пользоваться только

тогда, когда особой точности не требуется. Для всякого химика очень важно воспитать в себе привычку к точности в вычислениях, когда это необходимо, и пользоваться приближенными цифрами в тех случаях, когда это не повлияет на результаты работы. Когда нужна большая точность при разбавлении растворов, вычисление проводят по формулам.

Разберем несколько важнейших случаев.

Приготовление разбавленного раствора. Пусть a - количество раствора, $m\%$ - концентрация раствора, который нужно разбавить до концентрации $n\%$.

Получающееся при этом количество разбавленного раствора x вычисляют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot m}{n}$$

a - объем воды, v - для разбавления раствора вычисляют по формуле:

$$v = a \left(\frac{m}{n} - 1 \right)$$

Смешивание двух растворов одного и того же вещества различной концентрации для получения раствора заданной концентрации. Пусть смешиванием, в частей $m\%$ -ного раствора с x частями $n\%$ -ного раствора нужно получить $l\%$ -ный раствор, тогда:

$$x = \frac{n(l-m)}{n-l}$$

Точные растворы. При приготовлении точных растворов вычисление количеств нужных веществ проверяют уже с достаточной степенью точности. Атомные веса элементов берут по таблице, в которой приведены их точные значения. При сложении (или вычитании) пользуются точным значением слагаемого с наименьшим числом десятичных знаков. Остальные слагаемые округляют, оставляя после запятой одним знаком больше, чем в слагаемом с наименьшим числом знаков. В результате оставляют столько цифр после запятой, сколько их имеется в слагаемом с наименьшим числом десятичных знаков; при этом производят необходимое округление. Все расчеты производят, применяя логарифмы, пятизначные или четырехзначные. Вычисленные количества вещества отвешивают только на аналитических весах.

Взвешивание проводят или на часовом стекле, или в бюксе. Отвешенное вещество высыпают в чисто вымытую мерную колбу через чистую сухую воронку небольшими порциями. Затем из промывали несколько раз небольшими порциями воды обмывают над воронкой буже или часовое стекло, в котором проводилось взвешивание. Воронку также несколько раз обмывают и промывали дистиллированной водой.

Для пересыпания твердых кристаллов или порошков в мерную колбу очень удобно пользоваться воронкой. Воронки изготовляют емкостью 3, 6, и 10 см³. Взвешивать навеску можно непосредственно в этих воронках (негигроскопические материалы), предварительно определив их массу. Навеска из воронки очень легко переводится в мерную колбу. Когда навеска пересыпается, воронку, не вынимая из горла колбы, хорошо обмывают дистиллированной водой и промывали.

Как правило, при приготовлении точных растворов и переведении растворяемого вещества в мерную колбу растворитель (например, вода) должен занимать не более половины емкости колбы. Закрыв пробкой мерную колбу, встряхивают ее до полного растворения твердого вещества. После этого полученный раствор дополняют водой до метки и тщательно перемешивают.

Молярные растворы. Для приготовления 1 л 1 М раствора какого-либо вещества отвешивают на аналитических весах 1 моль его и растворяют, как указано выше.

Пример. Для приготовления 1 л 1 М раствора азотнокислого серебра находят в таблице или подсчитывают молекулярную массу AgNO_3 , она равна 169,875. Соль отвешивают и растворяют в воде.

Если нужно приготовить более разбавленный раствор (0,1 или 0,01 М), отвешивают соответственно 0,1 или 0,01 моль соли.

Если же нужно приготовить меньше 1 л раствора, то растворяют соответственно меньшее количество соли в соответствующем объеме воды.

Нормальные растворы готовят аналогично, только отвешивая не 1 моль, а 1 грамм-эквивалент твердого вещества.

Если нужно приготовить полунормальный или децинормальный раствор, берут соответственно 0,5 или 0,1 грамм-эквивалента. Когда готовят не 1 л раствора, а меньше, например, 100 или 250 мл, то берут 1/10 или 1/4 того количества вещества,

которое требуется для приготовления 1 л, и растворяют в соответствующем объеме воды.

После приготовления раствора его нужно обязательно проверить титрованием соответствующим раствором другого вещества с известной нормальностью. Приготовленный раствор может не отвечать точно той нормальности, которая задана. В таких случаях иногда вводят поправку.

В производственных лабораториях иногда готовят точные растворы «по определяемому веществу». Применение таких растворов облегчает расчеты при анализах, так как достаточно умножить объем раствора, пошедший на титрование, на титр раствора, чтобы получить содержание искомого вещества (в г) во взятом для анализа количестве какого-либо раствора.

Расчет при приготовлении титрованного раствора по определяемому веществу ведут также по грамм-эквиваленту растворяемого вещества, пользуясь формулой:

$$a = \frac{E_r TV}{E_o 1000}$$

где, а- количество растворяемого вещества, г;

E_r – грамм-эквивалент растворяемого вещества, г;

T- титр раствора по определенному веществу, г/мл;

V-заданный объем раствора, мл;

E_o - грамм-эквивалент по определенному веществу, г.

Пример. Пусть нужно приготовить 3 л раствора марганцовокислого калия с титром по железу 0,0050 г/мл. Грамм-эквивалент $KMnO_4$ равен 31,61, а грамм-эквивалент Fe 55,847.

Вычисляем по приведенной выше формуле:

$$a = \frac{31,61 * 0,0050 * 3000}{55,847} = 8,4901 \text{ г}$$

Стандартные растворы. Стандартными называют растворы с разными, точно определенными концентрациями, применяемые в колориметрии, например, растворы, содержащие в 1 мл 0,1, 0,01, 0,001 мг и т. д. растворенного вещества.

Кроме колориметрического анализа, такие растворы бывают нужны при определении pH, при нефелометрических определениях и пр. Иногда стандартные растворы хранят в запаянных ампулах, однако чаще приходится готовить их непосредственно перед применением. Стандартные растворы готовят в объеме не больше 1 л, а чаще — меньше. Только при большом расходе стандартного раствора можно готовить несколько литров его и то при условии, что стандартный раствор не будет храниться длительный срок.

Количество вещества (в г), необходимое для получения таких растворов, вычисляют по формуле:

$$a = \frac{M_1 T V}{M_2 (A)}$$

где M_1 - молекулярный вес растворяемого вещества;

T - титр раствора по определенному веществу, г/мл;

V - заданный объем, мл;

$M_2 (A)$ - молекулярный или атомный вес определяемого вещества.

Пример. Нужно приготовить стандартные растворы $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ для колориметрического определения меди, причем в 1 мл первого раствора должно содержаться 1 мг меди, второго — 0,1 мг, третьего — 0,01 мг, четвертого — 0,001 мг. Вначале готовят достаточное количество первого раствора, например 100 мл.

В данном случае $M_1 = 249,68$; а $\text{Cu} = 63,54$; следовательно, для приготовления 100 мл раствора, 1 мл которого содержал бы 1 мг меди ($T = 0,001$ г/мл), нужно взять:

$$a = \frac{249,68 \cdot 0,001 \cdot 100}{63,54} = 0,3929 \text{ г } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

Навеску соли переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и добавляют воду до метки. Другие растворы готовят соответствующим разбавлением приготовленного.

Эмпирические растворы. Концентрацию этих растворов чаще всего выражают в г/л или г/мл. Для приготовления эмпирических растворов применяют очищенные перекристаллизацией вещества или реактивы квалификации ч. д. а. или х. ч.

Пример. Нужно приготовить 0,5 л раствора CuSO_4 , содержащего Cu 10мг/мл. Для приготовления раствора применяют $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Чтобы подсчитать, сколько следует взять этой соли для приготовления раствора заданного объема, подсчитывают, сколько Си должно содержаться в нем. Для этого объем умножают на заданную концентрацию, т. е.

$$500 \cdot 10 = 5000 \text{ мг, или } 5,0000 \text{ г}$$

После этого, зная молекулярный вес соли, подсчитывают нужное количество ее:

$$\frac{249,68 - 63,54}{X - 5,0000} \quad \text{или} \quad X = \frac{249,68 \times 5}{63,54} = 19,648 \text{ г}$$

На аналитических весах отвешивают в бюксе точно 19,648 г чистой соли, переводят ее в мерную колбу емкостью 0,5 л. Растворение проводят, как указано выше [33].

1.5. Буферные растворы и способы приготовления

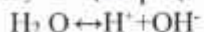
Ключевые слова: индикатор, растворы, буферные растворы, спирт, имол, бромтимол, водородный показатель, фенолфталеин

Водородный показатель.

Одно из важнейших свойств водных растворов – их кислотность (или щелочность), которая определяется концентрацией ионов H^+ и OH^- . Концентрации этих ионов в водных растворах связаны простой зависимостью $[H^+][OH^-] = K_w$; (квадратными скобками принято обозначать концентрацию в единицах моль/л). Величина K_w называется ионным произведением воды и при данной температуре постоянна. Чаще всего пользуются значением K_w при $25^\circ C$, которое равно $1,00 \cdot 10^{-14}$.

$$[H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-7} \cdot 10^{-7}$$

В абсолютно чистой воде, не содержащей даже растворенных газов, концентрации ионов H^+ и OH^- равны (раствор нейтрален).



В других случаях эти концентрации не совпадают: в кислых растворах преобладают ионы H^+ , в щелочных – ионы OH^- . Но их произведение в любых водных растворах постоянно. Поэтому если увеличить концентрацию одного из этих ионов, то концентрация другого иона уменьшится во столько же раз.

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

Эта величина может изменяться в небольших пределах – всего от -1 до 14 . При этом изменению концентрации ионов H^+ в 10 раз соответствует изменение pH на одну единицу.

При комнатной температуре в нейтральных растворах $pH = 7$, в кислых растворах $pH < 7$, а в щелочных $pH > 7$. Приблизительно значение pH водного раствора можно определить с помощью индикаторов [2, 6].

Буферные растворы

Растворы, способные сохранять постоянную концентрацию ионов H^+ при добавлении к ним небольшого количества сильной кислоты или щелочи, а также при разбавлении, называются буферными растворами или буферными системами.

Различают в основном протеолитические буферные растворы двух типов:

Кислотные буферные системы обычно образованы слабой неорганической или органической кислотой и солью этой же кислоты с сильным основанием. Например:

CH_3COOH	CH_3COONa	Ацетатный буфер
Слабая кислота	Соль кислоты	
H_2CO_3 ($H_2O + CO_2$)	$NaHCO_3$	гидрокарбонатный или бикарбонатный буфер
слабая кислота	соль кислоты	

Основные буферные системы образованы слабым неорганическим или органическим основанием и солью этого основания с сильной кислотой. Например:

$NH_3 \cdot H_2O$ (NH_4OH)	NH_4Cl	Аммиачный буфер
Слабое основание	соль	
$C_2H_5-NH_2$	$C_2H_5NH_3Cl$	этиламинный буфер
слабое основание	соль	

Уровень pH буферных растворов зависит от соотношения в нем кислот и солей, поэтому уровень pH раствора всегда одинаков. Уровень pH буферных растворов теоретически рассчитывается по следующей формуле.

$$[H^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{соль}}} K \text{ или } [OH^-] = \frac{C_{\text{основание}}}{C_{\text{соль}}} K$$

Здесь $C_{\text{кислота}}$ - концентрация кислоты;

$C_{\text{соль}}$ - концентрация соли;

$C_{\text{основание}}$ - это концентрация основания;

Точка электролитической диссоциации К-кислоты (основания).

Для живых организмов характерно поддержание кислотно-основного гомеостаза на определенном уровне. Это находит выражение в достаточно постоянных значениях рН биологических сред и способности восстанавливать нормальные значения рН при воздействии протолитов. В процессе метаболизма в организме постоянно происходит синтез, распад и взаимодействие огромного количества химических соединений. Все эти процессы осуществляются при помощи ферментов, активность которых связана с определённым значением рН.

Обеспечение постоянства рН крови и других органов и тканей является одним из важнейших условий нормального существования организма. Это обеспечение достигается наличием в организме многочисленных регулирующих систем, важнейшими из которых являются буферные системы. Таким образом, важнейшая физиологическая функция клеток также зависит от концентрации ионов водорода и их соотношения. Изменения концентрации соли в биологических жидкостях приводят к нарушению ряда важных физиологических функций [2,6,15].

Буферная емкость

Способность буферных систем противодействовать резкому изменению рН при добавлении к ним сильной кислоты или основания является ограниченной. Буферная смесь поддерживает рН постоянным только при условии, что количество вносимых в раствор сильной кислоты или щелочи не превышает определенной величины. В противном случае наблюдается резкое изменение рН, т.е. буферное действие раствора прекращается.

Это связано с тем, что в результате протекающей реакции изменяется соотношение молярных концентраций компонентов буферной системы: $C_{\text{кислота}}/C_{\text{соль}}$ или $C_{\text{основание}}/C_{\text{соль}}$.

При этом концентрация компонента, реагирующего с добавленной кислотой или щелочью, уменьшается, а концентрация второго компонента возрастает, т.к. он дополнительно образуется в ходе реакции.

Количественно буферное действие раствора характеризуется с помощью буферной емкости (В). При этом различают буферную емкость по кислоте (B_k) и буферную емкость по основанию или щелочи (B_o).

Буферной емкостью по кислоте является то количество химического эквивалента сильной кислоты, которое нужно добавить к 1 литру (1 дм^3) буферной системы, чтобы уменьшить её рН на единицу. Ее можно рассчитать по следующей формуле:

$$B_k = \frac{n(1/z \text{ HA})}{\text{pH}_1 - \text{pH}_2} \quad \text{где } n(1/z \text{ HA}) - \text{число молей химического эквивалента сильной}$$

кислоты, добавленное к 1 литру буферной системы;

pH_1 – водородный показатель системы до добавления сильной кислоты;

pH_2 – водородный показатель системы после добавления сильной кислоты.

Соответственно буферной емкостью по основанию является то количество химического эквивалента сильного основания (щелочи), которое нужно добавить к 1 литру (1 дм^3) буферной системы, чтобы вызвать увеличение ее рН на единицу:

$$B_o = \frac{n(1/z \text{ B})}{\text{pH}_2 - \text{pH}_1}$$

где $n(1/z \text{ B})$ – число молей химического эквивалента основания, которое добавили к 1 литру буферного раствора; pH_1 – водородный показатель раствора до добавления основания; pH_2 – водородный показатель раствора после добавления основания [2, 15].

1.6. Определение концентрации ионов водорода с помощью индикатора

Концентрацию (рН) ионов водорода можно определить с помощью индикаторов. Индикаторами являются слабые органические кислоты или основания, а их недиссоциированные формы отличаются от окрашенных диссоциированных форм. Диссоциация индикаторов зависит от реакционной среды.

Цветовые переходы некоторых индикаторов в зависимости от рН среды. Цвет индикатора, интервал рН (табл.1):

Таблица 1

Цветовые переходы некоторых индикаторов в зависимости от pH среды

Цвет индикатора, интервал pH:			
Индикатор	в кислой среде	в нейтральной	в щелочной
Лакмус	красный $\text{pH} < 5$	фиолетовый $5 < \text{pH} < 8$	синий $\text{pH} > 8$
Фенолфталеин	бесцветный $\text{pH} < 8$	бледно-розовый $8 < \text{pH} < 9,8$	малиновый $\text{pH} > 9,8$
Метилоранж	красный $\text{pH} < 3,1$	оранжевый $3,1 < \text{pH} < 4,4$	желтый $\text{pH} > 6,3$

Добавляя индикатор в раствор, можно определить pH среды в зависимости от образовавшейся окраски.

Реактивы: 1) 0,15М-ный раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

2) 0,15М-ный раствор $\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

3) метил рот, бром тимоловые индикаторы.

4) универсальный индикатор.

Индикаторы могут иметь разные цвета в зависимости от р. среды. Это можно увидеть в следующем примере (табл.2):

Таблица 2

Индикаторы цвета в зависимости от р. среды

Т №	Индикаторы	Предел изменения цвета	Цвет	
			В кислотах	В щелочи
1	Метил оксид	3,1-4,4	красный	желтый
2	Метилрот	4,2-6,2	красный	желтый
3	Бромтимол	6,0-7,6	желтый	синий
4	Фенолфталеин	8,0-9,8	бесцветный	пурпурно-красный
5	Тимолфталеин	9,3-10,5	бесцветный	темно-желто-коричневый

Ход работы: В четырех пробирках готовим буферные растворы с различными pH концентрациями, взяв 0,15 М-ные

растворы KH_2PO_4 и NaH_2PO_4 в пропорциях, указанных ниже. При смешивании растворов буфер в каждом растворе делится на два.

В пробирки первого ряда добавляется метилротный индикатор. В пробирки второго ряда добавляется бромтимоловый индикатор и наблюдается изменение окраски в пробирках (табл.3):

Таблица 3

Растворы	Номера пробирок			
	1	2	3	4
0,15 М KH_2PO_4 , мл	9,5	8,0	6,0	3,0
0,15 М NaH_2PO_4 , мл	0,5	2,0	4,0	7,0
pH раствора	5,59	6,24	6,64	7,17

1.7.Определение pH с помощью универсального индикатора

Универсальный индикатор состоит из смеси нескольких индикаторов, раствор которых формирует соответствующий цвет в зависимости от pH. Состав универсального индикатора представлен в таблице 4 ниже.

Изменение цвета I-универсального индикатора находится в диапазоне pH 1-10; Изменение цвета II –универсального индикатора находится в диапазоне pH 4-10.

Таблица 4

Состав I и II универсальных индикаторов

Индикаторы	Количество (г)	
	1	2
Тимол	1	-
Бромтимол	0,8	0,4
Диметиламиноазобензол	0,6	-
Метилрот	0,4	0,2
Фенолфталеин	0,2	0,8
Этиловый спирт	1000,0	1000,0

Изменение цвета универсального индикатора выглядит следующим образом при различных значениях pH (табл.5).

Таблица 5

Изменение цвета универсальных индикаторов

I индикатор		II индикатор	
pH	цвет	pH	цвет
2	красный	4	красный
4	темно-желтый	5	темно-желтый
6	желтый	6	желтый
8	зеленый	7	зеленый
10	синий	8,5	синий
		10	фиолетовый

Возьмите семь пробирок и приготовьте указанные ниже буферные растворы. В приготовленный буферный раствор добавляют по 2 капли универсального индикатора и определяют pH каждой смеси в зависимости от образовавшейся окраски:

Таблица 6

Определение pH с помощью универсального индикатора

Растворы	Номера пробирок						
	1	2	3	4	5	6	7
Na_2HPO_4 0,1M	0,40	4,11	7,71	10,30	12,63	15,45	19,45
Количество раствора, мл Количество 0,1 M раствора лимонной кислоты, мл	19,60	15,89	12,29	9,70	7,37	4,55	0,55
pH буферного раствора	2,2	3,0	4,0	5,0	8,0	6,8	8,0

1.8. Определение pH потенциометрическим методом

Этот метод основан на измерении электродвижущей силы гальванических элементов под влиянием концентрации, ионов водорода в исследуемых растворах с помощью специальных электродов. С помощью этого метода можно точно измерить pH любой жидкости. Специальные инструменты могут использоваться для измерения pH растворов с помощью различных потенциометров. Общее устройство этих приборов и все выполняемые ими операции по измерению pH растворов

фиксируются в паспорте, который прилагается к потенциометрам (рН-метрам).

Правила работы с инструментом.

Прибор включают на 15-20 минут перед измерением рН раствора. Электроды промывают 3-4 раза свежеприготовленной дистиллированной водой. Автоматическая температурная компенсация используется для измерения рН растворов.

рН раствора сначала измеряется в большом диапазоне прибора от -2 до +14, затем в малом диапазоне, а затем электроды прибора промываются водой 7-10 раз. После промывания электродов можно измерить рН растворов. Промытые электроды оставляют в воде[18,19,65].

II ГЛАВА. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

2.1. Микроскопия

Микроскопия - имеет давнюю историю, считается самой первой методикой, освоенной для изучения клеточного строения организмов. Начало с XVII века, когда в 1611 года Й. Кеплер предложил принцип создания светового микроскопа, а А. Левенгук впервые наблюдал с его помощью одноклеточные бактерии (1638). Именно световая микроскопия, имеющая предел разрешения 0,4-0,7 мкм, позволила М.Шлейдену и Т.Швану в 1838 году создать клеточную теорию, согласно которой клетка, содержащая ядро, является структурной и функциональной единицей строения всех животных и растений. Затем Р.А.Колликер впервые в 1857 году описал митохондрии, В.Флемминг - поведение хромосом при митозе.

В развитии микроскопии существенными веками стали изобретения новых поколений микроскопов: интерференционного (1930 г.), фазово-контрастного (1932) и электронного микроскопов (1939) [12].

Способность различить два объекта называется разрешением. Разрешение оптического прибора — минимальное расстояние между двумя точками, которые видны как отдельные и не сливаются. Чем меньше это расстояние, тем более мелкие объекты можно изучать.

Разрешение человеческого глаза — порядка 100 мкм (0,1 мм), но нужно учесть, что объект должен быть контрастным. На темном фоне в боковом свете можно иногда увидеть крупных амёб и инфузорий, которые могут иметь размеры 100-200 мкм. Для того чтобы различить клетки в животной или растительной ткани, нужно делать очень тонкие срезы. Эти срезы изучают под микроскопом — специальным увеличивающим оптическим прибором. Как правило, для повышения контраста требуется окрашивание препаратов специальными красителями. Перед этим препараты фиксируют, то есть обрабатывают специальными веществами, предотвращающими растекание и разрушение биомолекул, например, формалином. Поэтому обычно изучают уже мертвые клетки.

Световая (оптическая) микроскопия

Чаще всего применяются *световые микроскопы*, в которых объект освещают видимым светом. Видимый свет — это электромагнитное излучение длиной волны от 400 до 700 нм, то есть 0,4-0,7 мкм (1 нм = м). Разные длины волн света глазом воспринимаются как разные цвета. Наиболее длинноволновый свет — красный, наиболее коротковолновый — фиолетовый.

Белый свет — это смесь лучей разных длин волн. Его можно разложить в спектр — радугу — при помощи призмы.

Длина волны накладывает ограничение на минимальный размер объектов, которые можно изучать путем микроскопии. Волна может огибать объекты, поэтому невозможно изучать объекты размером существенно меньше длины волны света. Так как длины волн видимого света — 0,4-0,7 мкм, то разрешение светового микроскопа при использовании белого света — порядка 0,5 мкм. В реальности из-за дополнительных ограничений в обычный микроскоп, как правило, можно хорошо видеть объекты порядка 1 мкм. Объекты меньше 0,5 мкм видны, только если они сами излучают свет, что используется во *флуоресцентной микроскопии*.

У светового (оптического) микроскопа имеются следующие части (рис.3-4):

1. Объектив — система линз, фокусирующая свет от объекта. Обычно имеется несколько объективов во вращающейся (револьверной) головке.

2. Окуляр — система линз, в которую смотрит наблюдатель.

3. Тубус, при помощи которого зафиксированы на определенном расстоянии окуляр и объективы.

4. Штатив.

5. Предметный столик, где располагается объект на предметном стекле.

6. Осветительная система — обычно лампа и система фокусирующих линз (*конденсор*).

7. Макровинт и микровинт для грубой и тонкой фокусировки соответственно.

Часто имеется система для перемещения препарата — препаратопроводитель, оборудованный измерительными линейками.

Объекты можно изучать в светлом поле, а также в косом свете и в темном поле, что часто позволяет существенно повысить детализацию объекта и увидеть тонкую структуру.



Рис.3. Строение светового микроскопа.

Существуют фазово-контрастные и интерференционные микроскопы, позволяющие визуализировать такую характеристику света, как фаза. При прохождении через объект фаза лучей в разной степени сдвигается. Этот тип микроскопии позволяет видеть тонкие детали в живых объектах без фиксации и окрашивания.

Флуоресцентная микроскопия используется как для изучения образцов с собственной флуоресценцией (например, хлорофилл в синем свете флуоресцирует красным), так и для изучения образцов, окрашенных определенными флуоресцентными красителями или мечеными ими антителами для выявления определенных внутриклеточных структур.



Рис.4. Общий вид светового микроскопа

Электронная микроскопия

Гораздо большего разрешения, чем световой микроскоп, позволяет добиться микроскоп, в котором для освещения объекта используется пучок электронов — электронный микроскоп. Конечно, в такой микроскоп нельзя смотреть глазом, для фиксации результатов используются детекторы электронов. Чтобы электронный пучок не рассеивался, внутри микроскопа создают вакуум.

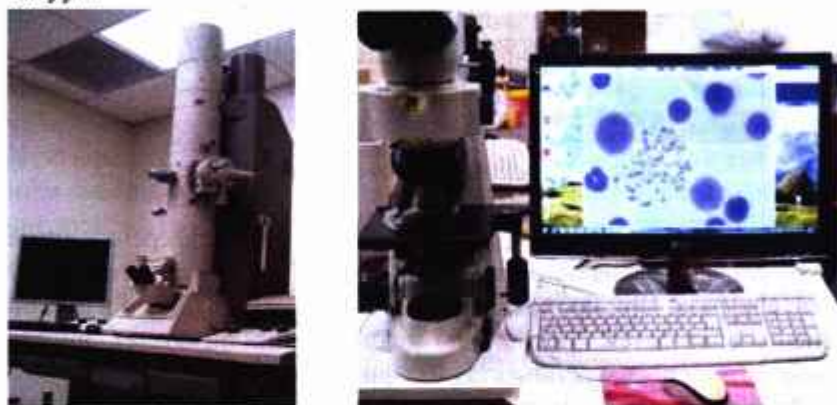


Рис.5. Общий вид электронного микроскопа

Подготовка препаратов для такой микроскопии очень сложна — их фиксируют, обезвоживают, заливают в плотную среду, делают тончайшие срезы при помощи прибора — микротомы. Также обязательно окрашивание или препаратов или напыление, как правило, солями тяжелых металлов, так как только они существенно задерживают поток электронов. Изображение получается не цветным (может быть потом «раскрашено» искусственно) [12].

Существует два типа электронных микроскопов — сканирующий и трансмиссионный (рис.5,6,7,8,9). Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) дает изображение поверхности (объект выглядит объемным), а трансмиссионный (ТЭМ), или просвечивающий, дает плоское изображение среза «на просвет». [12].



Рис.6. Сканирующий электронный микроскоп

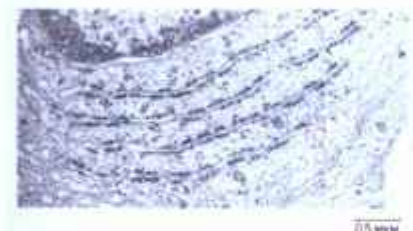
В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) образец открытый очень тонким слоем тяжелого металла, сканируется пучком электронов, который фиксирует на его поверхности электромагнитные кольца, действующие в электронном микроскопе как линзы (рис.6). Количества электронов отраженных и рассеянных каждой точкой образца при бомбардировке его пучком электронов, измеряется детектором и используется для контроля яркости соответствующих точек изображения на видеоэкране.

Микроскоп создает картинку трехмерных объектов с большей глубиной фокусом, в зависимости от модели, позволяет выявлять детали размером от 3 мм до 20 нм.

ТРАНСМИССИОННЫЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП



Из электронной микротомографии вытекает важность небольшого участка анализа образца. Ткань должна быть сфокусирована специальными реактивами и затем в вакуумной камере, затем быть окрашена очень тонким слоем, окрашенным только одним и тем же. (Поэтому, пожалуйста, Daniel S. Friedl)



электроны, когда их пучок проходит через препарат. ТЭМ дает полезное увеличение до миллиона крат и позволяет различить на биологических препаратах детали размером всего 0,2 нм.

Рис. 7. Трансмиссионный электронный микроскоп

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) на тех же принципах, что и световая микроскопия, но вместо пучка света используется пучок электронов, а для фокусировки - магнитные кольца вместо стеклянных линз. Образец, который помещают в вакуум, должен быть очень тонким. Контраст обычно достигается путем окрашивания образца электронно-плотными солями тяжелых металлов. Накапливаясь в определенных участках среза, они поглощают или рассеивают электроны, когда их пучок проходит через препарат. ТЭМ дает полезное увеличение до миллиона крат и позволяет различить на биологических препаратах детали размером всего 0,2 нм.

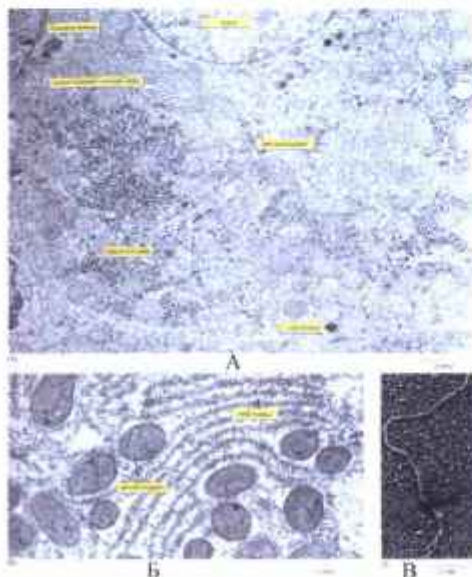


Рис.8. Снимки полученные в трансмиссионной электронной микроскопом.

Тонкое строение клетки можно увидеть в трансмиссионный электронный микроскоп. (А) Ультратонкий срез клетки печени, на котором видно множество деталей строения. (Б) Небольшой участок цитоплазмы при большом увеличении. Самые из ясно различимых структур -

рибосомы, каждая из них состоит примерно из 80-90 крупных молекул. (В) Участок длинной, нитевидной молекулы ДНК, выделенной из клетки, под электронным микроскопом.

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) дает изображение поверхности (объект выглядит объемным)



трансмиссионный (ТЭМ), или просвечивающий, дает плоское изображение среза «на просвет»

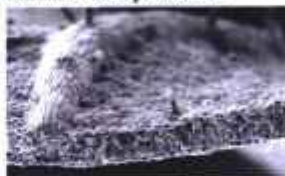


Рис.9. Изображения объектов полученных на сканирующей и трансмиссионной микроскопии.

2.2.Культивирование клеток и среды

Для изучения клеток их часто приходится культивировать, то есть выращивать на определенных питательных средах (рис.10). Это позволяет также изучать их потребности в определенных веществах, а также получать выделяемые ими молекулы.

Культура клеток - этот метод был введен в 1885 году, когда впервые было обнаружено, что клетки куриного эмбриона сохраняют жизнеспособность в солевом растворе. Начиная с 1907 года стали использовать культуры фрагментов тканей. В настоящее время используют диссоциированные культуры клеток, из которых можно получить клетки одного типа [12,75].



Рис.10. Культивирование растительных клеток

В биологии культивируемые организмы выделяют в среду полезные для человека вещества, например, антибиотики. Для того чтобы на среде росли только нужные организмы, необходимо соблюдать *стерильность* — предотвращать попадание микроорганизмов и их спор.

Для этого используют одноразовые сосуды, например, чашки Петри с крышкой, предотвращающей попадание микробов из воздуха, многоразовое оборудование стерилизуют, надевают резиновые перчатки, лабораторные халаты, используют шкафы с проточной системой циркуляции и фильтрации воздуха — ламинарии, манипуляции проводят рядом с пламенем горелки [20].

2.3. Биохимические методы

Для выделения определенных веществ из организмов их гомогенизируют — измельчают до образования однородной кашицы, затем ее подвергают другим манипуляциям и обрабатывают определенными веществами (рис.11).

В биохимии для исследования метаболизма часто применяется метод меченых атомов, когда в организм вводят соединения, содержащие те или иные радиоактивные или тяжелые изотопы, которые можно затем обнаруживать в различных веществах и отслеживать их превращения, таким образом изучая биохимические реакции в живых системах.



Рис.11.
Биохимические
методы
исследования

Метод меченных атомов применяется при изучении биологических процессов, происходящих в живых клетках. Чтобы проследить за превращениями какого-либо вещества, в него вводят радиоактивную метку, то есть заменяют в его молекуле один из атомов соответствующим радиоактивным изотопом.

Как известно, по химическим свойствам изотопы одного и того же элемента не отличаются друг от друга, но зато радиоактивный изотоп сигнализирует о своем местонахождении радиоактивным излучением. Это позволяет проследить за определенным химическим веществом, установить последовательность этапов его химических превращений, продолжительность их во времени, зависимость от условий.

2.4. Центрифугирование

Чтобы разделить различные органеллы и клеточные структуры по плотности, разрушенные клетки подвергают центрифугированию — раскручиванию в специальных центрифугах.

В 40-50-е годы прошлого века А.Клюд и Ж.Браше разработали метод дифференциального центрифугирования для разделения органелл клеток, с помощью которого в 1953 году de Duve впервые выделил лизосомы, а затем пероксисомы. В 1957 году М.Месельсон, У.Сталь и Дж.Виноград разработали метод центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия для разделения нуклеиновых кислот, с помощью которого было установлено осуществление репликации ДНК полуконсервативным путем [12].



Рис.12. Центрифугирование

Ротор центрифуги вращается очень быстро (десятки или даже сотни тысяч оборотов в минуту). Под воздействием центробежной силы все частицы в пробирке оседают. Центробежную силу характеризуют по сообщаемому ею ускорению, называя, во сколько раз оно превышает g — ускорение свободного падения, например, часто используется $13\ 000\ g$. Можно использовать плотные растворы солей для разделения частиц по их плавучей плотности. При длительном центрифугировании раствора тяжелой соли, например, хлористого цезия, создается градиент плотности — переход плотности в растворе, где более плотный раствор находится внизу и менее плотный — вверх. Если центрифугировать в этом растворе различные частицы, они останавливаются в том слое жидкости, где плавучая плотность частиц равна плотности окружающего раствора. Таким образом, можно разделить различные макромолекулы и молекулярные комплексы, например, субъединицы рибосом.

Этот метод широко используется в молекулярно-биологических исследованиях для выделения внутриклеточных компонентов и макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) (рис.12) [12,37] Метод центрифугирования основан на том, что частицы вещества, имеющие разную плотность, форму и размеры, осаждаются под действием центробежной силы с разной скоростью. Различают препаративное и аналитическое центрифугирование. Препаративное центрифугирование позволяет выделять большое количество клеточных частиц, с возможностью последующего изучения их

структуры и биологической активности. Метод применим для выделения молекул ДНК и белков из предварительно очищенных препаратов. Аналитическое центрифугирование применяется для изучения высокоочищенных препаратов (например, органелл клеток), а для этого необходимо небольшое количество материала [37]. При этом характеристической величиной является величина центробежного ускорения (G), которое прямо пропорционально угловой скорости ротора (ω , рад · с⁻¹) и расстоянию от оси вращения до середины центрифужной пробирки (r , см).

$$G = \omega^2 r.$$

При этом один оборот ротора составляет 2π радиан, поэтому угловая скорость ротора в оборотах в минуту при скорости вращения ротора (V , об/мин) равна:

$$\omega = \frac{2\pi Vr}{60}$$

Центробежное ускорение будет равно:

$$G = \frac{4\pi^2 V^2 r}{3600}$$

а относительное центробежное ускорение, выражаемое в единицах g при гравитационной постоянной, равной $980 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$, можно вычислить по формуле

$$G = 1,12 \cdot 10^{-5} V^2 r$$

2.5. Метод ультрацентрифугирования

Ультрацентрифугирование метод разделения и исследования высокомолекулярных соединений, вирусов и субклеточных частиц с помощью ультрацентрифуги. Идея ультрацентрифугирования была предложена А. В. Думанским в 1913, однако разработка современной теории седиментационного анализа стала возможной только после того, как Т. Сведберг в 1926 сконструировал высокоскоростную ультрацентрифугу, обеспечивавшую ускорение $105 g$. Принято различать 2 типа ультрацентрифугирования: препаративное и аналитическое. Препаративное ультрацентрифугирования применяют для фракционирования и выделения биополимеров в количествах, достаточных для практических целей. Широко используют ультрацентрифугирования в градиенте плотности растворов сахарозы, глицерина, декстринов.

Оно позволяет разделять смеси веществ на отдельные компоненты, различающиеся эффективной массой и коэффициентом трения частиц или молекул [37].

Применение зональных и проточных роторов дало возможность значительно повысить объёмы растворов фракционируемых частиц и использовать их для очистки вируса гриппа при изготовлении вакцин. Аналитическое ультрацентрифугирование используют для исследования гомогенности (чистоты) препаратов биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов), а также для определения констант седиментации, молекулярной массы, констант ассоциации и размеров макромолекул. Ультрацентрифугирование применяется в медицине при клинической диагностике, для приготовления кровезаменителей и т.п.

В основном ультрацентрифугирование используют в научно-исследовательской работе. Однако аналитическое ультрацентрифугирование может эффективно применяться для постановки и уточнения диагноза, например, при количественном определении липопротеидов сыворотки крови с целью установления типа липопротеинемий, для анализа иммуноглобулинов сыворотки крови, идентификации вирусов и др.

Ультрацентрифугирование производят в аналитических или препаративных ультрацентрифугах, скорость вращения ротора в которых достигает 80 000 оборотов в мин., а ускорение центробежной силы в сотни тысяч раз превышает ускорение силы земного тяготения. В таких условиях происходит седиментация не только грубых дисперсий, но и растворенных макромолекул — белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и другие.

Ротор ультрацентрифуги вращается в вакууме при давлении ок. 10^{-3} мм. рт. ст., создаваемом форвакуумным и диффузионным насосами, и приводится в движение чаще всего электрическими моторами. В аналитических ультрацентрифугах в отверстия ротора вставляют так называемые ячейки, представляющие собой металлические цилиндры с центральной вставкой, имеющей секториальную полость и зажатой между двумя кварцевыми стеклами. Объем этой полости составляет 1 мл и меньше. Объем пробирок в препаративных ультрацентрифугах зависит от максимальной скорости вращения ротора [37].

Для наблюдения за процессом седиментации и регистрации границ седиментации в аналитических ультрацентрифугах имеется

несколько оптических систем, из которых чаще всего используют абсорбционную и рефрактометрическую (шлирен-систему). Абсорбционная система регистрирует степень поглощения света раствором в ячейке в зависимости от расстояния от оси вращения. Эту систему применяют при исследовании разбавленных растворов (концентрация около 0,005%) нуклеиновых кислот (при длине волны 260 нм) и белков (при длине волны 230 нм). Шлирен-система позволяет регистрировать градиенты показателей преломления (или концентраций) в виде пиков, соответствующих границам седиментации или флотации. Шлирен-систему применяют для анализа растворов белков и других высокомолекулярных соединений с концентрацией около 0,5%.

Основными методами аналитического ультрацентрифугирования являются определение скорости седиментации и седиментационного равновесия. В первом случае речь идет о движении границы седиментации от мениска к дну ячейки или границы флотации от дна ячейки к мениску. Этот метод применяют для определения гомогенности веществ, их коэффициентов седиментации или флотации, а также для определения других параметров. При определении седиментационного равновесия при ультрацентрифугировании достигается такое состояние, когда поток вещества за счет седиментации сравнивается с потоком за счет диффузии. Этот метод используют для определения молекулярного веса (массы).

Основными методами препаративного ультрацентрифугирования являются дифференциальное, зонально-скоростное и равновесное (изопикническое) ультрацентрифугирование. Дифференциальное ультрацентрифугирование основано на раздельном осаждении частиц на дно пробирок. Для этого подбирают такую скорость и время вращения ротора ультрацентрифуги, чтобы в осадке были самые крупные частицы, а в над осадочной жидкости оставались менее крупные. При ультрацентрифугировании 1 г гомогената ткани (после его отстаивания в течение 20 мин.) при скорости вращения ротора ультрацентрифуги, соответствующей ускорению центробежной силы 1000 g через 5 - 20 мин. на дно центрифужной пробирки оседают ядра и оставшиеся неразрушенными (интактные) клетки, при 10 000 g (20 мин.) - митохондрии, лизосомы и другие, при 100 000 g (1 - 2 часа) - свободные рибосомы и микросомы, при дальнейшем центрифугировании со скоростью вращения ротора,

соответствующей ускорению примерно 400 000 g, осаждаются растворенные белки, нуклеиновые кислоты и другие макромолекулы. При зонально-скоростном ультрацентрифугировании раствор разделяемых компонентов наслаивают на более плотную среду. Последнюю готовят, создавая в пробирке для ультрацентрифугирования градиент концентрации сахарозы (применяют также глицерин, фиколл и др.). Такой градиент концентрации предотвращает конвекционное размывание зон седиментирующих компонентов. После достижения оптимального разделения зон ультрацентрифугирование прекращают, зоны извлекают (например, прокалывая дно пробирки иглой от шприца, то есть «раскапывая градиент»). Затем изучают компоненты выделенных зон по тем или иным свойствам. В этом случае разделение белков, нуклеиновых кислот и других происходит в соответствии с их коэффициентами седиментации. При равновесном (изопикническом) ультрацентрифугировании пробирки заполняют раствором разделяемых компонентов в присутствии больших количеств, например, хлористого цезия CsCl_2 (применяют также сернистый цезий Cs_2SO_4 , метризамид и др.). Вовремя ультрацентрифугирования возникает градиент плотности хлористого цезия, причем плотность раствора у мениска должна быть меньше, а плотность раствора у дна - больше плотности исследуемых компонентов. В таком случае эти компоненты будут седиментировать или флотировать до тех пор, пока не достигнут слоя, в котором плотность хлористого цезия равна плавучей плотности исследуемых компонентов (так называемая изопикническая область). При этом движение компонентов прекратится и возникнет равновесное состояние. Отбор проб производится так же, как и при зонально-скоростном ультрацентрифугировании. Разделение смеси частиц при равновесном ультрацентрифугировании осуществляется не по коэффициентам седиментации, а по плавучей плотности [22,25].

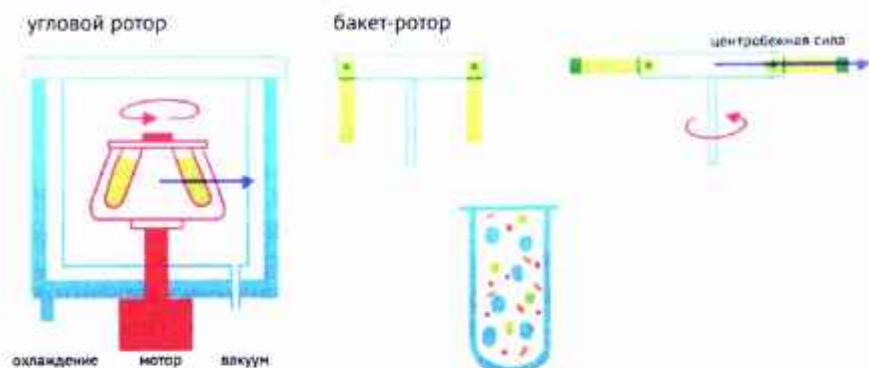


Рис.13. Центрифугирование. Вверху- устройство центрифуги. В зависимости от скорости вращения ротора и его размера центрифуга способна генерировать значительные ускорения. Роторы могут быть угловыми и бакет-роторами (с качающимися стаканами), они отличаются направлением действия центробежной силы. Внизу- схема дифференциального центрифугирования. В зависимости от силы приложенного поля получать различные фракции клетки – от самых крупных органелл (ядер, митохондрий), осаждающихся при небольших значениях относительного ускорения, до самых мелких (рибосом и др.), осаждающихся большими ускорениями (рисунок Ольги Пташник) [14].

Для препаративного ультрацентрифугирования применяют роторы разных типов. В угловых роторах пробирки вставляются в гнезда под углом к оси вращения, седиментация в этом случае происходит в направлении радиуса на стенки пробирок, а по ним — на дно пробирок. Эти роторы обычно применяют для дифференциального ультрацентрифугирования. В роторах со свободно подвешенными гильзами с пробирками (так называемое бакет-роторы) гильзы во время вращения ротора принимают горизонтальное положение и седиментация происходит параллельно стенкам пробирок. Такие роторы обычно используют для зонального и равновесного ультрацентрифугирования с градиентами концентрации или плотности поддерживающей среды. Для этих же целей стали использовать так называемые зональные роторы. Эти роторы имеют большую внутреннюю полость, в которой создание градиента (напр., концентрации сахарозы) и

отбор проб происходит при малых скоростях вращения ротора (ок. 2000—3000 оборотов в мин.), а разделение осуществляется при максимальных скоростях его вращения [22,25].

2.6.Хроматография

Хроматография - впервые был изобретен русским ученым М.С.Цветом, который в 1906 году фракционировал окрашенные экстракты листьев растений на колонках с порошком мела.

В настоящее время существует большое количество вариантов хроматографии, в которых используются матрицы (носители) разных типов, позволяющие разделить белки по заряду (ионнообменная хроматография), по размеру молекул (гель-хроматография) и способности специфически взаимодействовать с определенными химическими веществами, предварительно связанных а матриксом (аффинная хроматография) (рис.14) [12,20].



Рис.14.Тонкослойная хроматография

Хроматография основана на разной скорости движения через адсорбент растворенных в специальном растворе веществ. При пропускании такого раствора через адсорбент каждое вещество из смеси передвигается на определённое расстояние в зависимости от своей молекулярной массы.

Адсорбентами могут быть волокна фильтровальной бумаги, порошок целлюлозы и другие пористые вещества.

2.7.Электрофорез

Электрофорез - этот метод основан на способности белков, обладающих определенными суммарными положительными и

отрицательными зарядами, перемещаться в электрическом поле в соответствии с величиной заряда, размером и формой молекулы. Электрофорез можно проводить в буферном растворе или в пористых носителях: агарозном, крахмальном и полиакриламидном геле, на целлюлозных и нитроцеллюлозных пластинах.

Простейший метод электрофореза на пластинах целлюлозы был использован В.Ингрэном в 1956 году при фракционировании фрагментов протеолитического расщепления гемоглобина человека. С помощью этого метода были получены пептидные карты - «фингерпринты» - отпечатки пальцев.

Часто используемый метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) был разработан в 1959 году С.Рэймондом и затем усовершенствован Б.Дэвисом и Л.Орнштейном. В 1966 году Дж.Майзелем было предложено модификация данного метода электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия (рис.15,16) [12,20, 22].

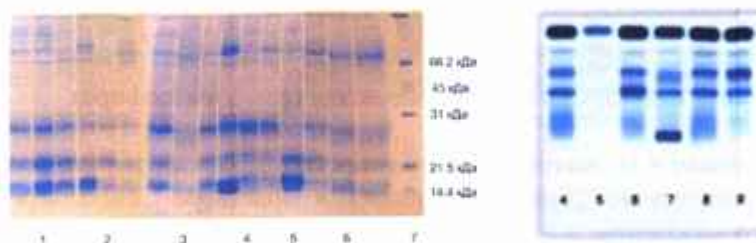


Рис.15. Электрофорез

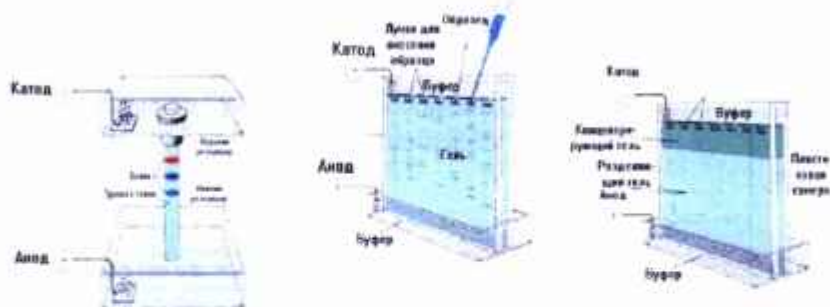


Рис.16. Строение прибора для гель-электрофорез

Близким к хроматографии является метод электрофореза в геле, где разделению смеси веществ в растворе способствует электрический ток.

Методы хроматографии и электрофореза позволяют разделить смеси веществ, выделенные из клетки, определить их качественный и количественный состав.

Для разделения смеси белков на компоненты используется метод электрофореза: в электрическом поле отдельные белковые молекулы с определенной скоростью перемещаются к одному из электродов. При этом одни белки двигаются в сторону катода, другие перемещаются к аноду.

2.8.Изоэлектрофокусирование

Изоэлектрофокусирование - 70-х годов XX века в Швеции был разработан метод разделения белков в электрическом поле. Метод основан на фракционировании белков в определенном значении pH, задаваемом электрофоретическим буферным раствором. При

изоэлектрофокусировании белки разделяют в градиенте pH, создаваемым с помощью специальных реагентов (амфолинов). В процессе изоэлектрофокусирования белки передвигаются в электрическом поле в строгом соответствии только зарядом молекул и останавливаются (фокусируются) в тех точках градиента pH, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам, то есть, где молекулы становятся электро-нейтральными. Метод позволяет не только тонко разделить белки по заряду, но и быстро и точно определить их изоэлектрические точки (рис.17).

Разработанное в 1975 году П.Офареллом сочетание методов изоэлектрофокусирования и электрофореза ПААГ с СДС получило название *двумерного электрофореза* [25].

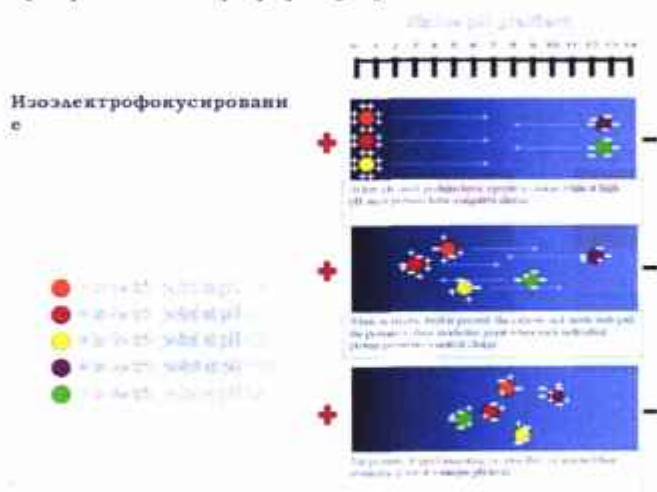


Рис.17. Изоэлектрофокусирование.

2.9.Метод рекомбинантных генов

Рекомбинация - процесс обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул нуклеиновых кислот, то есть перераспределение генетического материала, приводящее к созданию новых комбинаций генов (рис.18).

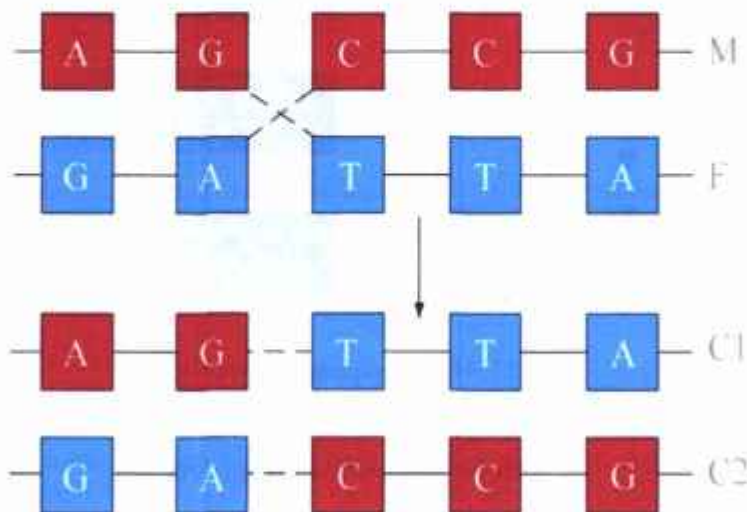
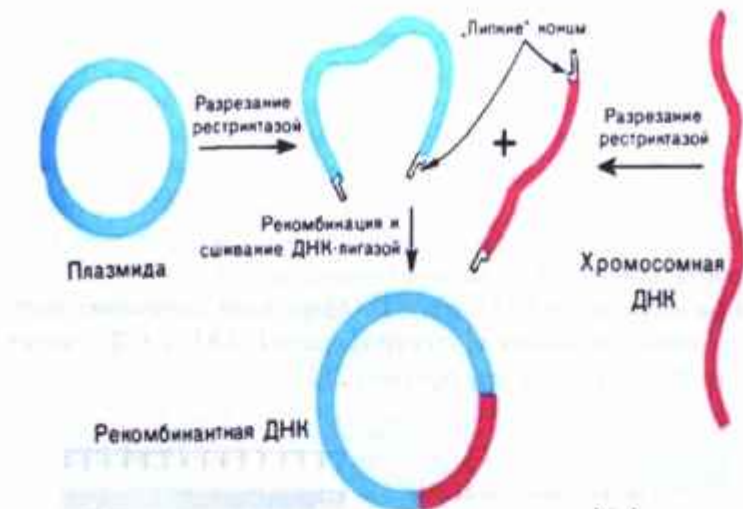


Рис. 18. Схема генетической рекомбинации.

В естественных условиях рекомбинация у эукариот — обмен участками хромосом в процессе клеточного деления. У прокариот рекомбинация осуществляется при передаче ДНК путём конъюгации, трансформации или трансдукции, либо в процессе обмена участками вирусных геномов.

Суть этой технологии заключается в соединении фрагментов ДНК *in vitro* с последующим введением рекомбинантных генетических структур в живую клетку [22,75].

Метод рекомбинантных генов применяют для изучения механизма наследственности и мутагенеза. Метод рекомбинантных ДНК «вырезают» из клетки, встраивают её в генетический аппарат бактерии или вируса и изучают её структуру, синтезируют новые гены, переносят их из эукариотических клеток в бактериальные и стимулируют их работу.

Методом рекомбинантных ДНК были получены генетически модифицированные растения и трансгенные животные, обладающие новыми полезными для человека свойствами. Рекомбинантные структуры используются в медицине в методах генной терапии, диагностике и создании рекомбинантных вакцин [7,11,16,40]

Рекомбинация происходит в результате физического разрыва в хромосомах (М) и (F) последующего соединения с образованием двух новых хромосом (C₁ и C₂) [11].

III ГЛАВА. ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

3.1. Гомогенизирование

Гомогенизация тканей - это процесс, используемый для подготовки образцов тканей для определенных типов исследований. Это включает в себя побуждение клеток к лизированию или распаду на части, чтобы высвободить их содержимое. Устройства, предназначенные для гомогенизации тканей, используются во многих лабораториях, и для определенных типов клеток могут использоваться специальные методы, например, когда клетки трудно разрушить из-за их структуры.

Разработан ряд методик для исследования изолированных отделов клетки. Для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем гомогенизируют в за буферной 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, то есть 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 [8].

3.2. Приготовление гомогената из растительных и животных тканей.

3.2.1. Приготовление гомогената из растительных тканей

В физиолого-биохимических исследованиях используются семена, корни, корневища, корнеплоды, стебли, листья, цветки растений. Перед началом анализа исследуемый образец взвешивают на аналитических весах, а затем ткань измельчают. Все

операции производят при низкой температуре, с охлаждением инструментов, используемых во время опытов, а реактивы должны быть помещены в ледяную баню. Если разрушение растительных тканей проводили на механической мельнице, то перед экстракцией помол необходимо взвесить, так как часть образца ткани во время измельчения может быть потеряна. Для измельчения растительных тканей с низкой влажностью (5-15%) используют механические мельницы. Разрушение тканей с высокой влажностью (65-90%) проводят на гомогенизаторах. Ткани со средней влажностью (15-65%) обычно предварительно высушивают в сушильных шкафах с вакуумом при низкой температуре (60-70°C), что обеспечит максимальную сохранность в них функционально активных веществ. Перед началом экстракции биогенных соединений из разрушенных тканей растений необходимо правильно подобрать растворитель. Экстракцию полярных, заряженных соединений проводят, используя полярные растворители (вода, 50%-ный раствор этанола, ацетон). Экстракцию гидрофобных компонентов гомогената тканей проводят, используя неполярные растворители (гексан, хлороформ, диэтиловый эфир и др.) или водные растворы с детергентами (тритоны: X-45, X-100, X-114, X-102, X-165, X-305; бридж: 35, 56, 58; луброл PX и WX; твин: 20, 40, 60, 80 и др.). Для полного разрушения растительных и животных тканей используют ультразвук. Отделение неразрушенных клеток и ядер проводят центрифугированием. Режим центрифугирования подбирается индивидуально. Так, гомогенат ткани для энзимологических исследований центрифугируют со скоростью (7000 - 12000)·g в рефрижераторных центрифугах при 0°C. Полученный после центрифугирования супернатант хранят в холодильнике при +4°C. Расчет объема супернатанта производят путем сложения величин объемов предварительно определенной в исследуемой растительной ткани гидровлаги и раствора, взятого для экстракции биогенных соединений. Качественный и количественный состав веществ, содержащихся в супернатанте, определяют, используя стандартные методики. Следует придерживаться следующего правила при выборе методики. Используемый метод должен быть специфичным, т.е. исключать возможность побочных реакций, затрудняющих интерпретацию полученных результатов, и легко воспроизводимым [27,37,45,60].

Целое растение или его часть после взвешивания подвергают гомогенизированию путем механического растирания в ступке при постоянном охлаждении. Полученную однородную массу центрифугируют. Над осадочную жидкость подвергают исследованию.

Зерновки с влажностью 8-10% и другие сухие части растений измельчают на мельнице 2 г зерновок измельчают в течение 1 мин. Полученный сухой порошок взвешивают и растворяют в бидистиллированной воде или другой среде выделения, охлажденной до 0°C, в соотношении 1:3 (на 1 г зерновок добавляют 3 мл охлажденной среды выделения). После перемешивания исследуемый образец центрифугируют при 7000g.

Над осадочную жидкость (супернатант) используют для биохимических исследований [45].

3.2.2. Приготовление гомогената из животной ткани

Хотя исследование гомогенатов тканей практически не применяется в клинко-диагностических лабораториях, оно широко используется для научных целей в экспериментальных работах, также может проводиться исследование биопсийного материала и кусочков ткани, взятой во время операции.

Целью гомогенизации является разрушение тканевой структуры клеточных стенок и или мембран. Гомогенат ткани может быть использован как материал для исследования активности ферментов, содержания различных метаболитов, а также для дальнейшего фракционирования клеточных компонентов.

Выбор метода разрушения клеточной структуры и среды суспендирования зависит от ткани, а также от целей исследования.

Навеску ткани, отмытую от крови, быстро измельчают ножницами или пропускают через металлический пресс, иногда растирают в ступке с кварцевым песком (мышечная и соединительная ткань). Все процедуры проводятся максимально быстро и на холоду.

Для приготовления гомогенатов тканей из таких органов, как печень, селезенка, тимус с целью максимального сохранения клеточных структур чаще всего используют стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком типа Поттера и Даунса — соответственно с ручным или механическим приводом.

Эффективность гомогенизации зависит от скорости вращения пестика (800-1000-2000 об/мин), зазора между пестиком и стаканом (обычно 0,14-0,16 мм), количества движений пестика вверх-вниз (8-10 движений) и времени гомогенизации (0,5-1,5 мин). Стакан гомогенизатора обязательно помещается в ледяную баню, полученный гомогенат фильтруют через один слой капрона или 3-4 слоя марли, чтобы отделить неразрушенные кусочки ткани [19].

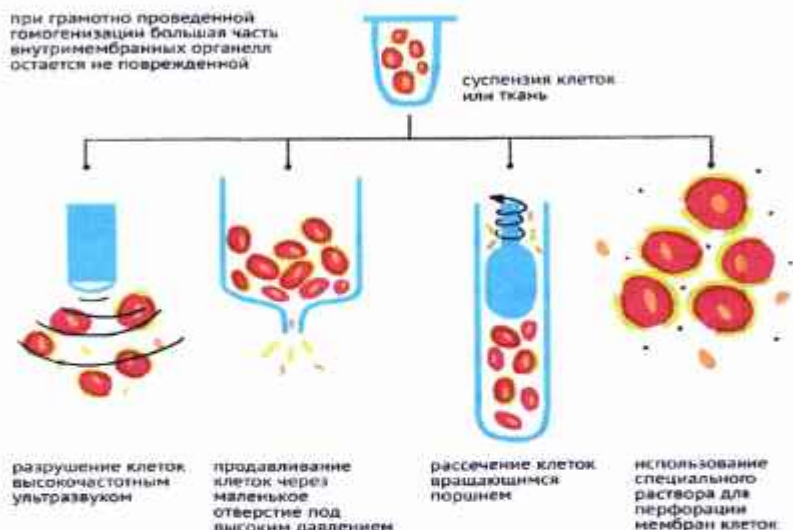


Рис.19. Общая схема разрушения биологического материала для получения отдельных субклеточных фракции (рисунок *Ольги Пташник*) [14].

Результат гомогенизации можно контролировать морфологически с использованием так называемых "витальных" красителей типа акридинового оранжевого, определяя процент неразрушенных клеток, или биохимически, определяя активность ферментов цитозоля и субклеточных частиц.

К другим методам разрушения тканевой и клеточной структуры относятся: действие осмотического шока, многократное замораживание-оттаивание, обработка ферментами (трипсин, лизоцим, β -галактуридаза, липаза), обработка органическими растворителями (толуол, этилацетат), ультразвуком, высоким давлением.

Гомогенизация

Среда суспендирования для гомогенизации тканей обычно имеет нейтральное значение pH и необходимое осмотическое давление, предохраняющее частицы от набухания и разрыва. Готовится она чаще всего на основе буферного раствора (обычно трис-HCl, pH=7,4) с добавлением 0,25 М сахарозы или 0,2 М KCl. Иногда добавляют вещества, препятствующие инактивации ферментов (например, этилендиаминтетраацетат — ЭДТА, связывающий двухвалентные ионы металлов или глутатион, препятствующий переокислению липидных компонентов).

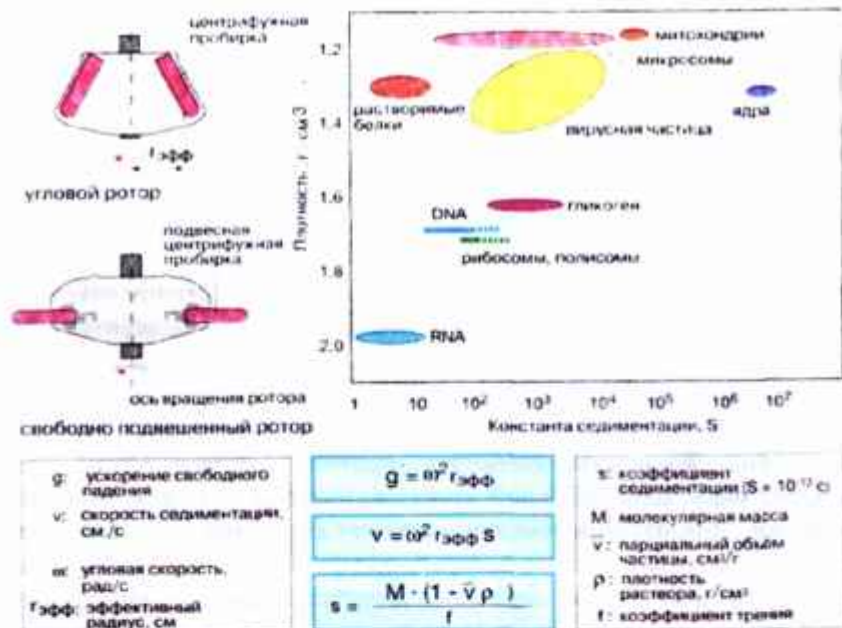
Соотношение ткань/среда (вес/объем) может быть различным. Обычно готовят исходный 10% гомогенат (1 г ткани на 9 мл среды).

3.3.Центрифугирование

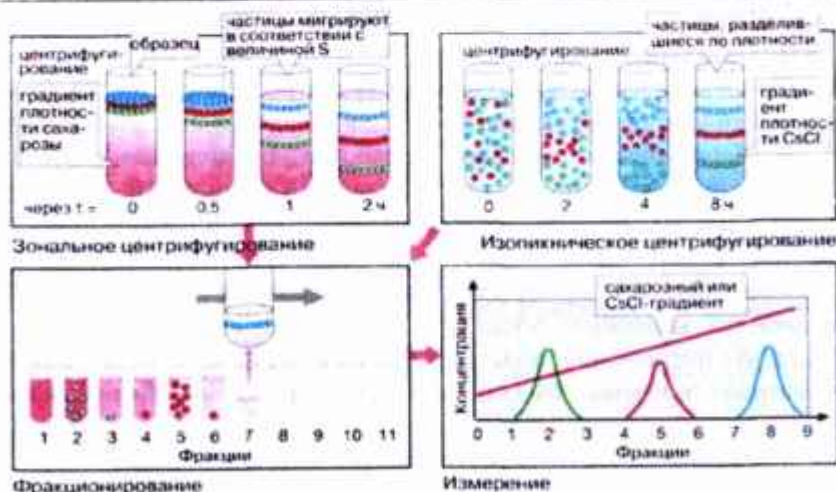
Центрифугирование — разделение неоднородных систем (например, жидкость — твердые частицы) на фракции по плотности при помощи центробежных сил. Центрифугирование осуществляется в аппаратах, называемых центрифугами. Центрифугирование применяется для отделения осадка от раствора, для отделения загрязненных жидкостей, производится также центрифугирование эмульсий (например, сепарирование молока). Центрифугирование бетона применяется для увеличения его прочности. Для исследования высокомолекулярных веществ, биологических систем применяют ультрацентрифуги. Центрифугирование используют в химической, атомной, пищевой, нефтяной промышленности (рис.20).



Рис. 20. Роторы и пробирки центрифуги



А. Основы метода центрифугирования



Б. Центрифугирование в градиенте плотности

Рис.21. Методы центрифугирования и центрифугирование в градиенте плотности

Метод центрифугирования применяется практически во всех сферах человеческой деятельности: в науке и медицине, промышленности, сельском хозяйстве, в быту и в технологических областях [17,37,45].

Различные методы центрифугирования: для разделения веществ может применяться и другой метод осаждения — отстаивание, когда сепарация происходит под воздействием гравитации. Как правило, обработка в аппаратах-отстойниках предшествует центрифугированию и является подготовительным этапом работы.

Непосредственно метод центрифугирования делится на отстаивание, фильтрацию и осветление.

Фильтрация осуществляется с использованием перфорированного барабана, на котором установлено фильтрующее вещество. Жидкость свободно проходит сквозь него под воздействием центробежной силы, а твёрдые частицы остаются снаружи. Для отстаивания применяются барабаны со сплошными стенками, в нижнюю часть которых подаётся суспензия. В процессе осадок выделяется на стенках, а жидкость образует внутренний слой, затем переливающийся за край.

И, наконец, осветление также протекает в сплошных барабанах, представляя из себя процесс свободного осаждения частиц под воздействием центробежного поля.

По своей физической сущности, фильтрационные и отстойные методы сильно различаются.

В барабанах-отстойниках обработка проводится с целью очистки жидкости, содержание загрязнений и примесей в которой достаточно незначительно, путём уплотнения осадка и осаждения твёрдых частиц.

При этом от процесса с использованием гравитации это отличается коренным образом — в первую очередь из-за того факта, что отстаивание является достаточно равномерным процессом, а центрифугирование, из-за непараллельности линий центробежного поля, достаточно непостоянным методом. Два метода различаются по самой своей сути, и это необходимо учитывать.

Фильтрационное центрифугирование устроено несколько сложнее, поскольку протекает, как правило, в три этапа: сначала идёт образование осадка, затем уплотнение, потом устранение жидкости. Фильтрование центробежной силой также сильно

отличается от фильтрации при помощи «обычной» гравитации. Сходным можно назвать только первый этап.

Использование центрифугирования в разных областях

Метод получил огромное распространение и используется практически в любой сфере деятельности. Встретить его можно в биологии и медицине, лабораторной диагностике, пищевой промышленности; он давно и успешно заменяет собой более традиционные и менее эффективные процессы фильтрации, отжимания и очистки.

Промышленные центрифуги имеют большую мощность и более сложное устройство ротора, благодаря которому одновременно можно обрабатывать много вещества. Их применяют в сфере сельского хозяйства для извлечения мёда из сот и очистки зерна, отделяют в них жир от молока сепарацией, также они весьма распространены в сфере обогащения руд. Найти центрифугу можно даже в прачечной — там в ней производят отжим белья после стирки.

Лабораторные центрифуги с достаточно медленной скоростью вращения ротора используются для отделения сыворотки крови, осадков мочи, при серологических исследованиях и для осаждения эритроцитов. Лабораторные разновидности дополнительно подразделяются на клинические, стационарные, рефрижераторные, настольные и угловые малогабаритные: каждая применяется в своей сфере лабораторных исследований в зависимости от целей и задач медицинского центра.

3.4.Разделение клеточных компонентов методом ультрацентрифугирования

С помощью ультрацентрифугирования разделяются компоненты клеточной структуры и макромолекулы, изучаются отдельно.

Суть метода заключается в том, что биологические макромолекулы с разной молекулярной массой осаждаются с определенной скоростью.

Ультрацентрифуга была впервые открыта в 1925 году шведским ученым Сведбергом. Современные ультрацентрифуги работают в системе высокого вакуума. Его ротор вращается со скоростью 80 000 об / мин, а центробежная сила может увеличить гравитационную силу Земли (g) до 500 000. Осаждение частиц под действием такой силы называется седиментацией. При

ультрацентрифугировании скорость осаждения компонентов называется коэффициентом седиментации, который представляет собой важную характеристику биологических макромолекул, и эта единица называется Svedberg, в честь изобретателя и обозначается буквой S. Коэффициент седиментации биологических макромолекул составляет от 1 до 200S [25].

Для изучения биохимических процессов, происходящих в клетке, компоненты клеток выделяют в чистом виде.

Принцип работы с центрифугой: Центрифугирование - метод разделения жидких дисперсных сред на компоненты под воздействием центробежной силы. При отделении осадка от раствора с помощью центрифуги перед работой необходимо ознакомиться с техническим описанием и инструкцией по эксплуатации центрифуги и соблюдать следующие правила: Рабочая поверхность должна быть ровной и твердой. Не используйте центрифугу на неровной или наклонной рабочей поверхности. Снять крышку с центрифуги и поместить в противоположные гнезда уравновешенные пробирки с разделяемой смесью. При работе на центрифуге следует использовать только специальные центрифужные (конические) пробирки. Закрывать центрифугу крышкой, установить необходимую скорость центрифугирования и включить центрифугу переключателем. После окончания центрифугирования выключить центрифугу, дождаться её полной остановки и лишь после этого открыть крышку. Запрещается включать центрифугу с открытой крышкой и останавливать центрифугу рукой или каким-либо предметом. Вынуть пробирки с отделенными осадками из центрифуги. В случае ненормальной работы центрифуги (удары, вибрация, посторонний шум и т.д.) её необходимо остановить и сообщить преподавателю или лаборанту. Запрещается работать на неисправной центрифуге (рис.23) [37].

Необходимые инструменты: ножницы; пинцет; скальпель; гомогенизатор; стеклянные стержни; пипетки - 2 мл, 5 мл, 10 мл, центрифуга; центрифужные растворы; пробирки; очки; воронка; бинт; фильтровальная бумага; Буфер ТКМ из 0,25 М сахарозы - pH-2Н; 0,001 М-трис, 0,0025 М калий, 0,0025 М магний; печень крысы.

Ход работы. Все процессы проходят в холодном помещении (0-4 ° С). Крысу забивают и отделяют печень. Ткань сначала промывают холодным буфером, а затем тщательно размельчают

ножницами. Полученную массу помещают в гомогенизатор (специальную стеклянную емкость) и натирают тefлоновым стержнем, соединенным с электродвигателем.

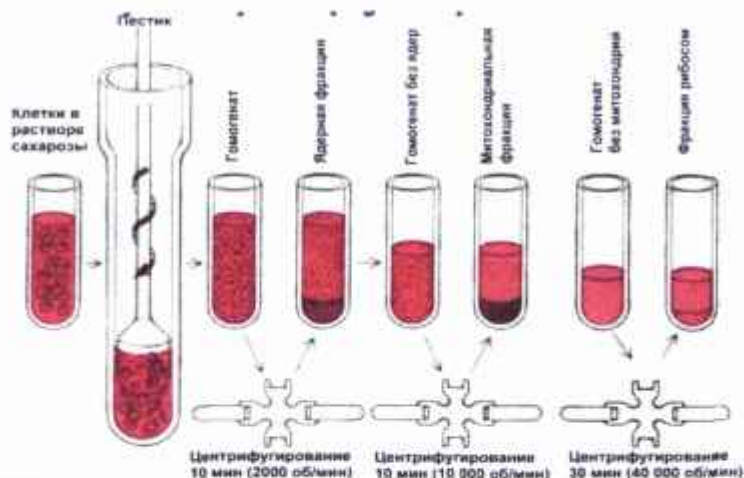


Рис.22. Схема выделения клеточных компонентов методом ультрацентрифугирования [45].

Этот процесс называется гомогенизацией. Одну часть измельченной ткани и 10 частей измельченного буфера получают для гомогенизации, и этот процесс продолжают до тех пор, пока не образуется такой же массовый гомогенат [19].

Центрифугирование. Вверху - устройство центрифуги. В зависимости от скорости вращения ротора и его размера центрифуга способна генерировать значительные ускорения. Роторы могут быть угловыми и бакет-роторами (с качающимися стаканами), они отличаются направлением действия центробежной силы. Внизу - схема дифференциального центрифугирования. В зависимости от силы приложенного поля можно получать различные фракции клетки - от самых крупных органелл (например, ядер), осаждающихся при небольших значениях относительного ускорения, до самых мелких (рибосом и пр.), осаждающихся большими ускорениями (рисунок Ольги Пташник) (рис.22, 29) [34].

Гомогенат добавляют в пробирки и центрифугируют. Гомогенат разделяют на отдельные фракции методом дифференциального

центрифугирования. Поскольку компоненты ячейки имеют разную плотность и размер, они вращаются и осаждаются с разной скоростью, схема фракционирования которой показана выше [25].



Рис.23. Виды лабораторных настольных центрифуг

3.5.Выделение клеточных органелл растительной клетки

Для того чтобы изучить состав и функции клеток и субклеточных органелл, применяют метод дифференциального центрифугирования. Дифференциальное центрифугирование субклеточных органелл основано на различии в их размерах и плотности. Дифференциальное центрифугирование используется для разделения компонентов гомогената на ряд фракций (обычно пять): ядра, хлоропласты, митохондрии, рибосомы и над осадочная фракция (смесь растворимой фазы цитоплазмы с растворимым содержимым вакуоли и любых других разрушившихся органелл). Каждая из фракций осаждается при определенной скорости центрифугирования и времени. При высокоскоростном центрифугировании крупные компоненты клетки (например, ядра) быстро оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высоких скоростях в осадок выпадают более мелкие компоненты, такие как хлоропласты и митохондрии. Разрушение клеток проводят в изотонической среде в гомогенизаторах. Полученную однородную массу (гомогенат) затем разделяют на фракции методом центрифугирования, теория которого излагается по Л. А. Остерману [25, 27].

1. Выделение клеточных ядер из растительной ткани

В клетках эукариот, имеющих ядра значительной величины, отделение их от других органелл достигается дифференциальным

центрифугированием. При выделении ядер из растительного материала возникают значительные трудности, связанные с особенностями клеток растений. Введение в среду выделения гексиленгликоля (2-Methyl-2,4-pentanediol) и соли защищает ядра от разрушения, добавление не ионного детергента (Triton X-100) облегчает высвобождение ядер из клеток и предотвращает агрегацию ядер.

Методика выделения интерфазных клеточных ядер основана на выделении субклеточных структур растительных клеток с использованием разделения их на составные части центрифугированием. При центрифугировании крупные ядра оседают (седиментируют) при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки [1,12,27,38].

Материалы и оборудование: 1) семена злаковых растений (*Secale cereale* L.) 2) гексиленгликоль (2-Methyl-2,4-pentanediol), 3) PIPES-KOH, 4) магний хлористый ($MgCl_2$), 5) Triton X-100, 6) меркаптоэтанол (2-mercaptoethanol), 7) ингибитор протеаз (PMSF), 8) фарфоровая ступка с пестиком, 9) miracloth (марля), 10) электронные весы, 11) pH-метр, 12) магнитная мешалка с якорем, 13) автоматические вариопипетки, 14) пробирки центрифужные (2 шт.), 15) центрифуга с охлаждением, 16) воронка, 17) колотый лед (хладозлемент), 18) глицерол, 19) детергент (мыльный раствор), 20) фильтровальная бумага, 21) поддон, 22) термостат, 23) перчатки, 24) шпатель, 25) ножницы

Ход работы:

1. Подготовка растительного материала

Посадка семян: Семена злаковых обработайте детергентом (промойте мыльным раствором) и поместите на поддон, покрытый увлажненной водопроводной водой фильтровальной бумагой. Поддоны поместите в термостат при температуре 22°C и проращивайте в темноте в течение 2 суток.

Срезка проростков: Проростки срежьте и измельчите ножницами. Взвесьте 10 г растительного материала.

2. Приготовление буферов для выделения интерфазных клеточных ядер Приготовление буфера для гомогенизации растительного материала: Состав буфера для растирания (РБ):

1M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль);

10 mM PIPES-KOH (pH 7,0);

10 mM $MgCl_2$;

0,2% Triton X-100;
5 mM 2-mercaptoethanol;
0,8 mM PMSF

Приготовление буфера для отмывки клеточных ядер.

Состав буфера для отмывки (ОБ):

0,5M 2-Methyl-2,4-pentanediol (гексиленгликоль);
10 mM PIPES-KOH (pH 7,0);
10 mM $MgCl_2$;
0,2% Triton X-100;
5 mM 2-mercaptoethanol;
0,8 mM PMSF

2. Выделение интерфазных клеточных ядер

1. Измельчение растительного материала: Навеску растительной ткани (10 г), измельченную ножницами на кусочки длиной 1-2 см в предварительно охлажденных ступках на холоду, разотрите пестиком с добавлением 40 мл РБ буфера до однородной массы. Консистенцию гомогената контролируйте визуально.

2. Фильтрация: Перенесите гомогенат из ступки с помощью шпателя в воронку с 4 слоями miracloth (или 6 слоями марли) и профильтруйте в центрифужную пробирку. Полученный фильтрат - это клеточный сок, содержащий органеллы и загрязненный обрывками клеток и крахмала.

3. Осаждение ядер: Экстракт отделите от осадка центрифугированием в бакет-ротаторе в течение 20 мин при 25g и температуре 4°C. При центрифугировании осаждаются 9 обрывки клеток и крахмал. Осторожно (т.к. осадок рыхлый) отделите супернатант от осадка. Далее супернатант, содержащий ядра и другие органеллы, центрифугируйте при 350g при температуре 4°C в течение 20 мин. При этом ядра осаждаются. Осторожно слейте супернатант. В дальнейшей работе используйте осадок.

4. Отмывка ядер: Осадок осторожно ресуспендируйте с 8 мл ОБ буфера на льду, и центрифугируйте при 800g и температуре 4°C в течение 10 мин. Повторите отмывку еще 2 раза.

5. Получение препарата клеточных ядер: К осадку добавьте 2 объема буфера для отмывки ядер (ОБ) (соотносительно с объемом осадка) и осторожно ресуспендируйте ядра.

6. Хранение препарата: К полученному осадку с ОБ добавьте равный объем стерильного глицерола, разделите на равные аликвоты и храните в морозилке (-20°C).

3. Выделение митохондрий из растительной ткани

Митохондрии занимают значительную часть цитоплазмы почти во всех эукариотических клетках. Получение функционально активных митохондрий из растений связано с рядом определенных трудностей. В первую очередь, к ним относится наличие плотных и жестких клеточных оболочек, вызывающих механические повреждения при растирании клеток. Отрицательную роль играют кислая реакция клеточного сока, выделяющегося в процессе гомогенизации ткани, а также содержащиеся в значительном количестве во многих растительных клетках фенольные соединения, являющиеся разобщающими агентами и 15 ингибиторами.

Другие особенности растительных тканей (например, высокое содержание крахмала, хлорофилла, масел и т.д.) также оказывают влияние на качество и чистоту изолированной митохондриальной фракции. Поэтому для получения интактных митохондрий в каждом конкретном случае, в зависимости от объекта и его физиологического состояния, необходимо подбирать оптимальные условия выделения органелл.

Материалы и оборудование: 1) семена растений озимой ржи или др. злаков, детергент, перманганат калия (KMnO_4), 2) бидистиллированная вода, сахароза, 3) MOPS (буфер - морфолинопропан-1-сульфониевая кислота), 4) ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), хлорид калия (KCl), 5) хлорид магния (MgCl_2), 6) цистеин, 7) бычий сывороточный альбумин (БСА), 8) соляная кислота (HCl), 9) гидроксид калия (KOH), 10) ступка и пестик (гомогенизатор), 11) капроновая ткань, 12) электронные весы, 13) pH-метр, 14) магнитная мешалка с якорем, 15) автоматические вариопипетки 16) мерный цилиндр (100 мл), 17) пробирки центрифужные, 18) центрифуга с охлаждением 19) кисточка (стеклянная палочка с резинкой), 20) воронка, 31) колотый лед (хладозлемент), 32) фильтровальная бумага, 33) шпатель, 34) ножницы, 35) термостат, 36) стеклянный стакан (50, 100, 200 мл) и воронка.

Ход работы:

1. Получение растительного материала: Семена злаков (озимой пшеницы) промойте детергентом, слабым раствором KMnO_4 , затем водой. Выращивайте в кювете на влажной фильтровальной бумаге в термостате (в темноте) при $24-26^\circ\text{C}$. По истечение 3-х суток срежьте побеги. Нарезанные побеги длиной 2-3

см промойте дистиллированной водой, обсушите и поместите на несколько минут в холодильник. Взвесьте 30 г растительного материала.

2. Приготовление сред для получения препарата митохондрий: Все растворы для выделения митохондрий готовятся на бидистиллированной воде. Во время всей процедуры выделения растворы и посуда должны быть хорошо охлажденными (находиться в воде со льдом, холодильнике или на хладоэлементе). Все среды готовят накануне выделения митохондрий и на ночь оставляют в холодильнике. В начале рассчитайте необходимый объем всех сред. Среда выделения готовится в соотношении 1:4 (на 30 г растительного материала требуется 120 мл среды). Перед процедурой выделения митохондрий в среду выделения добавляют цистеин (50 мг/100 мл). Среда промывания - готовится 20 мл среды (10-12 мл используется). Среда ресуспендирования - готовится 10 мл среды (к митохондриям добавляется 0,6 мл). pH всех сред доводят до 7,4. Раствор 20% БСА готовится на среде промывания и хранится в морозильной камере. БСА связывает жирные кислоты и фенольные вещества, которые интерферируют с митохондриальной фракцией, а также работает как субстрат для протеаз для защиты митохондриальных белков от повреждений. В стеклянном стакане растворите указанные компоненты, за исключением цистеина, доведите pH (при постоянном перемешивании) до значения 7,4 и бидистиллированной водой доведите до нужного объема. Затем раствор профильтруйте, отлейте объем, необходимый для среды промывания и для среды ресуспендирования. В среду ресуспендирования добавьте необходимые компоненты, доведите pH до значения 7,4. В оставшуюся после фильтрации среду (объем среды выделения) добавьте цистеин, перемешайте, доведите pH до значения 7,4 и профильтруйте. Растворы поместите в холодильник.

2.1 Приготовление среды для выделения митохондрий:

Состав среды выделения (pH 7,4, г/100 мл)

Концентрация вещества Количество в г/100 мл среды

300 мМ сахараза 10,260

40 мМ MOPS 0,837

5 мМ ЭДТА 0,186

10 мМ KCl 0,075

1 мМ $MgCl_2$ 0,009

0,1% БСА 0,100

0,05% цистеин 0,050

2.2 Приготовление среды для промывания митохондрий:

Состав среды для промывания, pH 7,4. Среда для промывания состоит из тех же компонентов, что и среда выделения, за исключением цистеина.

Концентрация БСА - 0,4%.

300 мМ сахараза

40 мМ MOPS

5 мМ ЭДТА

10 мМ KCl

1 мМ $MgCl_2$

0,4% БСА

2.3 Приготовление среды для ресуспендирования митохондрий:

Состав среды ресуспендирования, pH 7,4. Среда для ресуспендирования имеет такой же состав, что и среда промывания, но не содержит БСА.

300 мМ сахараза

40 мМ MOPS

5 мМ ЭДТА

10 мМ KCl

1 мМ $MgCl_2$

Выделение митохондрий:

30 г растительного материала поместите в стакан, замороженный в лед (или помещенный на холодоэлемент) и залейте средой выделения (60 мл).

В среду выделения предварительно добавьте раствор 0,1% БСА (0,6 мл 20% раствора БСА на 120 мл среды выделения = 0,1% БСА).

Навеску измельчите ножницами, быстро и тщательно разотрите в ступке пестиком (или измельчите в гомогенизаторе).

Полученный гомогенат профильтруйте через капроновую ткань, залейте оставшейся средой выделения и отожмите пинцетом в химический стакан с воронкой.

Отфильтрованный гомогенат разлейте по центрифужным пробиркам, которые попарно уравновесьте.

В течение всей процедуры выделения химический стакан с воронкой и капроновой тканью, центрифужные пробирки находятся на льду или холодильнике.

Уравновешенные пробирки центрифугируйте при $2000 \times g$ в течение 3 мин при 40С. Надосадочную жидкость (супернатант) быстро и осторожно перелейте в чистые охлажденные центрифужные пробирки, уравновесьте и центрифугируйте при $3000 \times g$ в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте.

Центрифужные пробирки опрокиньте на фильтровальную бумагу, чтобы дать стечь оставшейся жидкости.

Одну центрифужную пробирку поместите в стаканчик со льдом, залейте половиной объема среды промывания и аккуратно промойте осадок с помощью охлажденной кисточки.

Общий объем среды промывания - 12 мл (перед промыванием в среду добавьте 0,4% БСА (0,3 мл 20% БСА на 12 мл среды = 0,4% БСА). Слейте промытый осадок в следующую пробирку с осадком, опять промойте и так до тех пор, пока не останется только одна пробирка. Оставшейся средой вторично промойте уже промытые пробирки и слейте в одну.

Центрифужную пробирку уравновесьте такой же пробиркой, наполненной водой и центрифугируйте при $3000 \times g$ в течение 5 мин. Супернатант слейте и отбросьте, осадок ресуспендируйте с помощью кисточки в 0,6 мл охлажденной среды ресуспендирования. Пробирка с суспензией митохондрий поместите в стакан со льдом и используйте для работы. Суспензию митохондрий можно хранить в холодильнике в течение 30-60 мин [17,27,36, 60].

3.6. Выделение клеточных органелл животной клетки

Выделение ядер из животной ткани

Ядра изолировали из нормальной ткани печени крыс по методу Блобела и Поттера в модификации Кузьминой с соавторами [19].

Для изоляции ядер животных забивают декапитацией для более полного обескровливания. Быстро извлекается печень и помещает её на охлажденную среду, содержащую 0,25М сахарозу на буфере ТКМ (буфер ТКМ содержит 0,005М $MgCl_2$, 0,025 М KCl и 0,001М трис- HCl , pH-7,5). Охлажденную ткань печени измельчается ножницами и гомогенизируют при $+4^{\circ}C$ в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема с тефлоновым пестиком в 0,25М сахарозе на буфере ТКМ. Полученный гомогенат фильтруется через 4 и затем 8 слоев марля и центрифугируется при 300-400g в течение 10 минут. Центрифугат используется для получения митохондрий.

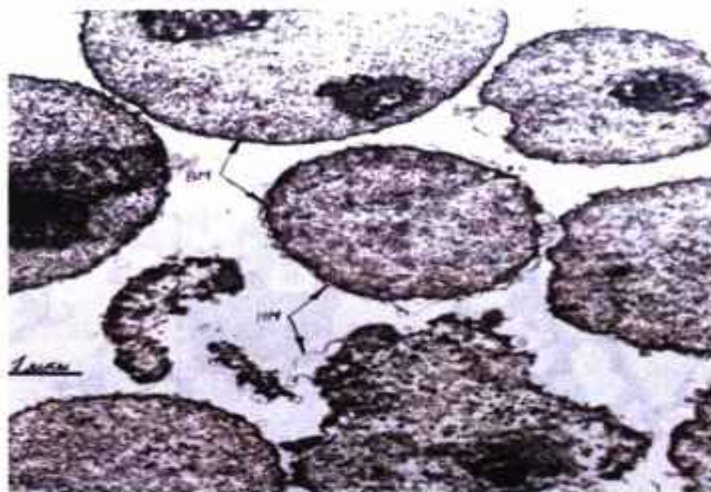


Рис.24. Электронная микрофотографии изолированных ядер из нормальной и регенерирующей печени крыс[13].
 BM – внутренняя мембрана ядерной оболочки;
 NM – наружная мембрана ядерной оболочки

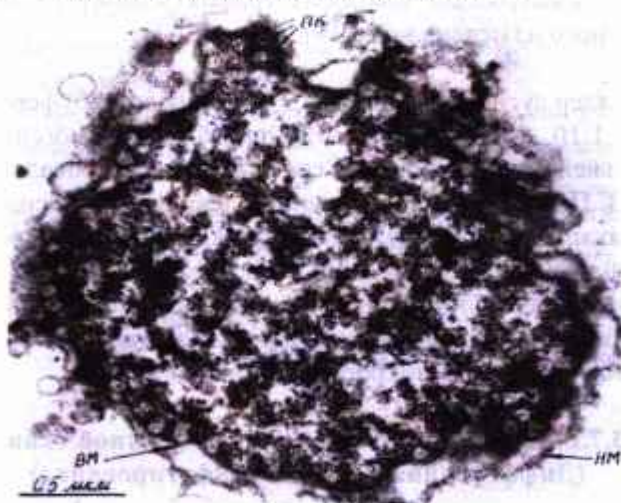


Рис.25. Электронная микрофотография ядра, изолированного из печени крыс через 18-20 часов после частичной гепатэктомии. Увеличение 50.000х
 ПК – поровые комплексы ядерной оболочки;
 BM – внутренняя мембрана ядерной оболочки;
 NM – наружная мембрана ядерной оболочки.



Рис.26. Электронная микрофотография ядерного матрикса, изолированного из печени крыс[19].

Осадок ядер суспендировали в 2,2 М сахарозе на буфере ТКМ в отношении 1:10 по объему, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера Эльвейема в течение 15 сек и центрифугировали 40 мин при 50 000 д. После центрифугирования осадок ядер суспендировали в 0,25 М сахарозе на буфере ТКМ и осаждали центрифугированием при 300-400 д в течение 5-7 мин, и еще раз промывали 0,25 М сахарозой на буфере ТКМ с последующим центрифугированием в тех же условиях. Чистота изолированных ядер контролировалась при помощи электронной микроскопии (рис.24, 25, 26).

3.7.Выделение митохондрий из животной ткани (Дифференциальное центрифугирование)

Митохондрии - внутриклеточные органеллы большинства эукариотических клеток, имеющие собственную ДНК. Митохондрии - энергетические станции клеток. Метод дифференцированного центрифугирования для исследования субклеточных структур, в частности митохондрий, разработал доктор Альберт Клод.

получивший Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1974 году.

В данном эксперименте рассматривалось выделение митохондрий из клеток печени крыс методом центрифугирования. В процессе выделения использовались новые бакеты уникальной формы, бакетный ротор R8S, который можно применять для высокоскоростного центрифугирования с охлаждением при ускорении $11\ 500 \times g$ и конические пробирки объемом 50 мл (рис.27) [37].

Оборудование: центрифуга: высокоскоростная центрифуга с охлаждением, ротор, бакетный ротор, пробирки: 50 мл пробирки с коническим дном.



Рис.27. Бакетный ротор

Ход работы:

1. Приготовьте 10% гомогенат печени крыс (количество ткани: от 10 до 20 г);
2. Центрифугируйте при скорости 1 800 об/мин, ускорении 600 $\times g$, в течение 10 минут, при $+4^{\circ}\text{C}$, режимы ускорения/торможения - 9/9;
3. Перенесите супернатант в 50 мл коническую пробирку;
4. Центрифугируйте при скорости 5 600 об/мин, ускорении 5500 $\times g$, в течение 20 минут, при $+4^{\circ}\text{C}$, режимы ускорения/торможения - 9/9;

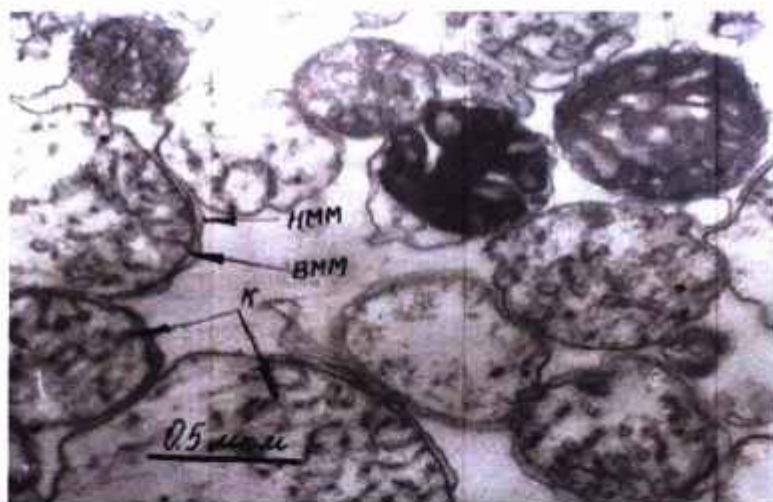


Рис.28. Электронная микрофотография изолированных митохондрий из печени крыс через 18-20 часов после частичной гепатэктомии. Увеличение: - 45.000х [19].

НММ - наружная митохондриальная мембрана

ВММ - внутренняя митохондриальная мембрана

К – кристы.

5. Слейте супернатант. При декаптации слегка встряхните пробирку несколько раз, чтобы избавиться от красно-коричневой липосомной фракции в верхней части осадка. Добавьте необходимое количество 0.25-ти молярного раствора сахарозы в желто-коричневый осадок митохондрий и снова центрифугируйте при скорости 5 800 об/мин, ускорении 6000 x g, в течение 15 минут, при +4°C, режимы ускорения торможения - 9/9;

Чем больше раз повторять вышеописанную операцию, тем выше степень чистоты выделенных митохондрий, однако при повторях снижается их активность, поэтому рекомендуется повторять вышеописанную операцию не более двух раз.

Осадок: фракция митохондрий (Рис.28)

Выделение митохондрий из животной ткани

Среда для выделения митохондрий содержала следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20

мМ HEPES; свободного от жирных кислот БСА в концентрации 2 мг/мл; все компоненты были растворены в Milli-Q воде; pH 7.4.

Среда для промывки митохондрий содержала следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; все компоненты были растворены в Milli-Q воде; pH 7.4.

100% Перколл содержал следующие компоненты: 220 мМ маннитол; 100 мМ сахарозу; 1 мМ ЭГТА; 20 мМ HEPES; все компоненты были растворены в 100% Перколле; pH 7.4.

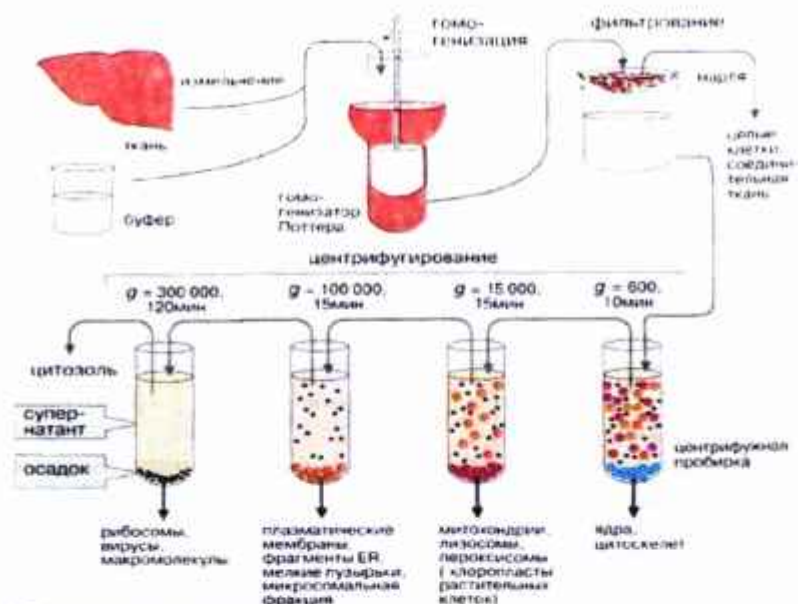
23% раствор Перколла был приготовлен из 100% Перколла путем его растворения в среде для промывки митохондрий.

Метод 1. Выделение митохондрий без градиентного центрифугирования.

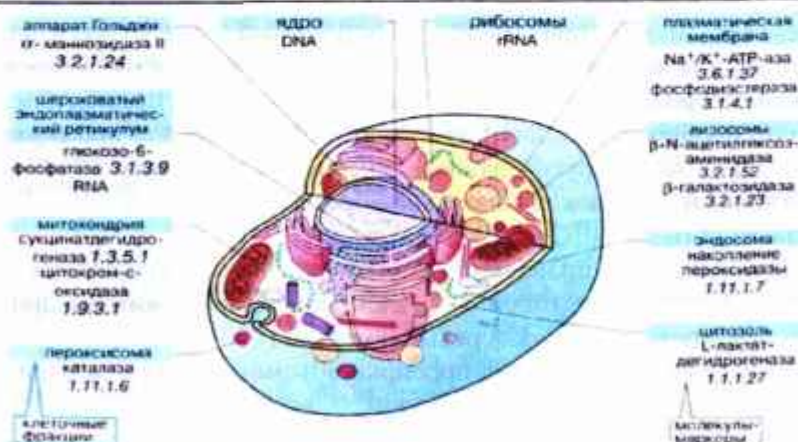
Ткани промывались в среде выделения и гомогенизировались в стеклянном Dounce-гомогенизаторе в 15 мл среды выделения при температуре +4°C. Полученный гомогенат переносили в охлажденную центрифужную пробирку и доводили до нужного объема средой выделения. Гомогенат це пробирку, доводили до нужного объема средой промывки. Проводили центрифугирование в течение 10 мин при 10000 g. Полученный осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл охлажденного до +4°C раствора среды центрифугировали 5 мин при 600 g. Супернатант переносили в чистую пробирку, доводили до нужного объема средой промывки. Проводили центрифугирование в течение 10 мин при 10000 g. Полученный осадок тщательно ресуспендировали в 1 мл охлажденного до +4°C раствора среды.

Промывки и проводили повторное центрифугирование в течение 10 мин. при 10000 g. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в 50 мкл среды промывки [17].

Гомогенат переносили в пробирки объемом 1.7 мл и доводили до нужного объема средой выделения. Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Полученный супернатант переносили в чистые пробирки и доводили до нужного объема средой промывки.



А. Выделение клеточных органелл



Б. Молекулы-маркеры

Рис.29. Выделение клеточных органелл и молекулы-маркеры [45].

Метод 2. Выделение митохондрий методом градиентного центрифугирования.

Ткани промывали в среде выделения и гомогенизировали в стеклянном Dounce-гомогенизаторе в 6 мл среды выделения при температуре +4°C. Осаждение фракций свободных митохондрий и синапсом осуществляли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при 14000 g. Полученный супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл среды промывки. После этого осадок перекомбинировали в одну чистую пробирку и аккуратно наносили по 200 мкл сверху на 23% раствор Перколла. Центрифугирование в градиенте Перколла проводили в течение 15 мин при 23000 g при ускорении центрифуги равном 6. После центрифугирования наблюдалось разделение на 3 фазы. Аккуратно удаляли верхний и плотный средний слой. Нижний слой ресуспендировали и добавляли среду промывки до объема 1.7 мл. Следующую промывку осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 18000g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали и перекомбинировали в одну пробирку и центрифугировали при 14000 g 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 20 мкл среды промывки.

Осадок: фракция митохондрий.

IV ГЛАВА. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКА И АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕКТЕ

Белки — это природные полимеры, состоящие из остатков сотен и тысяч аминокислот, соединенных пептидной связью. От набора аминокислот и их порядка в полипептидных цепях зависят индивидуальные свойства белков.

В молекуле аминокислоты содержится несколько функциональных групп: аминогруппа, карбоксильная группа и радикалы (остатки). Число их может быть разным.

По степени сложности белки делятся на *протеины* (простые белки), состоящие только из остатков аминокислот, и *протеиды* (сложные белки), состоящие из белковой и небелковой частей. Небелковая часть протеидов может быть представлена нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеиды), фосфорными кислотами (фосфопротеиды), углеводами (гликопротеиды).

К простым белкам относятся альбумины, глобулины и глютелины. Альбумины и глобулины составляют основную часть белков сыворотки крови, яичного белка и молока. Глютелины относятся к растительным белкам и встречаются в семенах злаков, образуя основную массу клейковины [4,20].

Кроме того, существуют и структурные белки (протеиноиды), которые являются белками животного происхождения. Они выполняют в организме опорную функцию, нерастворимы в воде, устойчивы к перевариванию ферментами. К ним относятся кератины — белки волос, ногтей; эластины — белки связок, соединительной ткани сосудов и мышц; коллагены — белки костной, хрящевой и плотной соединительной ткани. При длительном нагревании коллаген превращается в водорастворимый глютин (желатин).

Различают четыре структуры организации белка:

- первичная — последовательное соединение аминокислотных остатков в полипептидной цепи;
- вторичная — закручивание полипептидных цепей в спирали;
- третичная — свертывание полипептидной цепи в глобулу;
- четвертичная — объединение нескольких частиц с третичной структурой в одну более крупную частицу.

Реакция на присутствие белка основаны на наличии в нем отдельных химических групп и на его физико-химических

свойствах. Ряд цветных реакций на белок направлены на обнаружение той или иной аминокислоты, входящей в состав белка. Поэтому для установления наличия белка недостаточно какой-либо одной реакции [17].

Известные реакции обнаружения белков и пептидов можно разделить на следующие группы:

1. Реакция на пептидную связь, характерную для белков и пептидов;
2. Реакции на α -аминогруппу и α -карбоксильную группу, которую дают аминокислоты и некоторые другие соединения;
3. Реакция на боковые радикалы или отдельные аминокислоты [35].

4.1. Методы выделения и очистки белков

Последовательность операций по выделению белков обычно сводится к измельчению биологического материала, экстрагированию белков (переводу их в растворенное состояние) и, выделению исследуемого белка из смеси других белков, очистке и получению индивидуального белка. Все операции проводят при температуре, близкой к 0°C и не применяют сильных кислот и оснований, чтобы избежать денатурации.

Исходный биологический материал измельчают при помощи ножевых или пестиковых гомогенизаторов, часто используют валковые или шаровые мельницы. Кроме того, применяется метод попеременного замораживания и оттаивания ткани, в основе разрушающего действия которого лежат разрывы клеточной оболочки, вызванные кристалликами льда. Для разрушения тканей используют также ультразвук, пресс-методы и метод "азотной бомбы", который заключается в насыщении клеток азотом под высоким давлением, а затем резким сбрасыванием давления - выделяющийся газообразный азот как бы "взрывает" клетки.

Измельченную ткань заливают экстрагентом, в качестве которого используют 8-10% растворы солей, буферные смеси, органические растворители, а также не ионные детергенты - вещества, нарушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами, между белковыми молекулами. Однако ими пользуются осторожно, чтобы не нарушить третичную (четвертичную) структуру белков. Из органических соединений

используют водные растворы глицерина и слабые растворы сахарозы. Так как растворению и стабилизации белков способствуют кислые и слабощелочные среды, то в качестве буферных смесей используют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси. Нерастворимые части ткани осаждают центрифугированием. В над осадочной жидкости содержатся растворимые белки.

Главная трудность выделения индивидуального белка в его отделении от остальных белков, так как все белки обладают сходными свойствами и их разделение основано на небольших различиях в свойствах разных белков [17].

Имеется ряд методов выделения белков.

1. Избирательная денатурация. Многие белки денатурируются и выпадают в осадок при нагревании раствора до 50-70°C или при подкислении до $\text{pH} \approx 5$. Если выделяемый белок выдерживает эти условия, то часть посторонних белков можно удалить из раствора таким способом.

2. Высаливание представляет собой процесс осаждения белков из раствора при добавлении различных солей. Чаще всего используют зависимость растворимости белков от концентрации сульфата аммония. Если в раствор добавить небольшое количество $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (например, 10 г на 100 мл раствора), то наименее растворимые белки выпадут в осадок. Осадок отделяют центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляют еще 10 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и получают второй осадок. Продолжая эту процедуру, получают ряд фракций: в одной из них содержание искомого белка больше, чем в других.

3. Методы ионно-обменной хроматографии и электрофореза основаны на различиях в количестве и природе ионогенных групп аминокислотных радикалов. Для хроматографии белков применяют ионообменники на основе целлюлозы или других гидрофильных полимеров.

Электрофорез применяют в различных вариантах. Наиболее простой из них - электрофорез на бумаге. Полоску фильтровальной бумаги пропитывают буферным раствором и включают ее в электрическую цепь с постоянным током. Процедуру проводят в герметически закрытой камере. Белки из электрофореграммы обнаруживают, обрабатывая полоску красителем, связывающимся с белками и образующим цветные соединения. После окончательного

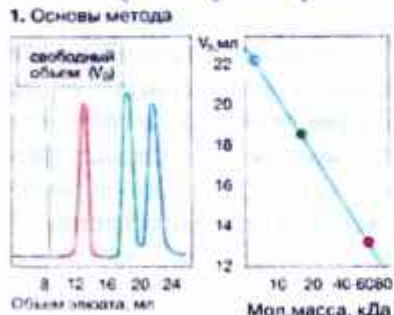
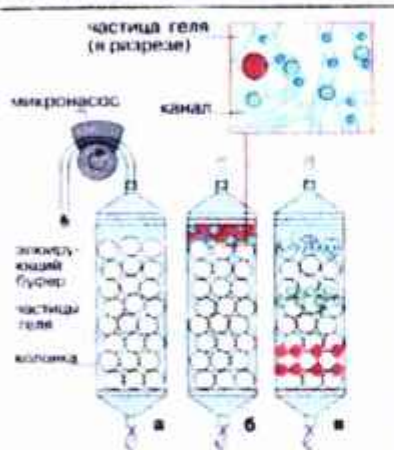
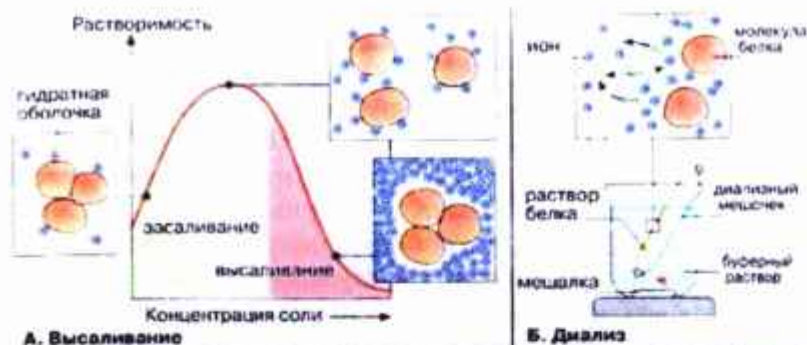
разделения белков на фракции, в зависимости от заряда белковой молекулы, отдельные белки вымывают (предварительно разрезав полоску на части) подходящим растворителем и осаждают. Для получения больших количеств очищенного белка вместо полоски бумаги в этом методе используют толстый блок какого-либо инертного материала - крахмала, целлюлозного порошка или полимеры, образующие гели - агар, полиакриламид.

3. Методы гель-фильтрации и ультрацентрифугирования основаны на различиях белков по молекулярной массе.

Молекулярная масса белков достигает десятки и сотни тысяч атомных единиц массы (а.е.м., или Да). Для определения молекулярных масс белков разработаны специфические методы. Наиболее распространенный из них - метод ультрацентрифугирования, разработанный шведским ученым Сведбергом. Он основан на измерении скорости седиментации веществ. Во вращающемся роторе ультрацентрифуги центробежное ускорение достигает 100000-500000 g (g - ускорение свободного падения). На поверхность буферного раствора, налитого в кювету ультрацентрифуги, наносят тонкий слой раствора белка и кювету помещают в ротор. При вращении ротора более плотные, чем растворитель, молекулы белка перемещаются в направлении от оси вращения. Положение белковой зоны регистрируют специальной оптической системой по показателю преломления, который больше в зоне белка, чем в буферном растворе (рис.30) [37].

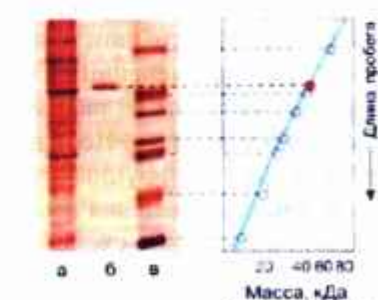
Более просто молекулярную массу белка можно определить методом гель-фильтрации, или молекулярного просеивания. Метод основан на применении специальных полимерных веществ (например, сефадекса), набухшие зерна которых имеют поры определенного размера. Небольшие молекулы легко проходят в эти поры, а диффузия крупных молекул затруднена. Это явление и лежит в основе разделения веществ методом гель-фильтрации.

Принципиальная схема метода изображена на рисунке приведенном ниже. Белковый раствор вместе с буфером перемещаются вдоль колонки между гранулами сефадекса. Белки проходят медленнее, чем буферный раствор, причем тем медленнее, чем меньше молекулярная масса белка, так как их молекулы легче диффундируют внутрь гранул сефадекса.



2. График элюирования
В. Гель-фильтрация

3. Определение мол. массы



4. Определение мол. массы

Рис.30. Методы выделения и анализа белков [45].

В результате в колонке образуются отдельные зоны белков: чем ниже расположена зона, тем больше молекулярная масса белка.

Белковые фракции, различающиеся молекулярной массой, собирают в отдельные пробирки и идентифицируют хроматографически.

Между объемом вымывания (объем буферного раствора, затраченный на вымывание из колонки данной фракции - V , мл) и логарифмом молекулярной массы ($\lg M$) - линейная зависимость. Предварительно колонку калибруют, пропуская через нее растворы стандартных белков с известной молекулярной массой [17].

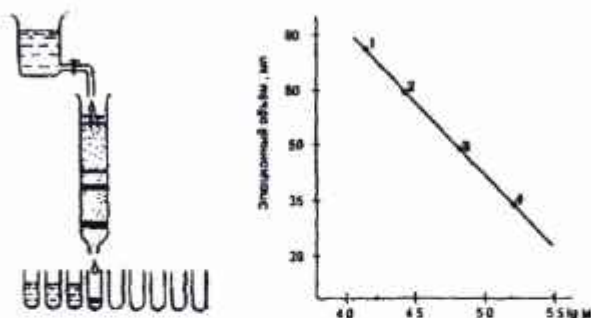


Рис.31. Принципиальная схема метода гель-фильтрации и ультрацентрифугирования [37,45].

4.2. Экстракция белков из биологических объектов

Чтобы определить качество белков, их сначала нужно разделить в чистом виде. Это один из признаков биологической ценности белков. Его аминокислотный состав проявляется в общем количестве белков, которые он выводит из организма.

Используется метод Т. Б. Плешкова при выделении белков от растений [27].

Реактивы: растительный материал, жидкий азот, боратный буфер (рН-10), 0,2%-ный раствор бисульфата натрия, белковый спирт, 1%-ный и 10%-ный раствор уксусной кислоты, 0,2%-ный раствор каустической соды, трихлорацетат, 50%-ный раствор кислоты, ацетон, этиловый спирт, диэтиловый эфир.

4.2.1. Экстракция общих белков из растений

Существуют разные способы разделения белков из разных органов растений. Берут образец из лекарственного растения сenna, 50-100 г свежего материала (листья, стебли, плоды или других вегетативных органы) и замораживают в холодильнике или с

использованием жидкого азота. Затем замороженный образец измельчают в гомогенизаторе или фарфоровой ступке с раствором боратного буфера (рН-10) в соотношении 1: 4 до образования однородной массы. Чтобы повысить растворимость белков при измельчении, добавьте немного 0,2%-ного раствора бисульфата натрия и 3-4 капли октилового спирта для предотвращения вспенивания. Полученный гомогенат замораживают в холодильнике, затем размораживают на шейкере 1-2 часа. По истечении времени его центрифугируют 10-15 минут со скоростью 3000 оборотов в минуту. Перелить раствор в мерную колбу до объема 500 мл. Осадок экстрагируют еще 5-6 раз небольшим объемом буферного раствора. Каждый раз при центрифугировании гомогената растворы переливают в мерную колбу. Весь объем раствора в колбе для экстракции до метки заполняют дистиллированной водой.

Количество растворенного азота должно составлять 90-95% от общего азота в растении. Чтобы определить белок в растворе по Келдалю, возьмите 20 мл раствора, а также на основе этого можно определить общий азот в тестируемом растительном материале.

Для осаждения растворенных белков раствор наливают в химический стакан ёмкостью 1000 мл и с помощью 10% -ного раствора уксусной кислоты доводят до рН 4,4-4,5. рН раствора определяется с помощью бумажного индикатора. Если среда становится кислой, ее рН можно снизить до 4,4-4,5 с помощью щелочи. Стакан с раствором нагревают на водяной бане до 70°C, осажденные белки центрифугируют и отделяют. Осажденные белки промывают уксусной кислотой. Для этого в центрифужную пробирку вливают 1%-ный раствор уксусной кислоты, перемешивают осадок, центрифугируют и выливают раствор на осадок.

Белки повторно осаждаются, чтобы разделить их более чистом виде. Для этого в центрифужные пробирки наливают 0,2 Н раствор каустической соды, хорошо перемешивают осадок и переливают жидкость из пробирки в стакан. Пробирку еще несколько раз промывают 0,2 Н раствором едкого натра, и их также добавляют к жидкости в химическом стакане. Жидкость в химическом стакане перемешивают на водяной бане при 50°C до полного растворения белков. Нерастворимые частицы отделяют центрифугированием.

Для повторного осаждения белков в стакан, содержащий раствор белка, добавляют 50% трихлоруксусную кислоту до тех пор, пока конечная концентрация в растворе не станет 5%. В этом случае осажденные белки отделяют центрифугированием. Осадок белка в растворе центрифуги промывают ацетоном (5-6 раз), горячим этиловым спиртом (1-2 раза) и эфиром (2-3 раза) (при центрифугировании эфиром крышка центрифуги должна быть открыта). Каждый раз после центрифугирования жидкость на осадке сливается. Полученные таким образом белковые препараты сушат и хранят при комнатной температуре в вакуум-эксикаторе. Общий азот в оксидных препаратах определяют по методу Кельдаля. Получаемые белковые препараты представляют собой белый или светло-серый порошок, содержащий 14-16% азота [27,36].

4.2.2. Экстракция (разделение) белков на отдельные фракции

Для более глубокого изучения белков необходимо разделить их на фракции. Разделение белков на фракции основано на их растворении в разных растворителях.

Белки, выделенные из тканей растений, последовательно экстрагируются водой (альбумины), спиртом (проламины) и щелочными растворами (глобулины). Фракционирование белков также проводится в холодильных камерах при температуре около 4°C.

Ход работы: Взять 25-50 г исследуемого растительного материала, зафиксировать жидким азотом и заморозить в холодильнике. Затем замороженный материал гомогенизируют с водой (1:4) или измельчают в фарфоровой ступке до образования однородной массы. Полученную однородную массу переносят в колбу и встряхивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Это обеспечивает полное растворение белков. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов.

При отделении белков от семян растений семена сначала измельчают в муку мелкого помола. Их жиры и масла разделяются с помощью эфира и ацетона. Порошки ацетона сушат в эксикаторе. Взять 5-10 г ацетонового порошка, смешать с 30-60 мл воды и встряхивать в течение 1 часа с помощью механического шейкера. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов [27,36].

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

4.2.3. Экстракция водорастворимых белков

Последующие рабочие процедуры выполняются равномерно, независимо от растительного материала. После того, как белковые растворы вынут из холодильника, их центрифугируют и жидкость в осадке переливают в большой стакан. Осадок в центрифужном растворе гомогенизируют с трехкратной массой воды, помещают в колбу и встряхивают в течение 30-40 минут. Затем его снова центрифугируют и жидкость в осадке выливают снова в тот же стакан. Экстрагируют водой, повторяют центрифугирование еще 4-5 раз. В этом случае водорастворимые белки полностью экстрагируются, а осадок смешивается с 1М раствором хлорида калия в объеме, в 4-5 раз превышающем массу, и оставляется в холодильнике.

Когда ткань растения экстрагируется водой, в раствор попадают не только белки, но и другие водорастворимые соединения, включая свободные аминокислоты, сахара и минеральные соли. Поэтому полученный экстракт можно рассматривать как слабый физиологический раствор. В таком растворе есть не только водорастворимые белки (альбумины), возможно частично, также проходят белки (глобулины) в солевых растворах. Экстракт диализуют в дистиллированной воде для выделения альбуминов и глобулинов. Во время диализа низкомолекулярные вещества, включая минеральные соли, попадают в воду изнутри целлофанового мешка. В мешочке остаются только белки. В конце диализа из-за отсутствия солей в целлофановом мешке белки, растворимые в солевых растворах, немедленно осаждаются, а альбумин остается в растворе. Чтобы отделить альбумины от белков, растворимых в физиологических растворах, раствор в целлофановом пакете и осадок переносят в центрифужные растворы. Пакет промывают 2-3 раза дистиллированной водой и также переливают в центрифужный пробирку. Затем его центрифугируют со скоростью 3-4 тысячи в минуту в течение 5-10 минут. Раствор переливают в мерную колбу на 250 мл. Осадок промывают 2-3 раза дистиллированной водой и центрифугируют. Все растворы переливают в мерную колбу и

доливают до линии дистиллированной воды. Этот раствор, содержащий альбумин, хранится в холодильнике.

Оставшийся осадок в центрифужных пробирках растворяют в 10-15 мл 1М растворе хлорида калия и переливают в колбу на 250 мл. Пробирки 2-3 раза промывают раствором хлористого калия и также переливают в колбу. Жидкость в колбе заполняется до линии раствором хлорида калия. Этот раствор, содержащий легко растворимые глобулины, хранится в холодильнике.

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

4.2.4. Экстракция солерастворимых белков

Растительную массу, оставленную 1М раствором хлорида калия, перемешивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Затем центробежный раствор отделяют. Осадок 3-4 раза экстрагируют 1М раствором хлорида калия и центрифугируют. Все растворы добавляются к исходному раствору и заполняются раствором хлорида калия до линии измерительного стакана. Этот раствор состоит из глобулинов.

После разделения глобулинов оставшийся осадок экстрагируют 80% -ным раствором спирта. При этом спирторастворимые белки отделяются (проламины), экстракцию длится 1 час, затем центрифугируют и белковые растворы переливают в мерную колбу.

Осадок снова 3-4 раза экстрагируют спиртовым раствором и все растворы сливают в колбу. Колба наполняется спиртовым раствором до линии. Спиртовые растворы в холодильнике не хранятся. Их можно хранить при комнатной температуре, и количество белка следует определять, как можно скорее.

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

4.2.5. Экстракция щелочно-растворимых белков

Для этого остаток в центрифужной пробирке растворяют в 0,2%-ном растворе бисульфита натрия, приготовленной 0,2 М-ном боратном буфере (pH-10). Разделение некоторых белковых фракций во многом зависит от времени нахождения растительного материала в растворителе.

После разделения всех белковых фракций оставшийся растительный материал промывают водой и фильтруют, затем

остаток нагревают до 50-60°C и сушат. Общий азот в нем определяется по методу Кельдаля.

Таким образом, 6 различных белковых фракций растительного материала представляют собой альбумины, легкорастворимые глобулины и глобулины, которые разделяются с помощью хлорида калия; экстрагируются проламины, глютелины и нерастворимый азот. Для определения количества белка из каждой пробирки берут 20-50 мл раствора (исключая конечные фракции) и в пробирке Кельдаля определяют следующие белки.

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод [5,27,36].

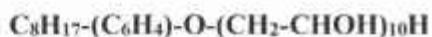
4.2.6. Экстракция общих белков из животной ткани

Современные методы измельчения тканей обычно сочетают с одновременной экстракцией белков из гомогенатов тканей. Большинство белков тканей хорошо растворимо в 8-10% растворах солей. При экстракции белков широко применяют различные буферные смеси с определенными значениями pH среды, органические растворители, а также неионные детергенты - вещества, разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами. Из органических соединений, помимо давно применяемых водных растворов глицерина, широко используют (особенно для солюбилизации) слабые растворы сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает pH среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси со значениями pH от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков. Особенно широкое распространение получили трис-буферные системы, представляющие собой смеси 0,2 М раствора трис-(оксиметил)-аминометана ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (сокращенно обозначают «Трис») с 0,1 М раствором хлороводородной кислоты в разных соотношениях. Для выделения белков сыворотки крови используют способы их осаждения этанолом (метод Кона), ацетоном, бутанолом и их комбинации. Почти все органические растворители разрывают белок-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков. Для получения из биологического материала белков в чистом, гомогенном, состоянии

применяют различные детергенты, способствующие расщеплению белок-липидных комплексов и разрыву белок-белковых связей.



Додecilсульфат натрия



Тритон X-100

В частности, для освобождения белков (ферментов), прочно связанных с биомембранами митохондрий или других субклеточных структур, применяют тритон X-100, додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия. Следует, однако, иметь в виду, что детергенты, вызывая разрыв белок-белковых связей, разрушают олигомерную (четвертичную) структуру белков.

Поскольку на растворение белков сильное влияние оказывает pH среды, большинство солей применяют в виде буферных смесей (фосфатных, ацетатных, боратных, цитратных и т.п.).

Широко используют буферные смеси, составленные с применением органических соединений:

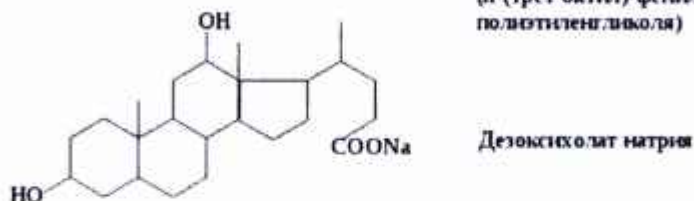
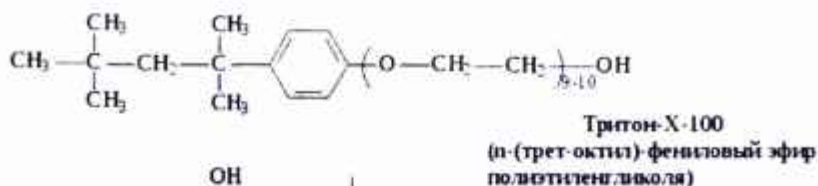
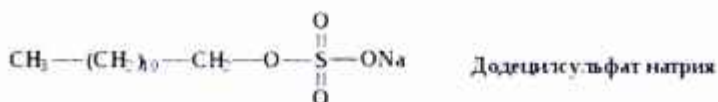
- трис-(оксиметил)-аминометан - $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ и его соль с соляной кислотой (трис-буфер);

- диэтилбарбитуровая кислота и ее натриевая соль (веронал-мединаловый буфер)

- N,N-бис(2-оксиптил)-глицин - $(\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ (бициновый буфер)

Применяемый при экстракции глицерин предохраняет белки от денатурации.

Извлечению белков из биологического материала и белково-липидных комплексов биомембран способствует обработка их детергентами - додецил сульфат натрия, тритон-X-100 и дезоксихолат натрия. Перечисленные выше методы выделения и экстракции белков применяются в основном при исследовании животных тканей.



Детергенты, используемые для экстракции белков.

Детергенты ослабляют гидрофобные белок-липидные и белок-белковые взаимодействия. В результате происходит деструкция биологических мембран и высвобождение из них структурных и функциональных белковых компонентов, например, ферментов.



Рис.32. «Методы осаждения белка» [27,45].

4.3. Методы определения количества белка в биологических объектах

Методы определения количества белка основаны на исследовании азота в тканях. В тканях и органах животных содержится в среднем 16% общего азота белков, т.е. 100 г белка содержат 16 г азота. В то же время, когда содержание азота в белках и продуктах составляет 6,25 ($100: 16 = 6,25$) при среднем содержании азота 16%, полученные и расщепленные белки становятся известными.

Определение содержания белка по азоту

Для определения азота в тканях, органах, биологических жидкостях и водных экстрактах используются три различных модификации метода Кельдаля: макрометод, полумакрометод и микрометод.

Принцип метода. Когда ткань или белок заливают концентрированной серной кислотой или щелочным катализатором (минерализация), амины, имины и другие типы азота превращаются в аммиака. В конце реакции образуется сульфат аммония и определяется его количество.

Необходимые инструменты: ножницы; скальпель; Пипетки 1 и 2 мл; Колба Кельдаля на 50 мл; Бюретка 20 мл.

Реактивы: 1. Концентрированная серная кислота.

2. 0,1 Н раствор серной кислоты.

3. 0,1 Н раствор гидроксида натрия.

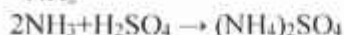
4. 33-40%-ный раствор гидроксида натрия.

5. Катализатор (пергидрол).

Ход работы: Определение общего азота в биологических объектах проводится в три этапа. Первый шаг - минерализовать белок. В колбу Кельдаля на 50 мл добавляют 0,2 мл сыворотки крови или 150-250 мг биологического объекта. Затем в пробирку добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты и трубку нагревают на огне.

Исследуемый объект гидролизуют и разлагаются. Когда смесь станет коричневой, снимите колбу с огня, немного остудите и добавьте 2-4 капли пергидроля, встряхните вещества в колбе и снова поставьте на огонь. Добавьте пергидроль еще 1-2 раза до образования бесцветной минерализации.

Химическая схема первого этапа следующая:



Второй шаг - прогнать аммиак. Вторая часть эксперимента проводится на специальном приборе. Масса отлитой ткани в колбе Кельдаля разбавляется водой и переливается в приводную колбу. Затем общий объем доводят до половины колбы водой. Добавьте в колбу 2-4 капли индикатора метилрота и закройте перфорированной пробкой. Затем он оснащается поддоном для сбора капель, который соединяется с воронкой и охладителем.

Заливная трубка №5 заполняется 20 мл раствора 0,1N-ной серной кислотой и в нее добавляется 2-4 капли индикатора метилрота, затем эта трубка соединяется с другим концом холодильника с помощью удлинителя. В приводную трубку через воронку добавляют раствор 33-40%-ного раствора гидроксида натрия до тех пор, пока жидкость не станет желтой (щелочная реакция). При подключении холодильника трубка нагревается и откачивается аммиак. Жидкость в приводной трубке кипятят до тех пор, пока аммиак не будет полностью удален, полнота аммиака определяется по изменению цвета лакмусовой бумаги.

Химическая схема второй ступени следующая:



Третий этап. Титрование и расчет. По окончании процесса прогона приводную трубку промывают 2-3 мл дистиллированной воды и добавляют в приемную трубку. Серная кислота, не связанная с аммиаком в приемной колбе, титруется 0,1N-ным раствором гидроксида натрия. Азот рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot 1,4 \cdot 100}{C}$$

где: X-тест-объекте, количество азота в мг%; а- количество 0,1 л раствора серной кислоты в приемной колбе; b - 0,1N раствор гидроксида натрия, применяемый для нейтрализации связанной аммиаком серной кислоты; С - вес объекта испытаний, мг; 100 - обычный множитель для расчета азота в мг %.

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

4.4.Высаливание

Высаливание - процесс осаждения белка солями щелочных, щелочно-земельных металлов и нейтральными солями. Процесс обратим, так как сохраняет нативные свойства белков.

Разделение белков на основе их различной растворимости является классическим методом. Так фракционирование солями основывается на избирательном разделении белков вследствие их различной растворимости в растворах солей. Соль подбирается в соответствии со следующими требованиями: она должна обладать достаточной растворимостью, которая не меняется значительно в зависимости от температуры, при добавлении соли не должен заметно меняться рН раствора, она легко отделяется от белка и не оказывает денатурирующего действия. Наиболее часто употребляемой солью для фракционирования белков является сульфат аммония. Обычно проводят фракционное осаждение белков возрастающими концентрациями сульфата аммония. При описании методов выделения количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения и часто употребляют выражения вроде "фракция, осажденная между 55 и 60% насыщения". Правильно рассчитать количество соли, которое нужно добавить к данному объему раствора, чтобы получить указанный процент насыщения, не простое дело. Поскольку при растворении соли меняется объем жидкости, количество соли, которое нужно добавить к данному объему жидкости, не пропорционально требуемому проценту насыщения. Высаливание при добавлении необходимого количества сульфата аммония для осаждения всех белков является эффективным способом концентрирования - при 13 условии, что образец, который нужно сконцентрировать, не слишком разбавлен. Для получения раствора, приблизительно 85%-ного насыщения удобно растворить 60 г сульфата аммония в 100 мл. При такой концентрации немногие белки имеют растворимость

выше 1 мг/мл. Но если исходная концентрация белка в растворе ниже 1 мг/мл, то перед высаливанием следует повысить ее, например, с помощью ультрафильтрации [17,35].

4.4.1.Осаждения белка методом высаливания

Принцип метода. Белки в растворе и соответственно в организме сохраняются в нативном молекулы и гидратная оболочка вокруг нее. Удаление этих факторов приводит к склеиванию состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекул белков и выпадению их в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необратимым в зависимости от реактивов и условий реакции. На практике реакции осаждения используют для выделения альбуминовой и глобулиновой фракций белков плазмы крови, количественной характеристики их устойчивости в плазме, обнаружения белков в биологических жидкостях и освобождения от них с целью получения гомогенного белкового раствора. Из глобулиновой фракции впоследствии выделяют антитела к различным антигенам. Под действием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия (удаления) этих факторов белки вновь переходят в растворимое состояние и приобретают свои нативные свойства. Одним из видов обратимого осаждения белков является высаливание. Насыщенным раствором сульфата аммония осаждается альбуминовая фракция белков, полунасыщенным раствором - глобулиновая фракция [17].

Цель занятия: Изучить свойства простых белков. Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

Ход работы:

Реактивы: 1) насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
2) кристаллический $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3) 10%NaOH, 4)1%CuSO₄.

Материалы исследования: Сыворотки крови, яичный белок.

Принцип: Под действием нейтральных солей, солей щелочных и щелочно-земельных металлов происходит нейтрализация заряда белковых частиц и их дегидратация. Используя разные концентрации солей, можно разделить белки на фракции. При растворении осажденного белка в воде происходит восстановление его исходных физико-химических и биологических свойств.

Проведение анализа: К 20 каплям яичного белка добавляют равный объем сульфата аммония (получается полунасыщенный

раствор), в котором выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отделяют фильтрованием. Наличие белка на фильтре доказывают биуретовой реакцией. К фильтрату добавляют порошок сульфата аммония до полного насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов. Обратимость осаждения проверяют, добавляя к осадку дистиллированную воду. Аналогично проводится фракционирование белков сыворотки крови.

Практическое значение: Метод высаливания используют в клинических лабораториях для разделения альбуминов и глобулинов, определения их соотношения в сыворотке крови. В норме отношение альбумин/глобулин в сыворотке крови человека колеблется в пределах 1,5-2,3 и меняется при патологии, например, при воспалительных заболеваниях увеличивается содержание глобулинов.

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод о возможности очистки белка.

4.4.2. Осаждения яичного альбумина методом высаливания

Цель занятия: Изучить свойства простых белков. Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

Оборудование: Фильтровальная бумага; воронки; штативы с мерными пробирками; автоматические пипетки, наконечники. Реактивы: Неразведенный яичный белок; сульфат аммония в порошке; насыщенный раствор сульфата аммония (7,67 г до 10 мл); NaOH (10%-ный раствор); CuSO_4 (1%-ный раствор); дистиллированная вода.

Ход работы:

1. В пробирку налить 30 капель не разведенного яичного белка.
2. Добавить 30 капель насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое пробирки перемешать. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония. При этом глобулиновая фракция осаждается, а альбуминовая остается в растворе.
3. Осадок глобулинов отфильтровать
4. К фильтрату добавлять порошок сульфата аммония до тех пор, пока не прекратится растворение соли. Должен выпасть осадок - это альбумины. Сущность реакции заключается в дегидратации молекул белка.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.3.Осаждения яичного альбумина при понижении ионной силы

При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Цель занятия: Изучить свойства простых белков. Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

Ход работы:

1. Осторожно иглой проделать отверстие в скорлупе яйца с двух сторон и вылить белок в стакан на 500 мл, затем добавить 250 мл H_2O и содержимое перемешать стеклянной палочкой с резиновым наконечником.

2. Раствор перенести в мерный цилиндр и объем довести H_2O до 300 мл. Раствор оставить на 30 мин при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

3. 20 мл суспензии профильтровать через складчатый фильтр.

4. Наличие белка на фильтре проверить биуретовой реакцией: для этого воронку с фильтром вставить в чистую пробирку и на фильтр налить 1 мл 10% раствора $NaOH$ и 1 каплю 1% раствора сульфата меди.

Появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание. Для пептидной (амидной) группы характерна лактам-лактимная таутомерия: В щелочной среде преобладающая лактимная (енольная) форма полипептида взаимодействует с медью с образованием стабильного окрашенного комплекса.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.4.Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц и нейтрализации их зарядов, так и рядом других причин (денатурацией, образованием солей). В избытке серной или соляной кислот, а также при их длительном воздействии, выпавший осадок денатурированного белка растворяется за счет перезарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты этого

растворения не происходит (сопутствующий нитрат-ион мешает перезарядке белковой молекулы).

Ход работы: В 1-ю пробирку наливают 10 капель концентрированной соляной, во 2-ю 10 капель концентрированной азотной, в третью 10 капель концентрированной серной кислот. Затем, наклонив пробирки под углом 45° , осторожно по стенке пробирки (чтобы жидкости не смешались) наливают 10 капель раствора белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде тонкой пленки. Осторожно встряхнуть пробирки, что наблюдается?

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.5. Осаждение белка органическими кислотами

Механизм осаждения белков органическими кислотами объясняется дегидратацией белковой и снятием заряда. Реакции с трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой кислотами являются весьма специфическими и чувствительными (сульфосалициловая кислота открывает белок в разведении 1:50000). Они получили широкое практическое применение в клинических лабораториях при обнаружении белка в моче и других биологических жидкостях.

Ход работы: В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора белка и добавляют в одну пробирку 2 капли 10% раствора сульфосалициловой и в другую 2 капли 10% трихлоруксусной кислот. В обеих пробирках образуются осадки белка.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.6. Осаждение белка солями тяжелых металлов

При действии солей тяжелых металлов на растворы белка происходит денатурация белковой молекулы. Осаждение дегидратированного белка обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимых комплексов. Со свежес приготовленным гидроксидом меди-(II) все α -аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди-(II)-синего цвета: глицинат меди-(II). В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами. Избыток некоторых солей ведет к растворению (пептизации) осадка белков.

Ход работы: В три пробирки наливают по 5 капель 1% раствора яичного белка и по 2-3 капли: в первую - 7% раствора сернистой меди, во вторую - 5% раствора уксуснокислого свинца, в третью - 5% раствора азотнокислого серебра. Наблюдается образование осадка во всех трех пробирках. В первую пробирку добавляют еще 5-10 капель раствора сернистой меди, во вторую - 5-10 капель уксуснокислого свинца, в третью - 5-10 капель азотнокислого серебра. Пронаблюдать, что происходит. Результаты опыта внести в таблицу.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.7. Осаждение белков органическими растворителями

При добавлении к раствору белка органических растворителей, например, спирта, выпадает осадок белка. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Осаждение наступает только из нейтральных или слабых растворов (в слабой среде заряд на коллоидных частицах белка является наименьшим) и более полно в присутствии электролитов, например, хлористого натрия, что связано с ослаблением внутримолекулярных ионных связей ввиду конкуренции добавленных анионов и катионов. Если осаждение производить при низкой температуре (от 0 до 15 °C) и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок сохраняет свои природные свойства и может быть вновь растворен в воде. Длительное воздействие спирта приводит к необратимой денатурации белка. Однако некоторые белки, например, проламины растений, растворимы в горячем 70-80% спирте, гормон поджелудочной железы - инсулин растворяется в подкисленном 60% спирте. Это зависит от особенностей их первичной структуры [17].

Ход работы: 1. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при взбалтывании - этиловый спирт до появления осадка. При добавлении 1-2 капель 1% раствора уксусной кислоты образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении нескольких капель (1-2) насыщенного раствора поваренной соли.

2. Проводят ту же реакцию, взяв вместо этилового спирта ацетон.

3. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и добавляют равный объем хлороформа. После встряхивания пробирки и последующего разделения слоев воды и хлороформа в верхнем слое жидкости появляется осадок белка. Денатурация белка хлороформом получила распространение при выделении нуклеиновых кислот и их очистке.

4. В пробирку наливают 10 капель раствора белка и добавляют при 27 взбалтывании фенол до появления муты или осадка. Осадок увеличивается при стоянии.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.4.8.Осаждение белка при нагревании

Почти все белки денатурируют при нагревании до температуры от 50 °С до 55 °С и выше. Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка. Наиболее полное осаждение происходит в изoeлектрической точке белка, то есть при такой величине pH, когда коллоидные частицы белка наименее устойчивы.

Ход работы: В пять пронумерованных пробирок наливают по 10 капель 1% раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагревают на газовой горелке. Жидкость мутнеет, и, так как частицы денатурированного белка несут заряд, они удерживаются во взвешенном состоянии (яичный альбумин является кислым белком и в нейтральной среде заряжается отрицательно). Во вторую пробирку добавляют 2-3 капли 1% уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка вследствие того, что белок теряет заряд и находится в состоянии, близком к изoeлектрической точке. В третью пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты, и содержимое нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, так как в кислой среде частицы белка перезаряжаются, приобретая положительный заряд. В четвертую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. Образуется осадок белка вследствие адсорбции ионов хлористого натрия (образование двойного изoeлектрического слоя) и нейтрализации положительного заряда на частицах белка. В пятую

пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора едкого натра и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, так как в щелочной среде отрицательный заряд на частице белка усиливается. Результаты опыта внести в таблицу 7.

Таблица 7

Осаждение белка при нагревании

№	Среда	Реактивы	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Нейтральная			
2	Слабокислая			
3	Кислая			
4	Кислая и электролит			
5	Щелочная			

4.5.Количественное определение белков в биологическом материале

При проведении разнообразных биохимических исследований необходимо количественное определение содержания белка в исследуемой фракции, в исследуемом образце. Количественное определение белка проводится с небольшим количеством материала и требует высокочувствительных методов детекции.

Ниже приводятся описания наиболее широко распространенные колориметрические и спектрометрические методы определения белка [52,57]

4.5.1.Определение содержания белка

4.5.1.1.Определение содержания белка по методу Лоури

Принцип метода. Метод Лоури основан на изменении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно протекают две реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновым и цистеиновым радикалами белковой молекулы. Последняя характеризуется протеканием реакций восстановления смеси фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. При этом в реакции восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникающие при взаимодействии полипептидной цепочки белка со щелочным

раствором сульфата меди. Вторая реакция менее специфична, но зато более чувствительна. Метод Лоури позволяет определять концентрацию белка даже в разбавленных растворах в пределах 10^{-7} - 10^{-6} М [57].

Необходимые инструменты: штатив; пробирки; Пипетки 0,1, 1,5 и 10 мл; спектрофотометр.

Реактивы:

1. 0,1 Н раствор гидроксида натрия.

2. Раствор А: раствор 2%-ного карбоната натрия в 0,1 Н гидроксиде натрия.

3. Раствор В: 0,5%-ный раствор сульфата меди в 1%-ном тартарате натрия. Для приготовления раствора 10 г тартрата натрия растворяют в 300 мл воды. Затем к раствору добавляют 5 г сульфата меди и объем увеличивают до 1 литра.

4. Раствор С: чтобы приготовить этот раствор, добавьте 1 мл раствора В к 49 мл раствора А. Этот раствор готовится перед анализом.

5. Реагент Фолин или раствор Е. Для приготовления раствора возьмите 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г соли $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ в 2-литровую колбу и растворите в 700 мл воды. Затем к раствору добавляют 50 мл 85% кислоты H_3PO_4 и 100 мл концентрированной кислоты HCl . Затем смесь добавляют в обратную колбу и кипятят 10-12 часов. После закипания добавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды, несколько капель бромированной воды. Прокипятить без охлаждения 15 минут, чтобы удалить излишки брома. Смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют и доводят до 1 литра. Кислотность фолинового реагента определяют титрованием 0,1 Н. Гидроксидом натрия в присутствии фенолфталена. Реагент хранится в тёмной таре. Реагент фолин с кислотностью 1Н используется для определения белка.

Ход работы: Для построения калиброванного графика готовят стандартный раствор альбумина. Для этого 4 мг альбумина растворяют в 10 мл воде, в 0,1 мл этого раствора задерживается 40 мкг белка. Добавьте в пробирки 10-120 мкг раствора белка альбумина. Подготовка к этому показана в таблице 8.

Таблица 8

№	Количества белка, мкг	Раствор белка, мл	Дистиллированная вода, мл
1	120	0,3	0,1
2	110	0,275	0,125
3	100	0,250	0,150
4	90	0,225	0,175
5	80	0,2	0,2
6	70	0,175	0,225
7	60	0,150	0,250
8	50	0,125	0,275
9	40	0,1	0,3
10	30	0,075	0,325
11	20	0,05	0,35
12	10	0,025	0,375
13	-	-	0,4

К каждому раствору добавить 2 мл раствора С, хорошо перемешать и оставить при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавьте 0,2 мл реагента Фолина, встряхните пробирки и оставьте в комнате на 30 минут. Затем его измеряют относительно безбелкового зонда на длине волны 750 нм на спектрофотометре. По полученным данным график называется солевым. Для этого величина оптической плотности по оси ординат, количество белка в мкг отложено по оси абсцисс.

Чтобы определить количество белка в биологическом объекте, добавьте к раствору 0,4 мл исследуемого белка (разведенного в 50 или 100 раз) в условиях, описанных выше. В зависимости от оптической плотности количество белка определяется по графику, затем количество белка в неразбавленном объекте рассчитывается в мг.



Рис.32. Калиброванный график. По оси абсцисс - количество белка в образцах, мкг (С); Оптическая плотность по оси ординат (Е).

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.6.Метод Петерсона

Принцип метода. Данный метод аналогичен методу Лоури, характеризуется высокой чувствительностью (10-100 мкг белка), позволяет эффективно определять белок в мембранных фракциях.

Реактивы:

1. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 100 мкг белка в 1 мл (стандартный раствор).

2. CTC реактив: 0,1% раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2% раствор натрия-калия виннокислого, 10% раствор Na_2CO_3 .

Натрий-калий виннокислый растворяют в 25 мл дистиллированной воды. Na_2CO_3 растворяют в 25 мл дистиллированной воды, к раствору добавляют навеску $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и смешивают с раствором натрия-калия виннокислого.

3. 5% раствор додецилсульфата натрия (SDS).

4. 0,8 моль/л раствор NaOH.

5. 2 Н реактив Фолина-Чокальтеу.

6. Реагент А: 1 часть CTC-реактива (1) смешивают с 1 частью 0,8 моль/л раствора NaOH (4), после чего в полученную смесь доливают 2 части 5% раствора додецилсульфата натрия (3), тщательно перемешивают.

7. Реагент В: 1 часть реактива Фолина-Чокальтеу (5) смешивают с 5 частями дистиллированной воды

Ход работы: Для построения калибровочного графика из стандартного раствора альбумина готовят растворы белка, содержащие 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг альбумина в 1 мл. К 1 мл исследуемого раствора, содержащего от 10 до 100 мкг белка, приливают 1 мл реагента А, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавляют 0,5 мл реактива В, тщательно перемешивают и через 30 мин определяют оптическую плотность раствора при 670 нм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.7.Определение количества белков биуретовым методом

Белки реагируют с атомами меди в щелочных условиях, образуя сине-пурпурный цвет. Интенсивность этого цвета варьируется в зависимости от количества белка в растворе.

Биуретовый метод выполняется быстрее и проще, чем метод Кельдаля. Этот метод используется только при тестировании материалов с высоким содержанием белка [52].

Необходимые инструменты: штатив; пробирки; Пипетки 1, 2, 5, 10 мл; спектрофотометр.

Реактивы: 1. Стандартный раствор белка альбумина, этот раствор содержит 10 мг белка альбумина в 1 мл.

2. Биуретовый реагент берут из 0,15 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий-тартарат-калиевая или сегнетова соль) и растворяют в 50 мл воды. К этому раствору смешивают, добавляя 30 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и добавляя к раствору 0,1 г соли КДж, доводя до 100 мл водой.

Ход работы: для построения откалиброванного графика используется стандартный раствор белка альбумина, в котором хранится 10 мл белка альбумина в 1 мл раствора. Образцы готовят следующим образом (табл.9).

Таблица 9

№	Количество белка, мг	Объём белкового раствора, мл	H_2O , мл
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	16	1,6	0,4
8	20	2,0	-
9	0	-	2,0

Добавить во все пробирки 8 мл биурета и оставить при комнатной температуре. Измерение производится путем сравнения воды в девятом растворе, который сохраняет все компоненты, кроме белка. Через 30 минут его измеряют на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Полученные результаты используются для построения калиброванного графика. Для построения графика величина оптической плотности откладывается по оси ординат, а количество белка, соответствующего оптической плотности, откладывается по оси абсцисс.

Для определения количества белка в исследуемом растворе работа проводится в вышеуказанных условиях. Для этого исследуемый белок разводится до 2 мл, затем добавляется 8 мл биурета.

В зависимости от оптической плотности тестируемого белка определяется количество белка на графике. Количество белков рассчитывается в мг%.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.8. Определение количества белков методом микробиурета

Реактивы: 1. $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -2,1%-ный раствор;

2. KOH -30% -ный раствор;

3. А раствор;

4. Для приготовления этого раствора смешайте 1 часть 2,1% -ного раствора $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и 9 частей раствора KOH -30%-ного. Этот раствор готовят перед использованием [52, 60].

Ход работы: Выполните калибровку по стандартному раствору белка альбумина для определения количества белка в тестируемом объекте; график создан. Образцы, содержащие от 5 мкг до 120 мг белка, готовят для построения графика. К этим образцам добавляют 2,5 мл раствора А, измеренного при 310 нм на спектрофотометре через 30 минут.

Чтобы определить количество белка в исследуемом растворе, возьмите 0,5 мл этого раствора, добавьте 2,5 мл раствора и измерьте в условиях, описанных выше.

Оценка результатов: Кратко записать результаты реакций.

4.9. Разделение и очистка белков методом диализа

Диализом называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран. Белковые молекулы, обладая большой молекулярной массой, не способны проникать через полупроницаемые перегородки (искусственные и естественные мембраны). При этом низкомолекулярные частицы (органические и неорганические) легко проходят через поры полупроницаемых мембран.

Диализ широко используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей (соли, сахара и других), которые легко проходят через поры полупроницаемых мембран. Прибор, в

котором проводят диализ, называется диализатором. Целлофановый или коллодиевый мешочек, опущенный в сосуд с водой, представляет простейший диализатор. Белок, помещенный в мешочек, остается в нем, а низкомолекулярные вещества диффундируют через мембрану в воду.



Рис.34. Схема диализатора

Методом диализа можно разделить альбумины и глобулины. При переходе солей из белкового раствора в окружающую среду глобулины будут выпадать в осадок, т.к. они не растворимы в водной среде, а альбумины будут оставаться в растворе. Простейшим диализатором может служить целлофановый мешочек, опущенный в стакан с водой.

Солевой раствор белка помещают в мешочек, при этом молекулы низкомолекулярных веществ (ионы соли) диффундируют через стенку мешочка, а крупные молекулы белка остаются внутри мешочка (рис.34) [17,37].

4.9.1.Разделение белков методом диализа

Материалы и реактивы: раствор яичного белка, содержащего альбумины, глобулины и сульфат аммония; 10%-ный раствор хлористого бария; 10%-ный раствор едкого натра; 1%-ный раствор медного купороса; 10%-ный раствор хлористого аммония; сернокислый аммоний, тонко измельченный.

Оборудование: пробирки обыкновенные; целлофановый или коллодиевый мешочек; химический стакан или сосуд на 1-2 мл; пипетки мерные на 10 мл; пипетки.

Ход работы. 10-15 мл раствора яичного белка, содержащего альбумины, глобулины и сульфат аммония, помещают в

целлофановый мешочек и погружают в стакан с дистиллированной водой так, чтобы уровень жидкости в мешочке совпадал с уровнем воды. Для ускорения диализа необходимо менять воду в сосуде. Через 1 час анализируют воду из стакана: в одной пробирке проводят биуретовую реакцию и убеждаются, что белки через мембрану не проходят; в другой пробирке проводят реакцию на ион SO_4^{2-} , добавлением нескольких капель 10%-ного раствора BaCl_2 для установления проникновения соли через стенку целлофанового мешочка. Через 2-3 часа отмечают появление осадка глобулинов внутри мешочка, который отфильтровывают. В фильтрате остаются белки альбуминовой фракции.

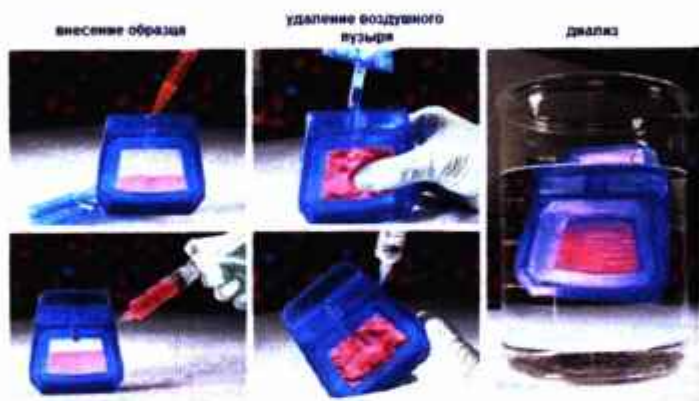


Рис. 35. Разделение белков методом диализа

Целлофановые или коллоидные мешочки

Глобулиновую природу белков осадка доказывают растворением его в растворах солей (10%-ный раствор хлористого аммония, хлористого натрия и др.). При разбавлении раствора водой вновь выпадает осадок (рис.35).

Альбуминовую природу белков фильтрата подтверждают разбавлением водой с отсутствием осадка или полным насыщением серноокислым аммонием (выпадает осадок).

Оценка результатов: Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

V ГЛАВА. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

5.1. Фракционирование белков

Для фракционирования белковых смесей, находящихся в растворе, широкое применение получили методы дробного осаждения, основанные на изменении растворимости белков в присутствии растворов солей и органических растворителей. На различиях в растворимости белков основано изоэлектрическое осаждение, достигаемое за счет минимальной растворимости глобулярных белков в изоэлектрической точке. В последние годы для фракционирования белков используют различные виды хроматографии и электрофореза (рис.36) [9,25,35,37].

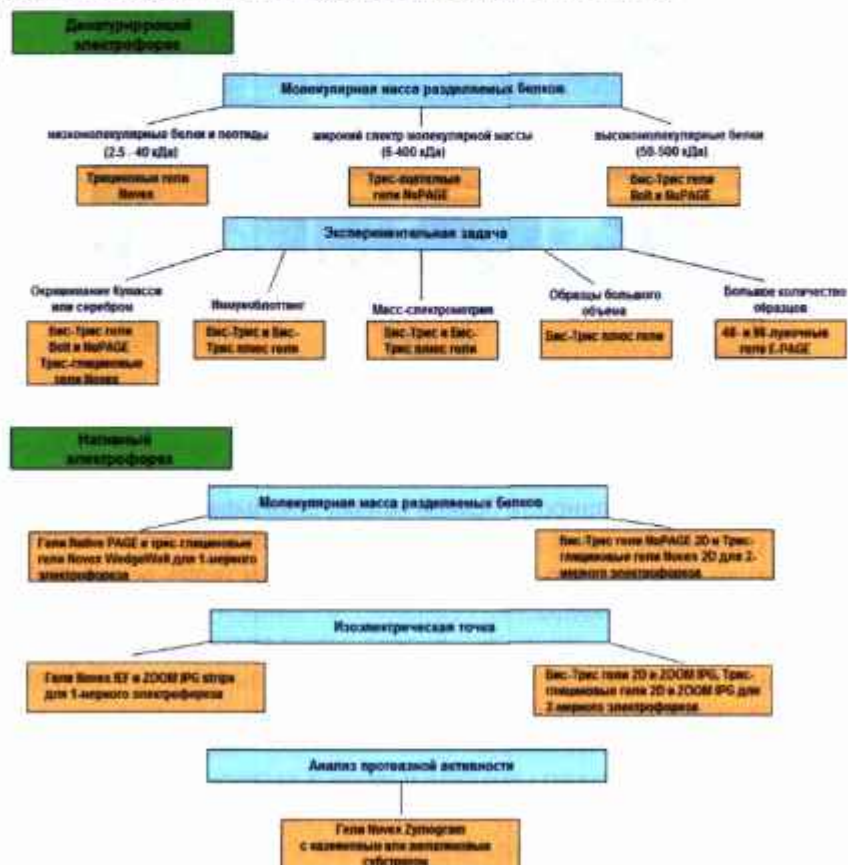


Рис.36. Схема денатурирующего электрофореза.

5.1.1.Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге

Цель работы: ознакомиться с принципом метода электрофоретического разделения белков сыворотки крови. Научиться идентифицировать электрофореграммы, рассчитывать процентное содержание белковых фракций, усвоить клиническое значение метода. Принцип метода основан на способности белков под действием внешнего электрического поля передвигаться в растворе к противоположным заряженным полюсам. Скорость и направление движения зависят от знака, величины заряда и относительной молекулярной массы белковой частицы. Скорость движения частицы в электрическом поле прямо пропорциональна величине заряда частицы и обратно пропорциональна ее размеру и степени гидратации. Разделять белки сыворотки крови можно с использованием различных твердых носителей: бумаги, природных и синтетических гелей. Поскольку величина и знак заряда белковой частицы определяются соотношением ионогенных групп, pH и ионной силой раствора, то при разных значениях pH раствора белки сыворотки крови будут передвигаться с разной скоростью и иметь разный заряд.

Чаще электрофоретическое разделение сывороточных белков проводится при pH 8,6. При этом все белки имеют отрицательный заряд, движутся к аноду. Наиболее высокая скорость движения у альбуминов (низкая молекулярная масса). При бумажном электрофорезе белки сыворотки крови разделяются на 5 фракций: альбумины, α_1 , α_2 , β и γ -глобулины. Наиболее медленно будут передвигаться γ -глобулины.

Ход работы: Ознакомиться с устройством камеры для электрофоретического разделения белков. Усвоить, что порядок работы складывается из следующих этапов:

1. Подготовка камеры к работе (заполнение буферными растворами, подключение электродов), подготовка бумажных полос;
2. Нанесение сыворотки крови на стартовую линию электрофореграммы;
3. Включение прибора в сеть и разгон белков;
4. Фиксация и проявление электрофореграмм;
5. Идентификация и количественное определение белковых фракций.

Взять готовую электрофореграмму и изучить распределение белковых фракций. Рассчитать процентное содержание белковых фракций. Для этого отметить и измерить ширину окрашенного пятна, занимаемого каждой белковой фракцией. Измерить наименьшую и наибольшую ширину и найти среднюю величину. За 100% принять общую ширину окрашенных пятен (находится путем суммирования отдельных пятен). Рассчитать процентное содержание каждой из выявленных фракций.

Пример расчета. Средняя длина пятна альбуминов (А) 2,7 см, α_1 -глобулины – 0,2 см, α_2 -глобулины – 0,4 см, β -глобулины – 0,5 см, γ -глобулины- 0,7 см. Общее расстояние, занимаемое пятнами, составляет 4,5 см. Эту величину следует принять за 100%. Расстояние, занимаемое альбуминами (2,7 см) – X%.

$$A = \frac{2,7 \cdot 100}{4,5} = 60\%$$

$$\alpha_2\text{-глобулинов} = \frac{0,2 \cdot 100}{4,5} = 4,4\% \text{ и т.д.}$$

Данные оформить в виде таблицы 10:

Таблица 10

Фракции	Расстояние в см	% содержание фракции	% содержание фракции в норме	Выводы
альбумины			52 – 65 %	
α_1 -глобулины			2,5 – 5 %	
α_2 -глобулины			7 – 13 %	
β -глобулины			8 – 14 %	
γ -глобулины			12 – 22 %	
Общий белок суммарно			100 %	

5.2. Электрофорез в ПААГ нативного белка в градиенте пористости геля

Электрофорез проводят в блоках полиакриламидного геля размером 110x100x1 мм [26]. Электрофорез нативного белка в градиенте пористости ПААГ. 1-анализируемый белок, 2- маркеры. Стеклопластины, одна из которых несколько длиннее другой (130x150 и 130x130 мм), отделяют друг от друга с помощью прокладок из органического стекла толщиной 1 мм и склеивают

липкой лентой. В просвет между стеклянными пластинами заливают раствор мелкопористого полиакриламидного геля, а затем, после его полимеризации, заливают крупнопористый гель. В 59 последний погружают зубчатый шаблон из 1 мм оргстекла для формирования восьми карманов для нанесения белковых проб. Верхним электродным буфером служит трис-глицин, pH 8,3 (0,025 М Трис и 0,192 М глицин). Нижний электродный буфер имеет такой же состав. Рабочий гель полимеризуют в 0,375 М ТрисHCl буфере, pH 8,8, а формирующий гель в 0,0625 М Трис-HCl буфере, pH 6,8. Анализируемые белки растворяют в буфере, который содержит: Трис-HCl (0,0625 М, pH 6,8), 2-меркаптоэтанол 5%, глицерин 10%, бромфеноловый синий 0,001%. Электрофорез проводят, выравнивая объем наносимого белкового препарата по количеству наносимого белка, не допуская в то же время перегрузки по белку, т.е. не более 25-30 мкг белка на трек. Разделяющий гель содержит градиент концентрации от 4,5 до 20 % полиакриламида. Этот градиент создают с помощью трех каналов перистальтического насоса Р-3 (Pharmacia, Швеция). Для того чтобы полимеризация проходила равномерно, полимеризующиеся блоки охлаждают. Для создания ровной верхней границы разделяющего геля на него наслаивают изобутанол, насыщенный водой. Электрофорез проводят в охлаждаемой камере. Стеклянные блоки прижимают специальными зажимами к передней части катодного отсека так, чтобы меньшая пластина была на уровне выреза в передней стенке прибора, а большая пластина была выше этого выреза. После заливки сочленений 1,5% агарозой в электродный резервуар наливают верхний электродный буфер. Пластины опускают в нижний электродный буфер. Для того чтобы между прокладками и пластинами не протекал электрический ток, эти стыки проливают расплавленным парафином. Охлаждение гелевых блоков осуществляют, пропуская холодную воду через трубчатый холодильник, встроенный в анодную часть. Этот холодильник охлаждает нижний электродный буфер, в который были опущены стеклянные блоки. В карманы геля наслаивают по 20-25 мкл белкового образца. Первые полчаса, когда образцы входят в гель, устанавливают силу тока 10 мА на блок. Далее электрофорез проводят при постоянной силе тока 20 мА. Электрофорез проводят сорок восемь часов, пока свидетель (бромфеноловый синий) не доходит до конца гелевого блока. После окончания электрофореза

стеклянные пластины вынимают из прибора, освобождают гель и помещают его в камеру для окрашивания. Электрофорез проводят в разработанной нами системе в блоках 7.5% полиакриламидного геля размером 70x80x1 мм, используя прибор для электрофореза Mini-PROTEAN II Electrophoretic Cell фирмы BIO-RAD (США). Анализируемые белки растворяют в Трис-НСl буфере (0,0625 М, рН 6,8), содержащем 2- меркаптоэтанол (5%), глицерин (10%), бромфеноловый синий (0,001%). Верхним электродным буфером служит трис-глицин, рН 8,3 (0,025 М Трис и 0,192 М глицин). Для обеспечения сдвига заряда белков ("charge shift"), в отличие от недавно предложенной системы, известной под названием «синего нативного электрофореза», в которой для этой цели используется краситель «Кумасси ярко-синий», в верхний электродный буфер добавляется SDS (0,01%). Нижний электродный буфер имеет такой же состав. Рабочий гель полимеризуют в 0,375 М Трис-НСl буфере, рН 8,8, а формирующий гель в 0,0625 М Трис-НСl буфере, рН 6,8 [60]. Электрофорез в ПААГ нативного белка со сдвигом заряда. Треки: 1- кукуруза, 2 - элимус, 3- рожь, 4- пшеница. Белки визуализируют окрашиванием Кумасси R-250. После окрашивания гели сканируют и определяют относительные молекулярные массы белков при помощи программы "Sigmagel". Как показал опыт применения данной системы [24,37], состав белков и определенные при ее помощи их молекулярные массы в диапазоне от 100 до 700 кД совпадают с составом белков и их молекулярными массами, определенными при помощи электрофореза нативных белков в градиенте полиакриламидного геля по Андерсон, Борг и Микаэльсон [51,73]. В то же время применение данной системы позволяет, за счет отсутствия сложного и длительного этапа заливки геля с градиентом концентрации полиакриламида, значительно ускорить и упростить проведение электрофореза [9].

5.3.Определение структуры и молекулярной массы белка методом электрофореза в ПААГ с ДСН

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) является общепринятым методом при определении гомогенности белков, определения их молекулярной массы и очистки (препаративный электрофорез)

Особенности электрофореза белков. Белки - это цвиттер-ионы, молекулы, имеющие и положительно (+) заряженные и отрицательно (-) заряженные радикалы. Поэтому молекула белка в растворе при любом pH, отличным от изоэлектрической точки, имеет определенный преобладающий заряд (+) или (-) и мигрирует к соответствующему полюсу в постоянном электрическом поле. Этот метод начала XX века получил название электрофорез с подвижной границей.

Позднее был разработан метод ступенчатого электрофореза (диск-электрофорез (от англ. «discontinuous» - прерывистый). Отличительная особенность диск-электрофореза - это полимеризация на пластине двух гелей: рабочего (мелкопористого) и над ним - «формирующего» (крупнопористого) геля. Диск-электрофорез - метод, сочетающий в себе разделение белков по их общему электрическому заряду, по величине молекулярной массы и по форме. Использование двухслойного носителя с различным размером пор и двух буферов, отличающихся между собой по составу и pH, обеспечивает концентрирование исследуемых белков в узкой стартовой зоне. *Это важно для четкого разделения смеси белков.*

Полиакриламид. Раствор, в котором мигрируют белки, удерживается сеткой полиакриламидного геля (ПААГ). ПААГ служит при электрофорезе поддерживающей средой и принимает активное участие в процессе разделения макромолекул благодаря эффекту молекулярного сита.

В качестве носителя при диск-электрофорезе используют ПААГ, который имеет структуру трехмерной сетки. Получают его сополимеризацией акриламида и сшивающего агента N,N' -метиленбисакриламида. Подбирая соответствующую концентрацию акриламида получают гель с нужным размером пор. При работе с глобулярными белками пользуются соотношением между средней молекулярной массой белков (М) и концентрацией (С) акриламида, которую надо взять для полимеризации, например (см. табл.):

М	С, %
10000 - 30000	15,0 - 30,0
30000 - 100000	7,5 - 15,0

В качестве катализаторов при получении ПААГ - геля используют персульфат аммония и N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). Варьируя концентрацией полимера можно получить гели с широким диапазоном пор.

Для удобства изложения используются следующие обозначения: **Т** - процентное отношение суммарной массы обоих мономеров к объему их раствора, **С** - процентное отношение массы метиленбисакриламида (Бис) к общей массе обоих мономеров. Для крупнопористых гелей, чтобы увеличить степень сшивки линейных полимеров акриламида отношение акриламида (Бис) должно составлять, от 35:1 до 20:1. Процентное содержание мономеров определяется по формуле:

$T = (a+b)/M \times 100\%$, количество сшивающего агента в % от общего количества мономеров определяется по формуле:

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

где **Т** - процентное содержание мономеров;

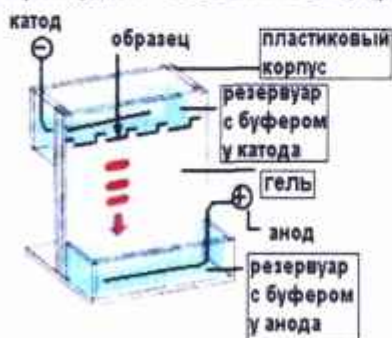
С- процентное количество (концентрация) сшивающего агента;

а - количество акриламида, (г);

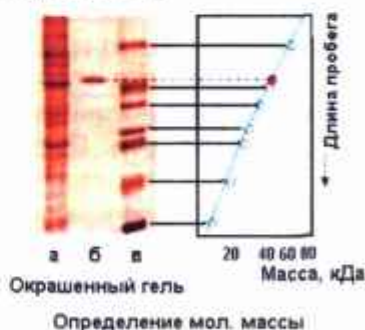
б - количество бис-акриламида, (г);

М - объём буфера, (мл). Правильно подобранные соотношения акриламида и бис-акриламида важны для качества фракционирования, окрашивания, высушивания и т.д.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе полипептидную цепочку распрямляют (схема электрофореза). Такой приём используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия (ДСН - $C_{12}H_{25}OSO_3Na$) (рис.37) [30,32,37].



А



Б

Рис.37. Схема электрофореза: А - камера для электрофореза, Б - электрофореграмма трех препаратов.

5.3.1.Разделение белков по размеру с использованием додецилсульфата натрия (ДСН)

Принцип метода. Электрофорез в ПААГ-ДСН позволяет фракционировать белки только по молекулярной массе. Для этого белки обрабатывают трёхкратным избытком ДСН-Na (1,4 мг ДСН-Na на 1 мг белка). Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Постоянство соотношения детергент белок делает постоянным отношение (-) заряда к массе любого белка. Благодаря электрическому отталкиванию остатков серной кислоты на поверхности белка полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жёсткого эллипсоида вращения.

Величину электрофоретической подвижности (R_f) определяют в относительных единицах, выражающих отношение пути миграции белка к миграции бромфенолового синего за время электрофореза. Одновременно проводят электрофорез белков - «маркёров», молекулярные массы которых известны.

Электрофорез проводят в тонком слое полиакриламида. После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.

Белки денатурируют бета-меркаптоэтанолом, при этом они утрачивают все виды структуры выше первичной, превращаясь в отдельные ниточки - полипептидные цепи. Эти цепи оказываются плотно покрыты детергентом - додецилсульфатом натрия, молекулы которого маскируют собственный заряд белка. Таким образом, все белки пробы будут в электрическом поле двигаться к аноду (рис.37).

Оборудование: Прибор для электрофореза, блок питания. Стаканы мерные: 50 мл, 100 мл; пипетки переменного объема для нанесения образца (50 мкл); наконечники для пипеток. Линейка, карандаш, стеклянные палочки.

Реактивы:

Запасной раствор акриламида (З.Р.А - 30%);

N,N-метиленбисакриламид (З.Р бис-А - 0,7% ; С 2,4-см.);

Буфер для разделяющего геля (б-р Р.Г.×4): 1,5 М трис - HCl (pH 8,8)/0,4% ДДС-Na;

Буфер для концентрирующего геля (б-р К.Г.×4): 0,5 М трис-HCl (pH 6,8)/0,4% ДДС-Na;

10% раствор персульфата аммония (ПСА); раствор ТЕМЕД;

Буфер для добавления к пробам ($\times 10$): 0,625 М трис-HCl (pH 6,8), 20% ДДС-Na;

Раствор БФС (бромфеноловый синий): 50% глицерин, 0,25% БФС;

Электродный буфер: 0,025 М трис-HCl, 0,192 М глицин, 0,1% ДСН.

Ход работы:

1. Собрать стеклянную камеру для электрофореза. Камера состоит из подставки для стекол, двух стеклянных пластин разной толщины, пластиковых прокладок, которые устанавливаются между стеклами (толщина геля) и резиновых прокладок (2-короткие, 2-длинные). (После сборки обязательно проверить камеру на герметичность: для этого залить в нее H_2O) (рис.38).

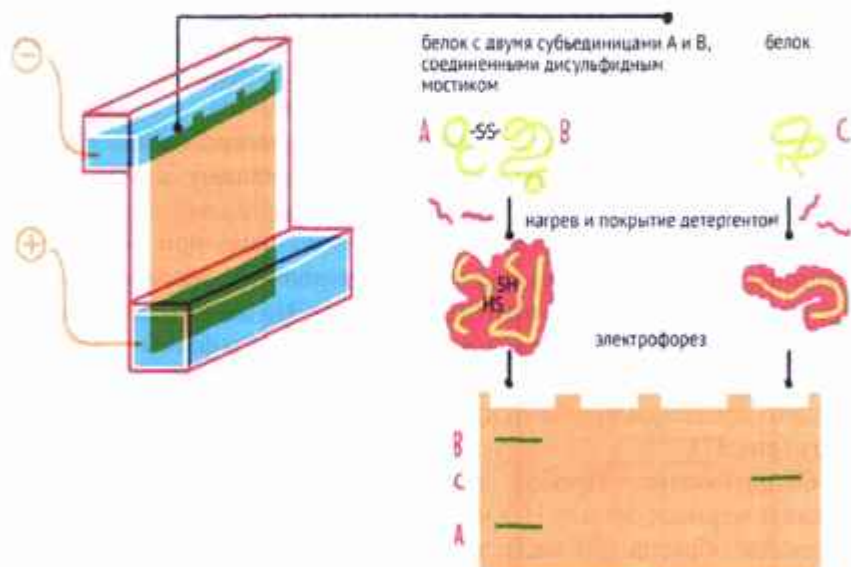


Рис.38. Схема проведения белкового геля-электрофореза [14].

2. Приготовить 8%-ный разделяющий гель (Р.Г.):

З.Р.А. $\rightarrow$ 5,5 мл,

$H_2O \rightarrow$ 9,5 мл,

б-р Р.Г. $\rightarrow$ 5,0 мл,

ТЕМЕД $\rightarrow$ 100 мкл,

10% ПСА $\rightarrow$ 100 мкл.

3. Залить РГ в стеклянную камеру, не доводя до верха 2 см.
4. Наслонить поверх геля дН₂О (полимеризация геля 10-20 мин)
5. Приготовить 4,5% концентрирующий гель (КГ):
 3. Р.А. → 1,0 мл,
 дН₂О → 2,75 мл,
 6-р К.Г. → 1,25 мл,
 ТЕМЕД → 50 мкл,
 10% ПСА → 50 мкл.

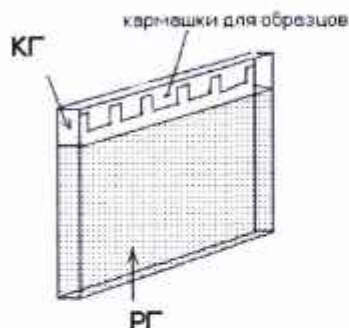


Рис.39. Стеклянная камера для электрофореза.
 КГ-концентрирующий гель,
 РГ-разделяющий гель

6. Вылить КГ на поверхность Р.Г. и вставить гребёнку. (Полимеризация ~5 мин).
7. Установить стеклянную камеру в аппарат для электрофореза (рис.40).

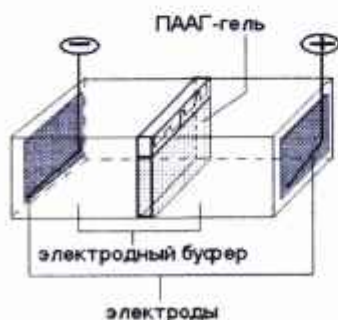


Рис.40. Схема камеры для вертикального электрофореза.

8. Налить электродный по обе стороны геля. «Кармашки» должны быть в буфере со знаком (-) буфер

9. Убрать гребёнку, вынуть заднюю (длинную) резинку, чтобы открыть доступ к буферу со знаком (+) нижней части геля.

10. Подготовка образцов. Смешать в пробирках «Эппендорф»:

образец (1 мг/мл) X → 50 мкл

буфер для проб → 5 мкл

БФС → 5 мкл

11. Пробу прогреть в водяной бане при 96°C в течение 3 мин, с последующим охлаждением до 20°C.

12. Режим проведения электрофореза:

(1) Установить ток 10 мА. Внести в кармашки по 20 мкл проб. (Каждую пробу вносить новым наконечником. Записать № кармашка и тип образца.)

(2) Электрофорез ведется при постоянной силе тока. До входа образцов в Р.Г. - ток 20 мА, основной режим - 40-45 мА. Когда полоса БФС дойдёт до границы геля, электрофорез остановить.

13. Фиксация белков в геле. После электрофоретического разделения буфер слить, стеклянную камеру с гелем, разъединить стёкла и гель поместить в кристаллизатор, содержащий раствор 7% уксусной кислоты и 20% спирта (1 ч - 24 ч).

14. Окраска белков:

(1). Слить фиксирующий раствор.

(2). Отмыть гель в дН₂O 4 раза по 5 мин (на качалке).

(3). Налить краситель Кумасси, содержащий 9% уксусной кислоты/40 % этилового спирта/ 0,25% Comassie G-250. Время окраски 10-30 мин.

(4). Краску слить, промыть гель 3 раза по 5 мин (на качалке). При необходимости отмывать гель до снятия фона и проявления синих полос.

5.4. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Принцип метода. Белки, обработанные концентрированным раствором додецилсульфата натрия в присутствии β-меркаптоэтанола, распадаются на отдельные полипептидные цепи и приобретают отрицательный заряд, значительно превышающий собственный заряд белковой молекулы. При последующем разделении с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном

геле белковые зоны распределяются на электрофореграммах таким образом, что подвижность белковой зоны обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы. Метод дает возможность определять молекулярные массы субъединиц олигомерных белков. Электрофоретическое разделение можно проводить различными методами (30,32). Ниже описаны два из них: метод Вебера и Осборн, а также метод, предложенный Лэммли.

В методе Вебера и Осборн буферные растворы для приготовления геля и электродный не отличаются между собой. Обычно используют 0,1 или 0,05 М натрий-фосфатный буфер. В методе Лэммли гелевый и электродный буферные растворы отличаются друг от друга по составу и величине pH. Кроме того, используют два типа гелей - концентрирующий и разделяющий. Эти модификации приводят к тому, что на границе между концентрирующим и разделяющим гелем весь белковый образец собирается в виде узкого диска. Это способствует более четкому разделению белков.

5.4.1. Метод Вебера и Осборн

Реактивы:

1. Акриламид - 30% раствор, содержащий 0,6% метиленабисакриламида.

(Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках)

2. Буфер для приготовления геля - 0,2 моль/л натрий-фосфатный буфер, pH-7,2.

3. Буфер для приготовления образцов - 0,02 моль/л натрий-фосфатный буфер, pH - 7,2.

4. Электродный буфер - 0,05 моль/л натрий-фосфатный буфер, pH - 7,2.

5. Персульфат аммония - 15 мг/мл *(готовят непосредственно перед употреблением)*.

6. ТЕМЕД.

7. Сахароза - 40% раствор.

8. Изопропиловый спирт - 70%.

9. Краситель кумасси R-250 - 0,04% раствор, приготовленный на 20% изопропанол и 10% CH_3COOH .

10. Уксусная кислота - 10% раствор.

11. Додецилсульфат натрия (ДСН) - 10% раствор.

12. β -меркаптоэтанол.

13. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой. В качестве белков-маркеров можно использовать следующие белки: фосфорилаза (91000 Да), бычий сывороточный альбумин (68000 Да), яичный альбумин (42000 Да), химотрипсиноген А (27000 Да), ингибитор трипсина из сои (24000 Да), РНКазы (14000 Да), цитохром с (12000 Да).

Ход работы:

Подготовка образцов: В растворы опытных и стандартных белков, содержащие 2-5 мг/мл, добавляют 10% ДСН до конечной концентрации 1% и β -меркаптоэтанол (для предотвращения неспецифической агрегации поли-пептидных цепей) до конечной концентрации 1-5%. Образцы выдерживают 5 минут при температуре 90°C. Если опытные или стандартные образцы находятся в растворах, содержащих ионы K^+ или NH_4^+ , перед обработкой ДСН их нужно обессолить диализом или гель-хроматографией, так как додецилсульфат калия и аммония плохо растворимы в воде.

Приготовление геля: Сливают в эрленмейеровскую колбочку 10 мл раствора акриламида, 15 мл фосфатного буфера, содержащего 30 мг ДСН, 3,5 мл H_2O , 1,5 мл персульфата аммония и 0,04 мл ТЕМЕД.

Проведение электрофореза: Разделение можно проводить как в трубочках, так и на пластинах для вертикального электрофореза. После обработки ДСН к образцам добавляют сахарозу (до концентрации 10%) и в качестве лидирующего красителя - бромфеноловый синий (до концентрации 0,001%). Образцы исследуемых белков и белков-маркеров наносят на поверхность геля в объеме от 20 до 100 мкл (каждого или смеси нескольких образцов) и осторожно накладывают электродный буфер. Нагрузка на гель определяется методом окраски гелей, а также способностью того или иного белка связывать используемый краситель. Как правило, при электрофорезе в трубочках удается обнаружить от 20 до 100 мкг белка, при электрофорезе в пластинке - от 4 до 15 мкг. В электродный буфер катодного отделения добавляют ДСН до концентрации 0,1%. Электрофоретическое разделение проводят при комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубочку. При этом сначала устанавливают силу тока - 2 мА на трубочку (напряжение около 50 В), напряжение поднимают до 100-200 В лишь после того, как образцы войдут в гель. При проведении

электрофореза в пластине напряженность электрического поля сначала устанавливают равной 6-7 В/см, после проникновения образцов в разделяющий гель напряженность можно увеличивать до 15-20 В/см. Разделение проводят до тех пор, пока краситель не пройдет 4/5 всей длины геля. Обычно это занимает 4-6 ч. После этого электрофорез прекращают, вынимают гель и помещают его для фиксации в 70% изопропанол на 0,5-1 ч. Затем гели прокрашивают раствором кумасси R-250 в течение 2-3 ч. Избыток краски удаляют промыванием 10% раствором CH_3COOH .

Обработка электрофореграмм. Определяют расстояние, пройденное каждым белком от стартовой линии. Определение можно проводить визуально или с помощью денситометра при 550-600 нм. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс длину пути $1a$, пройденного данным белком, а по оси ординат - логарифм его молекулярной массы. Определив длину пути, пройденного белком с неизвестной молекулярной массой $1x$, пользуясь калибровочным графиком, определяют молекулярную массу исследуемого белка. При проведении электрофореза в трубочках часто трудно получить хорошо воспроизводимые результаты на разных трубках. В этом случае определяют не абсолютную, а относительную подвижность белков. Для этого определяют отношение длины пробега белковой зоны либо к общей длине геля, либо к длине пробега лидирующего красителя. После этого строят зависимость относительной подвижности белков от логарифма их молекулярной массы.

5.4.2. Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях

Материалы и оборудование: камера для вертикального электрофореза, заливочное устройство, источник тока, автоматические пипетки, мерные пробирки на 15 мл и 50 мл, наконечники для пипеток, гребенки для геля.

Растворы:

1) 1,5 М буфер для нижнего (разделяющего) геля, pH 8,8-8,9 (18,2 г трис·(трис(гидроксиметил)аминометан) растворить в 100 мл воды, довести pH до 8,8 с помощью HCl конц.);

2) 1,25 М буфер для верхнего (концентрирующего) геля, pH 6,8 (15,1 г трис растворить в 100 мл воды, довести pH до 6,9 с помощью HCl конц.);

3) буфер для проведения электрофореза (электродный, x10), pH 8,2-8,3 (в 1 л воды растворить: 6 г трис, 28,8 г глицина, 2 г додецилсульфата натрия). При использовании буфер разводится деионизированной водой в десять раз;

4) 20 % пересульфат аммония (ПСА), катализатор полимеризации (200 мг ПСА растворить в 1 мл воды). Хранить готовый раствор в холодильнике не более недели, беречь от света;

5) 30 % сток-раствор акриламида-бисакриламида (29 г акриламида и 1 г метиленбисакриламида растворить в воде и затем довести до 100 мл);

6) 0,65 М буфер для солюбилизации и инкубации белковых проб:

а) для денатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего растворить в воде и довести до 10 мл;

б) для денатурирующих условий: 0,785 г трис, 3 мл 30 % глицерина, 2,5 мг бромфенолового синего и 1 г ДСН растворить в воде и довести до 10 мл.

Перед использованием оба концентрированных раствора следует развести в 5 раз, добавить 2 мг дитиотрептола (ДТТ) на 1 мл буфера.

(Все растворы для электрофореза готовят на деионизированной воде тQ. Примесь ионов тяжелых металлов нарушает полимеризацию геля.)

Ход работы:

1. Приготовление сток-раствора для заливки пробки: смешать 3 мл 30 % акриламида-бисакриламида, 1,5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 1,5 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить 25 мкл ПСА и 5 мкл ТЕМЕД.

2. Приготовление сток-раствора для концентрирующего геля (5 %): смешать 0,63 мл 1,25 М буфера для концентрирующего геля, 0,83 мл 30 % сток-раствора акриламида-бисакриламида и 3,42 мл воды.

Непосредственно перед заливкой добавить 20 мкл ПСА и 3 мкл ТЕМЕД.

3. Приготовление разделяющего геля (10 %): смешать 5 мл 1,5 М буфера для разделяющего геля, 6,6 мл 30 % сток-раствора акриламида-бисакриламида и 8,1 мл воды. Непосредственно перед заливкой добавить на 8 мл раствора 80 мкл ПСА и 8 мкл ТЕМЕД.

Растворы для приготовления гелей без ПСА и ТЕМЕД можно хранить в холодильнике 2-3 недели.

4. Подготовка и денатурация белковых проб. Белки из гомогената тканей желательно экстрагировать буфером для приготовления проб (с SDS). Полученную взвесь центрифугируют при 10 000 g 15 мин и дальше работают с супернатантом. Белковые пробы, полученные иным способом, смешивают с буфером для приготовления проб в соотношении 1:2 или 1:3 (по объему). Затем подготовленные пробы погружают в кипящую воду и нагревают 2-5 мин при 95-100°C.

5. Заливка геля:

5.1. Вымыть камеру детергентом, ополоснуть дистиллированной водой, высушить. Собрать камеру для проведения гель-электрофореза.

5.2. Добавить к нужному количеству раствора для пробки необходимое количество ПСА и ТЕМЕД. Немедленно залить пробку. После окончания полимеризации пробки добавить в раствор для нижнего (разделяющего) геля ПСА и ТЕМЕД.

5.3. Немедленно залить нижний (разделяющий) гель. Налить осторожно, не смешивая, водонасыщенный *n*-бутанол (1-2 см).

5.4. После завершения полимеризации отобрать *n*-бутанол тонкой пипеткой, 2-3 раза хорошо сполоснуть получившийся карман дистиллированной водой до удаления запаха спирта, удалить остатки воды фильтровальной бумагой, не касаясь геля.

5.5. Вставить (не до конца!) гребенку между стеклами (до дна кармана должно остаться 0,5-1 см).

5.6. Добавить в раствор для верхнего (концентрирующего) геля ПСА и ТЕМЕД.

5.7. Залить верхний (концентрирующий) гель. После полимеризации установить верхнюю камеру в поддон, залить разбавленный буфер для проведения гель-электрофореза, вытащить гребенку.

5.8. Немедленно промыть лунки шприцом с 1 электродным буфером, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (можно иглой шприца).

6. Внести в карманы необходимое количество проб; подсоединить камеру к источнику тока. При разделении в концентрирующем геле задать напряжение 50 В, силу тока 50 мА, в разрешающем - соответственно 100 В, 80 мА.

5.5.Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси

Зоны разделившихся белков необходимо проявить - сделать видимыми невооруженным глазом. Разделившиеся зоны белков фиксируют осаждением смесью уксусной кислоты и этанола (реже - метанола) или раствором ТХУ и окрашивают, используя раствор красителя. Фиксация предотвращает размывание зон из-за диффузии белковых молекул в геле. Используют такие красители, как амидочерный, кумасси бриллиантовый голубой (марки G-250, R-250), нитрат серебра. Интенсивность окраски полос пропорциональна количеству белка в зоне.

По сравнению с другими красителями кумасси имеет следующие преимущества:

- его чувствительность выше, чем у амидочерного (для R-250 - 0,3-1,0 мкг, для G-250 - около 10 нг белка в полосе);

- зависимость интенсивности окраски от концентрации белка остается линейной в более широком диапазоне концентраций, чем для амидочерного;

- значительно дешевле и проще в использовании, чем нитрат серебра, и не требует особо чистой дистиллированной воды.

Материалы и оборудование: шприц с иглой, лезвие безопасной бритвы и скальпель для отделения геля, лоток для окраски геля, шейкер, водяная баня.

Растворы и реактивы:

- 1) кумасси ярко-синий марок R-250 или G-250;
- 2) этанол (300 мл);
- 3) ледяная уксусная кислота (150 мл);
- 4) ТХУ, 12 % раствор (200 мл).

Ход работы:

Окраска кумасси ярко синим R-250, совмещенная с фиксацией.

1. Подготавливают кипящую водяную баню, установленную в вытяжном шкафу.

2. Готовят раствор красителя следующего состава: этанол - 300 мл, ледяная уксусная кислота - 60 мл, кумасси R-250 - 0,7 г. При необходимости фильтруют (под тягой).

3. Гель помещают в стакан и заливают пятикратным (относительно объема геля) объемом раствора красителя. Стакан с гелем помещают на водяную баню в вытяжной шкаф и кипятят 10

мин. При комнатной температуре окраска также возможна, но займет 4-5 ч.

4. Сливают краситель из стакана, промывают гель дистиллированной водой и заливают 7 % уксусной кислотой. Кипятят на водяной бане 5 мин, затем дважды меняют раствор уксусной кислоты на свежий и повторяют кипячение. Добавление в раствор кусочков фильтровальной бумаги, сорбирующей краситель, ускоряет отмывку (табл.11).

Таблица 11

Преимущества и недостатки использования различных носителей при электрофорезе

Название метода, носитель	Преимущества метода и/или носителя	Недостатки
Электрофорез с подвижной границей (в свободном растворе). Носителя нет.	Первый электрофоретический метод, позволивший разделять белки	Сложно избежать конвекции – перемешивания разделяемых зон; для исследования нужна проба в десятки мг белка; разрешающая способность мала (не более 8 компонентов в пробе).
На фильтровальной или хроматографической бумаге (50-е годы XX в.)	Сниженная конвекция, разделенные зоны можно зафиксировать и окрасить. Оборудование проще.	Непрозрачность. Загрязнения и неоднородность бумаги мешают разделению. “Хвосты” на электрофореграммах из-за высокой адсорбционной емкости. Фон окрашивается, что затрудняет распознавание белковых зон.

На пленках из ацетата целлюлозы (известен с 1957г.)	Быстрый, требует меньшего количества пробы для анализа. Низкая адсорбционная емкость помогает избежать появления "хвостов" на электрофореграмме. После окрашивания фон остается бесцветным. Пригодны для иммуноэлектрофореза.	Непрозрачность в водных растворах (можно добиться прозрачности, погрузив в минеральное масло). Дороже, чем при использовании бумаги. Мало пригоден для препаративного электрофореза.
В крахмальном геле (предложен О. Смитисом)	Первый носитель со свойствами молекулярного сита. Активно препятствует конвекции. Повышает разрешение.	Низкая прозрачность, хрупкость, размер пор можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля трудоемко.
В агаровых и агарозных гелях	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления.	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и COOH-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда — гидростатического давления. Возможно химическое

		взаимодействие веществ с агаром.
В полиакриламидном (ПААГ) геле (предложен Л. Орнштейном и Д. Дэвисом)	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный.	На сегодняшний день — лучший носитель, но готовится из акриламида — ядовитого вещества.

VI ГЛАВА. ХРОМАТОГРАФИЯ

6.1. Хроматографическое разделение аминокислот на бумаге

Хроматографический метод анализа открыт русским ученым М.С.Цветом в 1903 г. В настоящее время многочисленные виды хроматографического анализа широко используются в различных областях химии и биологии.

В зависимости от физико-химических факторов, определяющих основной механизм процесса, методы хроматографического анализа делят на четыре основных вида: адсорбционные, распределительные, ионообменные и осадочные.

Для разделения смеси аминокислот чаще всего применяют метод распределительной хроматографии на бумаге. Он основан на различной степени распределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами (неподвижной водной фазой и подвижной фазой органического растворителя) [43].

Органический растворитель (например, фенол, насыщенный водой, или смесь *n*-бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды), проходя через полоску фильтровальной бумаги, увлекает за собой аминокислоты, раствор которых был нанесен на бумагу. Различные аминокислоты передвигаются по бумаге с неодинаковой скоростью. Скорость перемещения аминокислот зависит от многих факторов: строения молекулы аминокислот, их способности легче растворяться в органическом растворителе или воде, избирательной адсорбции на бумаге, типа бумаги, условий проведения анализа и т. Д. Чем лучше растворяется аминокислота в органическом растворителе, тем больший путь она пройдет с ним по бумаге.

Приняты два способа хроматографического разделения аминокислот на бумаге – восходящий и нисходящий. При восходящем способе растворитель поднимается по бумаге снизу – вверх, при нисходящем – сверху вниз. Положение отдельных аминокислот обнаруживают путем проявления – обработки высушенной бумаги раствором нингидрина и последующего нагревания ее при 100° С. На полоске бумаги (хроматограмме) отчетливо видны пятна фиолетового, синего, голубого, желтого, оранжевого, коричневого цвета.

Положение аминокислот на бумаге можно установить и без проявления, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовых лучах. Пятна отчетливо флуоресцируют в ультрафиолете.

Для разделения аминокислот применяют специальную хроматографическую фильтровальную бумагу высокого качества, она должна быть строго равномерной по толщине и одинаковой по плотности, характеризоваться незначительным содержанием примесей.

На полоску хроматографической бумаги (длина 20-30 см, ширина 10-12 см), на стартовую линию (проведенную простым карандашом на расстоянии 2-3 см от нижнего края), в точки 1,2,3 (обозначенные карандашом на расстоянии 2 см друг от друга), нанесите специальной пипеткой аминокислоты: в точку 1 – триптофан (аланин или аргинин), в точку 2 – глицин (аргинин или лизин), в точку 3 – их смесь. Нанесение проводите в несколько приемов, следя за тем, чтобы пятно раствора при каждом прикосновении пипетки к бумаге не растекалось более чем на 3 мм. Каждую последующую порцию раствора наносите после полного высыхания предыдущей. Диаметр пятна не должен превышать 5 мм. Расстояние точек от бокового края хроматографической бумаги должно быть не менее 2 см (рис.41).

Полоску хроматографической бумаги с нанесенными на нее растворами (после высушивания) поместите в хроматографическую камеру, в которую предварительно (за сутки) налита разделительная система бутанола, уксусной кислоты и воды (15:3:7) или водонасыщенный фенол. Нижний край хроматограммы погрузите в жидкость примерно на 3-5 мм и подвесьте в камере, которую затем закройте.

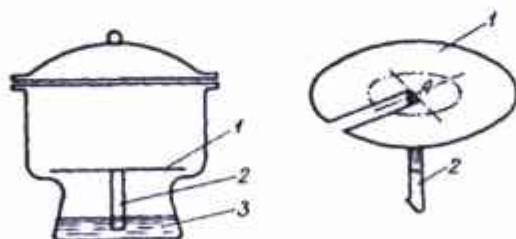


Рис.41. Распределительная круговая хроматограмма аминокислот: 1 – бумажный фильтр; 2 – фитиль; 3 – растворитель.

После достижения фронтом растворителя (водной смеси, бутанола и уксусной кислоты или фенола) верхнего конца бумаги (1-1,5 часа), полоску просушите в сушильном шкафу, предварительно отметив границу фронта растворителя. После этого

опустите её в 0,5% раствор нингидрина в ацетоне на 3 секунды. Затем просушите в сушильном шкафу при температуре 70°C (15 минут). Позиции аминокислот на хроматограмме выявляются в виде сине-фиолетовых пятен. Вклейте хроматограмму в тетрадь. Идентифицируйте пятна, рассчитав значения R_f для каждого пятна [43].

$$R_f = \frac{a}{b}$$

A – расстояние, пройденное аминокислотой;

b – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

Чем лучше растворимость аминокислоты в органическом растворителе, тем выше R_f , тем подвижнее аминокислота. Поскольку у аминокислот в смеси различная скорость движения, происходит их распределение.

Записать принцип работы хроматографического метода, зарисовать или подклеить в тетрадь полученные хроматограммы с указанием идентифицированных аминокислот. С помощью линейки измерить расстояние:

1) от места нанесения капли раствора до середины каждого пятна (a);

2) от места нанесения капли раствора до линии фронта растворителя (b).

Вычислить коэффициент распределения для каждой аминокислоты.

Сделайте вывод:

Таблица 12

R_f простейших аминокислот при хроматографировании на бумаге типа «быстрая» в различных растворителях

Аминокислота	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Глицин	0,45	0,07	0,02	0,03	0,36	0,44	0,28	0,41	0,15
Аланин	0,55	0,10	0,03	0,05	0,44	0,67	0,43	0,54	0,24
Норвалин	—	0,22	0,12	0,19	0,71	—	—	—	—

Валин	0,62	0,18	0,11	0,15	0,65	0,73	0,64	0,65	0,43
Изолейцин	0,67	0,31	0,18	0,27	0,76	0,78	0,71	0,66	0,43
Лейцин	0,69	0,36	0,21	0,31	0,78	0,78	0,72	0,68	0,43
Фенилаланин	0,64	0,36	0,36	0,33	0,79	0,73	0,66	0,66	0,52
Серин	0,47	0,08	0,01	0,02	0,34	0,48	0,34	0,51	0,14
Пролин	0,58	0,11	0,12	0,12	0,57	0,73	0,49	0,56	0,42
Триптофан	0,58	—	—	0,30	—	0,78	0,70	0,63	0,43
Орнитин	0,16	0,02	0,00	0,00	0,24	0,30	0,31	0,29	0,10
Лизин	—	0,02	0,00	0,01	—	—	—	—	—
Аспарагиновая кислота	0,45	0,02	0,00	0,00	0,31	0,38	0,15	0,48	0,07
Глутаминовая кислота	0,51	0,02	0,00	0,01	0,38	0,45	0,19	0,48	0,09
Цистин	—	0,02	0,00	0,00	0,25	—	0,20	—	0,06

Системы растворителей: I - *n*-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:5);

II - изомасляная кислота; III - лутидин - трет-амиловый спирт - вода (7:7:6);

IV - пиридин - изоамиловый спирт вода (7:7:6).

6.2.Разделение белков методом хроматографии

Принцип метода. Колонки - стеклянные трубки, размер которых зависит от целей работы и способа разделения. В основание колонки впаивают пористую стеклянную пластинку или перфорированный диск. Необходимо следить за тем, чтобы «мертвое» пространство под диском, между ним и основанием колонки, а также внутренний диаметр шлангов, по которым

выходящий из колонки элюат поступает в коллектор фракций, было минимальным. В противном случае происходит смешивание уже разделенных веществ. Коммерческие колонки снабжены специальными приспособлениями - концевыми адаптерами переменной длины, которые позволяют регулировать длину колонки и сводят к минимуму перемешивание элюируемых фракций.

Заполнение колонки. Колонку укрепляют строго вертикально, закрывают нижний кран (зажим) и наливают в нее примерно на 1/3 ее объема дистиллированной воды. Энергичными движениями стеклянного поршня освобождают пространство под регистрирующим устройством и (или) коллектором фракций диском от пузырьков воздуха. На диск с помощью поршня помещают кружок фильтровальной бумаги, по размерам точно соответствующий внутреннему диаметру колонки. Поршень осторожно вынимают, следя за тем, чтобы в колонку не попали пузырьки воздуха. Через воронку или по палочке наливают в колонку густую, тщательно взмученную взвесь используемого сорбента так, чтобы жидкость стекала по стенке колонки и не увлекала в свою толщу пузырьков воздуха.

Суспензии дают осесть, через несколько минут открывают кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции взвеси. Во избежание слишком сильного уплотнения сорбента заполнение колонки производят при небольшом давлении (особенно важно следить за этим при работе с гелем сефадекса). Давление определяет величина h - разница между уровнем жидкости над сорбентом в колонке (или присоединенном к ней верхнем резервуаре) и положением конца шланга, по которому элюат вытекает из колонки. Необходимо следить за тем, чтобы наполнение колонки было равномерным.

Заполнив колонку до нужной высоты, закрывают нижний кран (зажим) и дают суспензии осесть, не допуская «высыхания» наполнителя в колонке (для этого над верхним слоем сорбента всегда должен находиться слой растворителя). Следят также за тем, чтобы верхний слой наполнителя имел гладкую горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним иногда помещают кружок фильтровальной бумаги или поролон. Колонку закрывают пробкой с отводом или со стеклянной трубкой и присоединяют к резервуару, содержащему элюирующий раствор. Для поддержания

постоянного давления и сохранения постоянной скорости тока жидкости через колонку используют склянку Мариотта или насосы различных конструкций.

Внесение образца в колонку можно производить несколькими способами. Самый простой из них заключается в следующем: жидкость с поверхности наполнителя осторожно удаляют, оставляя слой в 1-2 мм; при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться; остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента; после того как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой в 5-10 см.

После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, устанавливают необходимую скорость протекания элюирующего раствора путем изменения рабочего давления и начинают сбор фракций с помощью коллектора. Собирать фракции элюата необходимо с момента нанесения образца на колонку. Фракции можно собирать в пробирку по объему (с помощью сифонов), по определенному количеству капель или через определенные промежутки времени.

Элюирование разделяемых веществ с колонок, как правило, проводят растворами, изменяя pH, ионную силу (концентрацию) или оба показателя одновременно. При этом градиент pH и ионной силы может быть ступенчатым или непрерывным (плавным). При создании ступенчатого градиента пользуются серией буферных растворов, пропускаемых через колонку последовательно один за другим. При этом виде элюции каждый из элюирующих буферных растворов пропускают через колонку до тех пор, пока концентрация белка в вытекающем из колонки элюате, пройдя через максимум, не снизится почти до исходных фоновых значений.

При непрерывном градиенте элюции изменение ионной силы и (или) pH элюирующего раствора происходит постепенно, по линейной или нелинейной зависимости от объема протекающей жидкости. Линейное изменение ионной силы или pH элюирующего раствора происходит тогда, когда эти параметры изменяются пропорционально объему протекающей жидкости. Получить линейный градиент можно с помощью прибора, состоящего из двух соединенных между собой одинаковых сосудов, установленных на одном уровне. В одном сосуде находится буферный раствор со значением ионной силы (или pH), которое должно быть достигнуто

к концу опыта, в другом смесителе, из которого раствор поступает непосредственно в колонку, вначале находится равный объем исходного буферного раствора. Часто применяют «выпуклый» или «вогнутый» градиенты, при которых ионная сила раствора увеличивается или уменьшается соответственно по экспоненциальной зависимости [31].

6.3. Метод гель-хроматографии

Принцип метода. Гель-хроматография (гель-фильтрация) - фракционирование смеси компонентов по размерам молекул путем прохождения их через гели с определенной величиной пор.

Раствор, содержащий смесь двух и более веществ, отличающихся по размеру молекул, а, следовательно, и по молекулярной массе, вносят в колонку, заполненную гелем с сетчатой структурой и уравновешенную буферным раствором. Наибольшей скоростью продвижения по колонке обладают компоненты раствора, размеры молекул которых больше пор геля. Такие компоненты не проникают в гранулы гелевой фазы и выходят из колонки первыми. Более мелкие молекулы, способные проникать внутрь геля, непрерывно обмениваются между жидкими фазами внутри и вне геля и продвигаются по колонке значительно медленнее. Находящиеся в растворе самые маленькие частицы (например, неорганические соли) выходят из колонки последними. На этом принципе основаны методы фракционирования белков и других полимеров, их обессоливание, определение молекулярной массы, замена одних буферных растворов другими и др.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гельхроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрылы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др. Набухая в воде, они образуют гели. Сефадексы - продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам щелочей и разбавленным кислот (до 0,1 Н.). Рабочий диапазон рН составляет 2-10. Гели декстрана подвержены действию сильных окислителей, вызывающих образование карбоксильных групп.

Номера в маркировке сефадексов характеризуют их пористость. Выбор определенной марки сефадекса определяется

молекулярной массой исследуемого белка (чем больше соответствие размеров молекул и величины пор, тем выше селективность), а степень зернения - поставленной задачей. Для обессоливания растворов белков и их концентрирования обычно используют сефадексы G-25 и G-50 (грубый или средний). При разделении же смеси белков пользуются сефадексами тонкого или сверхтонкого зернения. Чем мельче частицы геля, тем эффективнее происходит разделение, но тем меньше скорость протекания раствора через колонку [31].

Реактивы:

1. Натрий-фосфатный или калий-фосфатный буфер - 0,05 моль/л растворы, содержащие 0,05 моль/л KCl, pH- 6,5.
2. Сефадекс G-100.
3. Белки с определенной молекулярной массой (Да): яичный альбумин (45000), бычий сывороточный альбумин (68000), рибонуклеаза из поджелудочной железы (12700) цитохром с (13000).
4. Голубой декстран (2000 кДа).
5. Сахароза.

Ход работы. Разделение белков на колонках с сефадексом.

Сухой сефадекс суспендируют в 200-кратном объеме воды и оставляют стоять на 48 ч при комнатной температуре для полного набухания. Набухание можно ускорить, проводя его на кипящей водяной бане в течение 5 ч.

Колонку (размером 1,5x50 см)³ подготавливают так, как описано выше. В нее вносят относительно густую суспензию полностью набухшего геля. Для предотвращения образования пузырьков воздуха в слое геля в колонке суспензию сефадекса перед заполнением колонки можно деаэрировать с помощью водоструйного насоса в колбе Бунзена или вносить его в колонку при температуре, значительно превышающей комнатную (50-60°C). Сефадексу в колонке дают отстояться, затем с целью уравнивания и достижения постоянной высоты столба геля колонку промывают 3-5 объемами буферного раствора. Гидростатическое давление для сефадекса G-100 не должно превышать 50 см: $h=20-50$ см (давление при разделении образца и при заполнении колонки должно быть одинаковым). Для проверки равномерности заполнения через колонку можно пропустить раствор окрашенного белка, например, цитохрома с или голубого

декстрана. При этом окрашенная зона должна быть компактной и двигаться по колонке параллельно ее основанию.

Исследуемую белковую смесь растворяют в буферном растворе в объеме 1 мл (по 2-4 мг каждого белка) и вносят в колонку. Нанесение пробы на колонку проводят, как описано выше, увеличив плотность раствора добавлением сахарозы до 0,5 моль/л.

Перед использованием колонки определяют ее свободный объем (V_0). Для этого через колонку пропускают 1 мл (1 мг/мл) раствора голубого декстрана в 0,5 моль/л растворе сахарозы. В качестве растворителя как для голубого декстрана, так и для исследуемых белков применяют тот же буферный раствор, которым уравновешена колонка. Им же элюируют белки с колонки после нанесения анализируемой смеси. Следует отметить, что поскольку положительно заряженные частицы могут частично взаимодействовать с сефадексом (за счет имеющихся карбоксильных групп), для элюции обычно используют растворы с ионной силой выше 0,02. Если исследуемые белки после гель-хроматографии надлежит лиофилизировать, для элюции используют летучие буферные растворы (аммоний бикарбонатный, ацетатный, формиатный и др.).

Вытекающий из колонки буферный раствор собирают в пробирки порциями по 1—3 мл. Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку, начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм. Оптическую плотность растворов, содержащих рибонуклеазу, определяют при 230 нм, голубой декстран - при 650 нм, цитохром- С при 412 нм. После окончания анализа колонку промывают несколькими объемами буферного раствора. Строят профиль элюирования отдельных белковых фракций. Для этого вычерчивают график, на горизонтальной оси которого откладывают номера пробирок (фракций) или объем прошедшей через колонку жидкости, а на вертикальной оси - величины оптической плотности фракций.

Регенерация и хранение сефадекса. Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02% азида натрия, мертиолата или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-

кратным объемом 50% этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадексе выдерживают с 2-кратным объемом 96% этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60-80°C.

6.4.Метод ионообменной хроматографии

Принцип метода. В основе разделения соединений методом ионообменной хроматографии лежат реакции ионного обмена между анализируемыми соединениями и сорбентами-ионитами, имеющими в своем составе ионизируемые группировки.

Сильные иониты, функциональные группы которых образованы сильными кислотами или основаниями, могут быть ионизированы полностью во всем диапазоне рабочих значений pH - 3-11. Слабые иониты, функциональные группы которых образованы слабыми кислотами или основаниями, могут быть ионизированы не полностью и лишь в ограниченной области значений pH .

При фракционировании белков методом ионообменной хроматографии большое внимание уделяют выбору ионообменника (природе матрицы и емкости ионита) и буферного раствора, при котором осуществляется сорбция белков (величине pH и ионной силы, природе буфера и буферной емкости). При работе с белками в качестве сорбентов используют иониты, обладающие высокой степенью гидрофильности.

Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах. Выбор типа ионита определяется изоэлектрическими точками хроматографируемого материала и устойчивостью белка в определенной зоне значения pH .

Эффективная сорбция белков происходит при значениях pH , отстоящих не менее чем на единицу от pI . В области $pH < pI - 1$ белки можно хроматографировать на катионитах, а в области $pH > pI + 1$ - на анионитах. Изменение pH в направлении к ИЭТ способствует десорбции белков. При работе с белками используют буферные растворы с низкой ионной силой, но высокой буферной емкостью. Для этого пользуются буферными растворами, pK которых отстоит от величины pH , используемой в эксперименте, не более чем на 0,3-0,5 единиц pH . Хроматографию на анионитах ведут в таких системах, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазод и др.), а для катионитов

диссоциируемым компонентом является анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный буфер и др.).

При ионообменной хроматографии смесь белков сорбируется в верхней части колонки и затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию на ионите. Понижение сорбции осуществляют повышением ионной силы раствора и (или) изменением его pH. Изменение pH и ионной силы элюирующего буферного раствора можно проводить путем создания ступенчатой или градиентной элюции [31].

Ход работы: *Подготовка ионообменников к работе.* Навеску порошка сорбента суспендируют в 50-кратном и более объеме дистиллированной воды, перемешивают и оставляют набухать на ночь. Слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают дистиллированной водой, перемешивают и через 2—2,5 ч верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К оставшемуся осадку приливают 50-кратный объем 0,5 N NaOH, тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через воронку Бухнера. Осадок на воронке промывают водой до pH 7,0. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5 N HCl и через 30-60 мин отмывают дистиллированной водой примерно до pH 5,0. На следующем этапе в случае анионитов, например, ДЭАЭ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой щелочью переводят в OH--форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном объеме 0,5N NaOH, перемешивают и через час отмывают дистиллированной водой до pH воды. В случае катионитов, например, КМ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H+-форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном избытке 0,5 M раствора HCl в течение 30-60 мин. После фильтрования сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока pH промывной жидкости не достигнет pH воды.

Для освобождения от мелких и крупных частиц ионит суспендируют в цилиндре на 1 л, перемешивают, отстаивают 20-30 мин и верхний слой жидкости с неосевшими мелкими частицами декантируют. Эту операцию повторяют несколько раз (5-6), пока жидкость над осадком будет свободной от мелкой взвеси. Чтобы освободиться от крупных частиц, ионит суспендируют в воде, перемешивают и через ~ 1 мин суспензию сливают в другой цилиндр.

После описанной обработки ионит уравнивают буферным раствором, в котором осуществляют сорбцию белков на ионообменнике (исходный буферный раствор). Эту процедуру можно проводить как на колонке, так и вне ее. Обработку исходным буферным раствором осуществляют до тех пор, пока не произойдет выравнивания pH элюата на выходе из колонки (или жидкости, в которой суспендируют ионит) с pH исходного буферного раствора. Для ускорения уравнивания колонки ионит можно сначала обработать раствором того же состава, что и исходный, но с большей концентрацией, а после достижения нужного значения pH уравнивание продолжают исходным раствором. Другой способ уравнивания заключается в том, что ионит суспендируют в исходном буферном растворе до получения достаточно жидкой суспензии. Добавлением раствора, содержащего соответственно кислый или основной компонент исходного буфера, доводят pH (на pH-метре) до нужного значения. Затем сорбент уравнивают исходным буферным раствором. Во всех случаях конечное состояние равновесия (величину pH) необходимо контролировать.

Регенерация. По окончании работы ионообменники следует регенерировать. Для этого к использованному сорбенту добавляют 30-кратный объем 0,2-0,5 N раствора NaOH, перемешивают до получения однородной суспензии и фильтруют на воронке Бухнера. Обработку щелочью проводят дважды. После этого ионит отмывают водой до нейтральной реакции фильтрата. Регенерированный ионообменник уравнивают соответствующим буферным раствором.

Хранение. Ионообменники на основе целлюлозы и декстрана можно хранить во влажном состоянии непродолжительное время. Аниониты лучше хранить в солевой форме (не в OH--форме), катиониты хранят в солевой форме и в H+-форме. При хранении набухших ионообменников к ним добавляют антисептики; при добавлении толуола (нескольких капель на литр) следует помнить, что толуол поглощает при 280 нм, а растворимость его в некоторых буферах, например, в трис-буфере, достаточно высока.

Подготовка и заполнение колонки. Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в воде и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку

элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 2 см.

Подготовка исследуемого материала. Раствор белка, наносимый на колонку, должен иметь тот же состав и те же значения pH и ионной силы, что и исходный буферный раствор, которым уравновешен ионообменник. Образец переводят в исходный буферный раствор, подвергая его предварительно диализу или гель-хроматографии. Если объем пробы, предназначенный для ионообменной хроматографии, невелик, образец можно развести исходным буферным раствором. Нерастворимые компоненты удаляют центрифугированием или фильтрованием. Если исследуемый белок связывается с ионообменником прочно, объем наносимого белкового раствора значения не имеет, если он связывается слабо, наносимый объем должен быть по возможности небольшим.

Элюция белков с колонки. Скорость протекания элюента по колонке при ионообменной хроматографии сказывается на результатах разделения. При медленном токе жидкости, например, порядка 8 мл/см²·ч, разделение лучше, чем при токе жидкости через ту же колонку со скоростью 20 мл/см²·ч. На разделительной способности колонки сказывается, и крутизна создаваемого градиента элюции: чем круче градиент, тем острее пики на кривой элюции, однако лучшему разделению способствует более пологий градиент (рис.42).

Таблица 13

Области применения препаративной хроматографии

Масса вещества	Область применения
Микрограммы	Ферменты для молекулярной биологии
Миллиграммы	Биологические и биохимические тесты Характеристика структуры веществ (ЯМР, МС) Анализ побочных продуктов реакций Метаболиты биологических объектов Природные соединения для исследования
Граммы	Аналитические стандарты – наработка веществ Соединения для токсикологического скрининга Особо чистые вещества для исследований Выделение побочных продуктов реакций
Килограммы	Промышленное производство Фармацевтическая промышленность

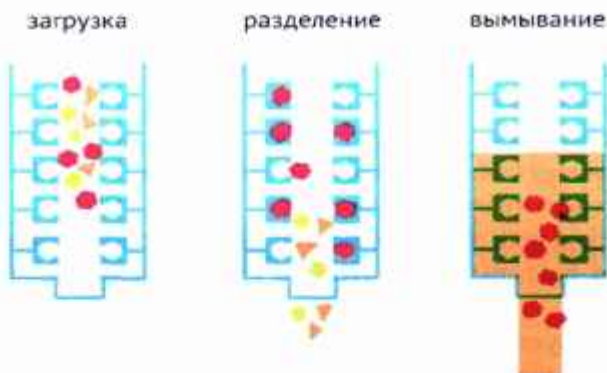


Рис. 42. Разделительная способность колонки.

6.5.Аффинная хроматография.

Колонка наполнена сорбентом, покрытым веществом, которое способно узнавать интересующую нас молекулу, или самими интересующими нас молекулами — смотря что мы хотим выудить из пробы. После пропускания через колонку смеси веществ в ней задержится только то, что способно специфически связаться с сорбентом. Потом это вещество можно снять с колонки или высокой концентрацией соли, или другим значением pH среды, или денатурантом — условиями, нарушающими специфическое сродство связанной молекулы и сорбента (рис.43) [14].

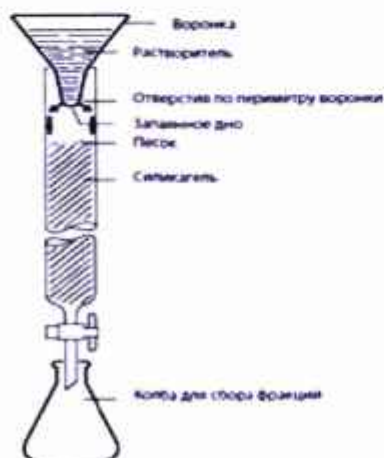


Рис.43. Базовый принцип препаративной хроматографии на примере метода, предложенного Кларком Стиллом. Колонка, заполненная песком и силикагелем, оснащенная также краником для дозирования элюата.

VII ГЛАВА. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

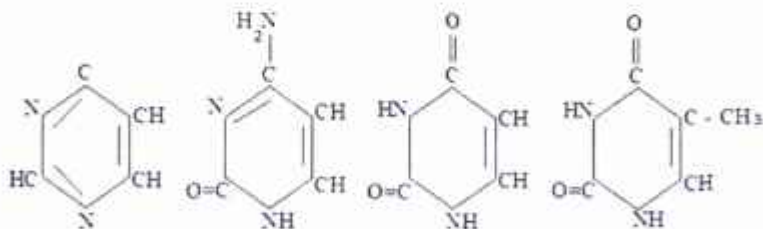
Нуклеиновые кислоты - ДНК (дезоксирибонуклеиновая) и РНК (рибо-нуклеиновая) кислоты играют ключевую роль в сохранении всех генетических маркеров в организме и в синтезе белка. Дезоксирибонуклеиновая кислота находится в основном в ядре эукариот (животных и растений).

Митохондрии также содержат ДНК. Ядро эукариот содержит несколько пикограмм (пг) ДНК: 6 пг у млекопитающих и 2 пг у птиц.

Существует три типа рибонуклеиновых кислот: информационная РНК (и-РНК), транспортная РНК (т-РНК) и рибосомальная РНК (р-РНК). Они отличаются друг от друга в зависимости от их состава, размера, функциональных свойств и расположения в клетке. РНК в основном находится в цитоплазме клетки, в меньшей степени в ядре. Функция, выполняемая РНК в клетке, заключается в участии в синтезе белковых молекул.

Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды) - это полимеры, состоящие из нуклеотидов. Нуклеотиды состоят из трех компонентов: азотистых оснований (пурин или пиримидин), углеводных компонентов - пентозы (рибоза или дезоксирибоза) и остатка фосфорной кислоты.

Пиримидиновые основания:



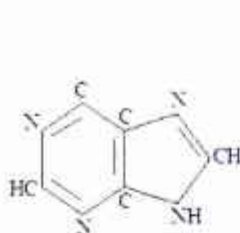
Пиримидин

Цитозин

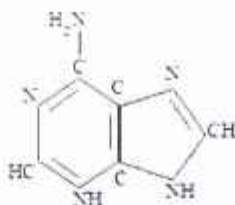
Урацил

Тимин

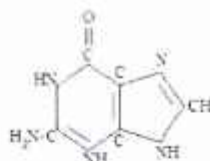
Пуриновые основания:



Пурин

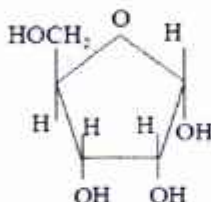


Аденин

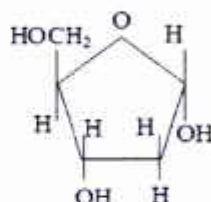


Гуанин

В зависимости от содержания пентозы нуклеиновые кислоты делятся на две группы: РНК и ДНК. Молекула РНК содержит рибозу, а молекула ДНК - дезоксирибозу.



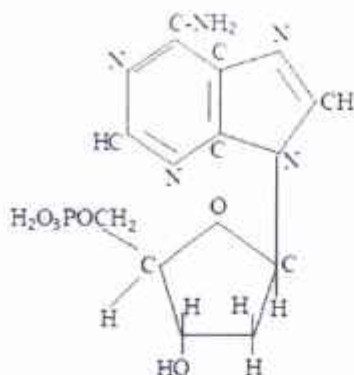
Д-рибоза



Д-2-дезоксирибоза

РНК содержит аденин, гуанин, цитозин и рибозу из азотистых оснований, и рибозу из углеводных компонентов. ДНК содержит из азотистых оснований - аденина, гуанина, цитозина и тимина, дезоксирибозу из углеводных компонентов. ДНК состоит из двух полинуклеотидов со спиральной цепью, а РНК состоит из одной спиральной цепи.

Нуклеотиды содержат аденин, который называется аденилат, гуанин, который называется гуанилат, и цитозин, который называется цитидиловой кислотой.



Аденозинмонофосфат

Кроме перечисленных оснований в состав нуклеиновых кислот в небольших количествах встречаются *минорные основания* (редко встречающиеся). Например, дигидроурацил, псевдоуридин, ксантин, гипоксантин, ацетилцитозин и др.

Нуклеопротеиды - сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части - нуклеиновых кислот. Нуклеопротеиды содержатся в большом количестве в ядерном веществе клеток. Кроме того, они выделены из цитоплазмы.

Нуклеопротеиды обладают свойствами кислот, нерастворимы в воде и растворимы в щелочах. Нуклеопротеиды содержат простой белок, в основном состоящий из протаминов или гистонов, которые обладают щелочными свойствами за счет большого количества входящих в них диаминомонокислот (аргинин, лизин и гистидин). Небелковая часть нуклеопротеидов представлена нуклеиновыми кислотами.

Нуклеиновые кислоты обладают кислотными свойствами вследствие диссоциации имеющихся у них остатков фосфорной кислоты [1,3,40].

7.1.Выделение нуклеопротеидов из печени животных

Реактивы: 5% -й раствор хлорида натрия, дифениламинный реактив (1г дифениламина в 100 мл ледяной уксусной кислоты, 2,75мл H_2SO_4 конц.), печень, дистиллированная вода.

Оборудование: гомогенизатор, центрифуга, центрифужные весы, центрифужные пробирки, стакан химический на 100 мл,

пипетка на 10 мл, цилиндры на 25 и 50 мл, стеклянные палочки, штатив с пробирками, водяная баня.

Ход работы: Навеску ткани печени 500 - 100 мг гомогенизируют в 5-10 мл 5%-го раствора хлорида натрия. Полученный гомогенат переносят в центрифужные пробирки, уравнивают их на центрифужных весах и центрифугируют 10 - 15 минут при 1500 - 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость делят на 2 части. В одной из пробирок проводят качественную реакцию на ДНК (см. ниже). Вторую пробирку помещают в кипящую водяную баню, предварительно добавив 3 мл 2 %-го раствора серной кислоты для проведения гидролиза (гидролиз проводят в течении часа). Гидролизат охлаждают, центрифугируют. В надосадочной жидкости содержатся составные компоненты нуклеопротеидов. Надосадочную жидкость разделяют на 3 части и проводят следующие качественные реакции: 1) на пуриновые основания, 2) на углеводную группировку, 3) на фосфорную кислоту.

Реакция на ДНК: К 10 каплям раствора приливают 10-15 капель дифениламинового реактива, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 10-15 минут. При нагревании дезоксирибонуклеопротеиды гидролизуются, а освободившаяся дезоксирибоза реагирует с дифениламином. Раствор дифениламина в смеси с уксусной и серной кислотами дает при нагревании с дезоксирибозой серо-синее окрашивание.

1. Проба на пуриновые основания: К 10 каплям гидролизата добавляют 1 каплю концентрированного раствора аммиака для нейтрализации и 5 капель 1%-го раствора AgNO_3 . При стоянии выпадает рыхлый осадок бурого цвета, обусловленный образованием соединений серебра с пуриновыми основаниями.

2. Качественные реакции на углеводы (рибозу и дезоксирибозу): Эти реакции основаны на способности рибозы и дезоксирибозы восстанавливать ионы металлов (медь, висмут, железо) в щелочной среде.

К 5 каплям гидролизата добавляют 5 капель 30%-го раствора гидроксида натрия и несколько капель 7%-го раствора сульфата меди до появления исчезающей мути гидроокиси меди (II) $\text{Cu}(\text{OH})_2$. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок гидрата меди (I) CuOH или красный осадок оксида меди (I) Cu_2O .

3. Молибденовая проба на фосфорную кислоту: К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель молибденового реактива, представляющего собой раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте, и кипятят. При охлаждении пробирки под струей холодной водопроводной воды выпадает кристаллический осадок лимонно-желтого цвета, обусловленный образованием фосфорномолибденовокислого аммония.

7.2.Выделение дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП) из тканей

Принцип работы: Дезоксирибонуклеопротеиды растворяются в растворах солей средней концентрации (например, в 1М хлориде натрия) с образованием вязких растворов и снова осаждаются при разведении их (0,15М) в виде нитей нуклеопротеидов.

Реактивы и оборудование:

1) NaCl 2М и 1М растворы, содержащие 0,04% трехзамещенного цитрата натрия (раствор хранят в холодильнике); 2) NaOH, 0,4 и 10% растворы; 3) дифениламиновый реактив, 1% раствор (1г дифениламина, дважды перекристаллизованного из 70% спирта или петroleйного эфира, растворяют в смеси 2,75 мл концентрированной серной кислоты и 100 мл ледяной уксусной кислоты); 4) CuSO₄, 1% раствор; 5) селезенка, печень.

Ход работы:

1. В ступке, охлаждаемой льдом, растирают 2 г ткани органа, затем постепенно добавляют 5мл охлажденного 2М раствора хлорида натрия, содержащего 0,04% трехзамещенного цитрата натрия, и растирают в ступке еще в течение 15мин.

2. Затем, перемешивая содержимое, постепенно, малыми порциями добавляют 50 мл охлажденного 1М раствора хлорида натрия. Образовавшуюся гомогенную массу переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

3. Надосадочную жидкость после центрифугирования сливают в маленький стакан, измеряют в цилиндре объем полученного центрифугата и медленно вливают его в шестикратный объем дистиллированной воды тонкой струйкой, размешивая жидкость деревянной палочкой. Выделившиеся нити ДНП наматывают на деревянную палочку. Затем часть нитей ДНП осторожно собирают и вместе с палочкой переносят в другую пробирку.

4. Нити выделенного ДНП растворяют в 1 мл 0,4% раствора NaOH. Полученный раствор делят на две части и ставят: 1) биуретовую реакцию (на белок); 2) реакцию с дифениламином (на ДНК).

Биуретовая реакция на белковый компонент в ДНП

К 5-10 каплям раствора ДНП добавляют 10 капель 10% раствора NaOH и по 1 капле 1% раствора сульфата меди (II). Раствор окрашивается в сине-фиолетовый цвет [52].

Реакция на ДНК

При нагревании ДНП гидролизуются, а освободившаяся дезоксирибоза дает синее окрашивание.

К раствору (15-20 капель) добавляют равный объем дифениламина, находящегося в смеси с уксусной и серной кислотами. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Жидкость постепенно приобретает синюю окраску, обусловленную реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

Результаты и выводы:

7.3.Выделение дезоксирибонуклеопротеидов из печени или селезенки

Нуклеопротеидами богаты печень, селезенка, поджелудочная железа, почки, дрожжи. Они растворяются в разбавленных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении раствора. Дезоксирибонуклеопротеиды хорошо растворяются также в солевых растворах.

Реактивы и материалы: а) печень или селезенка крупного рогатого скота или свиньи, свежие или замороженные; б) хлористый натрий, 5% -ый раствор; в) деревянная палочка с насечками.

2—2,5 г печени или селезенки разрезают на маленькие кусочки и затем растирают в ступке с 5%-ным раствором хлористого натрия, добавив немного стеклянного порошка. Раствор соли добавляют небольшими порциями (по 10—15 мл), всего расходуют его около 80 мл.

Растирают 12—15 мин. до получения гомогенной массы. Содержимое ступки разливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10—15 мин. (при 2500 оборотах в минуту), после чего измеряют объем центрифугата (сливая его в стеклянный цилиндр).

В стакан наливают дистиллированную воду (объем которой должен быть в шесть раз больше объема центрифугата) и, медленно помешивая в стакане деревянной палочкой, вливают в воду центрифугат.

Дезоксирибонуклеопротейды выпадают в виде нитей, которые наматывают на палочку.

7.4. Гидролиз нуклеопротейдов

Принцип работы: Для изучения состава нуклеопротейдов проводят кислотный гидролиз дрожжей в присутствии серной кислоты. При непродолжительном, т.е. частичном, гидролизе нуклеопротейды распадаются на белок и нуклеиновые кислоты. По продолжительном гидролизе наступает полный распад нуклеопротейдов (рис.44).

При гидролизе мононуклеотидов выделяются пуриновые или пиримидиновые основания, углевод (рибоза или дезоксирибоза) и фосфорная кислота.

Составные части нуклеопротейдов в гидролизате можно открыть с помощью цветных (качественных) реакций.

Исследуемый материал: дрожжи (пекарские).

Реактивы и материалы:

- 1) серная кислота, 10% раствор;
- 2) едкий натр, 10% раствор;
- 3) медь сернокислая, 1% раствор;
- 4) аммиак концентрированный;
- 5) азотнокислое серебро, 1-2% раствор (аммиачный раствор);
- 6) молибденовый реактив - раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте; 7) концентрированная серная кислота;
- 8) тимол, 1% алкогольный раствор;
- 9) круглодонная колба с воздушным холодильником; 10) воронка с фильтром;
- 11) мерный цилиндр на 50 или 100 мл.

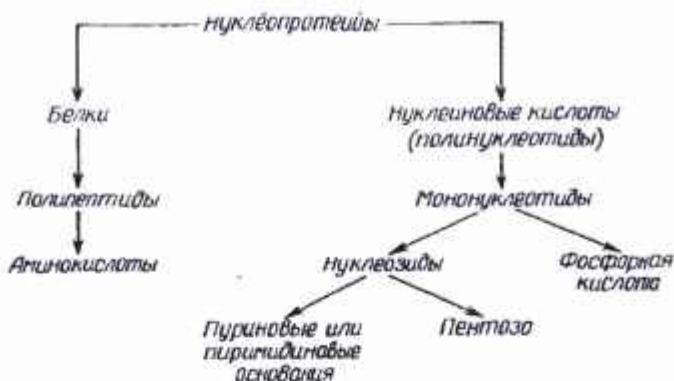


Рис.44. Схема гидролиза нуклеопротеидов

Ход работы: Кислотный гидролиз нуклеопротеидов.

Помещают 1 г пекарских дрожжей в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 20 мл 10% раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятят под тягой в течение 1 часа на асбестовой сетке при слабом нагревании. Через час после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть, переносят в цилиндр, доводят водой до первоначального объема и фильтруют.

С фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеидов. При гидролизе нуклеиновых кислот обнаруживаются фосфорная кислота, рибоза или дезоксирибоза и азотистые основания - пуриновые и пиримидиновые.

2. Качественные реакции на составные части нуклеопротеидов.

а) Биуретовая проба на полипептиды.

К 5 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 10% раствора едкого натра и 1 каплю 1% раствора медного купороса. Жидкость окрашивается в розовый цвет.

б) Серебряная проба на пуриновые основания.

Нейтрализуют 10 капель гидролизата 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1% раствора азотнокислого серебра. При стоянии через 3-5 мин выпадает небольшой бурый осадок серебряных производных пуриновых оснований.

в) Качественная реакция Молиша на пентозную группировку.

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз - оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом (метилизопропилфенол) или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета.

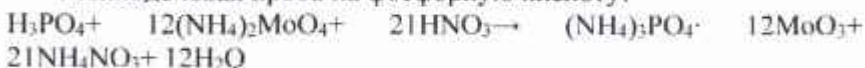
К 10 каплям профильтрованного гидролизата дрожжей добавляют 2-3 капли 1% алкогольного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20 капель концентрированной серной кислоты.

При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфуrolа с тимолом.

г) Молибденовая проба на фосфорную кислоту.

К 3-5 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте) и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту:



7.5.Выделение нуклеопротеидов из дрожжей

Реактивы и материалы: а) дрожжи пекарские, прессованные; б) диэтиловый эфир; в) едкий натр, 0,4%-ный раствор; г) уксусная кислота, 5%-ный раствор; д) стеклянный порошок или речной песок, тщательно промытый и прокаленный.

5 г дрожжей увлажняют в ступке 1 мл диэтилового эфира и 1 мл воды, добавляют немного стеклянного порошка или песка и растирают с 0,4%-ным раствором едкого натра, приливая его небольшими порциями (по 5 - 10 мл). Всего расходуют до 50 мл раствора щелочи; растирание продолжают в течение 15 - 20 мин. Содержимое ступки фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют в течение 10 мин. (при 2500 оборотах в минуту). Фильтрат или центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям

добавляют 5%-ный раствор уксусной кислоты до полного осаждения нуклеопротейда (обычно расходуют 10 - 15 мл раствора).

Осадок отделяют центрифугированием [43].

1. Гидролиз нуклеопротейдов

Гидролиз нуклеопротейдов происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой.

Реактивы и материалы:

а) осадок нуклеопротейдов (предыдущей работе);

б) серная кислота, 5%-ный раствор;

в) серная кислота, концентрированная;

г) едкий натр, 10%-ный раствор;

д) аммиак, концентрированный раствор (20—25%-ный);

е) сернокислая медь, 1%-ный раствор;

ж) тимол, 1%-ный спиртовой раствор;

з) аммиачный раствор окиси серебра: к 1-2%-ному раствору азотнокислого серебра добавляют концентрированный раствор аммиака до растворения образующегося в начале осадка;

и) молибденовый реактив: 3,75 г молибденовокислого аммония растворяют в 50 мл воды и добавляют 50 мл 32%-ной азотной кислоты ($\rho_{20} = 1,200$). Полное растворение соли происходит только после прибавления азотной кислоты.

Осадок нуклеопротейдов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5%-ной серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20-25 мл раствора. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипения и кипятят 1-1,5 ч, после чего охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят реакции на полипептиды, пуриновые основания, пентозы и фосфорную кислоту (*Гидролитическое расщепление нуклеопротейдов можно производить и без выделения их из дрожжей*).

Отвешивают 1г прессованных дрожжей, переносят навеску в круглодонную колбу вливают 30-40 мл 5%-ного раствора серной кислоты, закрывают колбу пробкой с воздушным холодильником, нагревают на малом огне до кипения, подложив под колбу асбестовую сетку. Кипятят 1-1,5 ч, после чего колбу охлаждают, содержимое ее фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят перечисленные ниже реакции [43].

7.6. Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеидов

Обнаружение полипептидов: Для выявления белка с частью фильтрата (2 мл) проводят биуретовую реакцию, добавляя 2 мл 10% раствора NaOH до щелочной реакции по лакмусу. Затем вносят 3 капли 1% раствора CuSO_4 и наблюдают появление фиолетовой окраски.

Обнаружение пуриновых оснований: К 2 мл фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции на лакмус и приливают 1 мл аммиачного раствора окиси серебра. Через несколько минут выпадают хлопья осадка серебряных солей пуриновых оснований.

Обнаружение пентоз: Определение пентоз основано на реакции с тимолом и концентрированной серной кислотой. Серная кислота вызывает дегидратацию пентоз и образование фурфурола, который с тимолом дает соединения красного цвета (продукты конденсации).

К 1 мл фильтрата добавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно настилают 1 мл концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев.

Обнаружение фосфорной кислоты: К 1 мл фильтрата приливают 2 мл молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорно-молибденово-кислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.

Пентозы можно обнаружить также с помощью реакций с орцином, или флороглюцином, или фелинговой жидкостью.

трихлоруксусной кислоты, переносят в центрифужную пробирку. Центрифугируют 7 минут (3000 - 4000 об/мин) в центрифуге с охлаждением или низкотемпературной комнате. Жидкость над осадком сливают, к осадку вновь приливают 5-10 мл 10%-ного холодного раствора трихлоруксусной кислоты и снова центрифугируют. Операцию повторяют в третий раз.

В осадке остаются нуклеиновые кислоты, белки и липиды, в промывные воды переходят низкомолекулярные производные азотистых оснований (в том числе нуклеотиды) и неорганические фосфорные соединения.

(Все операции необходимо проводить при низкой температуре во избежание отщепления пуринов (апуринизации) и последующего разрыва цепей ДНК при щелочном гидролизе.)

2) Осадок освобождают от липидов путем экстракции органическими растворителями, для чего его растирают стеклянной палочкой и последовательно центрифугируют с этиловым спиртом, два раза со смесью спирта с хлороформом (3:1), затем со смесью спирта с эфиром (3:1) и, наконец, с эфиром. Каждый раз берут по 10 мл растворителя. Промытый осадок высушивают в вытяжном шкафу (для ускорения высушивания осадок растирают стеклянной палочкой). В осадке остаются нуклеиновые кислоты и белки.

3) Разделение ДНК и РНК.

При мягком щелочном гидролизе РНК расщепляется до нуклеотидов, тогда как ДНК остается полимерной и выпадает в осадок при добавлении кислоты (хлорной или трихлоруксусной).

К высушенному на воздухе и растертому в порошок осадку добавляют 5-10 мл 0,5 н КОН и ставят на 15-18 часов в термостат при 37°C, после чего охлаждают до 0-2°C и добавляют холодный 50%-ный раствор трихлоруксусной кислоты с таким расчетом, чтобы довести концентрацию кислоты в нем (после нейтрализации щелочи) до 5%.

После добавлении кислоты гидролизат в течение 5 минут выдерживают в холодильнике при 0°C и затем центрифугируют.

В надосадочной жидкости содержатся нуклеотиды, которые высвободились при гидролитическом расщеплении РНК. Надосадочную жидкость сливают. В осадке остаются ДНК и белки.

4) Осадок растворяют в 1-2 мл 0,5 н КОН при 37°C, затем охлаждают до 0°C. Нерастворимый остаток отбрасывают.

В результате параллельных опытов получают два раствора, содержащих ДНК. Один из растворов используют для количественного определения ДНК по фосфору, а другой - для получения и разделения свободных пуриновых и пиримидиновых оснований [60].

7.8.Определение концентрации нуклеиновых кислот в крови животных

Схема работы [30]:

1. Приготовить две пробы гемолизата крови. Для этого взять два цилиндра (I, II) на 25 мл и в каждый добавить по 0,1 мл крови (по стенке пробирки), затем - по 1,4 мл дистиллированной (дН₂O). Внимание!!! Добавлять воду строго над каплей крови, по стенке пробирки.

2. К гемолизату добавить 13,5 мл 0,6 Н хлорной кислоты (вливать по стенке пробирки), перемешать. Пробирку I закрыть с пробкой. 3. Пробирку с пробой I поместить на 20 мин в кипящую водяную баню. (Пробу II не греть!). За это время происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот, связанных с белками, и осаждение белков. Система для гидролиза ДНК нагреванием в кислой среде.

4. После гидролиза пробирки охладить под струей воды из-под крана.

5. Перелить охлажденное содержимое I пробы и II (контрольной) пробы в центрифужные пробирки. Центрифужные пробирки уравновесить.

6. Центрифугировать 10-15 мин при 3000 об/мин на центрифуге (20°C).

7. Надосадочную жидкость обеих пробирок слить в чистые стаканчики. Отлить по 3мл каждой пробы в кювету для фотометрирования.

Оценка результатов:

1. Замерить поглощение растворов I и II проб при E-270 и E-290. Контроль - хлорная кислота.

2. Рассчитать суммарное содержание нуклеиновых кислот в пробирках с учетом разведения пробы крови по формуле:

$$X=(A-B)\times F\times 10,3\times 100 / 0,19\times V=\text{мг}\%$$

где, А и В -разность между оптическими плотностями исследуемого раствора при λ 270 и λ 290 нм; 0,19 поправка при измерение оптической плотности;

Г - объем раствора крови с хлорной кислотой;

В - объем крови, взятой для исследования, (отношение Г/В-разведение исходной пробы);

10,3 - коэффициент пересчета на количество нуклеиновых кислот;

100 - коэффициент пересчета в проценты.

7.9.Определение концентрации нуклеиновых кислот в мышечной ткани

Схема работы:

1. 10 и 500 мг мышечной ткани крупного рогатого скота поместить в центрифужные пробирки.

2. Добавить по 10 мл 0,2 Н хлорной кислоты. Перемешать стеклянной палочкой.

3.Осадок отделить центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин (20°C). Осадок повторно отмыть.

4. К осадкам добавить по 10 мл 0,5 Н раствора хлорной кислоты, закрыть пробирки петортой, нагревать в течение 30 мин в кипящей бане.

5. Гидролизат охладить под струей холодной воды и центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 мин (20°C).

6. Перелить надосадочную жидкость в чистые стеклянные пробирки и замерить поглощение растворов (Е-270 и Е-290); контроль 0,5Н раствор хлорной кислоты.

Оценка результатов: Рассчитать концентрацию ДНК и РНК. Так как нуклеиновые кислоты экстрагированы из ткани, сделать расчет по формуле:

$$C = (E_{270} - E_{290}) \times k \times V/190$$

(для ДНК k = 10,1; для РНК k = 10,5);

V - объем исследуемой пробы; 190 удельная экстинкция 1 мг фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора [60].

Вывод: Сравнить содержание РНК и ДНК в соматических клетках мышечной ткани.

7.10. Количественное определение нуклеиновых кислот в крови

Принцип работы: Интенсивность образования нуклеиновых кислот в организме зависит от уровня белкового питания. Определение суммы нуклеиновых кислот - дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой - дает возможность производить весьма точные серийные определения в небольших количествах крови с использованием спектрофотометрии при $\lambda=270-290$ нм (ультрафиолетовая часть спектра) после удаления белков при помощи соляной кислоты (63).

Спектрофотометрические измерения производят с помощью спектрофотометра СФ-26 или СФ-46.

Реактивы и оборудование: 1) кровь; 2) HCl, 0,6 н.; 3) пробирки обычные, мерные и центрифужные; 4) кипящая водяная баня (!); 4) центрифуга с холодильником; 5) СФ-46.

Ход работы:

1. 0,1 мл крови размешивают в 1,4 мл воды.

2. К полученному гемолизату прибавляют 13,5 мл 0,6 Н раствора соляной кислоты, для этого лучше применять широкие центрифужные пробирки на 30-40 мл.

3. Перемешав смесь, пробирку помещают на 20 мин в кипящую водяную баню и закрывают маленькой воронкой. За это время происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот, связанных с белками, и осаждение всех белков.

4. Пробирку охлаждают, затем центрифугируют 10-15 мин при 1500 об/мин.

5. Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку и фотометрируют в кювете шириной 10 мм при $\lambda=270$ и 290 нм против 0,6 Н раствора соляной кислоты.

6. Из среднего значения показателя, полученного при $\lambda=270$ нм, вычитают значение, полученное при $\lambda=290$ нм. Разность делят на эмпирический коэффициент 0,19. Получают количество фосфора в граммах (при разведении 0,1 мл крови в 150 раз).

7. Для нахождения фосфора в 100 мл крови надо увеличить полученное число в 100 раз. Чтобы вычислить содержание нуклеиновых кислот, количество фосфора умножается на коэффициент 10,3. Подсчет нуклеиновых кислот ведут по формуле:

$$X = \frac{(A - B) \times 15 \times 1000 \times 10,3}{0,19 \times 0,1},$$

где: А - число, полученное при измерении раствора при $\lambda=270$ нм;

В - число, полученное при измерении раствора при $\lambda=290$ нм.

пробками с воздушными холодильниками, нагревают их на кипящей водяной бане 30 мин.

6. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

7. Надосадочную жидкость сливают в отдельную чистую пробирку и объединяют с полученной в п.4. Точно измеряют общий объем.

8. Определяют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против 0,5 Н раствора хлорной кислоты. При необходимости исследуемый раствор разводят 0,5 н. раствором хлорной кислоты.

9. Рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле:

$$C_{\text{фосфора}} = A_{270} - A_{290} / 0,19 (\text{мкг})$$

где 0,19 - значение ΔA ($A_{270} - A_{290}$), которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора.

При дальнейших расчетах учитывают общий объем гидролизата и разведения.

10. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются пересчетным коэффициентом 10,3:

$$C_{\text{нк}} = C_{\text{фосфора}} \cdot 10,3 (\text{мкг})$$

11. Рассчитывают содержание нуклеиновых кислот в 1 г исследуемой ткани.

7.11.Выделение ДНК из растительных клеток

При выделении ДНК из тканей растений важным фактором является эффективное разрушение клеточных стенок. Многие методы, используемые для этого, приводят к сильной

фрагментации ДНК (из-за гидродинамических разрывов в цепи!). Часто приходится находить компромисс между размером ДНК и её количественным выходом, ведь молекулы ДНК - самые крупные полимерные биомакромолекулы. Высвобождение высокомолекулярной ДНК из клеток - это только часть задачи, поскольку растительные экстракты содержат большие количества белков, полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев весьма трудно отделить от ДНК. Ткани растений обычно разрушают механическим растиранием в присутствии детергентов, растворяющих мембраны клеток, и хелатирующих агентов, подавляющих действие клеточных нуклеаз за счёт связывания двухвалентных катионов. От белков ДНП-комплекса избавляются фенольной депротеинизацией образца. Некоторые методики для освобождения ДНК от белков хроматина предусматривают использование протеиназ. После депротеинизации препарат всё ещё сильно загрязнён полисахаридами [70].

Приборы: весы, ножницы, ступка для растирания, мензурка, центрифуга, центрифужные пробирки, химический стакан (50-100 мл), деревянная палочка с насечками.

Реактивы: банан, буферный раствор (120 мл H_2O , 1,5 г $NaCl$, 5 $NaHCO_3$, 5 мл жидкого средства для мытья посуды), изопропиловый спирт охлажденный в морозилке (либо этиловый спирт).

Ход работы:

1. Половину банана измельчите до состояния кашицы любым удобным для Вас способом.

2. 5 мл полученного пюре перенесите в стаканчик и добавьте 10 мл буферного раствора.

3. Полученную смесь энергично перемешивайте в течение не менее 2 минут.

4. Содержимое стаканчика разлейте в центрифужные пробирки. Центрифугируйте 5 минут при 1 тыс. об/мин.

5. Надосадочную жидкость (не менее 5 мл), слейте в чистую пробирку.

6. Аккуратно нанесите 10 мл охлажденного изопропилового (этилового) спирта на стенку слегка наклоненной пробирки. Позвольте спирту медленно стечь по стенке. Если вы все сделали правильно, спирт, плотность которого меньше плотности буфера, останется на поверхности раствора.

7. Поместите тонкую стеклянную или деревянную палочку, например, карандаш, в раствор таким образом, чтобы ее кончик оказался непосредственно под границей между буфером и спиртом, и очень осторожно в течение 1 мин поворачивайте попеременно в разные стороны. При этом наиболее длинные фрагменты ДНК накрутятся на палочку. Затем вытяните палочку - спирт заставит ДНК прилипнуть к концу палочки, и вы увидите на нем прозрачный вязкий осадок.

7.12.Выделения ДНК из растительных тканей

Принцип метода: Метод основан на том, что при добавлении к обработанной щелочью ткани насыщенного раствора натрия хлор в уксусной кислоте белки выпадают в осадок, а ДНК и другие соединения остаются в растворе. ДНК отделяют от других соединений путем осаждения ее спиртом, с последующим промыванием осадка трихлоруксусной кислотой [70].

Оборудование: центрифуга; водяная баня; гомогенизатор или фарфоровая ступка.

Посуда: колбы мерные на 100 мл — 4 шт.; пробирки на 5 мл — 3 шт. материалы и реактивы: побеги зерновок пшеницы; 1 М NaOH, 1 М NaCl в 20%-ной CH_3COOH , 96%-ный этиловый спирт, 5%-ная трихлоруксусная кислота.

Приготовление рабочих растворов: Раствор 1 М NaOH готовят, растворяя 4 г навески в 100 мл д. в.; раствор 1 М NaCl готовят, растворяя 5,85 г навески в 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты.

Ход определения: Навеска растительной ткани (1-2 г) предварительно измельчается ножницами и затем растирается в ступке, прибавляя 2 мл 1 М NaOH. После этого раствор сливают в пробирку, которую ставят на кипящую водяную баню на 15 мин, периодически перемешивая ее содержимое. После охлаждения пробы для осаждения белков приливают 1 мл 1 М NaCl в 20%-ной CH_3COOH и через 5-10 мин центрифугируют в течение 5 мин при 5000g. После отделения супернатанта к нему приливают 10 мл 96%-ного этилового спирта и ставят на 1 ч в холодильник при -20°C. При этом ДНК должна выпасть в осадок, а РНК - находиться в растворе. Пробирку еще раз центрифугируют 5 мин при 5000g. Осадок ДНК промывают 5%-ной трихлоруксусной кислотой.

Оформление работы: Записать условия проведения опыта и определить наличие ДНК в опытной пробе по реакции с дифенилом. Образец сохранить для следующих опытов.

7.13.Выделение ДНК из животных тканей

Принцип метода: Щелочной гидролиз тканевых препаратов проводят без предварительного выделения нуклеиновых кислот и удаления свободных нуклеотидов. Для выделения препаратов ДНК и освобождения их от белков используют насыщенный раствор NaCl, содержащий 20%-ную уксусную кислоту. После отделения белков ДНК осаждают спиртом [70].

Оборудование: аналитические весы; гомогенизатор; водяная баня; штатив.

Посуда: пипетки на 1 мл - 2 шт., на 5 мл - 2 шт.; колбы на 100 мл - 4 шт.; стакан; пробирки.

Материалы и реактивы: ткань животных; 1 М раствор NaOH; насыщенный раствор NaCl, приготовленный на 20%-ной уксусной кислоте; 0,5 М раствор HClO₄; 96%-ный этиловый спирт; ледяная уксусная кислота.

Приготовление растворов: Насыщенный раствор хлорида натрия готовят, добавляя NaCl до насыщения к 20%- ному раствору CH₃COOH. Все остальные растворы готовят на д. в.

Ход работы: 100 мг ткани помещают в центрифужную пробирку с 1 мл 1 М раствором NaOH и при помешивании нагревают 5 мин в кипящей водяной бане. Затем пробирку охлаждают и добавляют 0,5 мл насыщенного раствора NaCl, содержащего 20%-ную уксусную кислоту. Через 5 мин раствор центрифугируют 10 мин при 600g (4°C), удаляя выпавший в осадок белок. Супернатант сливают в стакан, а осадок растворяют при 0°C в 1 мл 1 М раствора NaOH. После этого белок еще раз осаждают добавлением 0,5 мл насыщенного раствора NaCl, содержащего 20%-ную уксусную кислоту. Раствор центрифугируют 10 мин при 600g (4°C) и супернатанты объединяют. Затем в стакан с супернатантом приливают охлажденный до 0°C 96%-ный этиловый спирт в соотношении 1:3 (на 1 мл супернатанта добавляют 3 мл 96%-ного этилового спирта). После перемешивания раствор оставляют при 4°C на 2 ч, а затем центрифугируют 10 мин при 600g. К осадку добавляют 5 мл 0,5 М раствора HClO₄. Пробирки закрывают пробками с воздушными холодильниками и помещают

на 20 мин в кипящую водяную баню. Гидролизат ДНК охлаждают и используют для аналитических исследований.

Оформление работы: Записать условия проведения опыта и определить наличие ДНК в опытной пробе по реакции с дифенилом. Образец сохранить для следующих опытов.

7.14.Выделение ДНК из эпителиальных клеток ротовой полости человека методом щелочного лизиса

Реактивы:

1. 50 ммоль/л раствор NaOH.
2. 1 моль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0.
3. Изопропиловый спирт.
4. 96% этиловый спирт.
5. 10 ммоль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0.

Ход работы. Прополаскивают ротовую полость 10 мл дистиллированной воды в течение 3 мин, после чего собирают жидкость в стаканчик. Собранную жидкость, содержащую эпителиальные клетки ротовой полости, разливают по 1 мл в чистые пробирки типа эппендорф. Проводят центрифугирование при 12000 об/мин в течение 4 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 200 мкл 50 ммоль/л раствора NaOH. Проводят щелочной лизис эпителиальных клеток в течение 10 мин при температуре 95°C, после чего пробы охлаждают до 4°C на ледяной бане, к каждой пробе приливают по 20 мкл охлажденного 1 моль/л раствора Трис-HCl, pH-8,0, после чего пробы центрифугируют 6 мин при 12000 об/мин.

180 мкл надосадочной жидкости переносят в чистые пробирки и проводят переосаждение клеток в тех же условиях после добавления 750 мкл охлажденного изопропилового спирта. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 500 мкл охлажденного 96% этилового спирта. Смесь тщательно суспендируют, центрифугируют в течение 2 мин при 12 000 об/мин., после чего в пробирку добавляют 500 мкл охлажденного 96% этилового спирта и центрифугируют еще в течение 4 мин.

Надосадочную жидкость тщательно отбирают, к осадку добавляют 200 мкл 10 ммоль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0 и тщательно суспендируют. Полученную суспензию инкубируют в течение 15 мин. при 55 °C и используют для определения концентрации ДНК в пробах и степени ее очистки.

Для определения степени очистки ДНК от углеводов, белков и иных примесей проводят измерение оптической плотности раствора нуклеиновой кислоты при 230, 260, 280 нм на СФ-26 в кварцевой кювете на 1 см.

Отношение поглощения при 260 и 280 нм указывает на степень очистки ДНК от примесей белковой природы. Препарат ДНК считается чистым, если данное соотношение приблизительно равно 1,8.

Отношение поглощения при 260 и 230 нм указывает на степень очистки ДНК от примесей углеводной природы. Препарат ДНК считается чистым, если данное соотношение приблизительно равно 1,8-2,2.

При проведении измерения концентрации ДНК в пробе, 100 мкл раствора нуклеиновой кислоты вносят в кварцевую кювету с 1 мл 10 ммоль/л раствором Трис-НСI, рН 8,0. Значение концентрации ДНК в исходном растворе рассчитывают по формуле:

$$C=50 \cdot A_{260} \cdot (V+v)/v,$$

где, С- концентрация ДНК (мкг/мкл),

A₂₆₀ – значение поглощения при 260 нм,

V – объем буфера (мкл),

v- объем образца,

50 – коэффициент пересчета.

Среднее значение концентрации ДНК составляет 400 мкг/мкл.

7.15.Определение температуры плавления ДНК

Принцип метода. Исследование температурной зависимости E_r является тестом на нативность ДНК. Резкий одномоментный прирост значения E_r в узком температурном интервале характерен для нативных образцов ДНК, которые характеризуются упорядоченностью водородных связей в молекуле. В денатурированных препаратах ДНК, где водородные связи неупорядочены и разрушаются постепенно, нарастание величины E_r также происходит постепенно при различных температурах.

Реактивы:

Буфер для растворения ДНК, содержащий 15 ммоль/л раствор NaCl, 1,5 ммоль/л раствор цитрата натрия, рН - 7,0.

Ход работы: 20 мкг ДНК, растворенной в буфере, помещают в 1 см кварцевую кювету для СФ-26. Определение оптической плотности ведут при 260 нм в промежутке от 25 до 95°C с

интервалом 5°C, причем препарат ДНК выдерживают при каждой температуре 5 мин.

По результатам измерения строят кривую плавления. Для этого по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора при измеряемой температуре (t) к оптической плотности при 25°C, а по оси абсцисс – температуру. Точку плавления ($T_{пл}$) ДНК находят по кривой плавления. Она соответствует середине зоны подъема кривой относительной оптической плотности.

Зависимость между точкой плавления и содержанием ГЦ-пар в ДНК определяют по формуле:

$$C_{гц} = (T_{пл} - 69,3) \cdot 2,44,$$

где, $C_{гц}$ – содержание ГЦ-пар в молярных процентах, а 69,3 и 2,44 – постоянные коэффициенты.

7.16. Качественная реакция на ДНК

Наличие ДНК определяют по цветным реакциям, характерным для дезоксирибозы. Часто применяют реакцию с дифениламином ($C_6H_5 - NH - C_6H_5$). Дифениламин с дезоксирибозой или ДНК образует соединение синего цвета. Рибоза и РНК дают с дифениламином зеленое окрашивание [61].

Реактивы и материалы: а) осадок дезоксирибонуклеопротенда (см. предыдущую работу); б) дифениламин: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. К раствору добавляют 2,75 г концентрированной серной кислоты ($\rho_{20} = 1,836$); в) едкий натрий, 0,4%-ный раствор.

Часть осадка дезоксирибонуклеопротенда переносят в пробирку и добавляют 0,5 - 1 мл едкого натрия (до растворения). К раствору проливают равный объем дифениламинового реактива. Осадок, выпадающий в начале, растворится в последующих порциях реактива, после чего его нагревают в течение 15- 20 мин. в кипящей водяной бане. Появляется синее окрашивание.

7.17. Количественное определение ДНК спектрофотометрическим методом

Принцип работы: Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламиновым реактивом.

Реактивы и оборудование: 1) дифениламиновый реактив, 1% раствор; 2) водный раствор ДНК; 3) пробирки обычные и мерные; 4) кипящая водяная баня; 5) СФ, кюветы.

Ход работы:

1. В опытную пробирку наливают 1 мл исследуемого водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинового реактива.

2. В контрольную пробирку наливают 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинового реактива.

3. Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 10 мин.

4. После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном светофилтре (КФК, кюветы шириной 5 мм) против контроля.

5. Построение калибровочного графика. В 3 пробирки помещают по 1 мл раствора ДНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно. Добавляют в каждую пробирку по 2 мл дифениламинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность.

Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов ДНК, а на оси ординат - значения оптической плотности (табл.14).

Таблица 14

Данные для построения калибровочного графика

	Пробирка №1	Пробирка №2	Пробирка №3
Станд. р-р ДНК	1 мл	1 мл	1 мл
Концентрация ДНК	50 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл
Дифениламиновый реактив	2 мл	2 мл	2 мл

7.18.Количественное определение ДНК (по Дише)

При нагревании дезоксирибозы с раствором дифениламина в смеси ледяной уксусной и серной кислот развивается синее окрашивание, имеющее максимум поглощения при 595 нм.

Механизм реакции заключается в образовании **оксилевулинового** альдегида и конденсации последнего с дифениламином с образованием окрашенного соединения [43,60].

Реактивы: а) раствор или суспензия ДНК, 50 - 500 мкг/мл; б) реактив Дише: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной

уксусной кислоты. К раствору прибавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.

Ход работы:

Для приготовления реактива Дише рекомендуется брать дифениламин, дважды перекристаллизованный из 70%-ного этилового спирта.

К 1 - 2 мл раствора (или суспензии) ДНК приливают двойной объем реактива Дише, нагревают 10 мин на кипящей водяной бане, затем охлаждают. Жидкость окрашивается в синий или сине-фиолетовый цвет. Измеряют поглощение раствора в фотоэлектроколориметре с красным (лучше оранжевым) светофильтром (595 нм) против контроля (реактив Дише).

Содержание ДНК в исследуемом растворе рассчитывают по калибровочной кривой, составленной по стандартному раствору натриевой соли дезоксирибонуклеиновой кислоты с известным содержанием фосфора (9,89 - 10,0 % в пересчете на чистую ДНК).

7.19. Количественное определение нуклеиновых кислот (ДНК) по фосфору

Определение по фосфору считается наиболее надежным методом количественной оценки нуклеиновых кислот, так как его процентное содержание в наименьшей степени зависит от нуклеотидного состава: для ДНК оно составляет 9,8-10,1%, для РНК - 9,1-9,6 %. При определении фосфора нуклеиновых кислот в тканях необходимо предварительно удалить свободные нуклеотиды, неорганический фосфат, а также все фосфорсодержащие соединения ненуклеотидной природы, в частности липиды [60].

Ход работы:

Первым этапом определения является минерализация ДНК-содержащей пробы. Для этого один из растворов, полученных после выделения, очистки и разделения нуклеиновых кислот, помещают в колбу Кьельдаля или жаростойкую пробирку, при необходимости упаривают на водяной бане до объема 1-2 мл, а затем добавляют около 1 мл концентрированной серной кислоты. Укрепив колбу (пробирку) слегка наклонно, осторожно нагревают раствор на плитке до тех пор, пока полностью не выпарится вода и раствор в колбе приобретет бурую окраску (при малом содержании органического вещества в пробе бурую окраску можно не заметить). После этого колбу (пробирку) охлаждают, осторожно

добавляют 2-3 капли 30%-ной перекиси водорода и раствор снова нагревают. (При появлении бурой окраски добавление перекиси водорода повторяют несколько раз). Нагрев при минерализации не должен быть слишком интенсивным: нельзя допускать, чтобы тяжелые пары серной кислоты и диоксид серы выходили из колбы, так как вместе с ними частично увлекается фосфат.

По окончании минерализации содержимое колбы (пробирки) количественно переносят в мерную колбу на 25 мл. В наполненную разбавленным минерализатом примерно наполовину колбу добавляют 1-2 капли фенолфталеина и нейтрализуют кислоту 5 н раствором щелочи до слабо-розовой окраски. Затем уровень раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки.

Определение содержания фосфата в пробе проводят методом Самнера. К разбавленному минерализату, содержащему 0,05-0,5 мкмоль фосфата, приливают дистиллированную воду до 3,6 мл, добавляют 0,5 мл 6,6%-ного раствора молибдата аммония, 0,5 мл 7,5 н раствора серной кислоты и 0,4 мл свежеприготовленного раствора сульфата железа (II). Пробу перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 40 минут, после чего фотометрируют при 625 нм. Калибровочный график строят с использованием стандартного раствора фосфата (KH_2PO_4), содержащего 0,5 мкмоль/мл фосфора.

Концентрацию фосфора в гидролизате находят по калибровочному графику и затем проводят пересчет на содержание ДНК в исследуемом образце животной ткани.

7.20. Метод определения содержания ДНК с помощью дифениламина

Принцип метода. В составе ДНК присутствует моносахарид дезоксирибоза, которая при реакции с дифениламином ($C_6H_5-NH-C_6H_5$) окрашивает ДНК в синий цвет, тогда как при реакции с рибозой РНК раствор приобретает зеленую окраску [17,60].

Оборудование: ФЭК; водяная баня.

Посуда: колба на 25 мл; пипетки на 1 мл - 3 шт. материалы и реактивы: осадок ДНК; дифениламинный реактив; 1 М раствор NaOH; раствор ДНК (200 мкг/мл).

Приготовление рабочих растворов. Дифениламинный реактив готовят, растворяя 1 г дифениламина в ледяной уксусной кислоте, с

добавлением 2,75 мл H_2SO_4 (концентрированная); раствор NaOH (40 мг/мл) готовят, растворяя навеску в д. в.

Построение калибровочного графика. В 3 пробирки последовательно вносят по 1 мл раствора ДНК с различной концентрацией (50, 100 и 200 мкг/мл) и по 2 мл дифенилового реактива. После перемешивания пробирки помещают на 10 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения измеряют светопоглощение проб на ФЭКе при 605-730 нм, против д. в. Результаты записывают в таблицу.

Ход работы. Перед началом исследований небольшое количество полученной в предыдущем опыте ДНК растворяют в 1 мл 1 М NaOH, а затем добавляют равный объем дифениламинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 15-20 мин. После охлаждения измеряют светопоглощение на ФЭКе при 605-730 нм против д. в.

Оформление работы. Записать условия проведения опыта, построить калибровочный график и определить содержание ДНК в исследуемой пробе. Нарисовать фрагмент третичной структуры ДНК.

7.21.Количественное определение РНК колориметрическим методом

Принцип работы: Метод основан на цветной реакции орцинового реактива с пентозой, входящей в состав РНК [30,60].

Реактивы и оборудование: 1) орциновый реактив (50 мг $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ растворяют в 250 мл концентрированной HCl и перед опытом к нужному количеству этого раствора добавляют орцин из расчета 4,76 мг/мл);

2) водный раствор РНК; 3) пробирки обычные и мерные; 4) кипящая водяная баня; 5) СФ, кюветы.

Ход работы:

1. В опытную пробирку помещают 1 мл исследуемого раствора РНК и 1 мл орцинового реактива.

2. В контрольную пробирку помещают 1 мл дистиллированной воды и 1 мл орцинового реактива.

3. Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане 20 мин.

4. После охлаждения измеряют оптическую плотность при красном светофильтре (КФК, кюветы шириной 5 мм) против контроля.

5. Построение калибровочного графика. В 3 пробирки помещают по 1 мл раствора РНК с концентрациями 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно. Добавляют в каждую пробирку по 1 мл орцинового реактива. Нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения измеряют оптическую плотность. Калибровочный график строят, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов РНК, а на оси ординат - значения оптической плотности (табл.15).

Таблица 15

Данные для построения калибровочного графика:

	Пробирка №1	Пробирка №2	Пробирка №3
Станд. р-р РНК	1 мл	1 мл	мл
Концентрация РНК	50 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл
Орциновый реактив	1 мл	1 мл	1 мл
Оптическая плотность			

7.22. Количественное определение РНК (по Мейбаум)

В основу метода положена известная реакция пентоз с орцином [37].

Реактивы: а) хлорное железо ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,1%-ный раствор в концентрированной соляной кислоте; б) орцин (5-метилрезорцин): раствор (10 мг/мл) готовят перед употреблением на солянокислом растворе хлорного железа; в) раствор РНК, 10 - 15 мг/мл.

Ход работы:

К 2 мл раствора РНК прибавляют столько же раствора орцина, нагревают 20 мин на кипящей водяной бане и охлаждают под краном. Жидкость окрашивается в зеленый или синевато-зеленый цвет. Содержание РНК вычисляют по калибровочной кривой, составленной по стандартным растворам РНК или рибозы. Предложена модификация метода Мейбаум, повышающая точность определения: после охлаждения окрашенный продукт экстрагирует изоамиловым спиртом, центрифугируют. Измеряют поглощение спиртовой фракции при 670 нм против контроля (раствор орцина), обработанного таким же образом, как и испытуемая проба.

Содержание РНК рассчитывают по калибровочной кривой.

7.23.Получение и разделение свободных пуриновых и пиримидиновых оснований

Свободные пуриновые и пиримидиновые основания являются компонентами ДНК и РНК и освобождаются при их гидролитическом расщеплении. Подвергая гидролизу ДНК действием концентрированных растворов минеральных кислот (например, 6 н соляной кислоты или 12 н хлорной) при 100°C можно добиться почти количественного освобождения пуриновых и пиримидиновых оснований. Для высвобождения нуклеозидов и нуклеотидов следует применять более мягкий метод - ферментативный.

Значительно легче гидролизуются РНК. Уже 1 н раствор серной или соляной кислот расщепляют РНК до пуриновых оснований и пиримидиновых нуклеотидов. Этот способ гидролиза позволяет установить неодинаковую прочность гликозидных связей в пуриновых и пиримидиновых нуклеотидах, так как последние в данных условиях почти не подвергаются дальнейшему расщеплению. Пиримидиновые основания освобождаются лишь при гидролизе РНК 12 н раствором хлорной кислоты (1 ч при 100°C). Для выделения свободных мононуклеотидов проводят расщепление РНК 0,3 н раствором гидроксида натрия в течение 18 часов при температуре 37°C.

Разделение полученной при гидролизе смеси оснований проводят методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок Силуфол UV-254.

В методе тонкослойной хроматографии разделение обеспечивается движением подвижной фазы через нанесённый на подложку тонкий слой сорбента. В качестве сорбентов чаще всего применяют диоксид кремния, силикагель и оксид алюминия, а также другие материалы (активированный уголь, сахарозу, карбонат кальция, тальк и др.). Выбор растворителя (подвижной фазы) определяется природой сорбента и свойствами разделяемых веществ. Продвижение органического растворителя по пластине так же, как и в бумажной хроматографии, обеспечивается капиллярными силами.

Хроматографическое разделение методом тонкослойной хроматографии проводят в разделительной камере с притёртой

крышкой. Положение зоны хроматографируемого компонента устанавливают по величине коэффициента R_f , равной отношению скорости движения его зоны к скорости движения фронта растворителя [60].

Ход работы: К одному из растворов, полученных при выделении, очистке и разделении нуклеиновых кислот, приливают 3 мл концентрированной соляной кислоты и выдерживают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 3 часов. По окончании гидролиза полученный раствор нейтрализуют 20%-ным раствором NaOH (постепенно добавляя раствор щелочи и периодически отбирая несколько капель раствора для определения характера pH среды с помощью фенолфталеина).

На хроматографических пластинках простым карандашом проводят стартовую линию на расстоянии 2,5 см от нижнего края. На стартовую линию в 2-3 подхода наносят несколько капель охлажденного гидролизата (пятно после каждого нанесения подсушивают на воздухе или высоко над нагретой плиткой). Пластинки помещают в хроматографические камеры (стеклянные цилиндры), в которые предварительно вносят 10-15 мл щелочного растворителя (н-пропано:25% аммиак: вода в соотношении 60:30:10. Когда растворитель поднимется на 4/5 высоты пластинки, ее вынимают, высушивают под тягой и просматривают при УФ-облучении. Пятна оснований четко локализованы благодаря флуоресцирующему носителю.

7.24.Выделение ДНК

7.24.1.Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол- хлороформной экстракции

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 5 мл в пробирке. О выращивании бактерий можно посмотреть в руководствах по микробиологии.

2. Осадить клетки из 5 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Ресуспендировать клетки в 500 мкл 10 mM Трис HCl pH 8.0. Для грамположительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл раствора лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивать переворачивая пробирку, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

3.2 Вносить порциями по 10 мкл 10%-ный раствор SDS, осторожно перемешивать, переворачивая пробирку до достижения прозрачного раствора вязкой субстанции. Если раствор не стал вязкий, то значит клетки не разрушились и дальше продолжать не имеет смысла.

(С этого момента все делать в перчатках и под тягой)

1. Внести 500 мкл смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко. При этом происходит денатурация белков, переход жиров и липидов в органическую фазу.

2. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости.

3. Перенести верхнюю фазу 450 мкл *(не трогая белый промежуточный слой)* в 1 мл изопропанола. При этом неизбежно уменьшается до 1/5 объема водной фазы. На практике лучше пожертвовать этим объемом сейчас, чем чистотой препарата впоследствии.

Для получения высокоочищенной ДНК повторить п.5-7 2-3 раза.

4. Осторожно намотать ДНК (которая будет выглядеть как вата) на наконечник на 200 мкл, зубочистку или стеклянную палочку. Если ДНК вышло мало, осторожно перемешать содержимое эппендорфа и повторить наматывание ДНК.

5. Опустить наконечник/палочку с ДНК в раствор 96% этанола, затем подсушить. Пересушивать осадок нельзя, в полностью высушенном виде он становится практически нерастворим в воде. Обычно осадки сушат на открытом воздухе не более получаса, под потоком нагретого воздуха. Далее намотанную ДНК опустить в эппендорф с 200-400 мкл деионизованной воды или буфера TE для растворения ДНК [30].

7.24.2.Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook et al., 1989].

1. Культуру растить в течение ночи на богатой среде (LB,

питательной бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки из 3 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Клетки ресуспендировать в 200 мкл раствора I.

Для грамположительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивая, суспензия должна стать более прозрачной и коричневой. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Клетки перенести в ледяную баню и внести 400 мкл свежеприготовленного раствора II (0.2M NaOH и 1% SDS). Раствор должен храниться в плотно закрытой таре, для исключения нейтрализации щелочи углекислым газом из воздуха. Осторожно перемешать переворачивая пробирку до получения прозрачного вязкого раствора. На данной стадии происходит лизис клеток, и геномная ДНК оказывается в растворе в расплетенном виде, что и обуславливает вязкость раствора. На данном этапе важно не повредить ее интенсивным встряхиванием.

5. Добавить 300 мкл охлажденного раствора 3 M ацетата калия (29 г ацетата калия, 1 л ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды), осторожно перемешать переворачиванием и инкубировать при температуре -20°C в течение 20-30 мин. На данной стадии происходит смена pH раствора в кислую область и геномная ДНК выпадает в осадок в виде белых хлопьев. Плазмидная ДНК ввиду своего малого размера в осадок не выпадает.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 15 мин для удаления преципитированной геномной ДНК. Иногда полезно разбить стадию на 2: центрифугировать 5 мин, затем проб заново осторожно перемешать для полного смешения растворов, затем центрифугировать 10 мин.

7. Супернатант (надосадок, надосадочную жидкость) перенести в чистый эппендорф (лучше дозатором). Проследить чтобы не было белых хлопьев - остатков геномной ДНК. Добавить 600 мкл изопропанола, перемешать и центрифугировать в течение

10 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 65 в термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизированной воды или буфера TE.

7.24.3.Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток Быстрое для электрофоретического анализа (Real fast MiniPrep).

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходных вектором. Качество очистки ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того. Удобно использовать для скрининга колоний. Иногда в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл.

3. Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в 300 мкл раствора TENS.

4. Инкубировать во льду 10 мин.

5. Добавить 150 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды), размешать в вортексе.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 10 мин для удаления преципитированной геномной ДНК.

7. Супернатант (надосадок, надосадочную жидкость) перенести в чистый эппендорф (лучше дозатором). Проследить чтобы не было белых хлопьев - остатков геномной ДНК. Добавить 900 мкл 96% этанола, охлажденного до - 200С, перемешать и центрифугировать в течение 5 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом (500 мкл внести в эппендорф и затем вылить), высушить при 65⁰С в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизированной воде или буфера TE.

9. Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции.

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходным вектором. Качество ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того. Удобно использовать для скрининга колоний. Недостаток - необходимость работать с фенолом (необходим вытяжной шкаф), а также в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 1-3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки в эппендорф: 0.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл.

3. Внести 10 мкл 10-кратного буфера для внесения, содержащего додецил сульфат натрия (SDS). Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в остатках супернатанта. *С этого момента все делать в перчатках и под тягой*

4. Внести 50 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко.

5. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости.

6. 10 мкл верхней фаз *(не трогая белый промежуточный слой)* использовать для электрофореза.

VIII ГЛАВА. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК

Электрофорез — метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд [3].

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от pH среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, то есть сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам канала, отнесенной к его длине (В/с). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости.

В настоящее время используют полиакриламидный и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации pH буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул. Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, образующую сетку геля, что увеличивает сетку геля и снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и

степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не могут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратиться.

В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца геля, электрофорез прекращают. Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси, кислоты выпадают в осадок в том месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют [37].

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, маркеры), содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины.

Часто используют гели в виде тонких пластин, запolyмеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. Кроме того, поскольку гель заливают в форму для полимеризации жидким, то его концентрация, состав буфера и содержание добавок строго одинаковы по всему сечению геля. Следовательно, плотность тока и напряжение электрического поля также одинаковы. Это обеспечивает строго идентичные условия фракционирования разных препаратов и дает возможность достоверного сопоставления их состава путем сравнения положения полос в параллельных треках.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов придают всей ДНК негативный заряд. Это делает ее растворимой в воде и притягивают ее к положительному (+) электроду. Поэтому, если поместить ДНК в электрическое поле, то она будет двигаться от минуса к плюсу. Фрагменты ДНК, имеющие наименьшую длину, приближаются быстрее всего к + электроду, в то время как длинные фрагменты остаются максимально близко к минусу. Наиболее часто используют агарозный гель. Гели различаются по содержанию в них агарозы. Чем больше агарозы тем более мелкие фрагменты ДНК можно разделить. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции ДНК и позволяет разделять малые фрагменты ДНК. Чем больше напряжение тем быстрее проходит форе́з - но слишком сильное напряжение нагреет буфер а это недопустимо. Конформация ДНК тоже играет важную роль. Релаксированные кольцевые плазмиды (неразрезанные рестриктазами) двигаются с другой скоростью чем линейные или суперскрученные.

Агароза - это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*). Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0.3%. При температурах 84-96°C (а у специальных типов - уже при 70°C) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость - «плавится». Растворы агарозы затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (36-42°C). У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30°C. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой – можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную агарозу предварительно охлаждают до 50-55 °C и уже при этой температуре заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

В агарозе неизбежно содержатся и эфиры серной кислоты. Чем меньше в агарозе заряженных сульфогрупп, тем слабее силы электростатического отталкивания между молекулами полимера и выше их способность к связыванию водородными связями. Их присутствие существенно влияет не только на температуры

плавления и застывания гелей, но и на сам процесс электрофореза. В частности, именно эфиры серной кислоты обуславливают сильно выраженное при электрофорезе в гелях агарозы явление эндосмоса, суть которого в следующем: отрицательно заряженные остатки серной кислоты неподвижно связаны с полимерными нитями агарозы. Соответствующие им положительные ионы, находясь в водной фазе под действием электрического поля, мигрируют в направлении катода. Их место занимают катионы которые увлекают за собой всю массу жидкости, находящейся внутри геля, и вместе с ней - растворенные в водной фазе геля макромолекулы. Электрофорезом в агарозном геле чаще всего разделяют отрицательно заряженные макромолекулы, а эндосмос направлен в противоположную сторону и ухудшает разделение. Поэтому агарозу подвергают специальной очистке, и содержание иона сульфата в продажных препаратах не превышает 0.5%.

Типом агарозы, отличающиеся слабо выраженным эндосмосом, содержат менее 0.3% сульфата. Наличие заряженных сульфогрупп иногда обуславливает еще и не специфическую сорбцию белков на агарозе, в результате чего полосы расплываются с образованием «хвостов». Степень эндосмоса количественно оценивают с помощью коэффициента относительной миграции ($-mr$) - представляющего собой отношение скоростей миграции незаряженного полимера (за счет только эндосмоса) и сходного с ним по структуре полианиона при электрофорезе в агарозе данного типа.

Агароза с повышенными температурами плавления и гелеобразования (тип HGT) имеет $-mr < 0,1$, именно она чаще всего используется для обычного электрофореза. Специальная технологическая обработка (введение оксиэтильных групп) позволяет получать агарозу с малой степенью эндосмоса и пониженными температурами плавления и затвердевания, например, тип LGT, 1%-ный раствор такой агарозы остается жидким при физиологической температуре (37°C); кроме того, плавление геля можно осуществить при температуре более низкой, чем температура денатурации ДНК. Такую агарозу используют для дальнейшей экстракции ДНК из геля после его плавления.

Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и нагревают до 90-95 °C. Перед заливкой в форму раствор

агарозы охлаждают до 50 °С. Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для гельфильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0.4-2%. Ниже представлены примерные концентрации гелей агарозы в % для некоторых распространенных объектов фракционирования (табл.16):

Таблица 16

**Выбор концентрации геля в зависимости от длины
разделяемых фрагментов ДНК**

Агарозный гель		Полиакриламидный гель (ПААГ)	
Концентрация агарозы, %	Длина фрагментов ДНК, т.п.н.	Концентрация акриламида, %	Длина фрагментов ДНК, п.н.
0,3	5-60	3,5	1000-2000
0,6	1-20	5	80-500
0,9	0,5-7	8	60-400
1,2	0,4-6	12	40-300
1,5	0,2-3	15	25-150
2,0	0,1-2	20	6-100

Нуклеиновые кислоты обладают значительным по величине отрицательным зарядом, величина которого мало зависит от pH окружающей среды, а отношение заряда к массе практически одинаково для всех нуклеиновых кислот.

Поэтому фракционирование идет за счет различия в размерах молекул. Выбор буфера в данной ситуации не играет существенной роли. Используют 0.089М Трис-боратный, 0.05 Трис-фосфатный (редко) и Трис-ацетатный буфер.

Электрофорез нуклеиновых кислот сильно зависит от вторичной структуры. Двунитевая молекула имеет более жесткую структуру, труднее изгибается, проходя через пространственную сетку геля. Однако для молекул с молекулярной массой больше 3.5

млн. дальтон ситуация обратная: двунитевая молекула обладает достаточной гибкостью, чтобы проходить через сетку геля, в то время как одонитевая молекула той же длины сворачивается в хаотический клубок такого размера, что ее продвижение затрудняется. Вирусные и митохондриальные двунитевые ДНК, а также плазмиды бактерий могут иметь структуру замкнутого двунитевого кольца. Нативное состояние такого кольца - «сверхскрученное». Кольцо в целом сворачивается в «жгут», что сильно увеличивает его компактность (суперскрученная ДНК). Если же хотя бы в одной нити кольца имеется единичный разрыв, то жгут разворачивается, и силами электростатического отталкивания фосфатных групп кольцо расправляется. Компактность молекул становится меньше, размеры увеличиваются (релаксированная ДНК). Суперскрученная ДНК при электрофорезе всегда мигрирует быстрее релаксированной.

Во многих случаях электрофореза бывает желательно оценить молекулярные размеры фракционируемых нуклеиновых кислот. Для этого удобно иметь набор молекул того же типа, но известной длины. В настоящее время имеется большое количество коммерческих маркеров на основе фага лямбда или DNA ladders, дающие при электрофорезе ряд последовательных полос на треке, соответствующих фрагментам определенной массы.

В лунки геля наносится проба ДНК, уже содержащий индикаторный краситель. Форму с гелем, содержащим нанесенные образцы переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания (напряжение 1-15 В/см длины геля), и проводят электрофоретическое разделение ДНК в направлении от катода к аноду. Чем ниже напряжение, тем выше разделяющая способность геля, полосы более четкие из-за меньшей диффузии, но электрофорез занимает больше времени. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения (когда индикаторный краситель достиг края геля) вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ-трансиллюминатора (желательно фотографируют).

8.1. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

1. Готовят 1х TBE в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.

2. Добавляют к 1 х TBE агарозу в количестве, необходимом для получения 0.8 - 2% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. 1% гель является относительно универсальным.

3. Охлаждают смесь до $\pm 50^{\circ}\text{C}$. За время охлаждения агарозы, подготавливают заливочный столик и кювету для электрофореза.

4. Добавляют к раствору агарозы краситель (см. п. 2.3) и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1.5 мм.

6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1хTBE.

7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.

8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. Для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.

9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1 – 10 В на 1 см геля.

10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют.

8.2. Окрашка ДНК

При электрофорезе используется два типа красителей (лидирующие и флюоресцентные).

В качестве лидирующих красителей используют бромфеноловый синий, оранжевый G, крезоловый красный ксиленцианол. Эти красители движутся в том же направлении что и ДНК, но с разной скоростью (рисунок). Зная размер ДНК продукта, можно оценить его положение в геле по положению индикаторных красителей.

Для детекции ДНК в геле используются различные флуоресцентные красители, которые способны связываться с двуцепочечной ДНК и светиться в ультрафиолетовом свете. На сегодняшний день используются разные красители, которые различаются по чувствительности, стоимости и безопасности. Эти красители могут быть добавлены непосредственно в гель, и тогда гель сразу можно просматривать в трансиллюминаторе. Альтернативно, гель можно окрашивать после проведения электрофореза в водном растворе красителя. Так как все красители способны связываться с ДНК, они являются канцерогенами, и при работе с ними используются перчатки.

Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ- излучением с длиной волны 290-330 нм. Это вещество способно встраиваться в двухцепочечные молекулы ДНК и флуоресцировать под ультрафиолетовыми лучами. При помощи цифрового фотоаппарата ДНК-фрагменты записываются и могут быть проанализированы. Бромистый этидий - сильный канцероген, способный проникать через кожу в организм, поэтому следует уделять особое внимание при работе с ним. Также не следует забывать, что бромистый этидий при фореze движется от (+) к (-). Если хочется, чтобы он не уходил из геля, лучше ввести его и в фореzный буфер.

Краситель нуклеиновых кислот **Midori Green** относится к новому безопасному классу красителей, применяемых для визуализации двухцепочечных и одноцепочечных молекул ДНК, а также молекул РНК в агарозном геле. Эти красители нового поколения пришли на смену токсичному бромистому этидию (EtBr, потенциальный мутаген), который обычно используется в геле-электрофорезе для визуализации нуклеиновых кислот (табл.17).

Лидирующие (индикаторные) красители для агарозного электрофореза в 1.2% геле в TBE буфере (по данным www.biotangusa.com)

- Xylene cyanol FF	7,000 - 6,000 bp
- Cresol red	900 – 700 bp
- Bromophenol blue	300 – 500 bp
- Orange G	50 –100 bp

SYBR Green I является одним из наиболее чувствительных красителей, применяемых для детекции двуцепочечных молекул ДНК при электрофорезах в агарозных и полиакриламидных гелях. Чувствительность этого красителя приблизительно в 25 раз выше, по сравнению с наиболее распространенным до настоящего времени бромистым этидием (EtBr). При использовании трансиллюминатора с длиной волны 300 нм, с помощью SYBR Green I может быть детектировано 60 пг двуцепочечной ДНК. Кроме этого, SYBR Green I с успехом может применяться при окрашивании синтетических олигонуклеотидов в полиакриламидных гелях, при этом его чувствительность выше, чем у EtBr в 50-100 раз.

Modori Green Direct используется с голубым светом в геледокументирующих системах, а также с обычными ультрафиолетовыми трансиллюминаторами. Пики длины волны возбуждения при этом получаются 290 нм и 490 нм, пик эмиссии - 530 нм. Краситель Midori Green Direct не является канцерогеном и в гораздо меньшей степени обладает мутагенными свойствами, чем бромистый этидий. Кроме того, Midori Green Direct не повреждает латексные перчатки и мембрану клеток и относительно безопасен для окружающей среды.

Растворы

1. 10x TBE буфер (Tris-Borate-EDTA): 108 г Трис основного, 55 г борной кислоты, 9.3 г ЭДТА натриевой соли, довести до 1 литра деионизованной водой. pH 8.3 и не требует доведения.

2. 50x TAE, (Tris-Acetate-EDTA): 242 г Трис основного, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0.5M EDTA, довести до 1 литра деионизованной водой. Довести pH до 8.5.

ТАЕ буфер при нагревании (в отличие от ТВЕ) "неустойчив" и чтобы все было ок, следует агарозу растворять в воде, а потом в этот раствор добавлять ТАЕ (50х).

3. Агароза: для 1% геля - смешать 100 мл воды и 1 грамм агарозы в стеклянной посуде. Доведите раствор до кипения в микроволновой печи при высокой мощности. Вытащите сосуд из печи и размешайте до ресуспендирования осевшей агарозы. Охладите до температуры, комфортной для дальнейшей работы. В мерном цилиндре доведите объем дистиллированной водой до 100 мл. В форму для геля установите гребенку под будущие лунки. Влейте охлажденную агарозу в форму.

4. 6х буфер для внесения в лунку геля: 0.25% бромфеноловый синий, 0.25%

ксиленцианол, 40% сахароза или 40% глицерин в 1х ТВЕ.

5. Бромистый этидий EtBr: для внесения в гель 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Для окрашивания гелей 0.1 мг/мл в дистиллированной воде [26,37].

8.3. Секвенирование ДНК: метод Максама-Гилберта и метод Сенгера

Секвенирование ДНК и РНК - это рутинный процесс, позволяющий, тем не менее, проникнуть в суть всего живого. Первоначально расшифровка генома была «развлечением» для избранных, а сегодня заказать эту услугу может каждая вторая научно-исследовательская лаборатория. С каждым годом проникнуть в дебри геномной, транскриптомной эпигеномной информации становится все проще. Этот обзор посвящен основным принципам секвенирования нуклеиновых кислот и может послужить превосходным путеводителем как для любителя, изучающего основы молекулярной биологии, так и для специалиста, который планирует эксперимент и грезит научными прорывами [50,67].

С момента открытия нуклеиновых кислот прошло уже почти полторы сотни лет. В далеком 1869 году Иоганн Фридрих Мишер выделил из находившихся в гное клеток неизвестное доселе вещество, содержащее азот и фосфор, которое назвал нуклеином, а затем (из-за его свойств) - нуклеиновой кислотой. Первоначально считалось, что молекулы нуклеиновых кислот - резерв фосфора в клетках, однако уже в первой половине XX века ученые доказали

их наследственную природу. Тогда же появилось понятие гена – наименьшей структурной и функциональной единицы наследственности и сформировалась новая наука – генетика.

Вплоть до середины прошлого века структура носителей генетической информации и способы ее передачи оставались неясными. Модель двойной спирали ДНК, которая входит во все современные учебники генетики и молекулярной биологии, предложили в 1953 году Френсис Крик и Джеймс Уотсон (за это в 1962 ученые получили Нобелевскую премию). Последовавшие следом открытие генетического кода и разработка центральной догмы молекулярной биологии дали мощный толчок к развитию естественных наук, в первую очередь – генетики [50,67].

Почти четверть века назад в Соединенных Штатах стартовал грандиозный по своему масштабу научный проект, посвященный определению последовательности генома человека. Основной его целью стала расшифровка генетической информации, заключенной в хромосомах (компактизованная ДНК), которые мы наследуем от своих родителей. В течение тринадцати лет многочисленные исследовательские группы по всему миру работали над определением полной последовательности генома человека. Почти три миллиарда долларов, потраченные на этот проект, открыли перед исследователями замечательные перспективы. Используя полученные данные, появилась возможность искать и находить участки ДНК, связанные с генетически обусловленными заболеваниями. И если природа многих моногенных болезней (вызываемых отказом единственного гена нашего генома) стала понятна уже давно, то некоторые заболевания — сердечно-сосудистые, онкологические, болезни Альцгеймера и Паркинсона — являются многофакторными: вызвать их может широкий спектр изменений генома, многие из которых до сих пор неизвестны. Информация о генетических вариантах, связанных с человеческими недугами, позволяет формировать научно-обоснованный подход при их диагностике и лечении [76].

Расшифровка и *аннотация* (маркировка генов и других объектов в последовательности ДНК) генома человека поставили вопрос об использовании генетической информации как для диагностики заболеваний и их долговременного прогнозирования у человека, так и для исследования популяционной структуры сообществ, этногенеза и эволюционных процессов. Применение

современных технологий секвенирования и генотипирования предлагает перспективные способы решения задач современной медицинской геномики и *эпигеномики* [53,74].

Такие результаты могут быть использованы при создании систем для проведения дифференциальной диагностики и выявления генетической природы заболеваний, для проведения персональной терапии и подбора методик лечения на основе анализа индивидуальных генетических характеристик. Решение таких задач тесно связано с разработкой эффективных алгоритмов и математических моделей для биоинформатической обработки данных геномного секвенирования и их использованием на базе суперкомпьютерных кластеров.

Геномные исследования позволяют решать массу задач как прикладного, так и фундаментального плана. Благодаря им разрабатываются новые лекарства и продукты, они же позволяют проникнуть в глубокую историю человечества или понять причину массового вымирания видов [53,74].

Сейчас разработано несколько способов секвенирования НК. Самый популярный и надежный из них — секвенирование по Сэнгеру — позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар оснований (п.о.) и используется для небольших фрагментов генома/генов или для валидации результатов более современного секвенирования нового поколения (*next-generation sequencing, NGS*), где размер одного прочитанного фрагмента варьирует от 25 до 500 п.о. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, методы NGS используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала, которое необходимо, например, для *ресеквенирования* и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований [50,67]. Помимо этого, NGS-секвенирование значительно производительнее, позволяя одновременно считывать миллионы и даже миллиарды коротких фрагментов. Такой рост производительности привел к возможности определения последовательности сразу десятков геномов (в зависимости от их размера) за один запуск прибора.

Стремительно развивающиеся новые технологии секвенирования ДНК позволяют быстро и эффективно определять особенности организмов на уровне их геномов. Главным итогом развития геномных и постгеномных технологий стало существенное расширение возможностей изучения генетической

природы целого спектра заболеваний человека. Масштабные ассоциативные исследования на больших клинических выборках позволяют получать данные о генетических характеристиках, присущих конкретным группам людей (семьям, популяциям), развивая методы персонализированной медицины. В связи с этим, изучение механизмов генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям и выявление специфических генетических маркеров сегодня имеет особенную актуальность. Подобные методы широко применяются за рубежом и в России, где технологии современного секвенирования также постепенно внедряют в медицинские исследования и медицинскую практику с целью персонификации стратегии лечения [50,67].

Технологической основой для подобных исследовательских и сугубо прикладных проектов служат геномные секвенаторы (приборы, на которых проводят секвенирование), поставляемые различными коммерческими компаниями, такими как Illumina, Thermo Fisher Scientific, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences и другие.

В 2017 году на рынке представлены сразу несколько перспективных разработок в области секвенирования НК. Эти подходы применены в секвенаторах нового поколения:

- Ion Proton и Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher Scientific) — технология ионного полупроводникового секвенирования;

- MiSeq и NovaSeq (Illumina) — технология секвенирования на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов;

- MinION, GridION X5, PromethION и SmidgION (Oxford Nanopore Technologies) — нанопоровое секвенирование;

Современные технологии делают процесс секвенирования ДНК рутинной процедурой, особенно в том случае, когда речь идет об организмах с уже известной последовательностью генома — их последующая биоинформатическая обработка не представляет значительного труда, поскольку исследователь уже имеет референсный (ранее отсеквенированный) геном, который позволяет избежать ошибок при анализе полученных данных. При анализе нового, неопубликованного ранее, генома (*de novo* секвенирование и сборка) перед исследователем стоит ряд более сложных задач, в ходе решения которых он пытается сложить единичные фрагменты

в цельную последовательность, задействуя многочисленные математические алгоритмы и суперкомпьютерные мощности [65,71].

Однако наибольший интерес представляет не сама последовательность генома, а понимание того, как он функционирует: какие гены обеспечивают жизнедеятельность клетки, как происходит регуляция (включение или выключение генов) или какие генные пути начинают работать в ответ на стрессовые факторы.

Все современные секвенирующие платформы отличаются от метода секвенирования по Сэнгеру тем, что не требуют этапа клонирования фрагментов ДНК. Это экономит рабочее время и позволяет избежать ряда проблем с клонированием АТ-богатых участков. Общий принцип пробоподготовки для большинства современных (NGS) секвенаторов включает фрагментирование ДНК, привязку к субстрату, амплификацию фрагментов с помощью ПЦР (в одномолекулярном секвенировании от ПЦР удалось отказаться) и последующее считывание последовательности НК.

В отличие от метода секвенирования по Сэнгеру, современные платформы обеспечивают параллельное проведение миллиардов реакций в малых объемах, что позволяет получить намного больший объем информации на выходе.

8.4. Секвенирование по Сэнгеру: «Плюс-минус» метод секвенирования ДНК

Один из наиболее популярных методов секвенирования обязан своим появлением английскому биофизику Фредерику Сэнгеру (1918–2013) — единственному ученому в истории мировой науки, получившему сразу две Нобелевские премии по химии (в 1958 и 1980 годах). Первую премию присудили за установление структур белков, особенно инсулина, а вторую награду ему вручили в том числе и за разработку методов определения первичной последовательности нуклеиновых кислот.

Методику секвенирования ДНК с использованием радиоактивно меченых нуклеотидов и ДНК-полимеразы (или фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I) предложили Сэнгер и его коллеги в 1977 году, причем с течением времени этот метод прошел несколько модификаций и к настоящему моменту считается золотым стандартом современного секвенирования.

Первоначально Ф. Сэнгер и Алан Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК [40], который можно подразделить на две основные стадии:

Полимеразная цепная реакция [3], в которой используется ДНК (например, ДНК человека), фермент (ДНК-полимераза), олигонуклеотидные праймеры и смесь четырех дезоксинуклеотидов (dNTPs) (А, Т, Г и С), причем один из дезоксинуклеотидов радиоактивно помечен по α -положению фосфата (^{32}P).

Очистка смеси амплифицированных фрагментов от дезоксинуклеозидтрифосфатов, не вступивших в реакцию (например, на колонках). Смесь делят на восемь равных частей (в разных пробирках). В «плюс»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в присутствии каждого из четырех типов дезоксинуклеозидтрифосфатов; параллельно в «минус»-системе проводят четыре ПЦР-реакции в отсутствии каждого из них. Далее результаты визуализируют с помощью электрофореза, и определяют последовательность ДНК, исходя из того, что в «плюс»-системе терминация (прерывание) ПЦР происходит после конкретного dNTP, а в «минус»-системе.

8.5. Секвенирование ДНК методом полимеразного копирования (методом Сэнгера)

Ферментативный синтез олиго(поли)дезоксирибонуклеотидов с помощью ДНК-полимераз, заключающийся в копировании матричного полинуклеотида нашел блестящее применение в качестве одного из двух наиболее эффективных методов установления первичной структуры ДНК. Метод состоит в получении блоков-копий полидезоксирибонуклеотида, структура которого изучается. При этом обязательным является выполнение двух условий. Во-первых, копирование должно проводиться, начиная с определенного мономерного звена. Во-вторых, синтез копий следует осуществлять четыре раза, каждый раз останавливая его поочередно на каком-либо одном из четырех мономерных звеньев (А, Г, С или Т), иначе говоря, стремятся получить полный набор "комплементационно отраженных" копий исследуемого полинуклеотида, образование которых прекратилось в каждом из мест расположения одного из четырех мономерных звеньев нуклеиновой кислоты. Определение длины каждой копии позволяет

установить положение данного мономерного звена в цепи исследуемого полинуклеотида. Длина копии определяется фракционированием в полиакриламидном геле. Этот метод, таким образом, так же как и метод, основанный на модификации оснований позволяет получать информацию о положении определенного мономерного звена в цепи полинуклеотида прямо после фракционирования. Для получения копии исследуемого полинуклеотида в последнем выбирают точку отсчета, что достигается введением в систему ферментативного синтеза в качестве нуклеозидного компонента олигонуклеотида-затравки. Такой олигонуклеотид во всех копиях, образующихся в результате достраивания его ферментативным путем, остается постоянным 5'-концевым фрагментом, т. е. является точкой отсчета. Копирование с помощью ДНК-полимеразы в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозид-5'-пирофосфатов (один из них берется ^{32}P -меченным) проводят в течение ограниченного времени. Цель этого этапа - проведение статистически ограниченного синтеза для получения всех возможных копий, начиная с затравки, достроенной на одно, два и т. д. звеньев, и включая полную копию изучаемого полинуклеотида. В идеале смесь должна включать все возможные полинуклеотиды (рис. 5), синтез которых статистически прекращается где-то в середине матричного полинуклеотида в районе ATGCTG матричной последовательности. На практике различные компоненты смеси присутствуют в разных количествах. Если такую смесь далее подвергнуть электрофорезу в полиакриламидном геле в определенных условиях, когда скорость движения пропорциональна длине цепи, на электрофореграмме обнаруживается серия полос, представляющих различные олигонуклеотиды. Такое фракционирование обычно не проводят, хотя оно может использоваться для контроля на завершающем этапе анализа. Инкубационную смесь ^{32}P -меченных олигонуклеотидов различной длины в виде комплексов с матричным полинуклеотидом подвергают гель-фильтрации для удаления дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов и аликвоты реакционной смеси реинкубируют с ДНК-полимеразой в различных условиях. В случае "минус-системы" реинкубацию проводят в присутствии только трех дезоксирибонуклеозид-5'-три-фосфатов. Например, в "- А-системе" отсутствует dATP и каждая копия в смеси достраивается с помощью ДНК-полимеразы до места, в котором следующим

мономерным звеном должен быть остаток pдА (т.е. Т в матричном полинуклеотиде). Образующуюся смесь фракционируют с помощью электрофореза и обнаруживают (ауторадиографически) ограниченное количество полос (их количество равно количеству Т в матричном полинуклеотиде). Аналогично проводят копирование в отсутствие других субстратов: - dGTP, - dCTP или - dTTP (- G-, - C- и - T-системы соответственно). Все четыре электрофореза проводят в полиакриламидном геле параллельно. Полученные ауторадиограммы позволяют сразу написать нуклеотидную последовательность, причем чтение цепи снизу вверх соответствует 5'3'-полярности цепи копии. Например, положение самого короткого олигонуклеотида (в " - Т-системе") указывает на то, что следующий за ним по длине олигонуклеотид заканчивается на Т, т. е. что против полосы, расположенной выше (это полоса в - А-системе), следует записать букву Т. Таким же образом записывают далее в последовательности букву А (на основании положения следующего по длине олигонуклеотида, который оказался в "- А-системе") и т. д. Соответствующий участок цепи в матрице читается с учетом принципа комплементарности и антипараллельности цепей в комплексе матрица - затравка. Для проверки этих данных используют результаты анализа с помощью "плюс-системы". В этом случае дополнительное копирование (после первого этапа) проводят в присутствии ДНК-полимеразы, выделенной из бактериофага Т4, которая в отсутствие субстратов (нуклеозид-5'-трифосфатов) проявляет 3'-экзонуклеазную активность (аналогичную действию ФДЭ змеиного яда), т. е. отщепляет мононуклеотиды один за другим с 3'-конца. В то же время в присутствии субстратов ее полимеразная активность во много раз превосходит экзонуклеазную. Так, если в реакционной смеси присутствует хотя бы один дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат (dATP в " +А-системе"), деградация каждой копии, образовавшейся на первой стадии анализа, будет проходить вплоть до места положения А (Т в матрице). В этом случае pдА включается много быстрее, чем удаляется, и, таким образом, накапливаются фрагменты, содержащие на 3'-конце цепи А. Аналогично проводят копирование в присутствии только dGTP, dCTP или dTTP. Смеси параллельно подвергают электрофорезу, как и в предыдущем случае, и получают ауторадиограммы, из которых сразу считывается последовательность 5'3'-направление,

считывается также снизу вверх). Из сравнения фореграмм "плюс-" и "минус-систем" делается однозначный вывод о нуклеотидной последовательности в копиях и, следовательно, в матричном полинуклеотиде. В настоящее время выделение фрагментов ДНК, создание рекомбинантных генов, а так же прямое секвенирование ДНК и кДНК становятся общедоступными методами благодаря широкому внедрению ПЦР (полимеразной цепной реакции). Сущность ПЦР заключается в использовании двух олигонуклеотидов-праймеров, способных специфически гибридизоваться с последовательностями нуклеотидов на противоположных концах двух цепей участка ДНК, в качестве затравки для одновременного синтеза комплементарных цепей с противоположных концов матрицы с помощью термостабильной ДНК-полимеразы. В ходе повторяющихся циклов (температурной денатурации ДНК, отжига и ферментативской достройки праймеров) экспоненциально увеличивается количество дискретного фрагмента, фланкированного последовательностями нуклеотидов, соответствующих первичной структуре праймеров. Применимость метода Сэнгера зависит от возможности получения одноцепочечных копий клонированных ДНК. Для этой цели можно использовать векторы на основе бактериофага М13. Двухцепочечную чужеродную ДНК можно клонировать в двухцепочечной репликативной форме (РФ) фаговой ДНК, при этом после трансформации в белковую оболочку будет упаковываться только одна из цепей ДНК. Во всех векторах типа М13тр используются сходные полилинкерные последовательности, поэтому для инициации полимеразных реакций пригоден один и тот же универсальный праймер. При амплификации смеси генов (например, семейства генов) необходимо провести клонирование ПЦР-продуктов в векторах типа М13, в результате каждый фаг будет содержать только одну вставку. При прямом секвенировании смеси генов наблюдается несколько одинаково расположенных полос в разных дорожках геля. При амплификации же одного гена можно проводить прямое секвенирование, не прибегая к промежуточному субклонированию. Выбор оптимального праймера для ПЦР зависит от 5'- и 3'-концевых последовательностей амплифицируемого фрагмента ДНК. Кроме того, для встраивания ПЦР-продукта в полилинкерный сайт вектора М13 в 5'-конец праймеров должны быть включены подходящие рестрикционные сайты. В этом случае ПЦР-

амплификация с последующей рестрикцией продукта позволит провести его встраивание в ДНК M13, рестрицированную тем же ферментом. В разные концы амплифицируемого фрагмента лучше включать сайты для разных рестриктаз, поскольку это позволит избежать отжига векторной ДНК самой на себя и обеспечит положение клонированной вставки в определенной ориентации (так называемое направленное клонирование). При подборе праймеров необходимо учитывать следующие факторы.

а. Следует убедиться в том, что амплифицируемое семейство генов не содержит консервативного внутреннего рестрикционного сайта, идентичного сайту, включенному в праймер.

б. После включения рестрикционного сайта 5' - конец праймера нужно удлинить, в противном случае рестриктаза не будет расщеплять праймер. Необходимая для каждого фермента длина выступающего участка и время рестрикции указаны в каталоге фирмы New England BioLabs. Перед секвенированием двухцепочечную рекомбинантную ДНК M13 необходимо перевести в одноцепочечную форму. Для этого ее вводят путем трансформации в компетентные клетки *E. coli*. Бляшки, содержащие одноцепочечные рекомбинантные фаги, необходимо выколоть, нарастить в бактериальной культуре и депротенинировать. Затем переносят культуру в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g в течение 5 минут. Переносят 1 мл супернатанта (содержащего чистый фаг) во вторую пробирку на 1,5 мл, добавляют 200 мкл полиэтиленгликоля и инкубируют при комнатной температуре как минимум 15 минут. Собирают фаг центрифугированием в течении 5 минут при 12 000 g и отбирают супернатант. Быстро повторяют центрифугирование и полностью удаляют все следы супернатанта. Затем осаждают ДНК ацетатом натрия, промывают ее 70%-ным этанолом и высушивают под вакуумом. Растворяют ДНК в 30 мкл воды. Полученная ДНК представляет собой одноцепочечную матрицу для секвенирования. Ниже приведена конкретная методика секвенирования:

Материалы

- 5 x реакционный буфер: 200 mM трис-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl • Буфер для разведения фермента: 10 mM трис-HCl, pH 7,5, 5 mM ДТТ, 0,5 мг/мл БСА
- 5 x смесь для мечения: по 7,5 мкМ dGTP, dCTP, dTTP

- Смесь для ddG-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddGTP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddA-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddATP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddC-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddCTP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddT-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddTTP, 50 мМ NaCl
- Стоп-раствор: 90% формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилолцианол
- Универсальный праймер для секвенирования - 40 (0,5 пмоль/мкл)
- [35S]dATPS (1 мКи/37 МБк в 100 мкл) (Amersham, UK; в состав набора не входит)
- 0,1 М ДТТ

Методика Все реактивы добавляют с помощью диспенсера на 2 мкл Hamilton (PB600), соединенного с адаптером и шприцом 1710 с газовым затвором. Смесь для мечения предварительно разбавляют в пять раз.

1. Для каждой секвенируемой матрицы смешивают в микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл для получения праймерной смеси 6 мкл воды, 1 мкл универсального праймера и 2 мкл реакционного буфера.

2. Размечают микроплашку Falcon 3911. В верхней ее части наносят номера клонов, а слева, сверху вниз, - буквы TCGA.

3. На дно каждой ячейки наносят 2 мкл праймерной смеси, на боковые стенки - по 2 мкл раствора секвенируемой матрицы и центрифугируют плашку. Накрывают ее пленкой Saran(r) и крышкой и помещают в водяную баню с температурой 70°C на 5 мин. Охлаждают плашку на столе (за это время происходит отжиг праймера и ДНК M13).

4. Пока плашка охлаждается, готовят смесь для мечения. Для этого в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл вносят 0,5 мкл 35S-dATP, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 2 мкл разведенной смеси для мечения и 3,5 мкл воды.

5. Размечают поликарбонатную микроплашку Techne 96(r) так же, как первую плашку, и в ячейки в ряду "Т" вносят по 2 мкл смеси для ddT-терминации. Аналогичным образом вносят смесь

для терминации в ячейки остальных рядов и помещают планшку в термостат для микроплашек с температурой 42°C.

6. После охлаждения планшки (п. 3) в течение 30 мин добавляют к смеси для мечения (для каждой матрицы) последовательно 1,77 мкл буфера для разведения фермента и 0,22 мкл фермента Sequenase(r) II. (Это позволяет держать фермент Sequenase(r) II вне холодильника минимальное время).

7. По 2 мкл этой смеси наносят на боковую стенку ячеек, содержащих праймерную смесь, и центрифугируют планшку для перемешивания компонентов. Включают секундомер.

8. Через 2 мин начинают переносить раствор из ячеек первой планшки в соответствующие ячейки предварительно нагретой и помещенной в термостат поликарбонатной планшки. Для этого используют обычную микропипетку, быстро меняя наконечники после каждой ячейки (помните, что использованные наконечники радиоактивны).

9. После того как перенесен раствор из последней ячейки, включают секундомер и в наконечник на шприце Hamilton набирают стоп-раствор.

10. Через 5 мин наносят по 5 мкл стоп-раствора на боковую стенку каждой ячейки и центрифугируют планшку. После центрифугирования планшку, закрытую крышкой, можно хранить в морозильнике до использования (при - 20°C 35S-продукты можно хранить в течение недели).

Аmplифицированные последовательности нуклеотидов можно увидеть в УФ-свете после фракционирования продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия. В большинстве случаев после ПЦР при наличии 1 - 10 нг ДНК-матрицы выявляется только одна полоса ДНК ожидаемой электрофоретической подвижности. Чувствительность и специфичность детекции продуктов амплификации значительно увеличиваются при использовании различных вариантов ДНК-ДНК-гибридизации с олигонуклеотидами-зондами, имеющими радиоактивную биотиновую, флюоресцентную или хемолуминесцентную метку. Это сделало возможным проведение работ с минимально возможным количеством материала, (например, с одной клеткой, одной копией гена) без предварительной его очистки.

В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК (или кДНК, полученная с помощью предварительной обратной транскрипции РНК), выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью методов ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, продемонстрирована возможность анализа специфических участков ДНК при наличии одного волоса, клетки, сперматозоида в целях идентификации личности и пола хозяина.

Серповидно-клеточная анемия, диабет, ревматоидный артрит, мышечная дистрофия, фенилкетонурия, гемофилия, дефицит - антитрипсина - вот далеко не полный список генетических заболеваний, которые могут быть выявлены на ранних стадиях развития эмбриона с помощью ПЦР. Разработаны также подходы к раннему выявлению и прогнозированию онкологических заболеваний).

8.6. Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»

Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов» или метода «обрыва цепи» [25]. Суть этого метода заключается в том, что в реакционную смесь добавляют аналоги привычных нуклеотидов (дидезоксинуклеозидтрифосфаты), включение которых в синтезируемую цепь приводит к невозможности ее дальнейшего синтеза (терминации), а по образовавшемуся «обломку» можно установить последнюю букву секвенируемого фрагмента ДНК.

Автоматизированные модификации метода «терминаторов» активно применяют до сих пор в специальных приборах — секвенаторах. Открытие многочисленных флуоресцентных молекул позволило отказаться от использования радиоактивной метки и сделало возможным проведение реакции в одной пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом, а выстроившиеся в синтезируемую цепочку ДНК меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции,

предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента [59].

Использование секвенирования по Сэнгеру.

Секвенирование по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. В частности, оно используется для:

- секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов;
- идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных);
- валидации данных, полученных на платформах секвенирования нового поколения (NGS);
- микросателлитного анализа;
- анализа делеций и инсерций (малых и протяженных).

Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310.

Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью секвенирования «нового поколения», речь о котором пойдет в следующей главе, однако главные плюсы секвенирования по Сэнгеру — высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов — сохраняют актуальность этого типа определения последовательности ДНК.

Одним из первых методов глубокого секвенирования, предложенным на суд научного сообщества, было пиросеквенирование, подразумевающее «секвенирование путем синтеза». Основной смысл этого типа секвенирования заключается в последовательном синтезе ДНК на ДНК-фрагментах изучаемого организма в специальных пиколитровых «реакторах». В ходе синтеза дочерней цепочки ДНК детектируют пирофосфаты, высвобождающиеся при включении нуклеотида в синтезируемую на матрице (участке молекулы ДНК, служащим матрицей для синтеза) комплементарную цепь.

Технологию предложил в 1996 году Пол Нирен с коллегами из Королевского технологического института в Стокгольме [48,59]. Затем ее коммерциализировали (2005 год) и воплотили в приборе

GS FLX, 454 производства Roche (2008 год). Этим методом можно определять нуклеотидную последовательность фрагментов геномной ДНК размером 300–500 пар оснований (п.о.). Особо следует отметить тот факт, что подавляющее большинство NGS-методов требуют предварительной фрагментации ДНК для упрощения ферментативных реакций. К обоим концам фрагментированной ДНК «пришивают» ДНК-адаптеры (данная конструкция называется ДНК-библиотекой), необходимые для эмульсионной ПЦР (эПЦР) на магнитных сферах и последующего секвенирования.

Готовые ДНК-библиотеки иммобилизуют на магнитных сферах. Затем магнитные сферы с нанесенной на них клональной библиотекой доставляют на проточную ячейку, где в присутствии праймера, дезоксинуклеотидтрифосфатов и ферментов — ДНК-полимеразы, люциферазы, АТФ-сульфуриказы — происходит циклический синтез новой цепи [66].

Во время цикла пиросеквенирования при образовании фосфодиэфирной связи между матричной цепочкой ДНК и нуклеотидом синтезируемой цепи выделяется пирофосфат, который запускает каскад химических реакций, приводящих к выделению АТФ, необходимой для реакции окисления люциферина с выделением кванта света, который фиксируют аналоговой интегральной микросхемой (ПЗС-матрицей), состоящей из светочувствительных фотодиодов. Нуклеотиды, не вовлеченные в синтез новой цепи, удаляют из проточной ячейки, и начинается следующий реакционный цикл, в ходе которого добавляют дезоксинуклеотидтрифосфат другого типа.

Использование секвенирования нового поколения

Производительность и относительная доступность NGS-методов привели к настоящей революции в биологической и медицинской науке. Более того, благодаря новым подходам появилась реальная возможность проводить ранее технически недоступные исследования. Использование секвенирования нового поколения позволяет проводить такие проекты как:

1. *Полногеномный анализ* (в том числе, ресеквенирование и секвенирование *de novo*). Ресеквенирование полных геномов человека в интересах персонализированной медицины или секвенирование ранее не изученных геномов вирусов, бактерий, архей, растений, грибов и животных как с чисто фундаментальными, так и прикладными целями.

2. *Секвенирование РНК (RNA-Seq)*, позволяющее оценивать экспрессию генов не только качественно, но и количественно. Существует возможность отдельно оценивать экспрессию кодирующих и регуляторных РНК. Данные методики направлены на изучение работы генома (активности его генов, в том числе генов-регуляторов) в разных клетках, тканях и органах.

3. *Метагеномное секвенирование* — оценка разнообразия микроорганизмов в различных образцах. Позволяет оценивать бактериальное разнообразие в различных средах, например, в кишечнике человека, донных отложениях озера Байкал или в горячих источниках Камчатки.

4. *Анализ ДНК-белковых взаимодействий (ChIP-Seq)* — изучение влияния транскрипционных факторов и других ДНК-связывающих белков на экспрессию генов, а через нее на фенотипические и физиологические особенности клеток, органов и тканей.

5. *Бисульфитное секвенирование и его модификации (например, RRBS)* — оценка метилирования в геноме или его участках. Влияние метилирования регуляторных участков генома на уровень экспрессии генов через подавление их транскрипционной активности.

6. *Таргетное секвенирование (экзомное секвенирование, секвенирование митохондриальных генов, секвенирование ампликонов)*. Секвенирование отдельных (выбранных исследователем) участков генома, например, только генов митохондриальной ДНК, кодирующих белки генов или генов, для которых уже описано участие в процессах онкогенеза. Таргетное секвенирование позволяет значительно снизить стоимость эксперимента (из расчета на один образец) и многократно увеличить количество анализируемых образцов [58,72].

8.7. Полимеразная цепная реакция

Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) — это одно из самых ярких достижений в сфере молекулярной биологии. Метод получил широчайшее распространение в разных областях науки. Благодаря очень высокой специфичности и чувствительности, метод ПЦР применяется в медицине, биологии, ветеринарии, криминалистике, санитарной службе и других отраслях деятельности человека.

Для анализа методом ПЦР можно использовать любые биологические материалы, которые содержат нуклеиновые кислоты (молекулу ДНК или РНК).

ПЦР – полимеразная цепная реакция, в ходе которой амплифицируются определенные участки ДНК. ПЦР была изобретена американским ученым Кэри Мюллисом в 1983 году. Широкие возможности, сравнительная дешевизна и простота ПЦР позволили использовать этот метод генетического анализа в разных областях научных исследований.

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Праймеры подбираются по определенным правилам:

Размер праймера должен быть 16-25 нуклеотидов. При маленьком размере происходит неспецифическое распознавание ДНК.

1. Разница в температуре плавления праймеров – не более 6 градусов. Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера ведут по формулам $T_m = [(A+T) \times 2^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4^\circ\text{C}]$ если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований и $T_m = 22 + 1.46 \times ([2 \times (G+C)] + (A+T))$ если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований.

2. Количество остатков цитозина и гуанина должно быть 50-60 %. Для улучшения качества отжига рекомендуется подбирать праймеры так, чтобы последние несколько нуклеотидов 3' - конца праймера содержали GC- основания.

3. Отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимнокомплемментарными) и отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров).

Полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. В настоящее время существует множество различных полимераз. В 1975 г Т. Брок и Х.Фриз открыли *Thermus aquaticus* – граммотрицательную палочковидную экстремально термофильную бактерию, а в 1976 г из нее была впервые выделена

Тaq- полимераза. Данный фермент до сих пор активно используется в лабораториях, так как он относительно дешевый, неприхотлив к контаминации ДНК, обладает высокой процессивностью. Однако его нельзя использовать для клонирования, так как при синтезе данный фермент имеет низкую точность – в среднем наблюдается 1-2 мутации на 1000 нуклеотидов.

В настоящее время на рынке предложены высокоточные полимеразы, такие как Pfu полимераза, Pfu94 полимераза, Q-5 полимераза. Эти ферменты обладают 5'-3' экзонуклеазной активностью, за счет которой способны «исправлять» собственные ошибки путем удаления неправильно встроенных нуклеотидов. При их использовании точность синтеза составляет около 1 мутации на 10000 пар оснований.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) -

дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) –«строительный материал», используемый полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

ДНК-матрица – подготовленный к введению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Циклический температурный режим

В процессе реакции амплификации ДНК с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (95 °C).

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК- мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Температуру отжига подсчитывают для каждого праймера

отдельно, а затем устанавливают наиболее низкую из пары праймеров.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров ДНК-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы фермента, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу (как правило 72 °С). Эти три этапа многократно повторяются – 25 и более раз, в зависимости от количества ДНК матрицы.

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

«Эффект плато»

Следует заметить, что процесс накопления специфических продуктов амплификации по геометрической прогрессии идет лишь ограниченное время, а затем его эффективность критически падает – достигается «эффект плато». В зависимости от условий и количества циклов реакции амплификации, на момент достижения «эффекта плато» влияют:

Утилизация субстратов (дНТФ и праймеров). Стабильность реагентов (дНТФ и фермента).

Количество ингибиторов, включая пирофосфаты и ДНК-дуплексы.

Неспецифические продукты и праймер-димеры, конкурирующие за праймеры, дНТФ и полимеразу.

Концентрация специфического продукта за счет неполной денатурации при высокой концентрации ампликонов.

1) Приготовить ПЦР смесь:

- 10x буфер для полимеразы (поставляется вместе с ферментом) – 2.5 мкл
- ДНК полимеразы – 1 ед. активности
- Смесь дНТФ (10 mM раствор каждого) – 0.5 мкл
- Праймер 1 (5 мкМ раствор) – 2 мкл
- Праймер 2 (5 мкМ раствор) – 2 мкл
- ДНК-матрица – 0.01 мкг
- H₂O – до 25 мкл

2) Смесь смешать, сбросить на центрифуге, и поставить в амплификатор.

3) Примерная программа амплификации выглядит следующим образом: 1-95 °C – 4 мин (первичное плавление ДНК)

2-95 °C – 30 сек (плавление ДНК)

3-50* °C – 30 сек (отжиг праймеров, *-температура отжига рассчитывается по последовательности праймера

4-72 °C – 60 сек** (синтез ДНК, ** - время элонгации рассчитывается исходя из длины синтезируемого фрагмента, 1000 п.о. в минуту) Повторять пункты 2-4 30 раз.

Метод позволяет работать с любым биологическим материалом 2 °C – 5 мин (достройка незаконченных цепей ДНК).

Преимущества методики ПЦР

Всего разработано более 10 разных методик амплификации, применяемых лабораториями в зависимости от исходных условий и поставленных целей.

Общим для них есть высокая чувствительность (для положительного результата достаточно 40 (!) или менее искомым копий ДНК в 1 мл образца, то есть вероятность ложноотрицательного ответа ничтожно мала. И очень высокая специфичность: вероятность ложноположительного ответа составляет менее 1%.

Но точность результатов сильно зависит от качества сбора диагностического материала, тщательного соблюдения всех технических требований к каждому этапу и качеству оборудования, расходных материалов (буфера, праймеров, раствора для отмывки и т.д.).

Области применения в медицине

В дерматовенерологии ПЦР используют для выявления венерических заболеваний: микоплазменной, хламидийной инфекций, сифилиса, генитального герпеса и др.

Инфекционисты активно используют ПЦР для диагностики туберкулеза, ВИЧ, вирусных гепатитов, герпеса, мононуклеоза, вируса Эпштейн-Барр и др. А с помощью ПЦР в реальном времени, оценивая вирусную нагрузку, врачи могут составить мнение о динамике заболевания, отклике на лечение, что особенно актуально для пациентов с ВИЧ, принимающих терапию. Также благодаря ПЦР врачи могут в течение нескольких дней с уверенностью идентифицировать коклюш и паракклюш, выявить возбудителей

эпидемии ОРВИ. Уточняются типы вируса гриппа, циркулирующие на определенной территории, на основании чего появляется возможность разработать эффективную вакцину для каждого сезона гриппа.

В течение суток или быстрее можно установить вид возбудителя кишечной инфекции, а значит – назначить адекватное лечение и обнаружить вероятный источник заражения.

IX ГЛАВА. РЕШЕНИЕ ЗАДАЧ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКЕ

Ген – это участок ДНК, кодирующий определенный белок. Малейшее изменение структуры ДНК ведет к изменениям белка, что в свою очередь изменяет цепь биохимических реакций с его участием, определяющих тот или иной признак или серию признаков.

Первичная структура белка, т.е. последовательность аминокислотных остатков, зашифрована в ДНК в виде последовательности азотистых оснований аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц). Каждая аминокислота кодируется одной или несколькими последовательностями из трех нуклеотидов – триплетами. Синтезу белка предшествует перенос его кода с ДНК на информационную РНК (иРНК) – транскрипция. При транскрипции выполняется принцип дополнения, или комплементарности: А, Т, Г и Ц в ДНК соответствуют У (урацил), А, Ц и Г в иРНК. Непосредственно синтез белка, или трансляция, происходит на рибосоме: аминокислоты, подносимые к рибосоме своими транспортными РНК (тРНК), соединяются в полипептидную цепь белка соответственно триплетам оснований иРНК.

Однозначная связь между последовательностями нуклеотидов в ДНК и аминокислот в полипептидной цепи белка позволяет по одной из них определить другую. Зная изменения в ДНК, можно сказать, как изменится первичная структура белка [12,29,37].

Задача 1. Фрагмент молекулы ДНК состоит из нуклеотидов, расположенных в следующей последовательности: ТАААТГЦААЦЦ. Определите состав и последовательность аминокислот в полипептидной цепи, закодированной в этом участке гена.

Решение

Выписываем нуклеотиды ДНК и, разбивая их на триплеты, получаем кодоны цепи молекулы ДНК:

ТАА–АТГ–ГЦА–АЦЦ.

Составляем триплеты иРНК, комплементарные кодам ДНК, и записываем их строчкой ниже:

ДНК: ТАА–АТГ–ГЦА–АЦЦ

иРНК: АУУ–УАЦ–ЦГУ–УТТ.

По таблице кодонов (Приложение) определяем, какая аминокислота закодирована каждым триплетом иРНК:

Иле–Тир–Арг–Три.

Задача 2. Фрагмент молекулы содержит аминокислоты: аспарагиновая кислота–аланин–метионин–валин. Определите:

а) какова структура участка молекулы ДНК, кодирующего эту последовательность аминокислот;

б) количество (в %) различных видов нуклеотидов в этом участке гена (в двух цепях);

в) длину этого участка гена.

Решение

а) По таблице кодонов находим триплеты иРНК, кодирующие каждую из указанных аминокислот.

Белок: Асп–Ала–Мет–Вал

иРНК: ГАЦ–ГЦА–АУГ–ГУУ

Если аминокислоте соответствуют несколькими кодонов, то можно выбрать любой из них.

Определяем строение той цепочки ДНК, которая кодировала строение иРНК. Для этого под каждым кодоном молекулы иРНК записываем комплементарный ему кодон молекулы ДНК.

1-я цепь ДНК: ЦТГ–ЦГТ–ГАЦ–ЦАА.

б) Чтобы определить количество (%) нуклеотидов в этом гене, необходимо, используя принцип комплементарности (А–Т, Г–Ц), достроить вторую цепь ДНК:

2-я цепь ДНК: ГАЦ–ГЦА–АТГ–ГТТ

Находим количество нуклеотидов (нтд): в двух цепях – 24 нтд, из них

А = 6. Составляем пропорцию:

24 нтд – 100%

6 нтд – х%

$x = (6 \times 100) : 24 = 25\%$

По правилу Чаргаффа количество аденина в молекуле ДНК равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина. Поэтому:

Т = А = 25%

Т + А = 50%, следовательно

Ц + Г = 100% – 50% = 50%.

Ц = Г = 25%.

в) Молекула ДНК всегда двухцепочечная, ее длина равна длине одной цепи. Длина каждого нуклеотида составляет 0,34 нм, следовательно:

$$12 \text{ нтд} \times 0,34 = 4,08 \text{ нм.}$$

Задача 3. Молекулярная масса белка X равна 50 тыс. дальтонов (50 кДа). Определите длину соответствующего гена.

Примечание. Среднюю молекулярную массу одной аминокислоты можно принять равной 100 Да, а одного нуклеотида – 345 Да.

Решение

Белок X состоит из $50\,000 : 100 = 500$ аминокислот.

Одна из цепей гена, кодирующего белок X, должна состоять из 500 триплетов, или $500 \times 3 = 1500$ нтд.

Длина такой цепи ДНК равна $1500 \times 0,34 \text{ нм} = 510 \text{ нм}$.

Такова же длина гена (двухцепочечного участка ДНК).

Задача 4.

Последовательность нуклеотидов в цепи ДНК: ГТТ-ЦГТ-ААГ-ЦАТ-ГТТ-ЦГТ-ЦТ.

В результате мутации одновременно выпадают второй и шестой нуклеотиды. Запишите новую последовательность нуклеотидов в цепи ДНК. Определите по ней последовательность нуклеотидов в иРНК и последовательность аминокислот в полипептиде.

Для выполнения задания используйте таблицу генетического кода.

Решение:

Надо переписать данную в задаче цепь ДНК, затем вычеркнуть выпавшие нуклеотиды и переписать все заново. Затем, как обычно, построить иРНК и по ней построить цепь аминокислот, используя генетический код.

ДНК: ГТТ-ЦГТ-ААГ-ЦАТ-ГТТ-ЦГТ-ЦТ;

ДНК: ГТЦ-ГАА-ГЦА-ТГТ-ГЦТ-ТЦТ;

иРНК: ЦАГ-ЦУУ-ЦГУ-АЦЦ-ЦГА-АГА.

Последовательность аминокислот в полипептиде будет следующая:

Гли-Лей-Арг-Тре-Арг-Арг.

Задача 5.

Фрагмент одной из цепей ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов
АААГАТЦАЦТАТТЦТГТТАЦТА.

Напишите строение молекулы и-РНК, образующейся в процессе транскрипции на этом участке молекулы ДНК.

Решение:

Информационная РНК по принципу комплементарности снимает информацию с ДНК. Этот процесс называется транскрипцией. При этом к цитозину присоединяется гуанин, к гуанину – цитозин, к тимину – аденин, однако к аденину ДНК присоединяется не тимин, а урацил. Таким образом, для решения задачи достаточно произвести замену нуклеотидов по схеме:

$\text{Ц} \rightarrow \text{Г}, \text{Г} \rightarrow \text{Ц}, \text{А} \rightarrow \text{У}, \text{Т} \rightarrow \text{А}.$

В результате получим: цепочка

ДНК – А А А Г А Т Ц А Ц Т А Т Т Ц Т Г Т Т А Ц Т А,

молекула иРНК – У У У Ц У А Г У Г А У А А Ц А Ц А А У Г А

У.

В молекуле ДНК 17% адениловых нуклеотидов, сколько в ней содержится гуаниловых нуклеотидов?

Решение:

Согласно принципу комплементарности аденин всегда стоит в паре с тимином, значит их количество одинаково, т.е. $\text{А} = \text{Т} = 17\%$, а вместе они составляют 34%.

Тогда на долю остальных нуклеотидов приходится $100\% - 34\% = 66\%$. Поскольку гуанин всегда находится в паре с цитозином, то $\text{Г} = \text{Ц} = 66\%$, а на каждого из них приходится $66 : 2 = 33\%$.

Ответ: процентное содержание гуаниловых нуклеотидов составляет 33%.

Задача 6.

В молекуле иРНК : 22% аденина, 36% гуанина, 15% цитозина и 27% урацила. Сколько и каких нуклеотидов будет в двухцепочечной молекуле ДНК, на которой была синтезирована иРНК?

Решение:

Зная, что молекула иРНК комплементарна одной цепи ДНК, можно посчитать содержащиеся в этой цепи нуклеотиды: 22% аденина в иРНК соответствует 22% тимина в ДНК, 36% гуанина в

иРНК соответствует 36% цитозина в ДНК, 15% цитозина в иРНК соответствует 15% гуанина в ДНК, 27% урацила в иРНК соответствует 27% аденина в ДНК.

Теперь по принципу комплементарности можно посчитать нуклеотиды во второй цепи ДНК.

Если в первой цепи 22% тимина, то во второй цепи будет 22% аденина ($T = A$), если в первой цепи 36% цитозина, то во второй цепи будет 36% гуанина ($C = G$), соответственно во второй цепи будет 15% цитозина напротив Г ($G = C$) и 27% Т напротив А ($A = T$).

Теперь можно посчитать нуклеотиды в двух цепях: А = 27% в первой цепи + 22% во второй цепи = 49%, Т = А тоже 49%, Г = 15% в одной цепи + 36% во второй цепи = 51%, значит Ц тоже будет 51%.

Ответ: А = 49%, Т = 49%, Г = 51%, Ц = 51%.

Тесты по молекулярной биологии

№ 1. Хранение и передачу следующим поколениям клеток и организмов наследственной информации, которая записана в виде последовательности нуклеотидов, непосредственно осуществляет.....

- ДНК
- тРНК
- иРНК
- рРНК

№ 2.-единица генетического кода системы, кодирующей последовательность аминокислот в молекуле белка.

- Триплет нуклеотидов
- Ген
- Нуклеотид
- ДНК

№ 3.-моносахарид, входящий в состав молекулы АТФ.

- Десоксирибоза
- Глюкоза
- Рибоза
- Фруктоза

№ 4. В молекуле ДНК закодирована, Структура белка.

- Первичная
- Третичная
- Вторичная
- Четвертичная

№ 5. Транскрипция осуществляется в

- Ядре
- Наружной плазматической мембране
- Клеточном центре
- Аппарате Гольджи

№ 6. Кодону ГГА иРНК комплементарен антикодон, тРНК.

- ЦЦУ
- ТТА

ГТТ
ГГА

№ 7. ...-ферментативный процесс, который происходит в рибосоме.

Трансляция

Транскрипция

Гликолиз

№ 8. Во время транскрипции образуются химические соединения-....

иРНК

АТФ

полисахард

ДНК

№ 9. Какое количество антикодона входит.... в состав нуклеотидов.

3

2

1

4

№ 10. Белок, состоящий из 90 аминокислот кодируется....парами нуклеотидов.

270

30

45

90

№ 11. Перенос аминокислот в цитоплазме осуществляется....

тРНК

рРНК

ДНК

иРНК

№ 12. Полимерсодержит антикодонную петлю.

тРНК

ДНК

иРНК

pPHK

№ 13. В состав tPHK входит....

Урацил

Гуанин

Аденин

Тимин

№ 14. Сведения о первичной структуре белка из ядра в рибосому переносит...

Информационная PHK

ДНК

Транспортная PHK

Рибосомная PHK

№ 15.-источник энергии для большинства клеточных процессов.

АТФ

Глюкоза

АМФ

АДФ

Креатинфосфат

№ 16. Последовательность нуклеотидов иPHK, синтезируемая по матрице молекулы ДНК, имеющей следующую последовательность: 3'АТГЦЦЦГАТ5'-....

УАЦТТЦУА

АТГЦЦЦГАТ

ТАЦТТЦТА

АУГЦЦЦГАУ

№ 17. Триплеты нуклеотидов ДНК, не кодирующие ни одной из аминокислот, служат сигналами для...

Окончания транскрипции

Разделения генов

Начала трансляции

Окончания трансляции

№ 18. Триплет...молекулы иРНК комплементарен триплету
АТТ молекулы ДНК.

УАЦ
ГГА
АТГ
ТАЦ

№ 19. В молекуле ДНК:

Азотистые основания связаны друг с другом водородными связями.

Сахара присоединены ионными связями к азотистым основаниям

Сахара присоединены к азотистым основаниям водородными связями

Азотистые основания связаны фосфодиэфирными связями

№ 20. Компонент нуклеотида:

Остаток фосфорной кислоты

Аминокислота

Углевод

Липид

№ 21. Стартовым кодоном является:

AUG

AUC

UGA

UAA

№ 22. Генетический код —это...

Способ символической записи наследственной информации в молекулах нуклеиновых кислот с помощью триплетов.

Последовательность нескольких аминокислот

Нуклеотиды

Триплет нуклеотидов

№ 23. Функция РНК в клетке

Участие в биосинтезе белка

Энергетическая

Сократительная

Запасающая

№ 24. В состав РНК входят азотистые основания:

Урацил

Аденин

Гуанин

Тимин

Глицин

№ 25. Нуклеиновая кислота, которая переносит аминокислоту к месту синтез белка:

тРНК

иРНК

рРНК

ДНК

№ 26. Первичной структурой белка является:

Последовательность аминокислот, соединенных пептидной связью

Спираль

Кольцевая структура

Цепочка из аминокислот

№ 27. Отдельные нуклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот связаны:

3,5- фосфодиэфирной связью

0-гликозидной связью

N- гликозидной связью

α -1,4 гликозидной связью

№ 28. Если одна цепь ДНК содержит фрагмент Г-Ц-Ц-А-А-Т-Г-Ц-А-Ц то вторая цепь:

Ц-Г-Г-Т-Т-А-Ц-Г-Т-Г

Ц-Ц-А-А-Т-Г-А-Т-Г-Т

Т-Ц-Г-Г-Т-Г-Т-Ц-Т-Т

Ц-Т-Г-Т-А-А-Т-А-Т-Г

№ 29. Значение ДНК заключается в том, что она:
Является носителем генетической информации
Участвует в синтезе белка на рибосоме
Участвует в переносе информации в цитоплазму
Регулирует трансляцию

№ 30. В процессе репликации участвуют все ферменты, кроме:
ДНК азы
РНК – праймазы
ДНК – полимеразы
Топоизомеразы

№ 31. Информация о строении белка передается в цитоплазму:
Матричной РНК
Транспортной РНК
Рибосомной РНК
Интерферирующей РНК

№ 32. Процессинг - это:
Созревание РНК
Синтез РНК
Созревание ДНК
Элонгация в процессе трансляции

№ 33. Транскрипция - это:
Процесс переписывания информации, содержащейся в ДНК, в форме иРНК
Процесс переписывания информации, содержащейся в РНК, в форме ДНК
Процесс самокопирования ДНК с образованием двух идентичных дочерних молекул
Процессинг мРНК

№ 35. Основной фермент транскрипции:
РНК – полимераз
ДНК – полимераз
Рестриктаза
Лигаза

№ 36. Участок ДНК, с которым связывается РНК – полимераз, называется:

- Промотор
- Терминатор
- Транскриптон
- Инtron

№ 37. Синтез белка обозначают термином:

- Трансляция
- Транскрипция
- Репликация
- Редупликация

№ 38. Процесс элонгации в трансляции – это:

- Удлинение полипептидной цепи белка
- Начало синтеза белка
- Окончание синтеза белка
- Удлинение растущей цепи тРНК

№ 39. Функциями ДНК являются:

- Хранение генетической информации
- Передача генетической информации по наследству дочерним клеткам
- Матрица для синтеза РНК
- Участие в окислительных процессах.

№ 40. В молекуле ДНК не содержится:

- Урацил
- Тимин
- Аденин
- Гуанин

№ 41. Процесс синтеза РНК на матрице ДНК называется:

- Транскрипция
- Репликация.
- Трансляция
- Рекогниция

№ 42. Наследственная информация, записанная в виде генетического кода, хранится в:

- Молекуле ДНК
- Молекуле иРНК
- Молекуле рРНК
- Молекуле т-РНК

№ 43. Репликация - это:

- Копирование ДНК с образованием двух идентичных дочерних молекул
- Процесс переписывания информации с ДНК на РНК
- Процесс синтеза белка.
- Процесс переписывания информации с РНК на ДНК

№ 44. Механизм репликации ДНК является:

- Полуконсервативным
- Консервативным
- Неконсервативным
- Либеральным

№ 45. Фрагмент Оказаки - это:

- Короткий участок отстающей цепи ДНК.
- Длинный участок ведущей цепи ДНК
- Участок материнской цепи ДНК
- Участок дочерной цепи ДНК

46. Основной фермент транскрипции:

- РНК-полимераза
- ДНК-полимераза
- Рестриктаза
- Амилаза

№ 47. Синтез белка обозначает терминам:

- Трансляция
- Транскрипция
- Репликация
- Трансдукция

№ 48. Кодон инициации кодирует аминокислоту:

Метионин.

Аспарагин

Лизин.

Серин

№ 49. Процесс элонгации в трансляции - это:

Удлинение полипептидной цепи белка

Начало синтеза белка

Окончание синтеза белка

Синтез белка

№ 50. Функции ДНК:

Хранит и воспроизводит генетическую информацию

Транспортирует аминокислоты к рибосоме

Передаёт генетическую информацию дочерним молекулам ДНК

Транспортирует аминокислоты

№ 51. Функции РНК:

Переносит генетическую информацию от ДНК к рибосоме

Транспортирует аминокислоты к рибосоме

Передаёт генетическую информацию дочерним молекулам иРНК

Хранит генетическую информацию

№ 52. Функции т-РНК:

Транспортирует аминокислоты к рибосоме

Хранит генетическую информацию

Непосредственно участвует в сборке молекул полипептидов

Переносит генетическую информацию от ДНК к рибосоме

№ 53. Принципы репликации молекулы ДНК:

Полуконсервативность

Параллельность

Антипараллельность

Непрерывность

№ 54. Мономером ДНК является:

Нуклеотид

Азотистое основание

Дезоксирибоза

Рибоза

№ 55. Триплету ЦЦА иРНК соответствует триплет т-РНК:

ГГУ

ГГТ

УУЦ

ГГА

№ 56. Роль транспортных РНК в синтезе белка:

Переносят аминокислоты к месту биосинтеза белка

Переносят генетическую информацию к месту синтеза белка

Переносят генетическую информацию от ДНК к и-РНК

Переносят генетическую информацию от РНК к и-РНК

№ 57. Транспортная РНК характеризуется следующими свойствами:

Содержит нуклеотиды, антикодон, имеет форму клеверного листа

Содержит антиген, антикодон

Содержит аминокислоты, антикодон

Содержит кодон, антиген

№ 58. Комплементарные ДНК представляют собой:

Молекулы ДНК, комплементарные последовательностям иРНК

Молекулы ДНК, комплементарные последовательностям ДНК

Молекулы ДНК, комплементарная последовательностям р-РНК

Молекулы ДНК, синтезированные искусственным путём

№ 59. Синтез белка обозначают термином:

Трансляция

Транскрипция

Репликация

Трансдукция

№ 60. Кодон инициации кодирует аминокислоту:

- Метионин
- Аспаригин
- Лизин
- Серин

№ 61. Процесс элонгации в трансляции - это:

- Удлинение пептидной цепи белка
- Начало синтеза белка
- Окончание синтеза белка
- Удлинение цепи белка

№ 62. Изменение последовательности нуклеотидов в ДНК - это:

- Генная мутация
- Хромосомная мутация
- Геномная мутация

№ 63. Вторичная структура ДНК была открыта:

- Уотсоном и Криком
- Натансом и Ситом
- Эвери, Мак-Леодим и Мак-Карти
- Натансом и Криком

№ 64. Какими ферментами расщепляются нуклеиновые кислоты?

- Нуклеазы
- Линазы
- Пептидазы
- Лиазы

№ 65. Какой из этих РНК называют рибосомам?

- рРНК
- тРНК
- мяРНК
- мРНК

№ 66. Из каких полимеризующихся соединений образуются нуклеиновые кислоты?

Нуклеотиды

Моносахариды

Аминокислот

Кирелеозиды

№ 67. Что входит в химический состав нуклеотидов?

Азотистые основания, углеводов, фосфорная кислоты.

Углеводы, липиды, аминокислоты

Аминокислоты, липиды

Фосфатиды и аминокислоты

№ 68. Сколько нуклеотидных остатков приходится на один шаг спорами молекул ДНК?

10

5

8

3

№ 69. Какой из этих соединений нуклеотид трифосфат?

АТФ

АМФ

ТДФ

УДФ

№ 70. За счёт каких основных связей возникает первичная структура белков?

Пептидных

Гликозидных

Дисульфидных

Водородных

№ 71. Активация аминокислот для синтеза белка это присоединение аминокислотах:

тРНК

Остатку фосфорной кислоты

мРНК

Малой субъединице рибосомы

№ 72. Мономерами нуклеиновых кислот является:

Нуклеотиды
Моносахариды
Аминокислоты
Пептиды

№ 73. Типы связи характерные для первичной структуры:

Пептидная
Дисульфидная
Гидрофобные взаимодействия
Водородная

№ 74. Методы определения вторичной структуры белка:

Рентгеноструктурный анализ
Ультрацентрифугирования
Хромотография
Гель-фильтрация

№ 75. Для какого белка впервые была установлена первичная структура?

Инсулин
Холлаген
Миоглобин
Гемоглобин

№ 76. Сплайсинг - это:

Вырезание интронов и сшивание экзонов
Вырезание экзонов и сшивание интронов
Пагаденимирование 3' - конца молекулы мРНК
Получение идентичных копий молекулы РНК

№ 77. Активация аминокислот для синтеза белка осуществляет фермент:

Аминоацил - тРНК - синтетаза
Ацетил - КоА - ацетилтрансфераза
Моноаминоксидаза
Ацил - КоА синтетаза

№ 78. Информационная РНК (иРНК) является продуктом:
транскрипции ДНК
трансляции ДНК
трансдукции ДНК
репликации ДНК

№ 79. Функциями ДНК в живых организмах является:
Хранение, передача, реализация наследственной информации
Хранение, передача, реализация памяти
Хранение, передача, реализация психологических свойств
Изменения, перевод, репарация наследственной информации

№ 80. Функциями РНК в живых организмах является:
Информации реализации наследственной информации,
транскрипция, трансляция генов
Хранение, передача, реализация наследственной
Реализация наследственной информации, репарация генов
Хранение, изменение, реализация наследственной информации

№ 81. Информационная РНК (иРНК) состоит из и выполняет следующие функции:
одной цепи, содержит А,Г,Т,Ц, участвует в репарации ДНК;
одной цепи, содержит А,Г,Т,Ц, участвует в репликации ДНК;
одной цепи, содержит А,Г,Т,Ц, участвует в релаксации ДНК;
одной цепи, содержит А,Г, Ц, У участвует в транскрипции ДНК;

№ 82. Информосома представляет собой:
активную иРНК, связанную с белками;
неактивную иРНК, связанную с белками
активную иРНК, связанную с металлами;
активную иРНК, связанную с липидами;

№ 83. Транспортная РНК (тРНК) характеризуется:
Однацепочечной структурой, формой клеверного листа, участием в трансляции;
Однацепочечной структурой, формой кленового листа, участием в репликации;
Однацепочечной структурой, формой грибовидного листа,

участием в транскрипции;

Однацепочечной структурой, формой дубового листа, участием в апоптозе;

№ 84. Антикодон – это.....:

три нуклеотида на одном из концов тРНК;

три нуклеотида на конце иРНК;

группа нуклеотидов на р-РНК;

группа нуклеотидов на т-РНК;

№ 85. Молекулярная биология изучает:

Протекание биологических процессов на молекулярном уровне;

Строение клетки;

Морфологическое и физиологическое многообразие бактерий и вирусов

Физиологическое многообразие бактерий и вирусов

№ 86. Окончание полипептида, содержащее аминогруппу, называется:

N-конец;

C-конец;

Пептидная связь

Обе концы

№ 87. Мономерами белков являются:

Аминокислоты

Нуклеосомы;

Нуклеотиды;

Белки

№ 88. Нуклеотид – это мономер.....:

нуклеиновых кислот

белков

жиров

фосфолипидов

№ 89. Простые белки состоят:

Только из аминокислот

Только из нуклеотидов
Из аминокислот и небелковых соединений
Только из не белковых соединений

№ 90. В строение белков различают:
Четыре уровня организации молекулы
Три уровня организации молекулы
Два уровня организации молекулы
Уровня организации молекулы

№ 91. Полипептид образуется путем:
Взаимодействия аминокруппы одной аминокислоты и карбоксильной группы другой аминокислоты;
Взаимодействия аминокрупп двух соседних аминокислот
Взаимодействия карбоксильных групп двух соседних аминокислот;

№ 92. Степень спирализации белка характеризует:
Вторичную структуру белка;
Первичную структуру белка;
Третичную структуру белка;
Структуру белка;

№ 93. ДНК содержит:
Дезоксирибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, тимин;
Рибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, тимин;
В дезоксирибозу, остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, урацил;
В остаток фосфорной кислоты, одно из четырех азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин, урацил

№ 94. Генетический код был открыт:
Гамовым;
Гриффитом;
Очоа
Уотсоном и Криком

№ 95. Информация о строении белка передается в цитоплазму:
матричной РНК
транспортной РНК
рибосомной РНК
информационной РНК

№ 96. Процессинг – это
Созревание РНК
Синтез РНК
Созревание ДНК
Синтез белка

№ 97. Репликация – это
копирование ДНК с образованием 2-х идентичных дочерних молекул
процесс переписывания информации с ДНК на РНК
процесс синтеза белка
расщепление, происходящее в энергетическом обмене

№ 98. Для осуществления процесса репликации нуклеоплазме необходимо наличие
нуклеозидтрифосфатов
нуклеозиддифосфатов
нуклеозид монофосфатов
фрагменты Оказаки

№ 99. Основной фермент транскрипции
ДНК полимераз
РНК полимераз
рестриктаза
трансфераза

№ 100. Участок ДНК, с которым связывается РНК – полимераз, называется
промотор
терминатор
транскриптон
оперон

№ 101. Возникновение геномики как научной дисциплины стало возможным после:
установления структуры ДНК;
создания концепции гена;
дифференциации регуляторных и структурных участков гена;
полного секвенирования генома у ряда организмов.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

ACTIVATOR - АКТИВАТОР — вещество, действие которого проявляется в возрастании скорости ферментативной реакции; различают неконкурентную ($\alpha = 1$, $P > 1$), синергистическую ($\alpha < 1$, $p = 1$) и смешанные ($\alpha \neq 1$, $p \neq 1$) типы активирования

ACTIVE CENTER - АКТИВНЫЙ ЦЕНТР — участок, расположенный на поверхности белковой глобулы, образованный из разных аминокислотных остатков, собранных из различных участков полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; аминокислотные остатки имеют определенное пространственное расположение в активном центре, что обеспечивает специфичность (избирательность) механизма действия фермента

AEROBEE - АЭРОБЫ — организмы, использующие в качестве акцептора электронов молекулярный кислород; к аэробам относятся все животные и растения, а также многие микроорганизмы

AEROBIC CONDITIONS - АЭРОБНЫЕ УСЛОВИЯ — условия жизнедеятельности организмов и протекания биохимических реакций в присутствии кислорода, использующие его в качестве акцептора электронов

ALTERNATIVE SPLICING - АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ — наблюдается в разных тканях одного и того же РНК-предшественника, приводит к образованию разных РНК, содержащих разные наборы экзонов; в результате а. с. РНК, транскрибируемые с одного гена, будут кодировать белки с разными свойствами; выбор путей сплайсинга РНК-предшественника — это способ регуляции активности генов в разных клетках и тканях организма

ANABOLISM (ANABOLIC PATHWAYS) - АНАБОЛИЗМ (АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) — процессы ферментативного синтеза сложных биологических молекул (углеводов, нуклеиновых кислот, белков, жиров) из простых предшественников, с потреблением свободной энергии, которая поставляется в форме фосфатных связей АТФ

ANTIBODIES - АНТИТЕЛА — вещества гликопротеидной природы, образующиеся в ответ на введение в организм антигена и обладающие способностью к специфической реакции с антигеном

ANTICODON - АНТИКОДОН — триплет, содержащийся в составе молекулы тРНК, комплементарный какому-нибудь кодону и-РНК

ANTI-COMPETITIVE INHIBITION TYPE - АНТИКОНКУРЕНТНЫЙ ТИП ИНГИБИРОВАНИЯ — этот тип ингибирования проявляется при связывании ингибитора только с фермент-субстратным комплексом; при связывании в активном центре фермента ингибитора замедляется каталитический процесс

ANTIGENS - АНТИГЕНЫ — вещества, несущие признаки генетической чужеродности и индуцирующие синтез антител

ANTIOXIDANT ACTIVITY - АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ — активность, проявляемая действием антиоксидантов в живых организмах, подавляющих протекание процессов свободнорадикального окисления; эффект действия антиоксидантов часто используется в производстве пищевых продуктов; так, например, антиоксиданты (дигидрокверцетин, кверцетин, аскорбиновая кислота и др.) используются в качестве пищевых добавок или входят в состав уже готовых пищевых продуктов; молока, масла, сливок, сметаны, сыров и др

ANTIOXIDANT SYSTEM - АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА — это комплекс соединений, способных подавлять протекание свободнорадикальных реакций в биогенных системах; к этой группе относятся биогенные молекулы, которые по механизму действия можно условно разделить на две группы: 1) высокомолекулярные соединения — ферменты антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.), а также белки, способные связывать ионы железа и меди, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов (альбумин, трансферрин, ферритин и т. д.); 2) низкомолекулярные соединения, к которым относятся стероиды, убихиноны, фосфолипиды, некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевая кислота, глутатион, аскорбат, билирубин, токоферолы и др

ANTIOXIDANTS - АНТИОКСИДАНТЫ — это соединения, действие которых связано с обрывом цепной радикальной реакции, в результате чего образуются гидропероксид субстрата и обладающий низкой реакционной способностью свободный радикал ингибитора; антиоксиданты регулируют процессы свободнорадикального окисления в биогенных системах, создают оптимальные условия для нормального метаболизма и

функционирования клеток и тканей, их основной функцией в растительных и животных клетках является торможение процессов свободнорадикального окисления; эффективность действия антиоксиданта обусловлена предотвращением окисления SH-групп белков, сохранением состава биомембран, биологически активных веществ, информативных молекул и т. д., повреждение которых возникает в результате активации процесса перекисного окисления липидов; возможно проявление совместного действия а.; так, например, антиоксидантный эффект α -токоферола в мембранах усиливается аскорбатом; в присутствии аскорбата α -токоферол может восстанавливать перекись липида до его исходной формы; таким образом, уровень ПОЛ в клетке находится под контролем высокоактивной системы антиоксидантной защиты

ANTIRADICAL ACTIVITY - АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ — проявление реакционной способности соединений подавлять активность свободных радикалов и, в частности, активных форм кислорода

APROFERMENTAM - АПОФЕРМЕНТ — белковая часть холофермента

ASSIMILATION (PLASTIC RESPONSE EXCHANGE) - АССИМИЛЯЦИЯ (РЕАКЦИИ ПЛАСТИЧЕСКОГО ОБМЕНА) — процессы направленного синтеза биогенных молекул в живых организмах, протекающие с затратой энергии (АТФ и другие высоко энергетические молекулы); к процессам а. можно отнести биосинтез белка, гликонеогенез — синтез гликогена, липогенез — синтез жирных кислот и т. д.

BILE ACIDS - ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ — конечные продукты обмена холестерина; относятся к производным холановой кислоты, в составе которых холевая (3,7,12-триоксихолановая), дезоксихолева (3,12-диоксихолановая) и хено дезоксихолева (3,7 – диоксихолановая) кислоты; желчные кислоты могут присутствовать в конъюгированной форме с глицином (гликохолева, гликодезоксихолева, гликохенодезоксихолева кислоты) и таурином (таурохолева, тауредезоксихолева, таурохенодезоксихолева кислоты); основным местом синтеза желчных кислот является печень; при этом только комплекс желчных кислот с ненасыщенными жирными кислотами и моноацилглицеридами может создать смесь для эмульгирования жиров

CARBOHYDRATE - ОЛИГОСАХАРИДЫ—производные углеводов, содержащие от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных О-гликозидной связью; основными о. являются лактоза, сахароза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза

CARBOHYDRATES OXIDATION PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY -ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ —процесс, в котором происходит ступенчатый окислительный распад гексоз до пентоз и других сахаров с более короткой цепью; реакции катализируются глюкозо 6-фосфатдегидрогеназой, 6-фосфоглюконолактоназой, 6-фосфоглюконатдегидрогеназой, фосфопентозоэпимеразой, транскетолазой, трансальдолазой; значение пентозофосфатного пути окисления углеводов состоит в том, что он генерирует в цитоплазме НАДФН, необходимый для синтеза жирных кислот и стероидов; активность пентозофосфатного пути особенно высока в клетках печени, молочной железы, жировой ткани и коре надпочечников; пентозофосфатный путь окисления углеводов поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и нуклеотидов; суммарное уравнение реакций п. п. о. у. имеет следующий вид: $6\text{-Глюкозо 6-фосфат} + 7\text{H}_2\text{O} + 12\text{НАДФ}^+ \rightarrow 5\text{Глюкозо-6-фосфат} + 6\text{CO}_2 + 12\text{НАДФН} + 12\text{H}^+ + \text{Фн}$.

CATABOLISM (КАТАБОЛИЧЕСКИЕ WAY) - КАТАБОЛИЗМ (КАТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) — процессы ферментативного расщепления биологических молекул (углеводов, жиров и белков), сопровождающиеся выделением свободной энергии и накоплением ее в форме энергии фосфатных связей АТФ

CELL MEMBRANE (plasmalemma) - КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА (ПЛАЗМАЛЕММА) — структурное образование, изолирующее внутреннее содержание клетки от окружающей среды; к. м. состоит из упорядоченно расположенных молекул белков, липидов и углеводов; наружный и внутренний слой элементарной мембраны образованы белковыми молекулами, а между ними находятся два липидных слоя; белки располагаются как на поверхности к. м., так и пронизывают ее насквозь, формируя проводные каналы транспортных систем метаболитов клетки; поверхность к. м., обращенная наружу, отличается по химическому составу от внутренней; к. м. обладает избирательной

проницаемостью, регулируя, таким образом движение веществ в клетку и из клетки

СЕР - КЭП — группировка в составе гена и и-РНК, начинающаяся с 7-метилгуанозина; к. необходим для стабилизации и-РНК, предохраняя ее от расщепления 5'-эндонуклеазами

CHLOROPLASTS - ХЛОРОПЛАСТЫ — зеленые пластиды, содержащие пигмент хлорофилл, в которых протекает фотосинтез — процесс синтеза углеводов при участии энергии света; величина хлоропласта 4-6 мкм, овальной формы и зеленого цвета; содержатся в листьях, стеблях, плодах, прицветниках и др.; каждый хлоропласт окружен двойной мембраной и имеет сложную систему внутренних мембран; основная структурная единица хлоропласта — тилакоид, который представляет собой плоский мешочек, ограниченный однослойной мембраной; в мембране тилакоида находится хлорофилл и другие пигменты, а также ферменты, принимающие участие в реакциях фотосинтеза; тилакоиды собраны в стопки — граны; в матриксе хлоропласта содержится собственная ДНК, различные РНК и рибосомы; в каждой клетке около 20-30 х

CLASSIFICATION OF ENZYME - КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — в настоящее время, в соответствии с типом катализируемой реакции, ферменты сгруппированы в 6 классов: 1 класс — оксидоредуктазы; 2 класс — трансферазы; 3 класс — гидролазы; 4 класс — лиазы; 5 класс — изомеразы; 6 класс — лигазы (синтетазы)

CLONING - КЛОНИРОВАНИЕ — процесс получения многочисленных копий чужеродного гена, представляющего гомогенную популяцию молекул ДНК; клонирование ДНК возможно благодаря способности бактериальных плазмид и фагов продолжать нормально функционировать после встраивания в их геном дополнительных последовательностей ДНК

CODON - КОДОН — три последовательно соединенных нуклеотида в и-РНК, кодирующих определенную аминокислоту; генетический код для аминокислот является вырожденным, так как некоторые аминокислоты закодированы 2-6 кодонами; всего имеется 64 кодона, три из которых не кодируют никакой аминокислоты; УАГ, УАА и УГА — обозначают конец матрицы: на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи (терминирующие триплеты)

COFACTOR (COENZYME) - КОФАКТОР (КОФЕРМЕНТ)

— низкомолекулярное соединение небелковой природы, связанное с апобелком нековалентными связями в активном центре и участвующее в каталитическом процессе; в отсутствие кофермента фермент неактивен и каталитическая реакция не протекает; к коферментам относятся: НАД, НАДФ, ФАД, ТПФ и др.; предшественниками некоторых к. являются витамины (V_1 (тиамин) $\rightarrow$ ТПФ (тиаминпирофосфат), V_2 (рибофлавин) $\rightarrow$ ФАД (флавинадениндинуклеотид), V_3 (пантотеновая кислота) $\rightarrow$ SHCoA, V_5 (никотиновая кислота) $\rightarrow$ ФП (фосфопиридоксин), V_{12} (цианкобаламин) $\rightarrow$ МК (метилкобаламин), V_c (фолиевая кислота) $\rightarrow$ ТГФК (тетрагидрофолиевая кислота), Н (биотин) КВ (карбоксибиотин))

COMPETITIVE INHIBITION - КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — тип ингибирования, когда субстрат и ингибитор конкурируют за участок связывания в активном центре фермента, причем связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата и его превращению

COMPETITIVE INHIBITOR - КОНКУРЕНТНЫЙ ИНГИБИТОР — соединение, структура которого сходна со структурой субстрата; к. и. способен связываться в активном центре фермента, занимая место субстрата, препятствуя его связыванию, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции

COMPLEMENTARY DNA-КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ ДНК — специфическое расположение азотистых оснований двух цепочек ДНК, избирательно соединенных между собой водородными связями ($A=T$, $G=C$), обеспечивающее взаимную повторяемость нуклеотидов в цепях ДНК в обратной последовательности

CORE - ЯДРО — органоид, обеспечивающий хранение и передачу генетической (наследственной) информации; основными элементами я.

COVALENT BONDS - КОВАЛЕНТНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная между атомами за счет обобществления их электронов, в электронных оболочках, в общую электронную пару; разная электроотрицательность атомов, участвующих в образовании к. с., приводит к возникновению поляризации этой

связи; прочность ковалентной полярной связи меньше, чем неполярной

DENATURATION OF PROTEINS - ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ — изменение пространственной структуры белков под действием высокой температуры ($50-60^{\circ}\text{C}$) и кислотности среды ($4,0 > \text{pH} > 10,0$), что приводит к нарушению их нативной (природной) конформации; разворачивание глобулы белка делает доступными для воды гидрофобные остатки аминокислот, которые в нативном состоянии формировали преимущественно ядро белка, взаимодействие их радикалов может приводить к образованию крупных ассоциатов денатурированных белков, о чем свидетельствует степень помутнения раствора или образование осадков. При проведении центрифугирования или длительном отстаивании растворов денатурированных белков, в особенности при низких температурах ($0+4^{\circ}\text{C}$), агрегированные полипептидные цепочки белков оседают на дно сосуда

DENATURATION -ДЕНАТУРАЦИЯ —внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле или полинуклеотидных цепочек в ДНК без разрыва ковалентных связей, в результате действия химических или физических факторов (ионы тяжелых металлов, органические растворители, кислоты, щелочи, температура, ионизирующее излучение и др.), приводящих к изменению их физико-химических свойств и к утрате функциональной активности

DENATURE THE ENZYME - ДЕНАТУРАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — Ферменты выполняют роль биологических катализаторов; в каталитическом действии фермента принимают участие аминокислотные остатки, содержащие $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и другие группы, входящие в состав активного центра, протонирование и депротонирование, которых может влиять на его каталитические свойства; поэтому активность ферментов зависит от pH среды, изменение которой может приводить к нарушению нативной структуры апобелка и конформации активного центра, что проявляется в утрате специфических каталитических свойств; аналогично белкам, ферменты при повышении температуры изменяют свою конформацию, теряя способность катализировать превращения различных соединений

DEZOKSIRIBONUKLEINOV AN-acid (DNA)
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК) — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного связывания нуклеотидов в полинуклеотидную цепь, в упорядоченном расположении которых заложена индивидуальная информация о живом организме. ДНК является полинуклеотидом (биополимер), в составе которого азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин и тимин), моносахариды (дезоксирибоза) и остатки фосфорной кислоты; в полинуклеотидной цепи нуклеотиды последовательно связаны между собой за счет фосфодиэфирной связи

DISSIMILATION - ДИССИМИЛЯЦИЯ — (реакции энергетического обмена) процессы направленного распада веществ в клетках живых организмов; при этом накопившаяся в результате распада веществ энергия генерируется в связях высокоэнергетических молекул (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УДФ и др.), используемых в дальнейшем для синтеза пластических веществ; к процессам д. можно отнести гликолиз — распад глюкозы, липогенез — окисление жирных кислот, гликогенез — расщепление гликогена и др

ECOSYSTEM - ЭКОСИСТЕМА—сообщество организмов, обитающих в определенной среде и связанных между собой в единое функциональное целое взаимозависимым круговоротом веществ и энергии

ELECTRIC POINT - ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА — состояние заряженности белка при определенном рН, при котором устанавливается равенство положительных и отрицательных зарядов в молекуле белка; в растворе с определенным рН, которое совпадает с величиной и.э. т. белок в электрическом поле неподвижен

Endoplasmic reticulum - ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕТЬ — (эндоплазматический ретикулум) система разветвленных каналов и цистерн, ограниченных мембранами, пронизывающих гиалоплазму; каналы э. с. заполнены бесструктурной жидкостью — матриксом; различает два типа э. с. гладкая (агранулярная) и шероховатая (гранулярная); на мембранах гладкой э. с. находятся ферменты липидного и углеводного обмена, производящие синтез липидов и углеводов, а на мембранах шероховатой э. с. располагаются рибосомы, обеспечивающие синтез белков; по

каналам э. с. вещества могут транспортироваться из клетки в клетку

ENZYMES -ФЕРМЕНТЫ —(от англ. enzyme) энзимы, белки, обладающие каталитической активностью, способные ускорять протекание химических реакций в живых организмах; от обычных функциональных белков их отличает то, что на поверхности белковой глобулы у них располагается активный центр; это участок, образованный из различных аминокислотных остатков, собранных из различных областей полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; кроме активного центра, у некоторых ферментов имеется еще и регуляторный участок; в этом участке связываются молекулы, оказывающие влияние на связывание и превращение субстрата в ферментативном процессе; при этом сами регуляторы не претерпевают изменений; все биокатализаторы являются белками еще и потому, что через упорядоченный синтез белков, информация о которых заложена в геноме клетки, может осуществляться управление химическими реакциями, протекающими в клетке; активность ферментов зависит от параметров среды (температура, pH, ионная сила, природа растворителя, присутствия мицелл), природы и концентрации (фермента-субстрата, фермент субстратного комплекса), эффекторов (активаторов и ингибиторов), коферментов (для сложных ферментов), природы и расположения функциональных групп в области активного центра

EUKARYOTES - ЭУКАРИОТЫ — (от греч. ей — хорошо и каруон — ядро) организмы, клетки которых имеют клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой; отличительной особенностью э. от прокариот является наличие у них в органоидах (митохондриях и хлоропластах) небольших по размеру молекул ДНК, а также то, что все э. размножаются делением ядра с образованием настоящих хромосом; для большинства э. характерен половой процесс, при котором образуются ядра с уменьшенным вдвое (гомологичный набор) числом хромосом (см. мейоз); в надцарство э. входят разнообразные простейшие (жгутиковые, инфузории, споровики), грибы, животные и растения

EXON-ЭКЗОНЫ—участки в структуре ДНК и преРНК, несущие генетическую информацию о структуре белка и чередующиеся с интронами; в процессе сплайсинга интронные участки вырезаются, а экзоны сшиваются между собой, образуя

функционально активную и-РНК; считывание информации с и-РНК происходит на рибосоме, обеспечивая упорядоченный синтез полинуклеотидной цепочки белка

FLAVINADENIN DINUCLEOTIDE (FAD) - ФЛАВИНАДЕНИН-ДИНУКЛЕОТИД (ФАД) — сложное биологическое соединение, предшественником которого является витамин В₂ (рибофлавин); ФАД выполняет роль донора и акцептора электронов и протонов в окислительно восстановительных реакциях, катализируемых специфичными дегидрогеназами; восстановленной формой ФАД является ФАДН, которая, в основном, генерируется в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса) и в процессе липогенеза; при окислении в митохондриях одной молекулы ФАДН синтезируется две молекулы АТФ

FURAN - ФУРАН — углеводородный цикл из пяти членов, в состав которого входит атом кислорода

GANGLIOSIDE - ГАНГЛИОЗИДЫ — гликолипиды, в состав которых входит сialовая кислота

GENE EXPRESSION -ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ — активирование процессов транскрипции, т. е. биосинтеза преРНК на одной из полинуклеотидных цепочек ДНК и трансляции — биосинтеза белка на мРНК

GENE POOL - ГЕНОФОНД —сумма всех генов данного вида (заклученных в хромосомах), обеспечивающая возможность выживания вида в данных условиях обитания

GENE REPRESSION - РЕПРЕССИЯ ГЕНОВ — ингибирование процесса транскрипции (или трансляции) белком репрессором за счет его специфического связывания с регуляторным участком в структуре ДНК или РНК

GENETIC CODE - ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД —набор триплетов в ДНК и мРНК, представленных тремя последовательно соединенными мононуклеотидами, с помощью которых передается информация о первичной структуре белков, синтезируемых на рибосоме

GENOME -ГЕНОМ —овокупность генов, входящих в состав ДНК

GENOTYPE- ГЕНОТИП — суммарная генетическая информация, содержащаяся в хромосомах, которая получена организмом от предыдущих поколений

GLUTATHIONE (R-SH) - ГЛУТАТИОН (R-SH) — трипептид, в состав которого входят три последовательно соединенных аминокислоты (глутаминовая кислота, цистеин, глицин); г. служит донором водорода в окислительно-восстановительных процессах; в организме животных г. является субстратом глутатиопероксидазы, окисление которого сопровождается образованием окисленной формы (r-S-S-r); количество восстановленного глутатиона может служить критерием жизнеспособности живых организмов

GLYCOPROTEIN PROTEINS- ГЛИКОПРОТЕИНЫ — сложные белки, в состав которых входят углеводы; выполняют г. функции рецепторов мембран, участвующих в процессах биологического распознавания соединений и клеток (гормонов, бактерий и вирусов); ряд гликопротеинов, циркулирующих в кровяном русле человека и животных, являются транспортными белками; каталитическая функция выполняется такими белками, как пероксидаза, холинэстераза, глюкооксидаза, энтерокиназа и др., содержащие углеводы в своем составе; входя в состав межклеточного вещества соединительной ткани, г. выполняют структурно-механическую функцию

GOLGI-LATTICE CELL - АППАРАТ ГОЛЬДЖИ — структурный компонент клетки, представляющие собой стопку плоских мешочков — цистерн диаметром около 1 мкм и толщиной 0,02-0,025 мкм, ограниченных мембраной и расположенных параллельно друг другу; число цистерн в диктиосоме 5-7; диктиосома состоит из формирующего полюса, где возникают новые цистерны, и секретирующего полюса, где цистерна распадается и образуются секретирующие пузырьки — лизосомы, содержащие набор гидролитических ферментов, расщепляющих полисахариды, белки и сложные липиды; новые цистерны образуются на формирующем полюсе из элементов эндоплазматической сети; в животных тканях а. г. выполняет секреторную функцию, а в растительных клетках служит центром синтеза, накопления и секреции полисахаридов, которые затем соединяются с белками, формируя гликопротеиды эндоплазматической сети; в целом функция а. г. заключается во временном хранении и активной переработке продуктов жизнедеятельности клетки

HELICASE - ХЕЛИКАЗЫ — ферменты, расплетающие двойную спираль ДНК и удерживающие ее одиночные цепи от воссоединения

HISTONES-ГИСТОНЫ — небольшие щелочные белки (12-30 кДа), преимущественно расположенные в ядре животных и растений и играющие важную роль в структуре хроматина

HOLOENZYME-ХОЛОФЕРМЕНТ — активная форма фермента, состоящая из кофермента и белка (белковой части фермента)

HORMONES - ГОРМОНЫ — группа биологически активных веществ, синтез которых осуществляется в специализированных эндокринных железах или в тканях. По строению г. можно разделить на пять групп: производные аминокислот и ненасыщенных жирных кислот, пептиды, белки, стероиды; механизм действия г. проявляется через мембранные, внутриклеточные и внутриядерные рецепторные системы; при совместном действии гормонов возможен синергизм (когда действие одного г. усиливается другим гормоном), антагонизм (действие двух гормонов противоположно) или многоступенчатость (действие гормона провоцирует последовательное проявление действия нескольких систем); высокие концентрации г. способны регулировать нормальную деятельность организма, привести к возникновению заболевания

HYDROGEN BOND - ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная атомом водорода, находящегося между двумя атомами электроотрицательных элементов; в образовании водородной связи участвуют такие электроотрицательные атомы, как кислород, азот, фтор, хлор; энергия водородной связи сравнительно мала (около 40 кДж/моль)

HYDROLASES - ГИДРОЛАЗЫ — класс ферментов, катализирующих расщепление связей с участием молекулы воды в качестве нуклеофила

HYDROPHILIC -ГИДРОФИЛЬНОСТЬ — (гр. гидро — вода, филео — люблю, букв. любящий воду) свойства веществ, материалов интенсивно взаимодействовать с водой, хорошо растворяться в воде

HYDROPHOBIC INTERACTIONS - ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ — тип связей, устанавливаемый при взаимодействии между неполярными группами; г. в. относятся к

слабым связям; в белках. г. в. формируются между неполярными группами аминокислотных остатков, которые чаще всего локализируются внутри белковой глобулы, избегая контакта с молекулами воды

HYDROPHOBICITY - ГИДРОФОБНОСТЬ — (гр. гидро — вода, фобос — страх, боязнь, букв. боящийся воды) свойства веществ, материалов слабо взаимодействовать с водой, плохо растворяться в воде

ПЕ - ЖЕЛЧЬ — жидкость, компонентами которой являются желчные кислоты, жирные кислоты, триацилглицериды, фосфолипиды (фосфатидилхолин), билирубин и холестерин; кроме этого, в ж. определяется активность некоторых ферментов (щелочная фосфатаза, амилаза, каталаза, протеазы и оксидазы); в ж. содержатся белки, аминокислоты, углеводы и микроэлементы (железо, магний, медь, цинк, марганец); желчь способна выполнять следующие основные функции; 1) участие в эмульгировании липидов; 2) транспорт липидов по желудочно-кишечному тракту; 3) участие в механизмах всасывания липидов в ЖКТ; 4) нейтрализация соляной кислоты и повышение величины pH в тонком отделе кишечника; 5) активизация липаз, катализирующих гидролиз триацилглицеридов, фосфолипидов и стероидов

IMMUNITY - ИММУНИТЕТ — (от лат. immunitas — освобождение, избавление от чего либо) защитная реакция организма, выражающаяся в невосприимчивости организма к инфекционным агентам и чужеродным веществам; различают естественный или врожденный и. — наследуемый организмом от родителей и искусственный или приобретенный и. — вырабатываемый у человека после перенесенного инфекционного заболевания

INHIBITION - ИНГИБИРОВАНИЕ — процесс, при котором ферментативная реакция в присутствии ингибитора замедляется или полностью останавливается, в зависимости от природы ингибитора и обусловленного им типа ингибирования

INHIBITOR - ИНГИБИТОР — вещество, замедляющее или полностью останавливающее скорость ферментативной реакции, по той или иной причине частично или полностью препятствующее образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса; ингибиторами могут быть лекарственные препараты, яды и другие вещества

INTRON (BOX) - ИНТРОН (ВСТАВКА) — участок в первичной последовательности ДНК и транскрибируемый в структуру пре-РНК, информативность которого пока не установлена, вырезаемый ферментами в процессе сплайсинга из пре-РНК

ISOENZYMES (ISOZYMES) - ИЗОФЕРМЕНТЫ (ИЗОЭНЗИМЫ) — группа ферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию у одного биологического вида, но отличающихся между собой по структуре и ряду физико-химических свойств (электрофоретическая подвижность, растворимость, каталитические константы) вследствие генетически обусловленных небольших различий в первичной структуре, которые проявляются при формировании нативной структуры ферментов

IZOMERAZY-ИЗОМЕРАЗЫ — класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные превращения (рацемизация или эпимеризация); в названии фермента присутствует термин «рацемаза» (аланинрацемаза, метионинрацемаза, гидроксипролинрацемаза, лактатрацемаза и др.), «эпиме-раза» (альдоза-1-эпимераза, рибулозофосфат -4-эпимераза, UDP-глюкуронат -4-эпимераза и др.), «изомераза» (рибозофосфат-изомераза, ксилозофосфат-изомераза, глюкозаминфосфат-изомераза и др.), «таутомераза» (фенилпируваттаутомераза, оксалоацетаттаутомераза), «мутаза*» (фосфоглицератмутаза, метиласпаратмутаза и др.); и. подразделяются на 5 подклассов

LIGASE (SYNTHETASE) - ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ) — класс ферментов, катализирующих реакции соединения двух и более молекул, используя АТФ; в названии фермента присутствует термин «синтетаза» (тирозил-тРНК-синтетаза, треонин-тРНК-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза, аспарагинсинтетаза, карбамоилфосфат-синтетаза, аргениносукцинатсинтетаза и др.), «карбоксилаза» (пируват- карбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза, пропионил-КоА-карбоксилаза и др.); л. подразделяются на 5 подклассов

LIPID PEROXIDATION - ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — процесс окисления ненасыщенных жирных кислот продуктами свободнорадикального окисления; активно протекает в микросомальных системах печени и других тканях; генерация супероксидного радикала может происходить в результате

активности НАДФН-цитохром b5-редуктазы, митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы, а также фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксид радикала; процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный или гидроксильный радикалы; это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т. д.; образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы, а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием свободного радикала и накоплением гидроперекисей липидов (ROOH)

LIPOPROTEINS - ЛИПОПРОТЕИНЫ — сложные липопротеидные комплексы, в составе которых белки (альбумин) и липиды (нейтральные липиды, фосфолипиды, холестерин и его эфиры и др.); различают несколько классов л.: л. высокой плотности (ЛПВП), л. низкой плотности (ЛПНП), л. очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны (ХМ)

LIZOSOMY - ЛИЗОСОМЫ — (от греч. lysis — растворение, разложение и soma — тело) органоиды, выполняющие лизирующуюся, т. е. разрушающую, функцию; размеры л. колеблются от 0,2 до 0,5 мкм; в л. содержится набор гидролитических ферментов, гидролизующих белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и др. органические соединения при внутриклеточном пищеварении; л. обеспечивают постоянство состава веществ в клетке; участвуют в защите организма против вирусов, бактерий, инородных тел, а также удаляют отжившие клетки и их части; таким образом, л. выполняют в клетке пищеварительную, защитную и выделительную функции

LYASE - ЛИАЗЫ — это класс ферментов, катализирующих реакции разрыва C-C, C-O, C-N и других связей в субстрате без присоединения молекулы воды или окисления; л. отличаются от других ферментов тем, что в катализируемых реакциях в одном направлении участвуют два субстрата, а в обратной реакции только один; в названии фермента присутствуют термины «декарбоксилаза» или «альдолаза» или «лиаза» (пируватдекарбоксилаза,

оксалацетатдекарбоксиаза, оксалоацетатдекарбоксилаза, треонинальдолаза, фенилсеринальдолаза, изоцитратлиаза, аланинлиаза, АТФ-цитратлиаза и др.), а для ферментов, катализирующих реакции отщепления воды от субстрата — «дегидротаза» (карбонатдегидротаза, цитрат-дегидротаза, сериндегидротаза и др.); в тех случаях, когда обнаружена только обратная реакция, или это направление в реакции более существенно, в названии ферментов присутствует термин «синтаза» (малатсинтаза, 2-изопропилмалатсинтаза, цитрат синтаза, гидроксиметилглутарил CoA-синтаза и др.); л. подразделяются на 6 подклассов

MATRIX (INFORMATION) -МАТРИЧНАЯ (ИНФОРМАЦИОННАЯ) РНК — синтезируется в процессе транскрипции и содержит точную копию генетической информации, закодированной в определенном участке ДНК; информация об аминокислотах, которые будут включены в первичную структуру полипептидной цепи, передается с помощью кодонов (триплетов) в составе и-РНК

METABOLIC PROCESS- МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС — совокупность ферментативных реакций, катализирующих последовательное превращение биогенного соединения; регулируемые конечными продуктами по типу обратной связи; к основным м. п. относятся следующие: гликолиз, гликогенолиз, гликонеогенез, гликогенез, пируватдегидро-геназный комплекс (ПДК), цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный путь превращения углеводов (ПФП), липолиз, липогенез, синтез холестерина, синтез и распад триацилглицеридов и фосфолипидов, синтез и распад пуринов и пиримидинов, орнитинный цикл, перекисное окисление липидов, фолдинг, протеолиз, апоптоз, биосинтез ДНК, РНК и белка и др.

METABOLISM (METABOLISM) - МЕТАБОЛИЗМ (ОБМЕН ВЕЩЕСТВ) — совокупность биохимических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его жизнеспособность.

METABOLITES - МЕТАБОЛИТЫ — промежуточные продукты ферментативных реакций, протекающих в клетке

MICHAELIS CONSTANT (KM) - КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА (Km) — константа, по величине которой можно определить сродство субстрата к ферменту, а также возможность

образования фермент субстратного комплекса при протекании каталитического процесса в условиях стационара; кроме этого, K_m определяется как величина численно равная концентрации субстрата при скорости ферментативной реакции, составляющей половину максимальной (при $V_m/2$ Кт « Кя).

MITOCHONDRIA - МИТОХОНДРИИ — (от греч. mitos — нить, chon- drion — зерно, гранула) органеллы, выполняющие энергетические функции в клетке; диаметр м. около 0,1-0,5 мкм, длина — от 1 до 10 мкм; м. состоят из двух мембран (наружной и внутренней) и внутреннего пространства (матрикса); наружная мембрана м. регулирует поступление и выделение веществ; внутренняя мембрана м. образует к центру складки — кристы (ткани животных) и извилистые трубки в клетках растений, увеличивающих рабочую поверхность, на которой расположены ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции; в матриксе м. находятся ферменты цикла трикарбоновых кислот и ферменты, окисляющие липиды (жирные кислоты); основной функцией м. является синтез АТФ; в матриксе м. находятся рибосомы и молекулы митохондриальной ДНК

MITOCHONDRIA - НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ — кислоты, синтезирующиеся только в растениях и микроорганизмах и не образующиеся в организме животных и человека; к н. а. относятся лизин, аргинин, гистидин, валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан

NONCOMPETITIVE ACTIVATION - НЕКОНКУРЕНТНАЯ АКТИВАЦИЯ — проявляется в случае, если субстрат и активатор связываются независимо в различных участках активного центра фермента; при этом образуется тройной комплекс, фермент субстрат-активатор; связывание активатора ускоряет протекание каталитического процесса

NONCOMPETITIVE INHIBITION - НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — этот тип ингибирования проявляется в том случае, когда ингибитор и субстрат связываются в разных участках активного центра фермента; однако при связывании ингибитора образуется фермент субстратный комплекс, превращение в котором субстрата становится невозможным

NUCLEIC ACIDS (RNA and DNA) - НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (РНК И ДНК) — биополимер, в состав которого входят пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин,

гуанин, цитозин, урацил, тимин), а также моносахариды пентоз (рибоза или дезоксирибоза), связанные между собой остатками фосфорной кислоты

NUCLEOSIDES - НУКЛЕОЗИДЫ — соединения, в которых азотистые основания (пурины и пиримидины) связаны N-гликозидной связью с рибозой или дезоксирибозой (аденозин, гуанозин, тимидин, уридин, цитидин)

NUCLEOTIDES - НУКЛЕОТИДЫ — фосфорные эфиры нуклеозидов; например, адениловая (АМФ), гуаниловая (ГМФ), цитидиловая (ЦМФ), уридиловая (УМФ), тимидиловая (ТМФ) кислоты, называемые также как аденозин 5'-фосфат, гуанозин 5'-фосфат, цитидин 5'-фосфат, уридин-5'-фосфат, тимидин 5'-фосфат

OPERATOR - ОПЕРАТОР — регуляторный участок ДНК, служащий местом связывания репрессоров — белков, контролирующих синтез преРНК

OPERON (TRANSCRIPTON) - ОПЕРОН (ТРАНСКРИПТОН) — участок в структуре гена, являющийся элементарной единицей транскрипции, ограниченный промотором и терминатором, участвующий в процессе биосинтеза молекулы преРНК у прокариот и эукариот; в структуре оперона различают два участка: информативный и неинформативный

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION - ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ — процесс образования АТФ (процесс фосфорилирования АДФ), сопряженного с транспортом электронов по цепи переносчиков от НАДН или ФАДН к O_2 (процесс окисления); о. ф. катализируется четырьмя ферментативными комплексами, расположенными на внутренней мембране митохондрий: комплекс I — НАДН; убихинон-оксидоредуктаза (ФМН, FeS), комплекс II — сукцинат; убихинон-оксидоредуктаза (ФАД, FeS), комплекс III — убихинон; феррицитохром с-оксидоредуктаза, комплекс IV — ферроцитохром с-кислородоксидоредуктаза; цитохромы располагаются в порядке возрастания окислительно-восстановительного потенциала; терминальный цитохром a_3 (цитохромоксидаза) осуществляет конечную стадию процесса — перенос восстановительных эквивалентов на молекулярный кислород; в результате окисления одной молекулы НАДН синтезируется 3 молекулы АТФ, а одной молекулы ФАДН — 2 молекулы АТФ

OXIDOREDUCTASE - ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ — класс ферментов, катализирующих реакции окисления и восстановления; оксидоредуктазы подразделяются на 17 подклассов; субстраты оксидоредуктаз являются донорами атомов водорода и электронов и поэтому ферменты этого класса называются дегидрогеназами или редуктазами (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глиоксилатредуктаза, гидроксипируватредуктаза и др.); коферментами оксидоредуктаз могут быть НАД, НАДФ, ФАД, ФМН; к классу оксидоредуктаз принадлежат и оксидазы, в реакциях которых участвует кислород (альдегидоксидаза, ксантинооксидаза, пируватоксидаза, оксалатоксидаза, оксидаза L-аминокислот, аминоксидазы и др.); представителями оксидоредуктаз в молоке являются ферменты пероксидаза, каталаза

OXYHEMOGLOBIN - ОКСИГЕМОГЛОБИН — гемоглобин, в котором атомы железа каждого из гемов обратимо связаны с молекулой кислорода (HbO_2)

PEPTIDE BOND - ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ — ковалентная полярная связь, образованная между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, при соединении двух аминокислот между собой; пептидная связь относится к ковалентной полярной связи, обеспечивает стабильность первичной структуры белков ($-\text{NH}-\text{CO}-$)

PEROXIDASE (EC 1.11.1.7) - ПЕРОКСИДАЗА (КФ 1.11.1.7) — самый распространенный фермент растительных и животных тканей; п. относится к группе двухкомпонентных ферментов (железогликопротеин), в составе которых гемин (протопорфирин IX в комплексе с трехвалентным железом), и полипептидная цепь; п. катализирует реакции оксидазного, оксигеназного и пероксидазного окисления субстратов; в реакциях пероксидазного окисления субстратами фермента могут быть функционально активные вещества (НАДН, гидрохинон, аскорбиновая кислота, о-дианизидин, аминокислоты, флавоноиды, фенолтиазины и др.); оксидазными субстратами п. являются (ИУК, диоксифумаровая кислота, аскорбиновая кислота и др.); основными функциями углеводов, входящих в состав пероксидазы, являются: а) защищать фермент от инактивирующего действия свободных радикалов, образующихся при протекании оксидазных и пероксидазных реакций; б) обеспечивать растворимость фермента в полярных

растворителях; в) обуславливать взаимодействие фермента с мембранами и за счет этого встраивать фермент в определенные участки мембран органелл и клетки; г) защищать фермент от инактивирующего действия высоких температур и растворителей

PLASMID - ПЛАЗМИДЫ — добавочные маленькие кольцевые молекулы ДНК, присутствие которых необязательно для жизни клетки; п., содержащиеся в цитоплазме многих бактерий, способны автономно размножаться, стабильно наследоваться, т. е. сохраняться без специфической селекции во внехромосомном состоянии; кроме бактерий п. иногда содержат синезеленые водоросли, а из эукариотических организмов — дрожжи

POLYSACCHARIDES - ПОЛИСАХАРИДЫ — высокомолекулярные полимерные производные углеводов, образованные из последовательносоединенных моносахаридов, связанных между собой о-гликозидной связью; основными представителями п. являются крахмал, гликоген, целлюлоза, клетчатка, хитин, агар-агар

POSON RETROTRANS - РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ — участки клеточного генома, в которых закодированы обратные транскриптазы

PRIMASE-ПРАЙМАЗА — фермент, синтезирующий затравки (праймеры)

PROMOTER - ПРАЙМЕР — небольшой участок ДНК, используемый в качестве затравки при ее синтезе

PROMOTER- ПРОМОТОР — участок ДНК, служащий местом связывания ДНК-зависимой РНК- полимеразы, участвующий в регуляции синтеза пре-РНК

PROSTHETIC GROUPS - ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА — низкомолекулярное соединение небелковой природы, прочно связанное с апобелком, выполняющее активную роль в ферментативном катализе, при отсутствии которой фермент неактивен; к п. г. относятся: гем в пероксидазе и каталазе, изоадлоксазиновое кольцо в флавиновых ферментах, а также липоевая кислота и биотин в составе активных центров дигидролипонацетилтрансферазы и ацетил КоА- карбоксилазы соответственно и др

PROTEIN - БЕЛОК — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного соединения α -L-аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой

пептидной связью (-CO-NH-) согласно генетической информации, хранящейся в гене, и обладающий функционально активной третичной или четвертичной структурой; информация о природе аминокислот, последовательности их связывания в полипептидной цепи и количестве передается по следующей цепи: ДНК→преРНК→мРНК→белок

PROSSESSING - ПРОЦЕССИНГ— (посттранскрипционная модификация) процесс формирования зрелых молекул РНК (тРНК, и-РНК, рРНК) из неактивного предшественника (пре-РНК) в эукариотической клетке; в результате п. происходят следующие действия: отрезание «лишних» концевых последовательностей; расщепление длинных первичных транскриптов, вырезание из них участков, транскрибированных с интронов; добавление нуклеозидов к 3'-концу транскрипта; добавление нуклеотидов к 5'-концу транскрипта; модификация оснований в транскрипте; при этом конечным этапом п. является метилирование мРНК, в результате которого на каждые 400 остатков аденинов приходится один остаток 6-метиладенина; п. завершается тем, что функционально активная мРНК в виде нуклеопротеидного комплекса, в составе которого набор белков-информоферов, покидает ядро клетки через поры в ядерной мембране, поступая в цитоплазму для трансляции

RECOMBINANT DNA - РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК— измененные, химерные молекулы ДНК, составленные из фрагментов разного происхождения или с введенными в структуру нативной ДНК чужеродных последовательностей или новых генов; например, так изготавливается из рекомбинантных дрожжевых культур вакцина против гепатита В; модификации подвергается ДНК дрожжей, в состав которой вводится участок гена вируса гепатита В, кодирующий антиген (HBsAg или австралийский антиген); полученная в результате биосинтеза рекомбинантная неинфекционная вирусная вакцина содержит поверхностный антиген вируса гепатита В, продуцируемый дрожжевыми клетками; вакцина относится к адв-подтипу; антиген собирается и очищается от ферментативных культур рекомбинантного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих ген, кодируемый адв подтип HbsAg; затем белок HBsAg высвобождается из дрожжевых клеток путем их разрушения и очистки с помощью различных физических и химических методов; очищенная таким методом вакцина не

содержит определяемых количеств дрожжевой ДНК и содержит менее 1% дрожжевого белка; защитный эффект вакцины, производимой по описанному методу, у шимпанзе и человека сопоставим с таковым вакцины, полученной из плазмы крови

REPARATIONS - РЕПАРАЦИЯ — процесс восстановления поврежденных участков ДНК

REPLICATION-РЕПЛИКАЦИЯ — процесс синтеза ДНК путем ее удвоения: синтез одной дочерней цепи происходит в направлении от 5' 3' осуществляется непрерывно, в то время как синтез второй цепи в направлении от 3' 5' происходит прерывисто путем соединения коротких фрагментов, называемых фрагментами Оказаки, синтезируемых в противоположном направлении

RIBOSOME - РИБОСОМЫ — органеллы клетки размером 15-35 нм, синтезирующие белки из аминокислот, последовательно соединяя их согласно информации, содержащейся в ДНК; располагаются свободно в цитоплазме или фиксированы на эндоплазматической сети; имеются и в составе ядра клетки; р. состоят из двух субъединиц (малой и большой), образующих функционально активную димерную форму только при наличии мРНК; несколько объединенных рибосом формируют цепочки — полисомы или полирибосомы; рРНК обеспечивает контрольную функцию при считывании информации с мРНК, а тРНК, осуществляет распознавание, специфичное связывание и транспортировку аминокислот к месту синтеза полипептидной цепочки на рибосоме; для каждой из 20 аминокислот имеется своя тРНК, в структуре которой имеется антикодон; распознавая соответствующий у мРНК кодон, тРНК способна связаться с рибосомой, а затем обеспечить присоединение аминокислоты к растущей полипептидной цепочке

SATELLITE DNA - САТЕЛЛИТНАЯ ДНК — (от лат. satellitis — спутник, сопровождающий) ДНК эукариот, содержащая многократно повторяющиеся последовательности нуклеотидов

SECONDARY STRUCTURE OF DNA -ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — комплементарное расположение двух полинуклеотидных цепей, связанных между собой водородными связями молекул пуриновых и пиримидиновых оснований; пары (А=Т и Т=А) образуют по две водородные связи, а пары (Г=Ц и Ц=Г) — три водородные связи

SECONDARY STRUCTURE OF PROTEIN - ВТОРИЧНАЯ

SITE -САЙТ —короткая последовательность нуклеотидов в составе ДНК, РНК или аминокислот в белке

SPEISER-СПЕЙСЕР - (от англ. spacer — промежуток) участок ДНК, отделяющий один ген от другого; с. не кодирует белки

SPHINGOLIPIDS - СФИНГОЛИПИДЫ — сложные эфиры, составными частями которых являются ненасыщенный аминспирт сфингозин или дигидросфингозин, жирные кислоты, фосфат и полярная группировка, в составе холина или этаноламина, или серина и др

SPLICE - СПЛАЙСИНГ —конечный процесс формирования функционально активной и-РНК из пре-РНК путем вырезания из первичного транскрипта интронных (вставочных) участков, с последующим соединением между собой экзонов

SPLICEOSOME - СПЛАЙСОСОМА —специализированная внутриядерная многокомпонентная структура, включающая десятки белков и набор малых ядерных РНК, предназначенных для осуществления сплайсинга

STERIDY - СТЕРИДЫ —эфиры стерина и высших жирных кислот

STEROIDS - СТЕРОИДЫ —группа функционально активных соединений, основным компонентом которых является пергидрофенантрениклопентан; к стероидам относятся соединения животных тканей: холестерин, половые гормоны, кортикостероиды, желчные кислоты, витамины, а также вещества, синтезируемые растениями: сердечные гликозиды, алкалоиды, регуляторы роста растений; стероидные гормоны переносятся в крови с помощью специализированных белков-переносчиков: транскортина (кортикостероиды), тестостеронсвязывающего глобулина (тестостерон и эстрадиол) и транспортных белков (прогестерон и кальцитриол); после распознавания клетки-мишени гормон проникает внутрь клетки, связываясь с цитоплазматическим рецептором и в составе гормон- рецепторного комплекса переносится в ядро клетки; где связывается с промоторным участком ДНК, оказывает стимулирующее действие на процесс транскрипции; при этом увеличивается количество мРНК, которые стимулируют процесс трансляции различных функциональных белков; клетка содержит до 10⁴ рецепторов, с молекулярной массой 40-100 кДа

STEROLS - СТЕРИНЫ —стероиды, имеющие от 8 до 10 углеродных атомов в боковой цепи у C-17 и свободную гидроксильную группу в положении 3; основным представителем с. является холестерин

STRUCTURAL GENES - СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ —гены, несущие информацию о структуре специфических белков

SUBSTRATE - СУБСТРАТ — вещество, которое претерпевает химические изменения в процессе химической реакции, катализируемой ферментом; например, глюкоза является субстратом фермента гексокиназы, пируват — пируват декарбоксилазы, молочная кислота—лактатдегидрогеназы и т. д

SYMPTOM - ПРИЗНАК —совокупность показателей живого организма, проявляющих его индивидуальные свойства и особенности строения

TELOMERASE - ТЕЛОМЕРАЗА —(РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза) фермент, синтезирующий tandemно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК

TELOMERES - ТЕЛОМЕРЫ —специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящей из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей; т. построены из дезоксинуклеопротеидов (комплексов ДНК с белком)

THE PRIMARY STRUCTURE OF A DNA - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — структура, образованная за счет последовательного соединения мононуклеотидов в полинуклеотидную цепь, связанных между собой сложноэфирной связью, образованной фосфатными остатками (3',5'-фосфодиэфирная связь) одного мононуклеотида

The primary structure of the protein molecule - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ —последовательное соединение α -L- аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, заложенной в ДНК

THE SIGNAL SEQUENCE OF AMINO ACID RESIDUES - СИГНАЛЬНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ —обеспечивают направленную доставку вновь синтезированных белков к внутриклеточным органеллам и микрокомпартментам; они

оказывают влияние на характер фолдинга, посттрансляционные модификации и метаболическую стабильность; существуют пять биохимических процессов с участием вновь синтезируемых белков, контролируемых сигнальными последовательностями аминокислотных остатков: транслокация белка через плоскость мембраны; внутриклеточный перенос белка без пересечения плоскости мембраны; химические модификации белка без гидролиза пептидных связей; расщепление некоторых пептидных связей в белке; конформационные и иные пространственные изменения белков, включая фолдинг и олигомеризацию полипептидных цепей

THE TERTIARY STRUCTURE OF DNA-ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — определенное пространственное расположение двух полинуклеотидных цепей ДНК, комплементарно связанных между собой за счет водородных связей, приобретающих устойчивую структуру, стабилизированную нековалентными связями с белками (гистонами)

THE TERTIARY STRUCTURE OF PROTEINS - ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА — определенное расположение полипептидной цепи в пространстве, стабилизированное, в основном, за счет слабых (гидрофобных, гидрофильных и ионных), а также несколькими ковалентными дисульфидными (-S-S-) связями

TRANSCRIPTION - ТРАНСКРИПЦИЯ — (от англ. transcription — переписывание) процесс синтеза пре-РНК, путем переписывания информации с ДНК; т. осуществляется с помощью различных РНК-полимераз; в эукариотической клетке присутствует четыре вида РНК-полимераз: РНК-полимеразы I, II, III — располагаются в ядре клетки и одна — в митохондриях; РНК-полимеразы I отвечает за синтез рибосомных 18S, 28S и 5,8S РНК; рибосомальная 5S-РНК и транспортные РНК синтезируются РНК-полимеразой III, а РНК-полимераза II осуществляет синтез предшественников мРНК; в структуре ДНК выявляются особые регуляторные элементы, названные энхансерами, в присутствии которых резко возрастает скорость транскрипции; при этом энхансеры проявляют активность независимо от ориентации и положения относительно гена, т. е. они могут быть перед геном, внутри или за ним; индукция генов может осуществляться с

помощью гормона (стероида), который в составе комплекса с белком-рецептором способен связываться с регуляторной последовательностью ДНК, что сопровождается активированием процесса транскрипции

TRANSFER RNA (TRNA) SEQUENCE -ТРАНСПОРТНАЯ РНК (тРНК) —небольшие последовательности (75-90) мононуклеотидов, содержащие антикодон из 3-х мононуклеотидов, комплементарный кодону для аминокислоты в информационной РНК, расположенный в тРНК в месте локализации антикодоновой петли, недалеко от вариабельной петли; функция тРНК состоит в том, чтобы транспортировать аминокислоты к рибосоме и вставлять их в определенные участки полипептидной цепи при ее биосинтезе (процесс трансляции), переводя последовательность нуклеотидов в кодоне и-РНК в последовательность аминокислотных остатков первичной структуры белка

TRANSFERASE – ТРАНСФЕРАЗЫ - класс ферментов, катализирующих реакции переноса различных групп (метильные, гидроксиметильные, формильные, карбоксильные, карбамоильные, альдегидные, ацильные, алкильные, аминные и др.) от одного субстрата (донор) к другому (акцептор); в реакциях, катализируемых трансферазами, принимают участие пиридоксальфосфат, биотин, тиаминпирофосфат, 2-аминоаденозин, SH-KoA; название фермента формируется по принципу: акцептор группа трансфераза или донор-группа трансфераза (метионин-метилтрансфераза, тиолметил-трансфераза, серингидрокси- метил-трансфераза, глутамат-формил-трансфераза, холинацил- трансфераза, транскетолаза, трансальдолаза и др.); к этому классу принадлежат ферменты, переносящие гликозильные группы (фосфорилаза, амилосахараза, декстрансахараза и др.); трансферазы представлены 8 подклассами

TRANSPOSONS (TP-ELEMENTS) - ТРАНСПОЗОНЫ (ТП-ЭЛЕМЕНТЫ) — сегменты ДНК, содержащие гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции; т. могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма

TRANSPOSONS -ТРАНСЛЯЦИЯ — (от англ. translation — перевод) процесс перевода информации, заложенной в последовательности нуклеотидов и-РНК, в последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи; процесс т.

протекает в цитоплазме клетки на рибосомах; на включение в белок каждой аминокислоты расходуется энергия четырех высокоэнергетических связей (одной молекулы АТФ на стадии синтеза аминоацил-тРНК и трех молекул ГТФ — на стадиях связывания аминоацил-тРНК и трансляции)

TRIACYLGLYCEROLS - ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ — (нейтральные липиды) сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот

VECTOR - ВЕКТОР — молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечивать ее встраивание в ДНК клетки; ими могут быть бактериофаги или плазмиды

VITAMINS - ВИТАМИНЫ — группа биологически активных веществ, синтез которых преимущественно происходит в бактериях и растениях, являющихся предшественниками кофакторов или простетических групп; недостаток витаминов вызывает у животных и человека развитие симптомов гипо- и авитаминозов, а их избыток — гипервитаминозы; в. условно можно разделить на растворимые в полярных (водорастворимые: В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₇, В₈, В₁₂, В₁₃, В₁₅, В₁₆, С, Р, РР, Н, U, N, Q) и неполярных (жирорастворимые: А, D, E, К, F) растворителях; в составе ко- ферментов НАД, НАДФ присутствуют остатки витаминов В₃ (никотинамид) и РР (никотиновая кислота); ФМН и ФАД — В₂ (рибофлавин), HSKoA — В₃ (пантотеновая кислота), тиаминпирофосфата — В (тиамин), цинридоксальфосфата — В₆ (пиридоксин); в составе активных центров ферментов содержатся в качестве простетических групп витамины: липоевая кислота у липоатацетилтрансферазы, витамин Н (биотин) у пируват ацетил КоА-карбоксилаз, витамин К (филлохинон) у филлохинонредуктазы и менадионредуктазы, фолиевая кислота у трансаминаз, В₁₂ (кобаламин) у метилтрансфераз; кроме этого в составе белка родопсина присутствует витамин А (ретинол), участвующий в процессе фоторецепции; антиоксидантные свойства проявляют витамины: Е (токоферолы), Р (биофлавоноиды) и С (аскорбиновая кислота); в переносе ионов кальция участвует витамин D

В п. п. о. у. АТФ не синтезируется и не расходуется

СТРУКТУРА БЕЛКА — упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи,

закрученных в форму α -спирали или образующих складчатые слои (β -структура), стабилизированных за счет водородных связей

являются ДНК, РНК и белки, комплекс которых обеспечивает протекание в ядре основных трансформационных процессов; в я. протекают процессы, обеспечивающие удвоение ДНК — репликация и процессы передачи генетической информации с ДНК $\rightarrow$ преРНК $\rightarrow$ и-РНК — транскрипция и процессинг

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Агол В.И. и др. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот/Под ред. А.С.Спирина. М.: Высшая школа, 1990 г., 352 с.
2. Алексеев, В.Н. Количественный анализ// Под ред. П.К. Агасяна. - Изд. 4-е, перераб. - М.: Химия, 1972. - 504 с.
3. Альберте Б. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альберте, Д. Брей, К. Хопкин и др. пер. с англ.- 2-е изд., М.: Лаборатория знаний, 2018 г. -768 с.
4. Берёзов Т.Т. Биологическая химия: Учебник / Т.Т. Берёзов, Б.Ф. Коровкин. - М.: Медицина, 1982.- 1-е издание; 1998.- 2-е издание; 2002.- 3-е издание (704 с.).
5. Бухарина И.Л., Любимова О.В. Биохимия растений// учебно-метод.пособие, Ижевск: ФГОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2009 г., 50 с.
6. Великов В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Саратов 2013.
7. Генетическая инженерия / Под ред. А. А. Баева. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. Т. 12, ч. 1-2. — М., 1979. -80 с.
8. Зелди И.П. Методы экспериментальной биологии: Учеб. пособие / И.П. Зелди, А.В. Смирнов, Л.Б. Киселева, В.Н. Самарцев / Под ред. И.П. Зелди.- Йошкар-Ола: МарГУ, 2002.- 152 с.
9. Исследование белков и нуклеиновых кислот: Учебное пособие//З.И. Абрамова. - Казань: Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, 2006. 157 с.
10. Каюмов А.Р., Гимадудинов О.А. Практикум по молекулярной генетике. Учебно-методическое пособие. Казань КФУ 2016.
11. Кольман Я. Рем К.Г. Наглядная биохимия. Москва. Лаборатория знаний. 2019.
12. Коничев А.С. Молекулярная биология /А.С. Коничев, Г.А. Севастьянова. 4-е изд.,-М.: Академия, 2012 г., 400 с.- (серия бакалавриат).
13. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология//2-е изд.,-Москва, изд. Центр Академия, 2005 г., 400 с.
14. Куликов Е., Пташник О. Биологических методов в картинках // Биомолекула, М. 2019.

15. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. - М.: Мир, 1985. - 368 с.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
17. Методическое пособие к малому практикуму по биохимии. 6-е изд., перераб. и доп./Сост. С.А. Коннова, А.А. Галицкая, Е.В. Плешакова, М.В. Каневский, Ю.П. Федоненко. — Саратов, 2017. — 75 с.
18. Миловзорова А.М., Кулягина Г.П., Смирнов И.А. Рекомендации по технике безопасности и охране труда в биологической лаборатории//<https://mosmetod.ru>.
19. Мирхамидова П. Цитологический и биохимический анализ реакции ядерной оболочки гепатоцитов на облучение//Диссертации на соискание ученой степени док. биол. наук. Ташкент, 1994.
20. Мирхамидова П., Бабаханова Д. Б., Умарова Г., Кадирова Д.А. Биологическая химия. Ташкент-2018. С.350.
21. Молекулярная биотехнология: принципы и применение, Б.Глик, Дж. Пастернак, 2002.
22. Мухамедов Г.И., Мирхамидова П., Отажанова Д. Практикум по биологической химии. Ташкент-2022. С.250.
23. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология /Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. М.: МИА, 2003.
24. Нельсон Д., Коке М. Основы биохимии Ленинджера. Том 1. М.: Бином, 2012. – 696 с.
25. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: Практич. пособие. М., 1981. С. 286.
26. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. – 288 с.
27. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений//М.: Колос, 1976. - 256 с.
28. Ригетти П. Изoeлектрическое фокусирование. Теория, методы и применение. М.: Мир, 1986. – 399 с.
29. Рогожин В.В. Практикум по биохимии. Санкт-Петербург-Москва-Краснодар 2013.
30. Северин С. Е. Соловьевой Г. А. Практикум по биохимии учеб пособие. Изд-во МГУ, 1989.

31. Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков - Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.

32. Соколовская Б.Х. Сто задач по генетике и молекулярной биологии. Изд. Наука. Сибирское отделение Новосибирск -1971, 71 с.

33. Специальная технология для лаборантов химического анализа 3-5 разряда: учебное пособие//И.В. Александрова. Филиал ТИУ в г. Тобольске. Профессиональный учебный центр – Тюмень: Издательский центр БИК, ТИУ, 2016. – 117 с.

34. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и белка. М.: Высшая школа, 1986.

35. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. 1996.

36. Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И.Е. Количественное определение содержания белка // Физиология растений. 2011. Т.58. С.624-630.

37. Уилсон К., Уолкер Д. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 848 с.

38. Уотсон Д. Молекулярная биология гена. М.: Мир, 1978.

39. Уотсон Дж, Туз Дж, Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Москва 1986, 285 с.

40. Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс. — М.: Мир, 1986. — 288 с.

41. Ушакова Г.О. Лабораторный практикум к учебной дисциплине «Биохимия» //Г.А.Ушакова, О.А.Демшина. Д., изд.Арбуз, 2015. 61 с.

42. Фролов С. В., Фролова Т. А. Приборы, системы и комплексы медико-биологического назначения// учебное пособие в 10 частях, ч. 3. Лабораторное оборудование для биологии и медицины. Тамбов: Тамбовский государственный технический университет (ТГТУ), 2015. 82 с.

43. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии. 2-е изд. Минск: Высшей школа, 1976. - 288 с.

44. Шмид Р.Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. Москва. Лаборатория знаний, 2019.

45. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск, 2004, 496 с.

46. Яшин И.М., Васенев И.И., Черников В.А. Методы экологических исследований: Рабочая тетрадь//М. Изд.РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, 2011. 94 с.

47. Artemov A.V., Mugue N.S., Rastorguev S.M., Zhenilo S., Mazur A.M., Tsygankova S.V. et al. Genome-wide DNA methylation profiling reveals epigenetic adaptation of stickleback to marine and freshwater conditions. *Molecular Biology and Evolution*. 2017.

48. Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J. et. al.. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*. 323, 2009. Pp.133-138.

49. Erwin L., van Dijk, Hélène Auger, Yan Jaszczyszyn, Claude Thermes. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2014, 30, Pp.418-426.

50. F. Sanger, A.R. Coulson. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 94, 1975. Pp.441-448.

51. Fasman G.D. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Boca Raton: CRC, 1989. 601 p.

52. Gornall A.G., Bardawill C.S., David M.M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Method // *J. Biol. Chem*. 1949. V. 177. Pp. 751-766.

53. Hu B., Li X., Huo Y., Yu Y., Zhang Q., Chen G. et al Cellular responses to HSV-1 infection are linked to specific types of alterations in the host transcriptome. *Sci. Rep.* 6, 2016. 28075.

54. James G. Patton. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. Printed in the United States of America 2013.

55. Korlach J., Bibillo A., Wegener J., Peluso P., Thang T. Pham, et. al., Long, Processive Enzymatic DNA Synthesis Using 100% Dye-Labeled Terminal Phosphate-Linked Nucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 27, 2008. Pp.1072-1082.

56. Levene M.J., Korlach J., Turner S.W., Foquet M., Craighead H.G., Webb W.W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. 299, 2003. Pp. 682–686.

57. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193. Pp. 265-275.

58. Ma Z., Lee R. W., Li B., Kenney P., Wang Y. et. al.. Isothermal amplification method for next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110, 2013. Pp.14320-14323.

59. Mark A. Osborne, W. Scott Furey, David Klenerman, Shankar Balasubramanian. Single-Molecule Analysis of DNA Immobilized on Microspheres. *Anal. Chem.*, 72, 2000. Pp.3678-3681.
60. Matthew Meselson and Franklin W. Stahl. The replication of DNA in *Escherichia coli* (англ.) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* : journal. - 1958.- Vol. 44.- Pp. 671—682.
61. Maxam A.M. and Gilbert W. A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 1977. Pp.560–564.
62. Mohammed Awole Adem. Molecular biology and applied genetics for Medical Laboratory Technician Students. Upgraded – 2006.
63. Oliver Brandenburg, Zephaniah Dhlamini, Alessandra Sensi, Kakoli Ghosh, Andrea Sonnino. Introduction to Molecular Biology and Genetic Engineering. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2011.
64. Orlando L., Ginolhac A., Raghavan M., Vilstrup J., Rasmussen M. et. al.. True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone. *Genome Research*. 21, 2011. Pp.1705-1719.
65. Rastorguev S. M., Nedoluzhko A. V., Sharko F. S., Boulygina E. S., Sokolov A. S. et. al.. Identification of novel microRNA genes in freshwater and marine ecotypes of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Mol Ecol Resour*. 16, 2016. Pp.1491-1498.
66. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlén M., Nyrén P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry*. 242, 1996. Pp.84-89.
67. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 1977. Pp.5463–5467.
68. Sharon D., Tilgner H., Grubert F., Snyder M. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome. *Nat Biotechnol*. 31, 2013. Pp.1009-1014.
69. Shendure J. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science*. 309, 2005. Pp.1728-1732.
70. Shirokikh N.E., Spirin A.S. Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translation on initiation factors. (англ.) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: journal.- 2008. - Vol. 105, no. 31. - Pp. 10738 -10743.
71. Shulga O. A., Nedoluzhko A. V., Shchennikova A. V., Gruzdeva N. M., Shelenkov A. A. et. al.. Profiling of microRNAs in

wild type and early flowering transgenic *Chrysanthemum morifolium* by deep sequencing. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 128, 2017. Pp.283-301.

72. Stoddart D., Heron A. J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106, 2009. Pp.7702-7707.

73. Stoscheck C.M. Quantitation of Protein // *Methods Enzymol.* 1990. V. 182. Pp. 50-68.

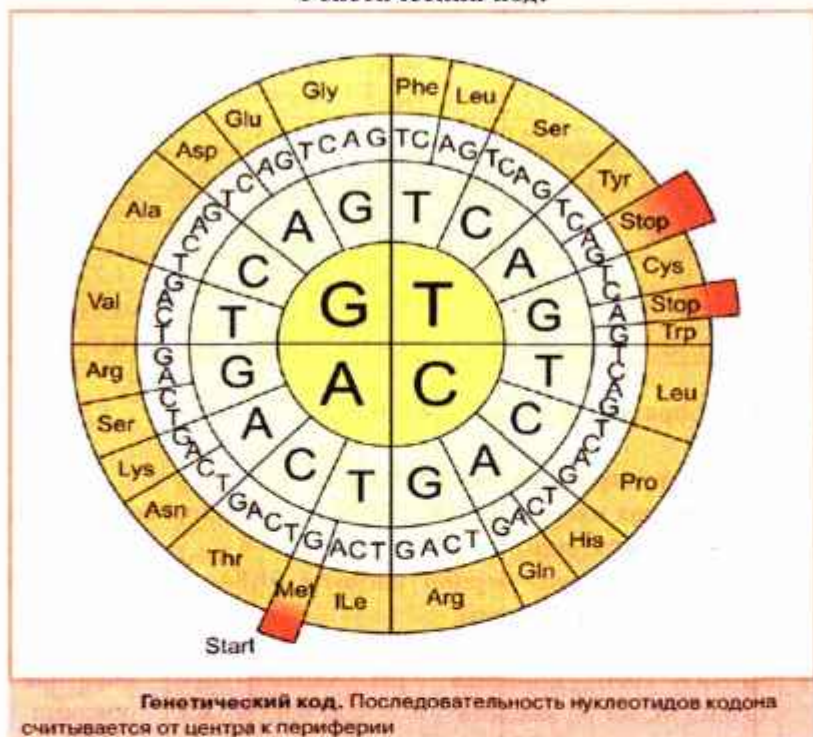
74. Wang M., Sun X., Yu D., Xu J., Chung K., Li H. Genomic and transcriptomic analyses of the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* in response to oxidative stress. *Sci. Rep.* 6, 2016. 32437.

75. www.biotangusa.com

76. Zhisong He, Dingding Han, Olga Efimova, Patricia Guijarro, Qianhui Yu, et. al.. Comprehensive transcriptome analysis of neocortical layers in humans, chimpanzees and macaques. *Nat Neurosci.* 20, 2017. Pp.886-895.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Генетический код:



Приготовление буферных растворов

Фосфатно-цитратный буфер, pH 2,2 - 8,0.

Для приготовления раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, относительная молекулярная масса 178,05, 0,2 М, растворяют 35,61 г соли в 1 л воды.

Для приготовления раствора лимонной кислоты 0,1 М растворяют 21,018 г кислоты в 1 литре воды.

pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитратная кислота, мл	pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитратная кислота мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85

2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,82	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Буфер Бората (0,2 М), pH 7,4-9,0.

Тетраборат натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

Молекулярная масса - 381,43. 19,072 г соли тетрабората натрия растворяют в 1 литре воды.

Молекулярная масса борной кислоты 61,84. 12,37 г борной кислоты растворяют в 1 л воды.

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Боратная кислота 0,2 М, мл	pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Боратная кислота 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Ацетатный буфер (0,2 М), pH 3,6-5,8.

Ацетат натрия, относительная молекулярная масса = 136,09

pH	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Ацетатная кислота 0,2 М, мл	pH	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Ацетатная кислота 0,2 М, мл
3,6	0,75	7,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,12	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40

4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Трис-буфер (0,05 М), рН 7,2-9,1.

Относительная молекулярная масса триса составляет 121,14, а объем раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой.

рН		Трис 0,2 М, мл	Хлоридная кислота, 0,1М, мл	Н ₂ О, мл
23 ⁰ С	37 ⁰ С			
7,20	7,05	25	45,0	До 100мл
7,36	7,22	25	42,5	--"
7,54	7,40	25	40,0	--"
7,66	7,52	25	37,5	--"
7,77	7,63	25	35,0	--"
7,87	7,73	25	32,5	--"
7,96	7,82	25	30,0	--"
8,05	7,90	25	27,5	--"
8,14	8,00	25	25,0	--"
8,23	8,10	25	22,5	--"
8,32	8,18	25	20,0	--"
8,40	8,27	25	17,5	--"
8,50	8,37	25	15,0	--"
8,62	8,48	25	12,5	--"
8,74	8,60	25	10,0	--"
8,92	8,78	25	7,5	--"
9,10	8,95	25	5,0	--"

Коэффициент разделения аминокислот с помощью тонкослойной и бумажной хроматографии

Аминокислоты	Разные ценности в различных растворах			
	1	2	3	4
Глицин	0,40	0,26	0,17	0,08
Аланин	0,59	0,38	0,24	0,13
Серин	0,31	0,27	0,16	0,08
Цистеин		0,07	0,08	0,02
Цестин	0,22	0,08	0,05	-
Метеонин	0,79	0,55	0,44	0,25
Треонин	0,49	0,35	0,17	0,13

Валин	0,79	0,60	0,45	0,24
Лейцин	0,82	0,73	0,61	0,41
Изолейцин	0,83	0,72	0,59	0,37
Аргинин	0,54	0,20	0,10	0,05
Лизин	0,46	0,14	0,08	0,03
Глутамат	0,29	0,30	0,17	0,03
Аспартат	0,13	0,24	0,16	0,02
Фенилаланин	0,84	0,68	0,53	0,34
Тирозин	0,58	0,45	0,24	0,24
Гистидин	0,66	0,20	0,10	0,13
Триптофан	0,75	0,50	0,43	0,17
Пролин	0,88	0,43	0,30	0,13

1 - Фенольная вода (4 г: 1)

2 - Н. Бутанол - ацетоновая кислота - вода (4: 1: 1).

3 - Н. Бутанол - уксусная кислота - вода (4: 5: 5).

4 - Н. Бутанол - этанол - вода (4: 1: 4).

Низкотемпературные формовочные смеси

Соли	Количество солей, г.	Количество снега или льда, г.	Максимальная низкая температура
MgSO ₄	23,4	100	- 3,9
NH ₄ Cl	30,0	100	- 15,8
NH ₄ NO ₃	45,0	100	-17,3
Na Cl	30,4	100	- 21,2
Na Cl	27,5	100	- 33,6
Ca Cl ₂	42,6	100	- 55,0
Na Cl	41,6		
NH ₄ NO ₃	41,6		
Na Cl	41,40,0	100	- 30
NH ₄ NO ₃	20,0		

Атомная масса отдельных элементов

Название элемента	Атомная масса	Название элемента	Атомная масса
Азот	14,008	Медь	63,57
Алюминий	16,97	Молибден	95,95

Барий	137,36	Натрий	22,997
Бор	10,82	Сера	32,06
Бром	79,916	Платина	195,23
Висмут	209,0	Ртуть	200,61
Водород	1,008	Стронций	87,63
Вольфрам	183,92	Железо	197,2
Йод	126,92	Углерод	12,01
Кадмий	112,41	Фосфор	30,98
Калий	39,096	Хлор	35,457
Кальций	40,08	Хром	52,01
Кислород	16,00	Цинк	65,38
Кремний	28,06	Свинец	207,21
Серебро	107,88		
Магний	24,32		
Марганец	54,93		

1 л - это количество вещества, которое используется для приготовления титрованных растворов различной нормальности.

Основные соединения	Молекулярная масса	Эквивалентная масса	1Н	0,5Н	0,2Н	0,1Н	0,05Н	0,02Н	0,01Н
H ₂ SO ₄ (плотность 1,84)	98,08	49,04	28 мл	14 мл	5,6 мл	2,8 мл	1,4 мл	0,56 мл	0,28 мл
HCl (плотность 1,19)	36,48	35,48	82 мл	41 мл	16,4 мл	8,2 мл	4,1 мл	1,64 мл	0,82 мл
HNO ₃ (плотность 1,40)	63,02	63,02	67 мл	33,5 мл	13,4 мл	6,7 мл	3,4 мл	1,34 мл	0,67 мл
H ₂ CO ₃ *2H ₂ O	126,07	63,04	-	-	-	6,3 г	3,15 мл	1,26 г	0,63 г
NaOH	40,00	40,00	40,02	20,0 г	8,0 г	4,0 г	2,0 г	0,80 г	0,40 г
KOH	56,11	56,11	56,11	28,06 г	11,2 г	5,6 г	2,8 г	1,12 г	0,56 г
Ba(OH) ₂ *8H ₂ O	3145	157,75 г	78,88 г	31,54	15,77 г	7,88 г	3,15 г	1,58 г	

Содержание

Введение	4
I глава. Технические требования техники безопасности и приготовление рабочих растворов в лаборатории молекулярной биологии	8
1.1.Правила техники безопасности работы в лаборатории	8
1.2.Ознакомление с основными приборами и оборудован	11
1.3.Единицы измерения	23
1.4.Приготовление водных растворов	23
1.5.Буферные растворы и способы приготовления	31
1.6.Определение концентрации ионов водорода с помощью индикатора	34
1.7.Определение pH с помощью универсального индикатора	36
1.8.Определение pH потенциометрическим методом	37
II глава. Методы исследования молекулярной биологии	39
2.1.Микроскопия	39
2.2.Культивирование клеток и среды	45
2.3. Биохимические методы	46
2.4. Центрифугирование	47
2.5.Метод ультрацентрифугирования	49
2.6.Хроматография	54
2.7.Электрофорез	54
2.8.Изоэлектрофокусирование	56
2.9.Метод рекомбинантных генов	59
III глава. Выделение клеточных структур из биологического материала	60
3.1.Гомогенизирование	60
3.2.Приготовление гомогената из растительных и животных тканей.	60
3.2.1.Приготовление гомогената из растительных тканей	60
3.2.2.Приготовление гомогената из животной ткани	62
3.3.Центрифугирование	64
3.4.Разделение клеточных компонентов методом ультрацентрифугирования	67
3.5.Выделение клеточных органелл растительной клетки	70
3.6. Выделение клеточных органелл животной клетки	76
3.7.Выделение митохондрий из животной ткани	78

IV глава. Методы исследования белка и аминокислот в биологическом объекте	84
4.1. Методы выделения и очистки белков	85
4.2. Экстракция белков из биологических объектов	89
4.2.1. Экстракция общих белков из растений	89
4.2.2. Экстракция (разделение) белков на отдельные фракции	91
4.2.3. Экстракция водорастворимых белков	92
4.2.4. Экстракция солерастворимых белков	93
4.2.5. Экстракция щелочно-растворимых белков	93
4.2.6. Экстракция общих белков из животной ткани	94
4.3. Методы определения количества белка в биологических объектах	97
4.4. Высаливание	99
4.4.1. Осаждения белка методом высаливания	100
4.4.2. Осаждения яичного альбумина методом высаливания	101
4.4.3. Осаждения яичного альбумина при понижении ионной силы	102
4.4.4. Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами	102
4.4.5. Осаждение белка органическими кислотами	103
4.4.6. Осаждение белка солями тяжелых металлов	103
4.4.7. Осаждение белков органическими растворителями	104
4.4.8. Осаждение белка при нагревании	105
4.5. Количественное определение белков в биологическом материале	106
4.5.1. Определение содержания белка	106
4.5.1.1. Определение содержания белка по методу Лоури	106
4.6. Метод Петерсона	109
4.7. Определение количества белков биуретовым методом	109
4.8. Определение количества белков методом микробиурета	111
4.9. Разделение и очистка белков методом диализа	111
4.9.1. Разделение белков методом диализа	112
V глава. Электрофорез	114
5.1. Фракционирование белков	114
5.1.1. Разделение и количественное определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге	115
5.2. Электрофорез в ПААГ нативного белка в градиенте пористости геля	116
5.3. Определение структуры и молекулярной массы белка	118

методом электрофореза в ПААГ с ДСН	
5.3.1.Разделение белков по размеру с использованием додецилсульфата натрия (ДСН)	121
5.4.Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия	124
5.4.1.Метод Вебера и Осборн	125
5.4.2.Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях	127
5.5.Проявление электрофореграмм с помощью красителя кумасси	130
VI глава. Хроматография	134
6.1.Хроматографическое разделение аминокислот на бумаге	134
6.2.Разделение белков методом хроматографии	137
6.3. Метод гель-хроматографии	140
6.4.Метод ионообменной хроматографии	143
6.5. Аффинная хроматография	147
VII глава. Нуклеиновые кислоты	148
7.1.Выделение нуклеопротеидов из печени животных	150
7.2.Выделение дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП) из тканей	152
7.3.Выделение дезоксирибонуклеопротеидов из печени или селезенки	153
7.4.Гидролиз нуклеопротеидов	154
7.5.Выделение нуклеопротеидов из дрожжей	156
7.6.Исследование продуктов гидролиза нуклеопротеидов	158
7.7.Выделение, очистка и разделение нуклеиновых кислот (по Шмидту и Таннгаузеру, в прописи Г.П. Георгиева)	159
7.8.Определение концентрации нуклеиновых кислот в крови животных	161
7.9.Определение концентрации нуклеиновых кислот в мышечной ткани	162
7.10.Количественное определение нуклеиновых кислот в крови	163
7.11.Выделение ДНК из растительных клеток	164
7.12.Выделения ДНК из растительных тканей	166
7.13.Выделение ДНК из животных тканей	167
7.14.Выделение ДНК из эпителиальных клеток ротовой полости человека методом щелочного лизиса	168
7.15.Определение температуры плавления ДНК	169
7.16.Качественная реакция на ДНК	170

7.17.Количественное определение ДНК спектрофотометрическим методом	170
7.18.Количественное определение ДНК (по Дише)	171
7.19. Количественное определение нуклеиновых кислот (ДНК) по фосфору	172
7.20. Метод определения содержания ДНК с помощью дифениламина	173
7.21.Количественное определение РНК колориметрическим методом	174
7.22.Количественное определение РНК (по Мейбаум)	175
7.23.Получение и разделение свободных пуриновых и пиримидиновых оснований	176
7.24.Выделение ДНК	177
7.24.1.Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол- хлороформной экстракции	177
7.24.2.Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook <i>et al.</i> , 1989]	178
7.24.3.Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток Быстрое для электрофоретического анализа (Real fast MiniPrep)	180
VIII глава. Электрофорез ДНК	182
8.1.Горизонтальный электрофорез в агарозном геле	188
8.2.Окраска ДНК	188
8.3.Секвенирование ДНК: метод Максама-Гилберта и метод Сенгер	191
8.4.Секвенирование по Сэнгеру: «Плюс-минус» метод секвенирования ДНК	195
8.5.Секвенирование ДНК методом полимеразного копирования (методом Сэнгера)	196
8.6.Секвенирование ДНК по Сэнгеру: метод «терминаторов»	203
8.7.Полимеразная цепная реакция	206
IX глава. Решение задач по молекулярной генетике	212
Тесты	217
Словарь терминов	235
Список литературы	263
Приложение	269

Мирхамидова П., Шахмурова Г.А.,
Туйчиева Д.Х., Махмудова К.Х.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

лабораторный практикум

учебное пособие

Издательство “Bookmany print”

Лицензия № 022246. 28.02.2022 г.

Подписано к печати 08.09.2023 г.

Гарнитура “Times New Roman”. Формат 60x84¹/₁₆.

учет-изд. л. 15,9, услов. печ. л. 16,2.

Печать офсетная. Тираж 100 экз.

г.Ташкент, Учтепинский р., 22-квартал, дом 17-б.

Отпечатано в типографии ООО “BOOKMANY PRINT”.

г.Ташкент, Учтепинский р., 22-квартал, дом 17-б.



ISBN 978-9910-9898-4-1

