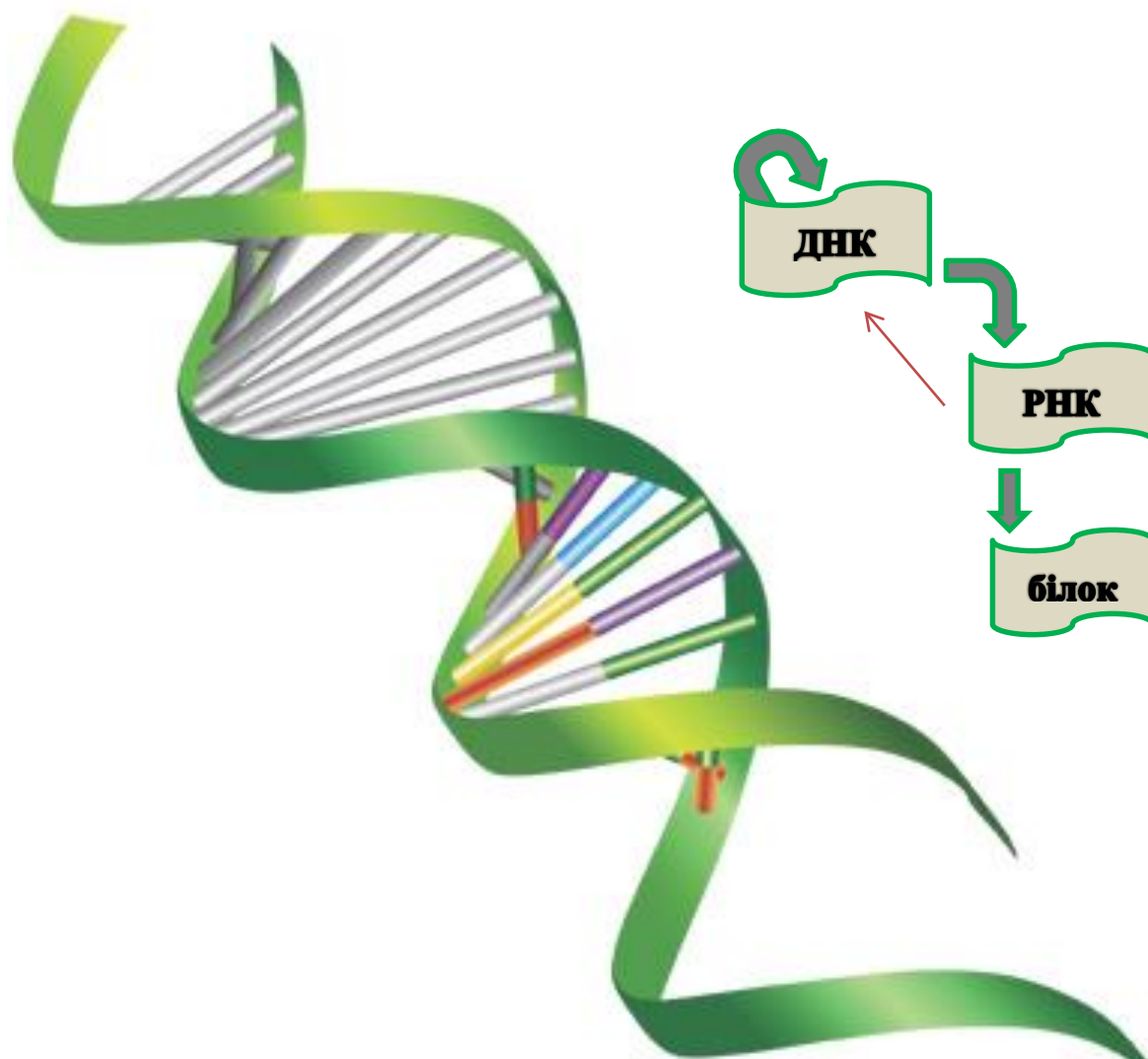


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Молекулярна біологія
навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія



Львів – 2024

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Молекулярна біологія
навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Львів – 2024

УДК: 577.2 (075)

Рецензенти:

завідувачка кафедри фармації та біології, канд. біол. наук, доцентка Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького Мирослава Грицина

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнологій, протокол №1 від 26. 02. 24 р.

Молекулярна біологія: навчально-методичний посібник / [уклад. Шемедюк Н.П.] 2-ге вид., переробл. та допов. Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 109 с.

Навчально-методичний посібник укладено для здобувачів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. У посібнику коротко викладено, проілюстровано теоретичний матеріал з дисципліни «Біологія клітини з основами молекулярної біології», розділом якої є «Молекулярна біологія». У посібнику рекомендовано до виконання лабораторні роботи, описано методи молекулярної біології та суть їх виконання. Наприклад, методи, що застосовують для одержання нуклеїнових кислот, дослідження протеїнів, теоретичні відомості щодо принципів, на яких базуються основні методи виділення, аналізу, визначення концентрації ДНК, РНК, протеїнів. Підібраний матеріал відповідає робочій програмі з дисципліни «Біологія клітини з основами молекулярної біології» для здобувачів факультету харчових технологій та біотехнологій ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ.....	8
ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ.....	12
ТЕМА 1: НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ.....	13
Лабораторна робота №1. Дослідження компонентів нуклеопротейдів у гідролізаті дріжджів. Дослідження нуклеїнових кислот.....	18
Лабораторна робота №2. Виділення загальної (тотальної) ДНК із культури бактерій (<i>Dhaese et al., 1979</i>).....	23
Лабораторна робота №3. Виділення загальної (тотальної) ДНК із культури тваринних клітин <i>BALB 3T3</i>	26
Лабораторна робота №4. Виділення рибонуклеопротейнів і виявлення РНК.....	29
ТЕМА 2: СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ.....	31
Лабораторна робота №5. Якісні реакції на присутність амінокислот, протеїнів у розчині.....	35
Лабораторна робота №6. Властивості протеїнів.....	42
Лабораторна робота №7. Концентрування протеїнів шляхом осадження ТХО.....	47
Лабораторна робота №8. Розділення амінокислот методом ПХ...55	
Лабораторна робота №9. Виділення глікогену.....	59
Лабораторна робота №10. Розділення альбумінів і глобулінів яєчного білка.....	61
ТЕМА 3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЧОВИН. ФОТОМЕТРІЯ.....	63
Лабораторна робота №11. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК у розчині.....	76
Лабораторна робота №12. Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК у розчині.....	78
Лабораторна робота №13. Кількісне визначення протеїнів у розчині методом Бредфорда.....	80
Лабораторна робота №14. Кількісне визначення протеїнів у розчині методом Лоурі.....	83
Лабораторна робота №15. Кількісне визначення протеїнів у розчині за допомогою біуретового реактиву	86
Лабораторна робота №16. Визначення вмісту казеїногену у молоці титриметричним методом.....	89

Лабораторна робота №17. Кількісне визначення зелених пігментів спектрофотометричним методом.....	91
ТЕМА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДНК.....	95
ТЕМА 5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕЇНІВ: ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА), РЕНТГЕНОСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ.....	99
Лабораторна робота №18. Визначення присутності антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА.....	102
ПРИГОТУВАННЯ ОКРЕМИХ РОЗЧИНІВ.....	104
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЯ КЛІТИНИ З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ».....	108

ВСТУП

Молекулярна біологія є основою сучасних біотехнологій для вирішення багатьох глобальних проблем людства, зокрема діагностики, профілактики та лікування захворювань, попередження епідемій, забезпечення продуктами харчування, вирішення екологічних проблем. На сьогодні розроблено різні методичні підходи у цих напрямках.

У навчально-методичному посібнику описано методи молекулярної біології та їх теоретичні основи. Наприклад, методи, що застосовують для одержання нуклеїнових кислот. Наведено теоретичні відомості щодо принципів, на яких базуються основні методи виділення, аналізу, визначення концентрації ДНК, РНК, протеїнів. Багато методик є досить складними у виконанні, тому окремо наведено приклади приготування розчинів, необхідних для проведення роботи. Для кращого розуміння принципу методу сформовано список рекомендованої літератури. У посібнику містяться найважливіші елементи лекційного матеріалу з розділу «Молекулярна біологія» та ілюстраційні пояснення до нього.

Вивчення дисципліни спрямоване на формування наступних компетентностей здобувача:

- вміння характеризувати особливості будови і властивості макромолекул, які є складовою частиною живої клітини;
- знання основних концепцій структурної організації протеїнів і нуклеїнових кислот;
- вміння аналізувати структурно-функціональну організацію генетичного апарату клітин;
- володіння теоретичними основами експериментальних методів дослідження протеїнів та нуклеїнових кислот;
- вміння відтворювати основні змістові елементи навчальної дисципліни, використовуючи схеми, що відображають основні молекулярні процеси;
- вміння застосовувати вивчені методи дослідження молекулярної біології;
- володіння культурою мислення, здатність до узагальнення, аналізу, сприйняття інформації, визначення мети і вибір шляхів її досягнення;
- прагнення до саморозвитку, підвищення кваліфікації і професійної майстерності, набуття нових методологічних,

технічних, технологічних знань, умінь, прийомів у проведенні експериментальних досліджень.

Навчально-методичний посібник буде корисним під час виконання курсових та кваліфікаційних робіт.

ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ

1. Під час роботи у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яку Вам доручено.

2. Під час виконання роботи дотримуйтесь правил поведінки у лабораторії (не відволікайте увагу товаришів, не залишайте без нагляду своє робоче місце, розпочату роботу).

3. Підтримуйте порядок робочого місця (на робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей, наприклад, сумок, портфелів, тощо).

4. Працюйте лише за закріпленим за Вами місцем у лабораторії.

5. Використовуючи речовин для досліду, звертайте увагу на етикетку. У тому разі, коли виникає сумнів щодо відповідності вмісту флакону надпису на етикетці, звертайтеся до викладача або лаборанта.

6. Розпочинаючи роботу, уважно ознайомтесь із завданням та правилами з охорони праці, обладнанням, матеріалами.

7. Хімічні реакції необхідно проводити за умов і у кількостях, концентраціях реагентів, які пропонуються у методичній літературі. Для проведення хімічних реакцій використовуйте зазначений у методичних матеріалах посуд і прилади.

8. Нагрівання вмісту пробірок відбувається поступово за допомогою пробіркотримача чи штативу. Пробірка спрямовується в напрямку від себе і свого товариша. Не нахиляйтеся над пробіркою, в якій кипить рідина.

9. Якщо потрібно ідентифікувати речовину за запахом, спрямовуйте до себе випари з пробірки помахом вільної руки.

10. Реактиви не пробуйте на смак, не пийте з хімічного посуду.

11. Досліди з леткими речовинами проводьте під витяжною шафою.

12. Роботи з бензолом, етерами та спиртами проводяться на певній відстані від полум'я, під витяжною шафою.

13. Розчиняйте сульфатну кислоту у воді шляхом внесення кислоти до води невеликими порціями, весь час помішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сульфатної кислоти, відбувається нагрівання розчину.

14. Зливати у раковину кислоти та лужні розчини можна після їх нейтралізації лугами чи кислотами відповідно.

15. Розлиті кислоти та лужні розчини присипати піском або

нейтралізувати, лише після цього проводити прибирання.

16. У разі виявлення порушення правил безпеки, повідомляйте викладача або лаборанта.

17. Після закінчення роботи поприбирайте робоче місце, вимийте посуд. Повідомте лаборанта або викладача про завершення роботи, підпишіть зошит.

СУВОРО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ:

1. вмикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу;
2. проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції;
3. тримати у приміщенні особистий одяг та інші речі;
4. їсти у приміщенні;
5. залишати без догляду запалені горілки та нагрівальні прилади;
6. працювати без спецодягу (халатів);
7. залишатися працювати у лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для забезпечення надання допомоги.

НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЯ ОБІЗНАНІСТЬ З РОБОТОЮ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЯМИ РЕАГЕНТІВ, ПРАВИЛАМИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИЗВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ !!!

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВИМАГАЮТЬ ОБЕРЕЖНОГО ПОВОДЖЕННЯ:

1. **Нітратна кислота.** Концентрована кислота спричиняє опіки шкіри. Випари нітратної кислоти подразнюють слизову оболонку дихальних шляхів, очей. Нітратна кислота може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом, солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.

2. **Ацетон.** Летка речовина. Зберігати у колбах з притертим корком.

3. **Луг.** При потраплянні на шкіру та слизові оболонки спричиняє опіки. Зберігати у сухому місці.

4. **Сульфатна кислота.** При потраплянні на шкіру спричиняє важкі опіки, при потраплянні у дихальні шляхи – подразнення слизових оболонок.

5. **Хлоридна кислота.** Спричиняє опіки шкіри. Випари спричиняють опіки слизових оболонок.

6. **Ацетатна кислота.** Спричиняє важкі опіки шкіри, випари – опіки слизових оболонок. Під час взаємодії з нітратною кислотою та

Натрію пероксидом може спалахнути. Гасити водою.

Основні правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин, під витяжною шафою:

1) обережно користуватись електричним, газовим обладнанням, використовувати водовідведення;

2) усі прилади, що використовуються для культивування клітин, повинні бути заземлені, розетки та вмикачі знаходяться у доступній та безпечній зоні;

3) робота здобувачів повинна відбуватись лише за присутності відповідального персоналу;

4) вмикати та вимикати прилади у боксі можна лише після погодження з відповідальними особами;

5) робота у культуральній лабораторії повинна відбуватись у максимально можливій тиші, без сторонніх шумів та відволікаючих подій;

6) перед початком роботи під ламінаром чи витяжною шафою слід максимально зручно обладнати робоче місце (висоту стільця, доступ до посуду, автоматичних піпеток, газового або спиртового пальника);

7) перед початком роботи у ламінарному боксі слід з'ясувати ступінь біологічної безпеки об'єкта дослідження: лінії клітин, первинної культури;

9) максимально дотримуватись правил та навиків стерильної роботи у ламінарному боксі;

10) перед роботою з леткими речовинами переконайтесь, що працює витяжна система шафи, не залишайте відкоркованими флакони, пробірки;

11) після закінчення роботи прибрати робоче місце та прозвітувати про виконану роботу.

Правила роботи з автоклавом

До роботи з автоклавом допускаються особи віком не менше 18-ти років, які пройшли медичний огляд, курс навчання та інструктаж з безпечного обслуговування автоклаву. Під час роботи з автоклавом, категорично забороняється:

1. Випускати пару у стерилізаційну камеру, якщо кришку неповністю закріплено;

2. Вмикати автоклав, якщо рівень води у водопаровій камері недостатній;

3. Відкривати кришку автоклава або ослабити її міцність чи

доливати воду у водопарову камеру, якщо у стерилізаційній камері фіксується тиск (слідкувати за показником манометра);

4. Працювати з автоклавом, якщо його не заземлено, протерміновано чергове гідравлічне тестування автоклава і перевірку манометра, а також за несправного або невідрегульованого попереджувального клапана;

5. Залишати автоклав без нагляду в робочому стані, тобто під тиском. Роботу автоклава потрібно зупинити, якщо тиск в автоклаві піднімається вище дозволеного, не дивлячись на виконання усіх вимог інструкції, а також, якщо на елементах автоклава є тріщини, здуття або протікання у зварних швах.

Правила роботи з сушильною шафою

1. Обслуговувати шафу може особа, яку ознайомлено із інструкцією щодо обслуговування сушильної шафи;
2. Упродовж експлуатації шафи контролюють температуру і слідкують за тим, чи горять контрольні лампочки;
3. Робота із незаземленою шафою категорично забороняється;
4. Забороняється класти до камери шафи матеріал, що загоряється за температури термостатування або близької до неї;
5. Під час експлуатації сушильна шафа не повинна встановлюватися поблизу опалювальної системи;
6. Робота із несправною шафою забороняється.

Правила роботи з дистилятором

1. Перед експлуатацією дистилятора необхідно перевірити чи вірно підключено всі проводи, заземлення;
2. Категорично забороняється підключати дистилятор до електричної мережі, не заземливши його;
3. За аварійної ситуації, у випадку зупинки подачі води із водопроводу, у камері випарювання відбувається бурхливе кипіння, піноутворення – у такому випадку потрібно швидко від'єднати апарат від електричної мережі;
4. За несправності дистилятор від'єднати від мережі;
5. Під час роботи із дистилятором потрібно стояти на гумовому килимку;
6. Перед вмиканням дистилятора включити воду.

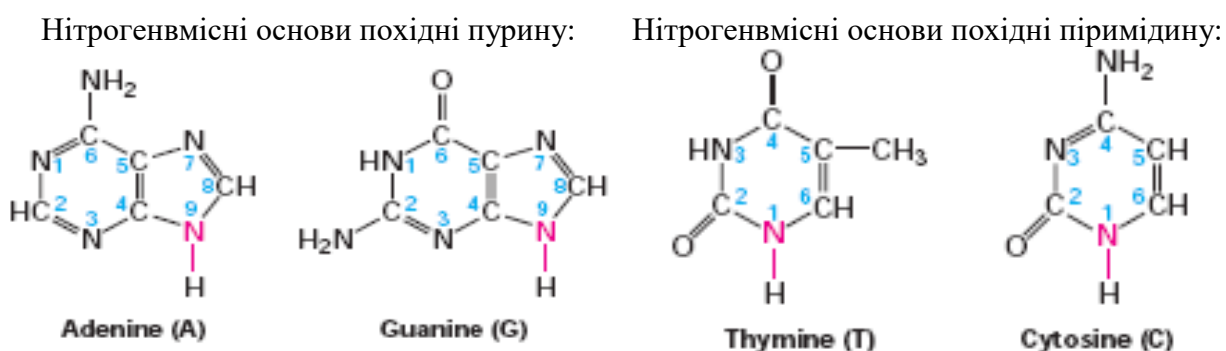
ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ:

1. Ваги аналітичні;
2. Морозильна камера;
3. Холодильник;
4. Мікроскоп;
5. Інкубатор;
6. Шейкер-інкубатор;
7. Вортекс;
8. рН-метр;
9. Система для титрування;
10. Спектрофотометр;
11. Термостат;
12. Магнітна мішалка;
13. Центрифуга/вортекс;
14. Дистилятор;
15. Охолоджуюча центрифуга;
16. Автоклав;
17. Качалка для культивування мікроорганізмів;
18. Бокс біобезпеки II класу захисту.

ТЕМА 1: НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

1. Структура нуклеїнових кислот.

Нуклеїнові кислоти – це біологічні полімери, мономерами яких є **нуклеотиди**. **ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота, **РНК** – рибонуклеїнова кислота. Нуклеотид складається з трьох компонентів: нітрогенвмісної основи, пентози і залишку фосфатної кислоти. Нуклеотид ДНК: нітрогенвмісна основа (Т, С, А, G), пентоза (дезоксирибоза), залишок фосфатної кислоти. Нуклеотид РНК: нітрогенвмісна основа (У, С, А, G), пентоза (рибоза), залишок фосфатної кислоти.



Зв'язки між нуклеотидами в ланцюгу утворюються за рахунок дезоксирибози і фосфатної групи. Цей зв'язок формується між 3'-ОН групою одного нуклеотидного залишку і 5'-ОН іншого. Ланцюг нуклеотидів, з'єднаних фосфодиестерним зв'язком є **первинною структурою** нуклеїнових кислот (рис. 1).

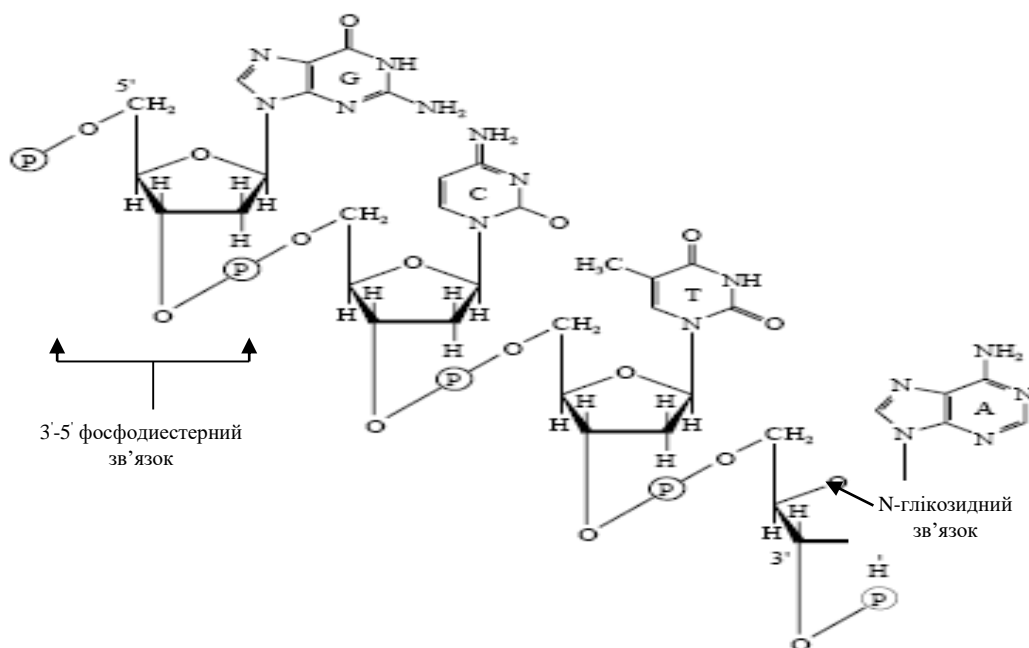


Рис. 1. Первинна структура ДНК

Вторинна структура ДНК

Два полінуклеотидних ланцюги мають антипаралельну структуру (в одному ланцюгу фосфодіестерні зв'язки направлені 3'→5', а в іншому 5'→3' напрямку), спіралізовані (рис. 2).

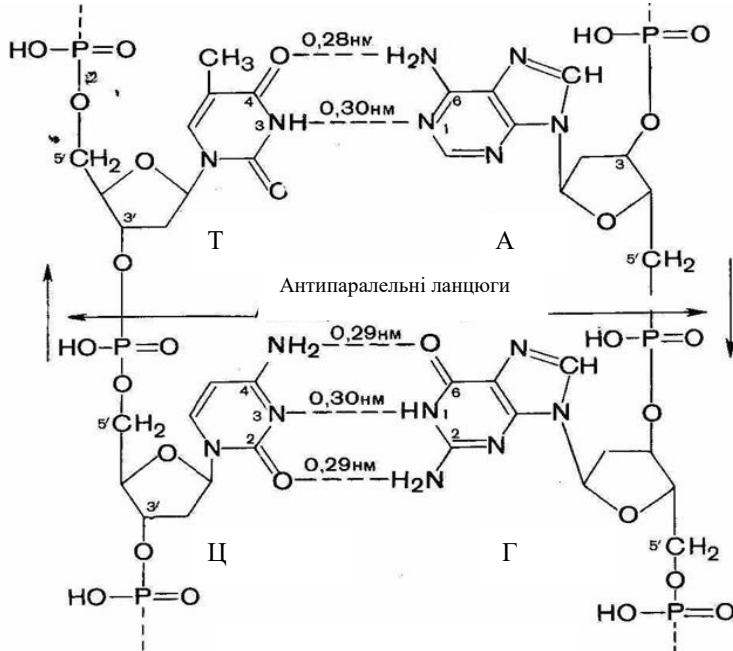


Рис. 2. Вторинна структура ДНК

Горизонтальне зображення ДНК: (5') – АТТГАЦАГГЦ -- (3')
(3') -- ТААЦТГТЦЦГ-- (5')

Під третинною структурою розуміють загальну форму молекул та суперспіралізацію (рис. 3). ДНК лінійна або кільцевої форми.

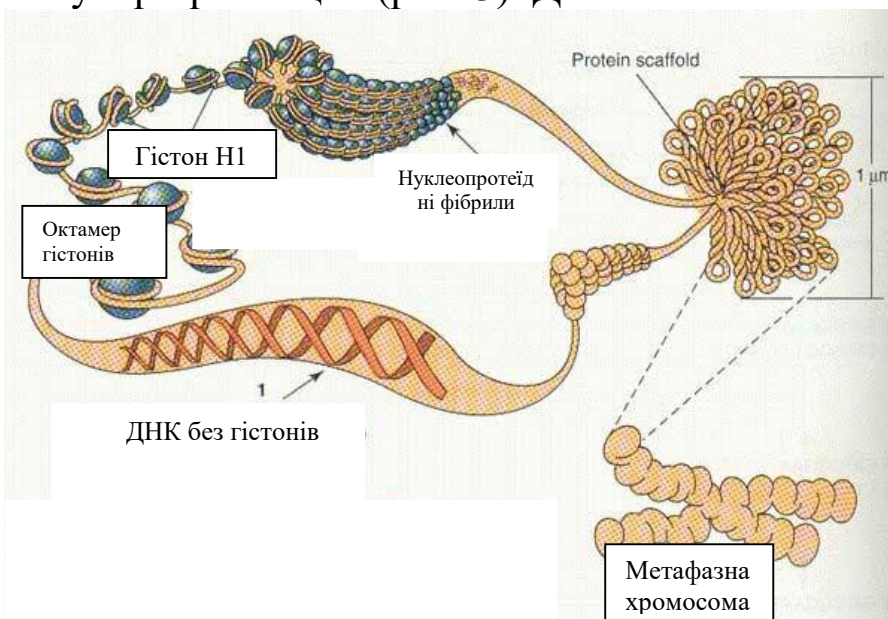


Рис. 3. Загальна схема упакування молекули ДНК

Чотири рівні упаковки ДНК – багаторівнева спіралізація ДНК.

Молекули ДНК дуже довгі, вони упаковуються за допомогою гістонів у спіраль значно меншої довжини (рис. 4, 5).

Перший рівень упаковки – нуклеосомний.

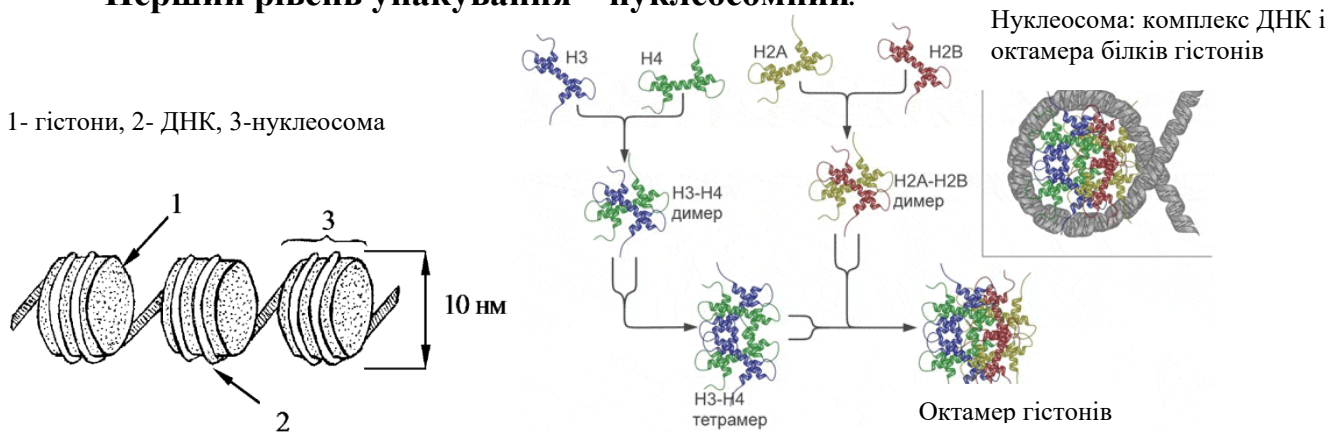
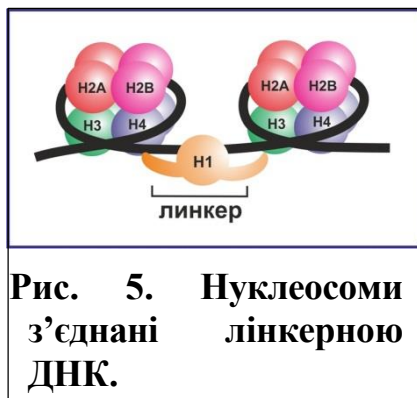


Рис. 4. Структура нуклеосоми (лат. *nucleus* – ядро, *soma* – тіло)

Нуклеосоми – дископодібні структури діаметром близько 10 нм.



Складаються з гістонового октамеру (8 молекул гістонів), що утворює протеїновий кор, навколо якого накручується сегмент двониткової ДНК (пДНК). Нуклеосоми з'єднуються лінкерною ДНК (іДНК) – приблизно 60 пар нітрогенвмісних основ. Лінкерна ДНК і нуклеосома містять 200 пар нітрогенвмісних основ ДНК. Гістони поділяються на 5 класів, різняться

розмірами, амінокислотним складом і величиною заряду. Так, розрізняють гістони, багаті на лізин, молекулярна маса яких становить 20000 а.о.м., і багаті на аргінін (молекулярна маса 15000 а.о.м.). Н1 – багаті на лізин; Н2А – багаті на аргінін та лізин; Н2В – помірно багаті на аргінін та лізин; Н3 – багаті на аргінін; Н4 – багаті на гліцин та аргінін. Гістоновий кор складають 4 типи гістонів – Н2А, Н2В, Н3, Н4. Гістон Н1 приєднується до лінкерної ДНК, бере участь в упакованні нуклеосомного ланцюга, з'єднує нуклеосоми між собою. За такого способу упаковки довжина ДНК зменшується у 7 разів.

За електрохімічними властивостями гістони належать до протеїнів з основними властивостями. Зв'язування протеїнів з ДНК

відбувається за рахунок електростатичних взаємодій: позитивного заряду гістону і негативного ДНК. Гістони беруть участь у стабілізації просторової структури ДНК, хроматину й хромосом. Також гістони регулюють транскрипцію і реплікацію.

Негістонові протеїни – це велика гетерогенна група протеїнів. Серед них є структурні і регуляторні протеїни, що беруть участь у регуляції генів, а також деякі ензими (ДНК-полімерази, РНК-полімерази). Негістонові протеїни відрізняються від гістонів за властивостями й амінокислотним складом. Вони є кислими протеїнами. З негістоновими протеїнами пов'язують специфічну регуляцію активності хроматину. Серед негістонових протеїнів є активатори та інгібітори транскрипції.

В інтерфазному ядрі хромосоми не виокремлюються та сприймаються разом як **хроматин**. Розрізняють гетерохроматин та еухроматин. **Гетерохроматин** – сильно конденсовані, функціонально неактивні ділянки хромосом. Мають вигляд ущільнень біля ядерної мембрани та на периферії ядра. **Еухроматин** – функціонально активні, деконденсовані, світлі ділянки хромосом.

Другий рівень упакування – супернуклеосомний (соленоїдний) (рис. 6).

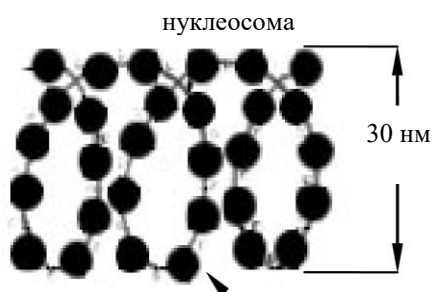


Рис. 6. Структура соленоїду

Нуклеосомна нитка конденсується, нуклеосоми поєднуються з гістоном Н₁, і утворюється спіраль $d = 30$ нм – **хроматинова нитка** (соленоїд). Виток спіралі містить 6-10 нуклеосом. Відбувається вкорочення ДНК ще у 6 разів. У формуванні соленоїду беруть участь Н₁, Н₃ і негістонові протеїни.

Третій рівень упакування – хромомерний (петельний).

Спіралізація продовжується і супернуклеосомна нитка утворює вигини та петлі. Вона є основою хроматиди. Діаметр петель – 50 нм, діаметр хроматиди – 300 нм. Нитка вкорочується ще у 10-20 разів.

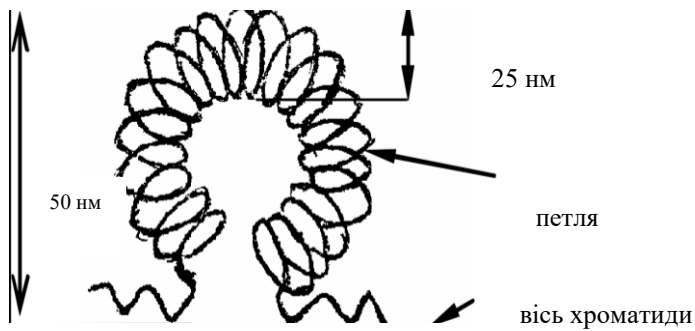


Рис. 7. Структура петлі ДНК

Кожну петлю складає 20-80 тисяч нуклеотидів (рис. 7). Ці петельні домени утримуються за рахунок негістонових протеїнів. Із петельних доменів першого порядку формуються петельні домени другого порядку за рахунок фосфорилування гістонів. У центрі мітотичної хромосоми розташовані протеїни – металопротеїди, що утворюють основу, до якої кріпляться петельні домени другого порядку.

Рівень метафазної хромосоми.

Найбільшій компактності хромосоми досягають у процесі мітозу у фазі метафази. Нитки багатократно укладаються по довжині хромосоми.

Лабораторна робота №1

Тема: Дослідження компонентів нуклеопротейдів у гідролізаті дріжджів

Мета роботи: ознайомлення з методами кислотного гідролізу пекарських дріжджів, якісними реакціями, які визначають будову нуклеопротейдів, набути навиків роботи з хімічним посудом, реагентами, закріпити знання будови нуклеїнових кислот.

Завдання:

1. Проведіть гідроліз клітин дріжджів.
2. Доведіть наявність пептидів у гідролізаті.
3. Якісно доведіть наявність пуринових основ у гідролізаті.
4. Якісно доведіть наявність фосфатної кислоти у гідролізаті.
5. Якісно доведіть наявність пентоз у гідролізаті.

Матеріали та обладнання, реактиви

Колба, зворотній холодильник, піщана баня, лійка, паперовий фільтр, пробірки, вага, піпетка мірна на 1 мл.

Пекарські дріжджі;

H₂SO₄ (10%);

NaOH (10%);

NaOH (30%);

CuSO₄ (1%);

CuSO₄ (7%);

NH₃ (концентрований);

AgNO₃ (1%);

Молібденова рідина.

Для якісного аналізу хімічного складу нуклеопротейдів використовується гідролізат дріжджів. За неповного гідролізу нуклеопротейди розпадаються на протеїни (гістони) і нуклеїнові кислоти. За повного гідролізу нуклеопротейдів у розчині можна виявити поліпептиди (біуретовою реакцією), пуринові основи (реакція з утворенням осаду солей Аргентуму), фосфатну кислоту (Амонію молібдатом), рибозу чи дезоксирибозу (реакція «срібного дзеркала», з реактивом Фелінга чи пробою Троммера).

Хід роботи

1. Гідроліз. У колбу внесіть 0,5 г пекарських дріжджів, 4 мл 10 %-ого розчину H_2SO_4 , кип'ятіть на піщаній бані 1 год. Колбу охолодіть, вміст профільтруйте через складчастий фільтр. Фільтрат поділіть на 4 частини.
2. Біуретова реакція. До 0,5 мл гідролізату внесіть 10 крапель розчину $NaOH$ (10%) до кислої реакції середовища і дві краплі розчину H_2SO_4 (1%). Спостерігайте зміну забарвлення суміші у фіолетовий колір.
3. Срібна проба на пуринові основи. До 1 мл гідролізату внесіть 1 краплину розчину Амонію і 5 крапель розчину Аргентуму нітрату. Спостерігайте через 3 – 5 хв утворення бурого рихлого осаду солей Аргентуму пуринових основ (аденіну та гуаніну).
4. Проба Троммера на рибозу і дезоксирибозу. До 0,5 мл гідролізату внесіть 10 крапель розчину $NaOH$ (30%) і 2–3 краплі розчину $CuSO_4$ (7%). Суміш перемішайте, нагрійте. Через 3 – 5 хв утворюється жовтий чи оранжевий осад сполук Купруму (I).
5. Реакція на фосфатну кислоту. До 20 мл молібденової рідини внесіть 3–4 краплі гідролізату, кип'ятіть. Через 3 – 5 хв суміш набуває лимонно-жовтого кольору чи випадає лимонно-жовтий осад. Отримані результати оформіть у вигляді таблиці.

Реагент	Біуретова реакція	Срібна проба	Проба Троммера	Реакція на фосфатну кислоту
Аналітичний ефект				

Висновки: _____

2. Дослідження нуклеїнових кислот.

Виділення ДНК.

Зростання попиту на високоякісні препарати нуклеїнових кислот зумовлено значним розширенням сфери їхнього застосування у різних галузях науки і виробництва: фундаментальних дослідженнях (біологія, космобіологія, молекулярна медицина, фармакологія), сільському господарстві (виведення високопродуктивних генетично модифікованих рослин і тварин), новітніх напрямках сучасної біо- та нанотехнології (генна інженерія, біосенсори, виробництво напівпровідників (нові матеріали) та засобів біоінформатики). Методи лабораторної діагностики генетичних захворювань стали доступними тільки після повного секвенування геному, дослідження структури і функцій ДНК. Для цього потрібно одержати максимально очищені від домішок і мінімально деградовані препарати ДНК з урахуванням особливостей тканин, їх хімічного складу (вмісту цукоридів, ліпідів, пігментів та інших сполук) й анатомічної будови (товщини клітинних стінок). Виділення і очищення нуклеїнових кислот – це перший крок у більшості молекулярно-генетичних досліджень та у всіх методиках, що пов'язані з рекомбінантними ДНК, полімеразною ланцюговою реакцією.

Біоматеріали – джерела ДНК та РНК, біобезпека

Тканини тваринного походження. ДНК та РНК із тканин теплокровних тварин можуть бути джерелом патогенних для людини вірусів, навіть невідомих, що є чинником небезпеки даної роботи. Традиційні джерела ДНК для наукових досліджень – тимус теляти і сперма лосося. Для виділення ДНК та РНК використовують кров та інші тканини, наприклад, тимус, печінка, мозок, селезінка.

Мікроорганізми. ДНК та РНК виділяють із клітин певних штамів мікроорганізмів. З цією метою не можна використовувати патогенні, умовнопатогенні штами та штами, що продукують токсини. ДНК та РНК з науковою метою отримують із кишкової палички, пивних (пекарських) дріжджів.

Рослини. Клітини цього типу характеризуються низьким сумарним вмістом нуклеїнових кислот та високою нуклеазною активністю, присутністю чималої кількості протеїнів, цукоридів, пігментів та інших клітинних агентів, позбутись яких буває дуже складно.

Одним із критеріїв якості препаратів нуклеїнових кислот є висока полімерність молекул. У процесі виділення ступінь деградації

цих біополімерів спричинений як дією клітинних нуклеаз, гідродинамічними впливами на цілісність молекул, так і біологічним віком вихідного біоматеріалу. Відомо, що онтогенез будь-якого організму супроводжується процесом старіння, внаслідок чого у клітинах відбувається поступова фрагментація ДНК. Це значно знижує вихід високополімерної нуклеїнової кислоти і потребує певної стандартизації біооб'єктів, які використовують для отримання нуклеїнових кислот.

Виділення ДНК складається з наступних етапів:

1. лізис клітин;
2. осадження протеїнів чи ферментативне руйнування протеїнів;
3. центрифугування для видалення денатурованих протеїнів і фрагментів клітинних органел;
4. осадження ДНК із розчину етанолом і після центрифугування розчинення осаду у буферному розчині.

Разом із ДНК частково виділяється РНК, яку деградує РНКаза.

Лізис (від грец. *λύσις* – «розділення») – руйнування живих клітин під дією хімічних або механічних агентів, наприклад, ензимів, вірусів (бактеріофагів), антибіотиків, детергентів, осмотичного шоку. Розчин, що утворюється у результаті, називається **лізатом** або клітинним екстрактом.

Способи лізису:

- механічне руйнування під дією гіпотонічного розчину чи за допомогою ультразвуку;
- хімічна обробка (дія детергентів – SDS (Натрію додецилсульфат);
- ферментативний лізис протеїнів (дія протеїнкінази К).

Осадження, осаджування – це сукупність хімічних реакцій, за допомогою яких досліджувані молекули або йони переходять у малорозчинні сполуки, які можна виділити з розчину у гравітаційному або відцентровому полі.

Для відділення протеїнів використовують комбінацію розчинників фенол:хлороформ; для осадження – метод селективної преципітації з використанням високих концентрацій солей («висолювання»); змінного рН.

Центрифугування для фракціонування денатурованих протеїнів і фрагментів клітинних органел проводиться за 15000 об/хв упродовж 15-ти хв.

Осадження ДНК із розчину можливе за дії етанолу 96%-ого, 70%-ого; ізопропанолу. Отриманий осад розчиняють у буферному розчині.

Використані у тексті аббревіатури:

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота (комплексон Ш, трилон Б, Na₂-ЕДТА) застосовують у вигляді дигідрату натрієвої солі;

NP-40 – октилфеноксиполіетоксиетанол, лізує цитоплазматичну мембрану, але не пошкоджує ядерну;

SDS – Натрію додецилсульфат, лізує ядерну мембрану;

Tris – тріс (гідроксиметил) амінометану (НОСН₂)₃СNH₂ для розчинення нуклеїнових кислот;

Буфер TE – буфер, який часто використовується для виділення і маніпуляцій з ДНК, кДНК і РНК. Назва буфера – аббревіатура його компонентів: *Tris* і ЕДТА, що хелатує катіони металів, наприклад, Mg²⁺. Буфер TE використовується для розчинення ДНК чи РНК і запобігання деградації нуклеїнової кислоти.

Приклади приготування розчинів у розділі «Приготування окремих розчинів».

Лабораторна робота №2

Тема: Виділення загальної (тотальної) ДНК із культури бактерій (*Dhaese et al., 1979*)

Мета роботи: ознайомлення з методами підготовки і руйнування культури бактеріальних клітин для виділення нуклеїнових кислот; опанування методу виділення тотальної ДНК із культури бактерій.

Завдання:

1. Деградувати клітини бактерій та провести протеїнізацію.
2. Осадити ДНК.

Матеріали та обладнання, реактиви

Мікроцентрифуга, центрифуга, вортекс, шейкер інкубатор, термостат, мікропіпетки-дозатори, ламінарний бокс, витяжна шафа, вага, водяна баня; лабораторний посуд, дозатори з одноразовими наконечниками;

штам ентеробактерії кишкової палички *Escherichia coli*. У пробірці з 5-ма мл рідкого живильного середовища 2YT вирощувати культуру бактеріальних клітин упродовж ночі з аерацією за 37°C;

Середовище 2YT. Приготування на 1 л: триптон – 16 г; дріжджовий екстракт – 8 г; NaCl – 5 г. Довести до 1 л дистильованою водою, рН середовища 7,0. Задля отримання твердого середовища до нього додають перед автоклавуванням агар до 1,5%;

5%-ий SDS. 5%-ий розчин Натрію додецилсульфату у буфері TE;

Проназа або протеїнкаіназа K. Розчин 5 мг/мл у буфері TE;

Буфер TE. 10мМ Tris-HCl, рН 8,0; 1мМ ЕДТА;

5М NaCl. Розчинити 292,5 г NaCl у 800 мл води та довести об'єм до 1 л;

Суміш фенол : хлороформ. Водонасичений фенол (насичений після перегонки 0,1М Tris-HCl, рН 8,0) змішують у пропорції 1:1 із заздалегідь приготованою сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт;

Суміш хлороформ : ізоаміловий спирт. Речовини змішують у пропорції 24:1 за об'ємом.

Ізопропанол;
РНКаза А;
Етиловий спирт (70%).

Виділення загальної або тотальної ДНК із клітин бактерій за використання Натрію додецилсульфату, протеїназ та фенолу (*Dhaese et al., 1979*) є досить поширеним підходом. Метод простий і надійний.

Разом з хромосомною ДНК виділяється також плазмідна і фагова ДНК за її наявності у клітині, а також РНК.

Плазматична мембрана бактеріальної клітини за використання цього методу руйнується під дією детергенту Натрію додецилсульфату (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) – однієї з найбільш поширених поверхнево-активних речовин (ПАР). Цілісність пептидогліканового шару теж порушується. Шляхом обробки бактеріального лізату фенолом, який денатурує протеїни, але не діє на нуклеїнові кислоти, видаляють усі протеїни, протеїни нуклеоїда також. Інші органічні сполуки клітини і низькомолекулярні речовини втрачаються при осаджуванні ДНК етанолом, оскільки залишаються в розчині. Отриманий у результаті центрифугування взірця осад нуклеїнових кислот, дезоксирибонуклеїнової і рибонуклеїнової, розчиняють у спеціальному буфері для зберігання ДНК – буфері TE. Хелатуючий агент, що входить до його складу – етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) запобігає впливу на ДНК клітинних нуклеаз, оскільки зв'язує необхідні для їх роботи катіони Mg^{2+} .

Хід роботи

1. Мікропіпеткою перенесіть 1,5 мл культури штаму ентеробактерії кишкової палички *Escherichia coli* у мікроцентрифужну пластикову пробірку об'ємом 1,7 мл. Осадіть клітини центрифугуванням (5 хв за 10000 об/хв) Зауважте, що це найчастіше використовувана швидкість мікроцентрифуги, її встановлюють за замовчуванням, якщо не вказана інша швидкість.
2. Видаліть супернатант (надосадову рідину).
3. Внесіть до осаду 300 мкл буфера TE та ресуспендуйте клітини.

4. До суспензії клітин внесіть 100 мкл 5%-ого розчину SDS, перемішайте.
5. Внесіть 150 мкл розчину пронази (5мг/мл), перемішайте.
6. Інкубуйте 1-0,5 год у термостаті за 37°C. Відбувається лізис клітин та ферментативний гідроліз протеїнів.
7. Осадити нуклеїнові кислоти із лізату спиртом. Для цього внести у пробірку рівний об'єм ізопропанолу (550 мкл) та центрифугувати упродовж 10-ти хвилин. (Після внесення спирту за необхідності можна перервати дослід; не центрифугувати пробу відразу, а залишити її у холодильнику. «Під спиртом» ДНК може зберігатися довгий час).
8. Розчиніть осад нуклеїнових кислот у 500 мкл буфера TE.
9. Внесіть рівний об'єм (500 мкл) суміш фенол:хлороформ, перемішайте, використовуючи вортекс;
10. Шляхом центрифугування (5 хв за 10000 об/хв) розділіть водну та органічну фази. Фенол залишається внизу, у водній фазі розчиняється ДНК. Денатуровані фенолом нуклеопротеїни втрачають розчинність і збираються під час центрифугування на межі розподілу фаз. Отже, відбулась екстракція ДНК із дезоксирибонуклеопротеїнового комплексу.
11. Перенесіть мікропіпеткою фазу, що містить ДНК, у чисту на 1,7 мл пробірку.
12. Ще раз екстрагуйте ДНК хлороформом для того, щоб позбутись фенолу: у пробірку внесіть рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт, змішайте, центрифугуйте 5 хв за 10000 об/хв. Супернатант перенесіть у чисту пробірку.
13. Оцініть мікропіпеткою-дозатором або за мітками на пробірці об'єм водної фази, що отримали, і внесіть 1/25 об'єму 5М NaCl до кінцевої концентрації солі 0,2М. Потім внесіть 2,5 об'єму холодного (-20°C) етанолу для осадження ДНК, точніше її натрієвої солі. Залиште на 1-2 години у морозильнику за температури -20°C. Можна залишати ДНК під спиртом й довше, доки взірець буде потрібен.
14. Осадіть нуклеїнові кислоти центрифугуванням упродовж 10-ти хв. за максимальної швидкості мікроцентрифуги. Злийте супернатант, промийте осад. Для цього до осаду внесіть 1 мл холодного 70%-ого етанолу, центрифугуйте 3 хв за 10000 об/хв. Злийте етанол, висушіть проби, не пересушуйте.

15. Позбутися РНК можна за допомогою ензиму РНКазу. До супернатанту внесіть РНКазу А, розчинену в ТЕ буфері до кінцевої концентрації 5 мг/мл, та інкубуйте 2 год за 56°C, відцентрифугуйте, промийте осад (п. 14).
16. Розчиніть осад в 50 мкл буфера ТЕ. Для електрофорезу ДНК достатньо 5–10 мкл взірця.

Висновки: _____

Лабораторна робота №3

Тема: Виділення загальної (тотальної) ДНК із культури тваринних клітин *BALB 3T3*

*Мета роботи: ознайомлення з методами підготовки і руйнування культури тваринних клітин для виділення нуклеїнових кислот; опанування методу виділення тотальної ДНК із культури тваринних клітин *BALB 3T3*.*

Завдання:

1. Деградувати клітини бактерій та провести протеїнізацію.
2. Осадити ДНК.

Матеріали та обладнання, реактиви

Мікроцентрифуга, центрифуга, вортекс, термостат, мікропіпетки-дозатори, ламінарний бокс, витяжна шафа, вага, водяна баня; лабораторний посуд, культура тваринних клітин.

Лізувальний буфер (20 мМ ЕДТА, 1% NP-40 (октилфеноксиполіетоксиетанол, лізує цитоплазматичну мембрану, але не пошкоджує ядерну), 50 мМ *Tris*-HCl, рН 7,5);

Натрію додецилсульфат (10%) (розчин див. лабораторна робота №2);

РНКаза А (розчин див. лабораторна робота №2);

Протеїназа К (розчин див. лабораторна робота №2);

Буферний розчин TE (50 мМ *Tris*-HCl, рН 7,5; 20 мМ ЕДТА);

Амонію ацетат 10М;

Ізопропанол;

Етиловий спирт (80%).

Хід роботи

1. ДНК виділяють з культури тваринних клітин. Для цього потрібна суспензія культури тваринних клітин (3×10^6 клітин).
2. Біомасу клітин ресуспендуйте у лізувальному буфері впродовж 10-ти хв. на льоді. Лізувальний буфер вносять у розрахунку 10 мкл буферу на 10^6 клітин.

3. Осад клітин (біомасу) ресуспендуйте й центрифугуйте двічі впродовж 5-ти хв за 3000 g, відбираючи й об'єднуючи надосадову рідину, до якої вносять Натрію додецилсульфат 10%-ий до кінцевої концентрації 1%.
4. До об'єданого супернатанту внесіть РНКазу А, розчинену у ТЕ буфері до кінцевої концентрації 5 мг/мл, та інкубуйте 2 год за 56°C.
5. До розчину внесіть протеїназу К до кінцевої концентрації 2,5 мг/мл та інкубуйте 2 год за 37°C.
6. Після інкубації до проб внесіть 10М амонію ацетат (1/2 об'єму від загального).
7. Після перемішування внесіть охолоджений пропанол (2 об'єми від загального).
8. Проби залишіть на ніч за -20°C.
9. ДНК осаджуйте центрифугуванням упродовж 20-ти хв за 14000 об./хв.
10. Осад промийте 80%-им етиловим спиртом та розчиніть у буфері ТЕ з розрахунку 5–10 мкл/мл клітин.

Висновки: _____

Лабораторна робота №4

Тема: Виділення рибонуклеопротейнів і виявлення РНК

Мета роботи: ознайомлення з методом виділення рибонуклеопротейнів з біоматеріалу і якісним аналізом на присутність у ньому РНК.

Матеріали, обладнання та реактиви

Фарфорова ступка, мірний циліндр, центрифужні пробірки, хімічні стакани на 50 мл, пробірки, піпетки, водяна баня, центрифуга, ваги;

Дріжджі;

0,4%-ий розчин Натрію гідроксиду;

5%-ий розчин ацетатної кислоти;

дифеніламіновий реактив.

Виділення рибонуклеопротейнів ґрунтується на екстрагуванні їх розчином луґу з наступним переосадженням розчином ацетатної кислоти. Для якісного визначення рибонуклеопротейнів проводять реакцію з дифеніламіновим реактивом. При нагріванні розчину, що містить рибонуклеопротейни, з дифеніламіновим реактивом рідина поступово набуває зеленого забарвлення. Реакція зумовлена присутністю рибози, яка вивільняється під час гідролізу рибонуклеопротейнів.

Хід роботи

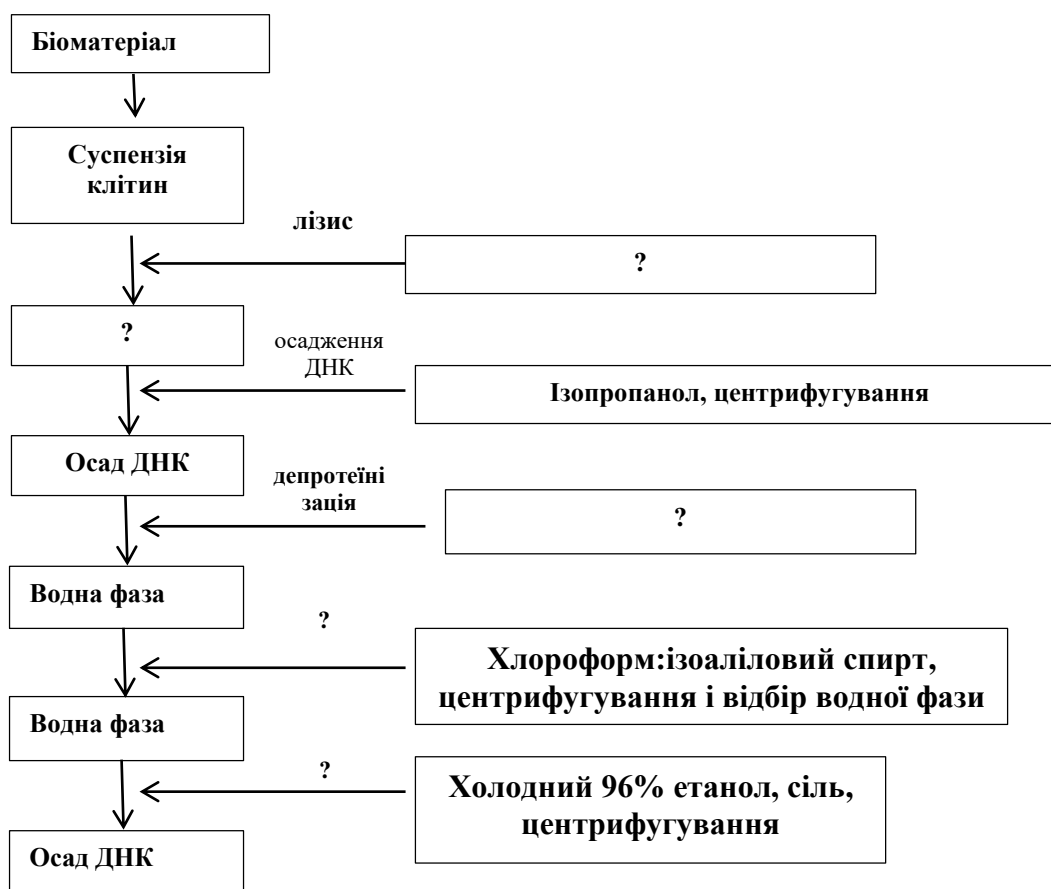
1. 5 г дріжджів гомогенізуйте у фарфоровій ступці з кварцевим піском, поступово екстрагуйте 40–50-ма мл 0,4%-им розчином Натрію гідроксиду, упродовж 15-ти хв.
2. Отриманий гомогенат перенесіть у центрифужні пробірки і відцентрифугуйте за 3000 об/хв упродовж 10-ти хв.
3. Центрифугат злийте у чистий стакан та переосадіть нуклеопротейни додаванням по краплях 10–15 мл 5%-ого розчину ацетатної кислоти і постійному перемішуванні (до повного осадження).
4. Суміш знову відцентрифугуйте за 3000 об/хв упродовж 10-ти хв. Надосадову рідину злийте, а з осадом проведіть якісну реакцію на РНК з дифеніламіновим реактивом.

5. Результати опишіть у висновку.

Висновок:

Питання для самоконтролю:

Доповніть загальну схему виділення ДНК

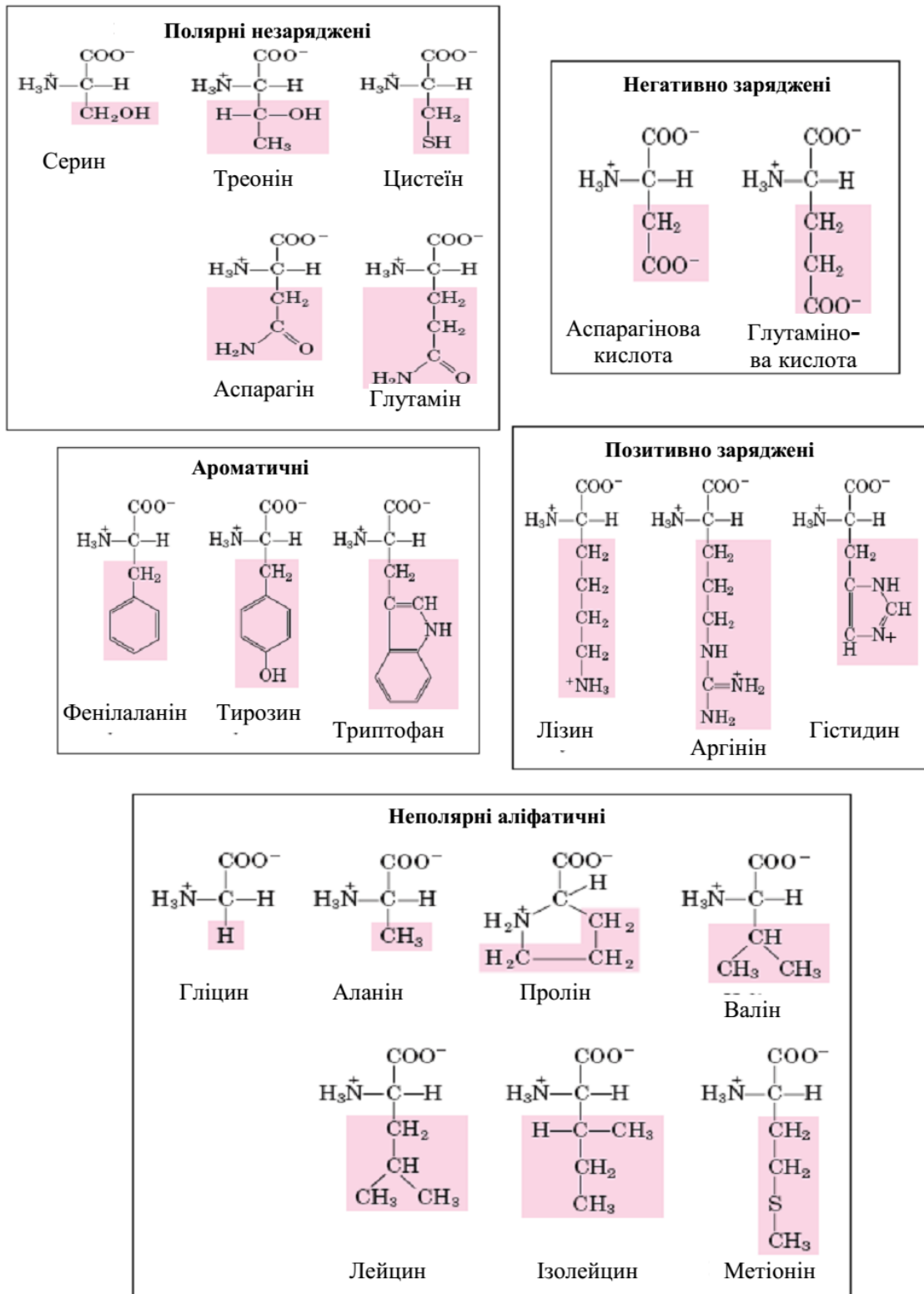


1. Нуклеїнові кислоти, структура нуклеотиду.
2. Правило Чаргаффа.
3. Охарактеризуйте первинну, вторинну, третинну структури ДНК.
4. Рівні суперспіралізації ДНК.
5. Протеїни гістони.
6. Негістонові протеїни.
7. Опишіть алгоритм дії за виділення ДНК.

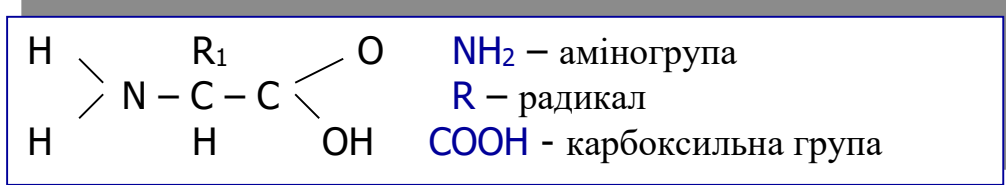
ТЕМА 2: СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНІВ

Структура амінокислот, протеїнів. Рівні організації.

Амінокислоти – органічні сполуки, похідні карбонових кислот, у яких атом Гідрогену заміщений аміногрупою. Залишки α -амінокислот є мономерами протеїнів. Структура 20-ти протеїногенних α -амінокислот:



Загальна формула амінокислот:



За біологічним значенням амінокислоти поділяють на:

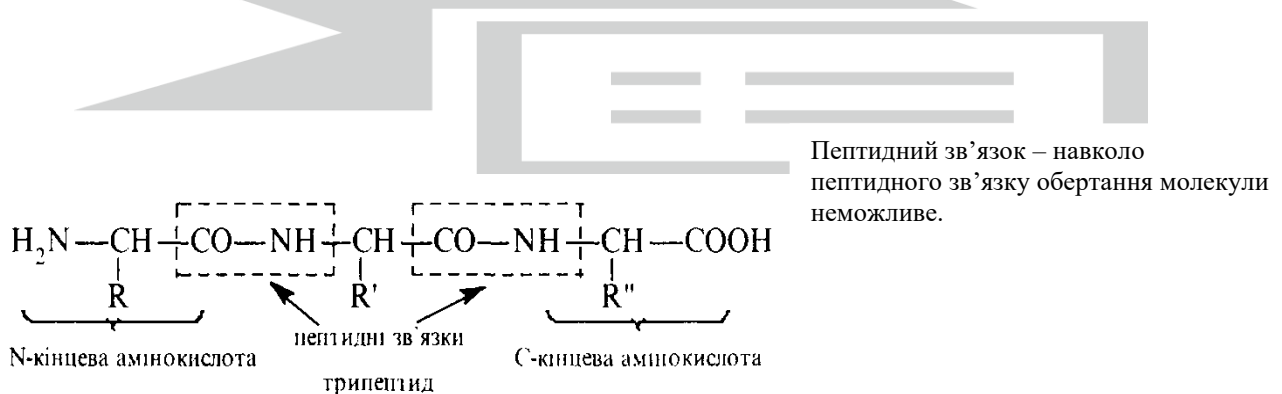
- Замінні – синтезуються в організмі;
- Незамінні – в організмі не утворюються, їх отримуємо з їжею;
- Абсолютно незамінних амінокислот є 8: валін, лейцин, ізолейцин, треонін, лізин, метіонін, фенілаланін і триптофан.

За приєднанням до атома Карбону аміно- (або іміно-) групи, амінокислоти поділяються на α , β , γ і т.д. При цьому:

- α -амінокислотами називаються такі, у яких карбоксильна та аміногрупа приєднані до одного й того ж атому Карбону;
- β -амінокислоти – аміногрупа приєднана до атому Карбону, сусіднього з тим, до якого приєднана карбоксильна група;
- γ -амінокислоти – аміногрупа приєднана через один атом Карбону від карбоксильної.

Первинна структура протеїнів.

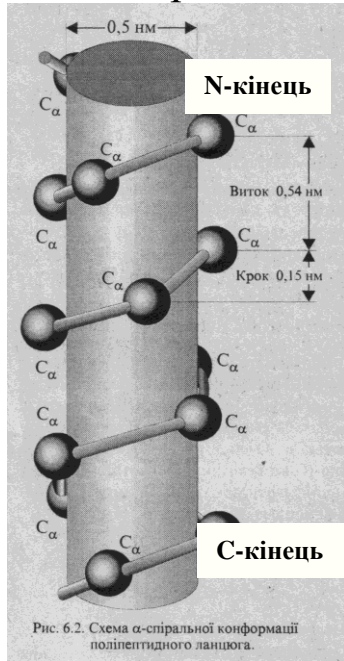
Під час взаємодії двох амінокислот відбувається реакція **конденсації** з утворенням пептидного зв'язку.



Первинна структура безпосередньо кодується послідовністю кодонів на мРНК і реалізується під час трансляції.

Вторинна структура протеїнів – впорядковані ділянки поліпептидних ланцюгів, що стабілізуються водневими зв'язками, міжпептидними -CO- і -NH-групами. У одного й того ж **глобулярного** протеїна можуть зустрічатись різні види вторинної структури, а також безструктурні ділянки. **Фібрилярні** протеїни, як правило, однорідні.

Типи вторинних структур:



α -спіраль (міозин, тропоміозин, α -кератин)

На один виток α -спіралі припадає 3,6 амінокислотних залишка (рис. 1).

Стабілізують α -спіраль:

Ala, Val, Leu, Phe, Trp, Met, His, Gln.

Дестабілізують α -спіраль:

Gly, Glu, Asp, Ile, Lys, Arg, Tyr, Asn, Ser, Cys.

Pro зазвичай розташований на повороті α – спіралі.

Рис. 1. Структура α -спіралі

β -складчаста структура (фіброїн шовку, β -кератин). β -складчаста структура чи «складчастий лист» – це асоціат витянутих зигзагоподібних пептидних ланцюгів, стабілізований міжланцюговими водневими, -CO - і -NH- зв'язками.

Поліпептидний ланцюг, що містить певне число ділянок вторинної структури, зазвичай згортається у відносно компактну систему, у якій елементи вторинної структури взаємодіють між собою і ділянками неупорядкованої структури. Під **третинною структурою** розуміють конформацію глобули, тобто укладання у просторі α -спіральних, β -структурних та безструктурних ділянок пептидного ланцюга. На відміну від вторинної, третинна структура утримується за рахунок безпосередніх зв'язків між радикалами амінокислот. Внаслідок вільного обертання навколо α -вуглецевих атомів радикали можуть по-різному орієнтуватись у просторі, формуючи зв'язки зі спорідненими групами і забезпечуючи термодинамічно вигідну структуру молекули. За рахунок них утворюються дисульфідні містки, складноестерні, водневі, амідні зв'язки.

Поліпептидний ланцюг глобулярних протеїнів містить багато гідрофільних полярних радикалів, які орієнтуються назовні глобули, утворюючи водневі зв'язки з молекулами води. Гідрофобні радикали переважно занурюються всередину глобули, уникаючи контактів із водним середовищем, і утворюють між собою гідрофобні зв'язки.

Оскільки кожен радикал є полярним (гідрофільним), або неполярним (гідрофобним), то водневі і гідрофобні зв'язки відіграють вирішальну роль у формуванні глобули. Утворена компактна кулеподібна структура стабілізується більш міцними йонними та дисульфідними зв'язками.

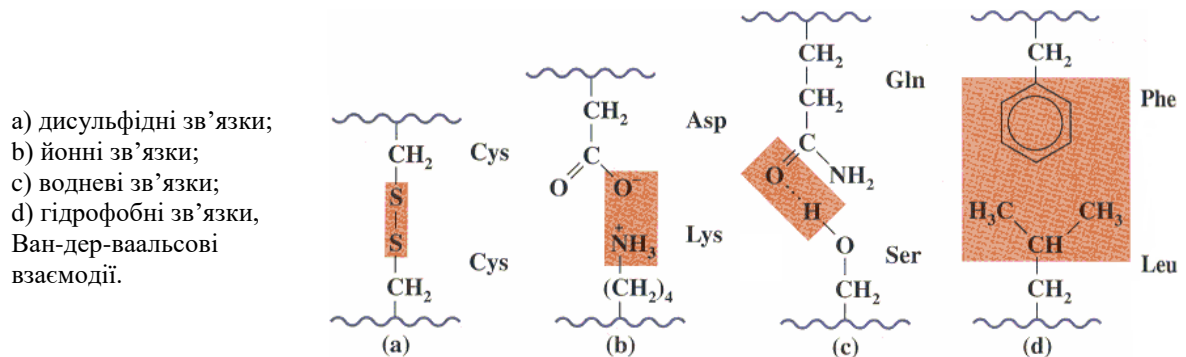


Рис. 2. Типи зв'язків, які стабілізують третинну структуру протеїнів

Четвертинна структура – це об'єднання кількох третинних структур (глобул) в одне ціле. Класичний приклад: гемоглобін, хлорофіл. У гемоглобіну гем – непротеїнова частина, глобін – протеїнова частина.

Лабораторна робота №5

Тема: Якісні реакції на присутність амінокислот, протеїнів у розчині

Мета роботи: оволодіти методами якісного аналізу амінокислот, протеїнів. Ознайомлення з теоретичними основами якісних реакцій на ці речовини.

Завдання:

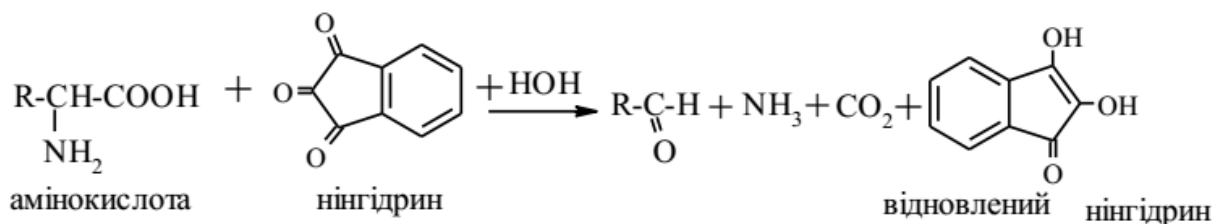
1. Виконати нінгідринову реакцію.
2. Виконати реакцію з нітритною кислотою і α -амінокислотами.
3. Виконати реакцію на виявлення α -амінокислот, за утворення комплексної солі Купруму.
4. Виконати біуретову реакцію на пептидні зв'язки.
5. Виконати ксантопротеїнову реакцію.

Завдання 1. Виконати нінгідринову реакцію.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, штатив з пробірками, крапельниці, водяна баня, термометр, годинник, тримач пробірок, лопатка, пальник;
1%-ий розчин гліцину;
0,1% -ий розчин нінгідрину у 95%-ому розчині ацетону.

Нінгідринова реакція – це реакція ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи. При взаємодії з нінгідрином протеїнів, пептидів, вільних α -амінокислот розчин набуває синього або синьо-фіолетового забарвлення (барвник Руемана). Реакція характерна для аміногруп, що знаходяться в α -положенні. α -амінокислоти під час нагрівання до 70°C з нінгідрином перетворюються на альдегіди з виділенням Амоніаку і вуглекислоти. Нінгідрин при цьому відновлюється:



Відновлений нінгідрин конденсується з Амоніаком та окисненим нінгідрином і утворює сполуку, яка енолізується і

переходить у забарвлену форму, синьо-фіолетового кольору барвник Руемана:



Хід роботи

1. У пробірку внесіть 5 крапель розчину гліцину та 2-ві краплі розчину нінгідрину.
2. Вміст пробірки ретельно перемішайте на водяній бані за 70°C упродовж 15-ти хв.
3. У пробірці спостерігайте синьо-фіолетове забарвлення.

Висновки: _____

Завдання 2. Реакція з нітритною кислотою

Матеріали, обладнання та реактиви

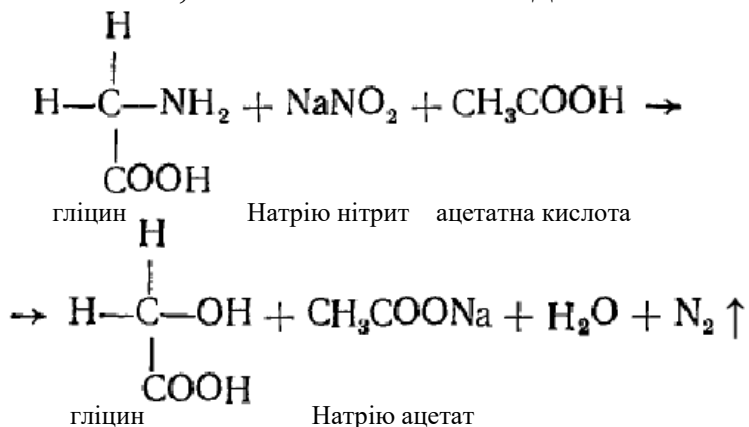
Скляні палички, штатив з пробірками, крапельниці;

1%-ий розчин гліцину;

5%-ий розчин Натрію нітриту;

концентрована ацетатна кислота.

Продуктом взаємодії α-амінокислоти з нітритною кислотою, яка утворюється у результаті реакції Натрію нітриту з ацетатною кислотою, є газоподібний Нітроген. Рівняння реакції:



Хід роботи

1. У пробірку внесіть 5 крапель розчину гліцину, 5 крапель Натрію нітриту, 2 краплі концентрованої ацетатної кислоти й обережно перемішайте.
2. Спостерігайте виділення газу.

Висновки: _____

Завдання 3. Утворення комплексної солі Купруму

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, штатив з пробірками, крапельниці, водяна баня, термометр, годинник, тримач пробірок, лопатка, пальник;
1%-ий розчин гліцину;
сухий Купруму (II) карбонат.

Під час нагрівання розчину амінокислоти з Купруму (II) карбонатом утворюється комплексна сполука Купруму, яка надає розчину синього забарвлення. За участю гліцину рівняння реакції має такий вигляд:



Хід роботи

1. У пробірку внесіть 1 мл розчину гліцину, а на кінчику лопатки – сухий Купруму (II) карбонат.
2. Суміш нагрійте у полум'ї пальника до кипіння.
3. Спостерігайте забарвлення розчину у синій колір.

Висновки: _____

Завдання 4. Біуретова реакція на пептидні зв'язки

Матеріали, обладнання та реактиви

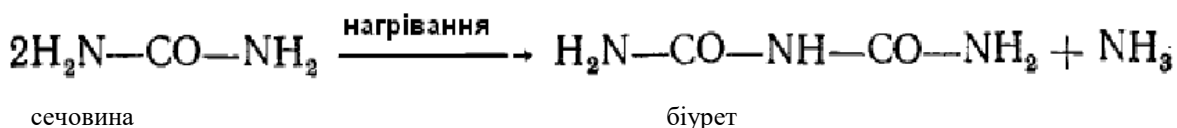
Скляні палички, штатив з пробірками, крапельниці, водяна баня, термометр, годинник, тримач пробірок, лопатка, пальник; суха сечовина;

10%-ий розчин Натрію гідроксиду;

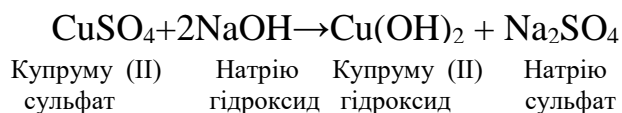
10%-ий розчин Купруму (II) сульфату.

Сполуки амінокислот, які містять не менше двох пептидних зв'язків ($-\text{CO}-\text{NH}-$), у лужному середовищі за наявності Купруму (II) сульфату утворюють комплекси з атомами Купруму, що забарвлені у фіолетовий колір.

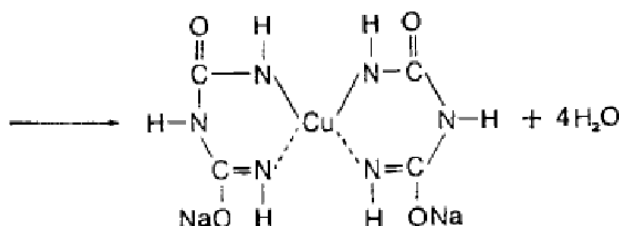
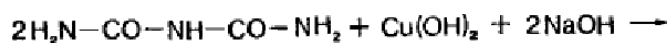
Вперше реакція утворення таких комплексних сполук Купруму проведена з Біуретом, що і зумовило назву «біуретова». Біурет, який можна отримати під час нагрівання сечовини до температури 180°C , не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки:



Купруму (II) гідроксид для проведення біуретової реакції одержують, як правило, у результаті реакції взаємодії Купруму (II) сульфату з Натрію гідроксидом:



Комплекс біурету з Купрумом утворюється за схемою:



Хід роботи

1. У пробірку внесіть сечовину на кінчику лопатки, обережно нагрійте на пальнику до розплавлення.
2. Охолодіть, внесіть 0,5 мл розчину Натрію гідроксиду, 2-3 краплі розчину Купруму (II) сульфату та перемішайте.
3. Спостерігайте зміну забарвлення вмісту пробірки у синьо-фіолетовий колір.

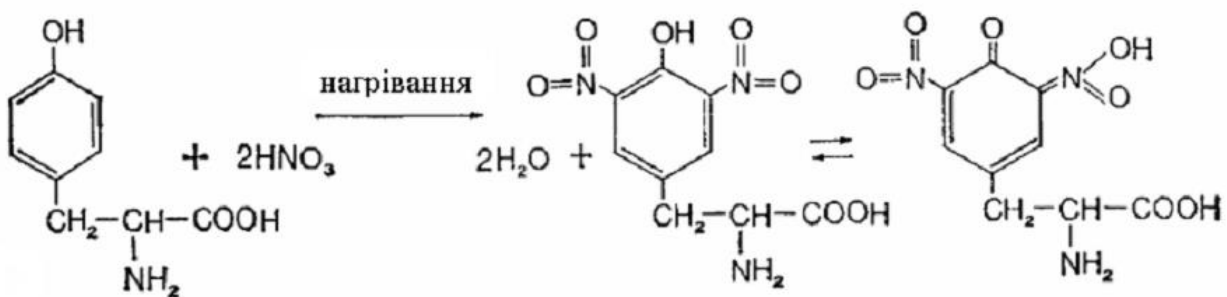
Висновки: _____

Завдання 5. Ксантопротеїнова реакція

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, штатив з пробірками, крапельниця, водяна баня, термометр, годинник, тримач пробірок, лопатка, пальник;
0,01%-ий розчин тирозину;
концентрована нітратна кислота;
10%-ий розчин Натрію гідроксиду.

При взаємодії з концентрованою нітратною кислотою протеїни, пептиди, що містять залишки циклічних амінокислот з ароматичними кільцями (фенілаланін, тирозин, триптофан), а також вільні вище вказані амінокислоти нітруються з утворенням динітропохідних жовтого кольору, які при внесенні лугу перетворюються на хіноїдні структури, забарвлені в оранжевий колір:

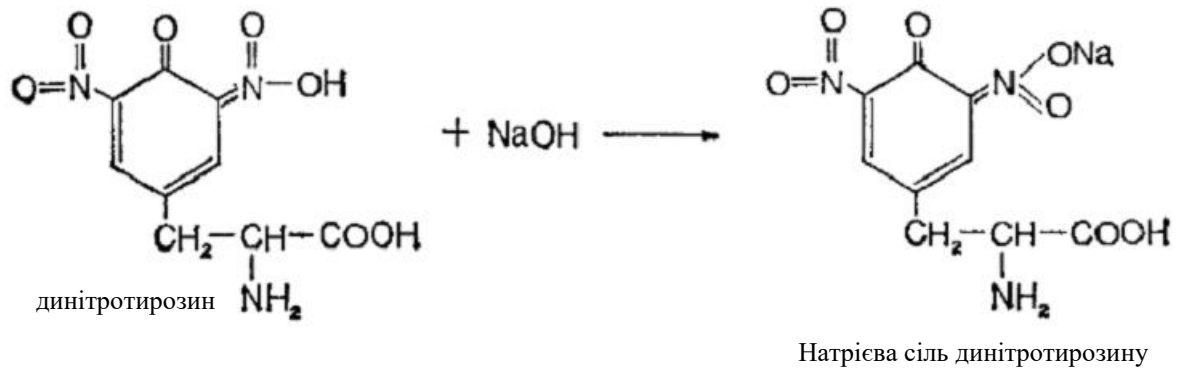


тирозин

динітротирозин

У реакції Натрію гідроксиду з хіноїдною формою утворюється

натрієва сіль динітротирозину, яка надає розчину оранжевого забарвлення:



Хід роботи

1. У пробірку внесіть 3 мл розчину тирозину та 1 мл концентрованої нітратної кислоти.
2. Суміш обережно нагрійте. Після охолодження в пробірку внесіть розчин Натрію гідроксиду.
3. Після нагрівання спостерігайте жовте забарвлення.
4. Після охолодження спостерігайте оранжеве забарвлення у пробірці.

Висновки: _____

Властивості протеїнів.

Розчинність різних протеїнів у воді і різних розчинниках неоднакова і залежить від природи протеїна й розчинника, значення рН, температури, йонної сили тощо. У кислому середовищі краще розчиняються протеїни, для яких характерні кислотні властивості, а в лужному – протеїни, з основними властивостями. Альбуміни добре розчиняються у дистильованій воді, а глобуліни розчинні у воді тільки за присутності електролітів. Протеїни опорних тканин (кератини, колаген, еластин) не розчиняються у воді й сольових розчинах, у воді вони лише набрякають. Розчинність протеїнів у воді зростає за невеликих концентрацій нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Цей ефект називають сольовим розчиненням. Нейтральні солі у малих концентраціях збільшують ступінь дисоціації йонізованих груп протеїнів, екранують заряджені групи молекул протеїнів і цим зменшують протеїн-протеїнові взаємодії. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висолюють) протеїни з водних розчинів; найактивніше це відбувається у ізоелектричній точці протеїну. При цьому солі відтягують на себе від заряджених груп протеїна поляризовані молекули води, чим частково позбавляють протеїн гідратної оболонки, яка запобігає його осадженню з розчину.

Реакції осадження протеїнів. Внаслідок кип'ятіння більшості протеїнів порушуються зв'язки, притаманні нативній структурі молекули протеїна. Найкращий спосіб осадження протеїнів – кип'ятіння у середовищах зі значенням рН, рівним ізоелектричній точці протеїнів.

Ізоелектрична точка протеїну – це таке значення рН розчину, при якому сумарний заряд молекули протеїна дорівнює нулю. Протеїн у ізоелектричному стані є нестабільним і легко осаджується.

Протеїни можуть осаджуватися внаслідок *висолювання*, що має місце за умов високої концентрації середніх солей (Амонію сульфату, Натрію хлориду) у розчині. Мінеральні та деякі органічні кислоти, органічні розчинники осаджують протеїни унаслідок денатурації та дегідратації молекул протеїнів, а також у результаті утворення комплексних солей кислот з протеїнами. Солі важких металів (Купруму, Цинку, Плюмбуму) осаджують протеїни у результаті утворення комплексних сполук з сульфгідрильними групами протеїнів. Осад протеїну в надлишку деяких солей важких металів (Плюмбуму ацетату, Купруму сульфату) може розчинятися.

Лабораторна робота №6

Тема: Властивості протеїнів

Мета роботи: Опрацювати методи осадження протеїнів.

Завдання:

1. Опрацювати метод осадження протеїнів нагріванням.
2. Опрацювати метод осадження протеїнів мінеральними кислотами.
3. Опрацювати метод осадження протеїнів йонами важких металів.
4. Опрацювати методи осадження протеїнів органічними розчинниками.
5. Опрацювати метод осадження протеїнів Натрієм хлористим.

Завдання 1. Осадження протеїнів нагріванням.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, пробірки у штативі (5 шт.), піпетки градуйовані, електроплита.

- 1%-ий розчин яєчного білка;
- Насичений розчин Натрію хлориду;
- 10%-ий розчин Натрію гідроксиду;
- 0,1 М розчин ацетатної кислоти.

Хід роботи

1. Щоб порівняти залежність осадження протеїнів від концентрації водневих йонів, у 5 пробірок внесіть по 3 мл розчину яєчного протеїну.
2. Нейтральний розчин протеїна у першій пробірці нагрійте до кипіння. **Очікуваний результат:** вміст у першій пробірці мутнішає, спостерігається опалесценція, що зумовлена руйнуванням гідратної оболонки навколо молекули протеїна та збільшенням протеїнових часток. Але міцели протеїна заряджені, тому залишаються у розчині, не випадаючи в осад.
3. Розчин у другій пробірці нагрійте до кипіння, внесіть 1 мл розчину ацетатної кислоти до появи слабкокислої реакції. **Очікуваний результат:** внаслідок відстоювання протеїн

- випадає в осад. За цих умов частинки протеїна втрачають заряд, тому що рН середовища близьке до ізоелектричного стану.
- У третю пробірку внесіть 1 мл розчину ацетатної кислоти для створення кислої реакції середовища. Кип'ятіть. **Очікуваний результат:** під час кип'ятіння розчину осад не утворюється, оскільки молекули протеїна набувають позитивного заряду, що підвищує їх стійкість.
 - У четверту пробірку внесіть 1 мл розчину ацетатної кислоти, 2 мл насиченого розчину Натрію хлориду та нагрійте. **Очікуваний результат:** випадає білий осад. Його утворення спричинене тим, що протеїн внаслідок взаємодії з йонами Натрію хлориду втрачає свій заряд.
 - У п'яту пробірку внесіть 2 мл розчину Натрію гідроксиду для створення лужного середовища. Кип'ятіть. **Очікуваний результат:** під час кип'ятіння рідини осад не утворюється, оскільки в лужному середовищі збільшується від'ємний заряд.

Висновки: _____

Завдання 2. Осадження протеїнів мінеральними кислотами.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, пробірки зі штативом;

1%-ий розчин яєчного білка;

Концентрована нітратна кислота.

Хід роботи

1. У пробірку внесіть 3 мл концентрованої нітратної кислоти.
2. По стінках пробірки обережно, щоб рідини не перемішувались, внесіть 3 мл розчину яєчного білка.
3. На межі розподілу двох рідин спостерігайте осад у вигляді білкового кільця (проба Гелера).
4. Вміст перемішайте, внесіть надлишок нітратної кислоти й пересвідчіться, що осад не зникає.

Висновки: _____

Завдання 3. Осадження протеїнів йонами важких металів.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, пробірки у штативі, крапельниці, піпетки градуйовані;

1%-ий розчин яєчного білка;

0,1%-ий розчин Купруму (11) сульфату;

1%-ий розчин Купруму (11) ацетату.

Хід роботи

1. У дві пробірки внесіть по 3 мл розчину яєчного білка.
2. У першу – дві-три краплі розчину Купруму (11) сульфату.
3. У другу – дві-три краплі розчину Плюмбуму (11) ацетату.

Очікуваний результат.

Спостерігають утворення осаду (з сіллю Купруму – блакитного кольору, Плюмбуму – білого). Внаслідок внесення надлишку розчинів солей осад, що утворився, розчиняється.

Висновки: _____

Завдання 4. Осадження протеїнів органічними розчинниками.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, пробірки у штативі;

1%-ий розчин яєчного білка;

95%-ий розчин ацетону.

Хід роботи

1. У пробірку внесіть 3 мл розчину яєчного білка.

2. Внесіть до розчину 3 мл ацетону.

Очікуваний результат.

Розчин у пробірці мутніє. Якщо у пробірку внести 1 мл насиченого розчину Натрію хлориду, через деякий час протеїн випадає в осад.

Висновки: _____

Завдання 5. Осадження протеїнів Натрієм хлористим.

Матеріали, обладнання та реактиви

Складчасті паперові фільтри, скляні палички, пробірки у штативі.

1%-ий розчин яєчного білка;

Насичений розчин Натрію хлориду;

0,1 М розчин ацетатної кислоти.

Хід роботи

1. У пробірку внесіть 3 мл розчину яєчного білка та Натрію хлориду до повного насичення.
2. Через кілька хвилин в осад випадають глобуліни.
3. Суміш фільтруйте через складчастий паперовий фільтр. У фільтраті містяться альбуміни, які не осаджуються.
4. До фільтрату внесіть 1 мл розчину ацетатної кислоти й нагрійте суміш до кипіння на водяній бані.
5. Альбуміни випадають в осад.

Висновки: _____

Лабораторна робота №7

Тема: Концентрування протеїнів шляхом осадження ТХО

Мета роботи: опрацювати метод осадження протеїнів ТХО зодля наступного концентрування розчину.

Завдання:

1. Осадити протеїни.
2. Концентрувати розчин протеїнів.

Матеріали, обладнання та реактиви

Лід, штатив з пробірками, піпетки, дозатори з наконечниками, центрифуга;

Трихлорацетатна кислота;

0,15%-ий Натрію дезоксихолат (зберігати за кімнатної температури);

суміші етанол : етер (1:1);

0,1 н NaOH;

буфер PBS;

розчин протеїна.

Метод осадження протеїнів трихлороцтовою кислотою важливий, коли концентрація протеїнів у колоїдному розчині занадто мала для аналізу або об'єм розчину дуже великий, щоб нанести потрібну кількість протеїнів в лунку гелю при електрофорезі. Осад розчиняють у меншому об'ємі буфера, концентруючи таким чином розчин протеїнів.

Хід роботи

1. Якщо мінімальна концентрація протеїнів у розчині близько 5 мкг/мл, то до розчину протеїнів внесіть 1/10 об'єму 100% ТХО.
2. Якщо мінімальна концентрація протеїну менше 1 мкг/мл, то до розчину протеїнів внесіть 1/10 об'єму 0,15%-ого Натрію дезоксихолату (співосаджувач), витримайте 10 хв за кімнатної температури і внесіть 1/20 первісного об'єму 100%-ої ТХО.
3. Інкубуйте 30 хв на льоді або 15 хв за -20°C .
4. Центрифугуйте 5–10 хв за максимальної швидкості центрифуги.

5. Відберіть супернатант піпеткою. Протеїни – в осаді.
6. Далі можна розчинити осад у 50–100 мкл 0,1 н NaOH і промити 1 мл суміші етанол : етер (1:1). Для повного видалення залишків ТХО ретельно промийте кілька разів поспіль.
7. Центрифугуйте на максимальній швидкості мікроцентрифуги. Супернатант відкиньте. Осад протеїнів розчиніть у меншому об'ємі буфера PBS.

Висновки: _____

Розділення амінокислот, протеїнів.

Розділення багатоконпонентних сумішей можна здійснювати різними процесами хімічної технології. Розділення суміші не спричиняє особливих труднощів, якщо її компоненти знаходяться в різних фазах. Воно суттєво ускладнюється, якщо компоненти суміші утворюють одну фазу. В цьому випадку необхідно змінювати агрегатний стан окремих компонентів (наприклад, домогтися випадання їх в осад), або застосовувати хімічні чи фізичні методи розділення. В основі останніх лежать кінетичні явища або фазові рівноваги.

Такі широко відомі методи розділення багатоконпонентних сумішей як дистиляція, кристалізація, екстракція, діаліз і адсорбція базуються на зміні фазових рівноваг. В цих процесах молекули речовин, які утворюють однофазову суміш, у певній системі з різних фаз переходять через границю розподілу, прагнучи до такої рівноваги між цими фазами, при якій у кожній з них встановлюється постійна рівноважна концентрація. Якщо властивості компонентів суміші подібні, то достатнє розділення досягається тільки багаторазовим повторенням елементарного акту розподілу.

Більш повного розподілу можна досягти, якщо багаторазове встановлення фазових рівноваг поєднати з дією кінетичного фактора, зокрема якщо **розділення суміші проводити в системах, в яких одна фаза (рухома) переміщується відносно другої (нерухомої)**. Рухома і нерухома фаза такої системи повинні володіти великою поверхнею дотикання та відносно невеликою товщиною взаємодіючого шару завдяки дифузійним процесам, які знижують ефективність розділення.

Ці вимоги виконуються у хроматографічному методі розділення суміші речовин, який знайшов широке застосування в аналітичній практиці.

Суть хроматографічного методу можна сформулювати так: хроматографія – це метод розділення та аналізу рідких або газуватих сумішей речовин, який ґрунтується на відмінності розподілу компонентів між двома фазами, що не змішуються і рухаються одна відносно одної.

Хроматографічні методи аналізу знайшли дуже широке застосування за останні 50 років. За розробку теорії і практики хроматографії англійським хімікам Мартіну і Сінджу в 1952 році була присвоєна Нобелівська премія в галузі хімії.

За допомогою хроматографічного методу можна здійснити:

- ✓ якісний і кількісний аналіз досліджуваної речовини;
- ✓ концентрування речовин з дуже розведених розчинів;
- ✓ розділення складних сумішей органічних і неорганічних речовин на окремі компоненти;
- ✓ розділення і виділення рослинних і тваринних пігментів, ізотопів, рідкоземельних елементів та інших речовин;
- ✓ очищення речовин від домішок;
- ✓ визначення молекулярної структури деяких сполук шляхом встановлення зв'язку між здатністю до сорбції і будовою даної речовини.

Хроматографічні методи на сучасному етапі використовуються у різноманітних сферах науки та промисловості, зокрема, у медицині, біології, фізиці, геології, біотехнології, хімічній та фармацевтичній промисловості тощо. Застосовують хроматографічні методи для ідентифікації протеїнів, наркотиків, антибіотиків, допінг-контролю, аналізу найбільш важливих класів пестицидів. Більше 10-ти робіт, виконаних із застосуванням хроматографічних методів, удостоєно Нобелівських премій.

Існує багато варіантів здійснення хроматографічного аналізу, у цьому посібнику ми детальніше розглянемо площинну хроматографію, зокрема її різновид **паперова хроматографія**.

У 1944 р. А. Мартін разом зі співробітниками Р. Консденом і А. Гордоном запропонували розподільний варіант хроматографії на папері.

За допомогою методів **площинної хроматографії** розділення речовин відбувається у тонкому шарі сорбенту, який нанесено на скляну або іншу пластинку чи на спеціальний **папір** для хроматографії, який одночасно є **носієм нерухомої рідкої фази**. Очевидно, що цими методами можна розділити тільки ті речовини, які розчиняються у рідкій рухомій фазі, й неможливо розділити газові суміші.

Паперова хроматографія (ПХ) – це різновид хроматографії, де *носієм нерухомого розчинника* є очищений від домішок **фільтрувальний папір**. Цей метод широко використовується для дослідження амінокислот, протеїнів, цукоридів, ліпідів, антибіотиків, гормонів, каротиноїдів, алкалоїдів. *Нерухомою фазою*, зазвичай, є **вода**. *Рухомою фазою (елюентом)* є **органічний розчинник або суміш органічних рідин і води** у різних співвідношеннях. Рухома і

нерухома фаза не повинні змішуватися. Розділення компонентів розчинів відбувається між зв'язаною водою і розчинником.

Рухома фаза просувається уздовж аркуша паперу. Розчинник, пересуваючись з різними швидкостями (залежно від полярності радикалу амінокислоти), переміщує компоненти суміші, наприклад, амінокислот на різні відстані. Положення амінокислот на пластинці виявляють за допомогою, наприклад, нінгідринової реакції. За присутності нінгідрину окремі амінокислоти проявляються як плями, забарвлені у фіолетовий, жовтий або червоний колір (залежить від хімічної структури амінокислоти). Амінокислоти у суміші ідентифікують за розподілом відомих амінокислот (**стандартів**), порівнюючи значення коефіцієнту розподілу R_f , який визначається як співвідношення відстаней, що пройшли амінокислота та рухома фаза від точки старту, і є характерною величиною для кожної амінокислоти за певних умов дослідів (склад розчинника, температура, тип носія на пластинці).

Хроматографічним папером називають целюлозний фільтрувальний папір, що відрізняється особливою чистотою вихідної сировини. Нанесена на нього рідина рухається під дією капілярних сил по капілярах, утворених волокнами паперу. Кількісно ця характеристика паперу визначається швидкістю, з якою розчинник проникає у капіляри, та кінцевою висотою підйому. Ці характеристики капілярного підйому залежать від густини та густоти сітки волокон паперу. Чим папір цупкіший (а значить менш проникний і менш прозорий), тим нижчі характеристики капілярного підйому.

Пробу на паперову хроматограму наносять капілярними піпетками у певне місце, яке названо **стартовим**, хроматограму висушують. При цьому потрібно слідкувати, щоб плями наносились об'ємом 5–10 мкл. Концентрація розчину – 5–20%, тобто кількість речовини в одній плямі складає 0,01–0,3 мг.

Для отримання хроматограми аркуш паперу після нанесення проби поміщають у хроматографічну камеру з рухомою фазою. Один кінець хроматограми занурюють у розчинник, який є рухомою фазою. Розчинник під дією капілярних сил рухається папером, розчиняючи і переносячи далі компоненти взірця. Відбувається розділення проби на окремі компоненти. Після проходження певної відстані розчинником, хроматограму виймають із камери, висушують. Утворені плями, які можуть бути як видимі, так і невидимі,

проявляють і позначають.

Залежно від напрямку руху розчинника розрізняють:

- ✓ спадаючу паперову хроматографію (потік рухається вниз);
- ✓ висхідну паперову хроматографію (потік рухається вгору);
- ✓ радіальну паперову хроматографію (рух починається з плями – місця нанесення краплі).

У перших двох випадках компоненти суміші після хроматографування розташовуються у вигляді окремих плям; в останньому випадку – у вигляді концентричних кілець. Виявляють хроматограму візуально – забарвлені плями, безбарвні – будь-яким зручним фізичним або хімічним методом.

Апаратура для проведення ПХ розрізняється за розміром та формою. Це залежить від методу хроматографування (висхідна, спадаюча, радіальна). Обладнанням для хроматографії можуть бути високі циліндричні посудини з щільними кришками. На внутрішній стороні кришки може бути гачок для підвішування смужок паперових хроматограм. Стінки посудини вистелені фільтрувальним папером для створення відповідної атмосфери, насиченої паром рухомої фази.

Для кількісної оцінки рухливості речовини в хроматографічній системі використовують коефіцієнт рухливості R_f , який дорівнює відношенню відстані l , пройденої речовиною, до відстані, пройденої розчинником L :

$$R_f = \frac{l}{L}.$$

R_f можна визначити експериментально: на хроматограмі вимірюють відстань l від лінії старту речовини до центру плями (рис. 1) і відстань від лінії старту до лінії фінішу розчинника – L . Величина R_f характеризує розташування зони речовини на хроматограмі. Зазвичай коефіцієнт рухливості лежить в межах $R_f = 0-1$. Оптимальне значення становить 0,3–0,7.

Умови хроматографування підбирають так, щоб величина R_f відрізнялася від нуля і одиниці. За відтворювання результатів і дотримання постійних умов хроматографування $R_f = const$. Розділення речовин практично можливо, якщо $R_{f(1)} - R_{f(2)} \geq 0,1$

На рухливість речовини в умовах хроматографії на папері впливає:

- ✓ коефіцієнт розподілу ($D = C_s/C_m$, де C_m і C_s – концентрації речовини у рухомій і нерухомій фазах відповідно);

- ✓ взаємодія речовин у рухомій і нерухомій фазах з волокнами паперу;
- ✓ характеристика паперу;
- ✓ умови проведення експерименту.

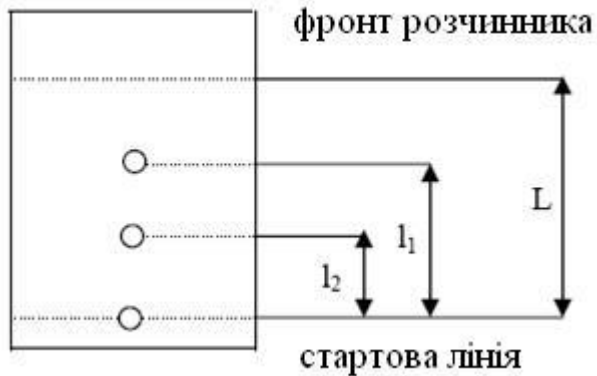


Рис. 1. Схема візуалізації результатів

Ефективність розділення речовин методом хроматографії на папері залежить від правильного вибору рухомої і нерухомої фаз, оскільки коефіцієнт розподілу залежить від відносної розчинності речовин у двох фазах. Рідкі фази (розчинники) для хроматографії на папері мають відповідати певним вимогам, основними з яких є такі:

- ✓ рухома і нерухома фази не повинні змішуватись або взаємна розчинність їх має бути обмеженою;
- ✓ компоненти суміші, які розділяються, повинні мати меншу розчинність у рухомій фазі, ніж у нерухомій;
- ✓ коефіцієнти розподілу компонентів суміші між рухомою і нерухомою фазами мають бути різними;
- ✓ склад рухомої фази під час хроматографування не повинен змінюватися.

Термінологія цієї теми:

Аналіт (analyte) – речовина-компонент досліджуваної суміші, яку хроматографічно розділяють.

Аналітична хроматографія – вид хроматографії, який використовується для визначення присутності аналітів у дослідній суміші, а також їх вмісту/концентрації.

Елюат (eluate) – розчинник з аналітами, який вже пройшов через хроматографічну систему і збирається на її виході для їх детекції.

Елюент (eluent) – розчинник, за допомогою якого відбувається «вимивання» аналітів з хроматографічної системи.

Елюотропна серія (eluotropic series) – список розчинників у порядку збільшення/зменшення їх сили елюції.

Зв'язана фаза (bonded phase) – компонент нерухомої фази, який ковалентно приєднаний до поверхні хроматографічної матриці на площині.

Коефіцієнт розподілу – специфічний коефіцієнт, що є основною хроматографічного розділення і залежить від спорідненості певного аналіту до обох фаз.

Нерухома фаза (immobilized phase) – стаціонарна фаза хроматографічної системи, певним чином іммобілізована на поверхні хроматографічної матриці.

Пряма фаза (forward phase) – нерухома фаза, яка у своїй основі містить полярні компоненти, такі як целюлозу, силікагель, сефадекс, тощо.

Рухома фаза (mobile phase) – фаза, яка у процесі хроматографічного розділення рухається з певною швидкістю і у певному напрямку вздовж нерухомої.

Хроматограма – будь-яка візуальна репрезентація ходу хроматографічного розділення.

Лабораторна робота №8

Тема: Розділення амінокислот методом ПХ

Мета роботи: Оволодіти методом хроматографії як одним з методів якісного аналізу на прикладі розділення суміші амінокислот паперовою хроматографією.

Завдання:

1. Засвоїти методику визначення якісного складу суміші речовин за допомогою паперової хроматографії.
2. Провести розділення суміші амінокислот хроматографією на папері.
3. Розрахувати R_f кожної плями і визначити склад контрольної суміші амінокислот.

Матеріали, обладнання та реактиви

Прилад для виконання висхідних хроматограм, хроматографічний папір, олівець, лінійка, скляні капіляри, сушильна шафа;
набір стандартів амінокислот;
суміш амінокислот;
суміші розчинників: а) н-бутанол : ацетатна кислота:вода (4:1:5);
б) ацетон : вода (3:2); в) н-бутанол : бензиловий спирт (1:1);
розчин нінгідрину в ацетоні.

Хід роботи

1. Отримайте у викладача розчин суміші невідомих амінокислот, а у лаборанта – аркуш хроматографічного паперу, відрізаного відповідно до розміру циліндра і розкреслений, як вказано на рисунку 2.
2. За допомогою лінійки проведіть на відстані 2 см від нижнього краю горизонтальну пряму АБ (лінія старту). Намалюйте кільця діаметром 3 мм на відстані 2 см один від одного, пронумеруйте. Від лінії старту на відстані 10 см проведіть пряму А'Б' (лінія фінішу).
3. Розчини амінокислот на папір нанесіть на окремому столі. Папір покладіть на попередньо ретельно вимите скло. Під нижній край паперу підкладіть скляну пластинку чи зошит

так, щоб та частина паперу, де намальовані кільця, знаходилася у повітрі, не торкалась поверхні скла. Капілярами у кільця послідовно нанесіть краплі розчинів сумішей, що досліджуються (аналітів) та «свідків». Крапля, яку наносять не повинна поширюватися за межі намальованого кільця. Розчин на кожне кільце нанести 5-6 разів після висихання попередньої краплі.

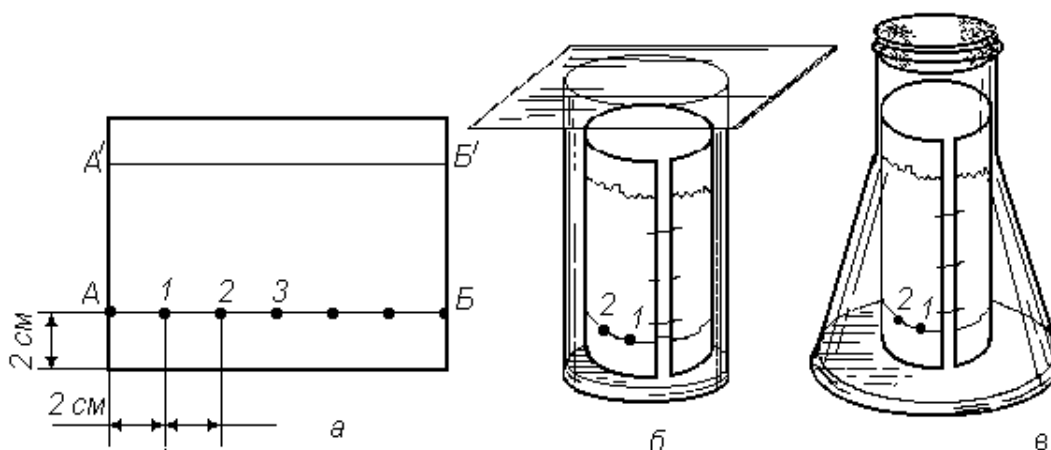


Рис. 2. Прилади для висхідної паперової хроматографії

4. Після висихання нанесених крапель ретельно вимийте руки з милом, згорніть папір у циліндр.
5. На дно скляного циліндра (обережно, не змочивши стінки) влийте суміш н-бутанолу : ацетатної кислоти : води (4:1:5). Висота шару розчинника не повинна бути вище 1 см від дна циліндра.
6. Паперовий циліндр обережно вставте вертикально у скляний циліндр так, щоб він не торкався стінок і щоб нанесені краплі знаходились на нижньому кінці паперового циліндра.
7. Скляний циліндр щільно закрийте кришкою з гумовою прокладкою і залиште до тих пір, поки розчинник не підніметься до лінії фінішу. Тоді обережно вийміть паперовий циліндр, розпрямте папір та висушіть його під тягою чи у сушильній шафі (70–80°C);
8. Після випаровування розчинника хроматограму проявіть. Як проявник для α -амінокислот використовуйте розчин нінгідрину (ω (нінгідрину) = 0,5%) в ацетоні. Цим розчином

змочить хроматограму декілька разів з пульверизатора так, щоб папір став трохи вологим.

9. Висушіть папір на повітрі та прогрійте у сушильній шафі за 110°C до появи плям. Значно краще висушити хроматограму поступово у темряві. Плями, що проявилися, легко обведіть олівцем.

Опрацювання результатів.

Порівнюючи положення плям суміші амінокислот та амінокислот-стандартів, амінокислоти ідентифікують. Визначивши за допомогою лінійки відстань, пройдену розчинником та кожною з амінокислот-стандартів і амінокислот суміші, обчислюють коефіцієнт розподілу R_f для амінокислот-стандартів та амінокислот суміші і порівнюють між собою (рис. 3). Дані заносять у таблицю 1.

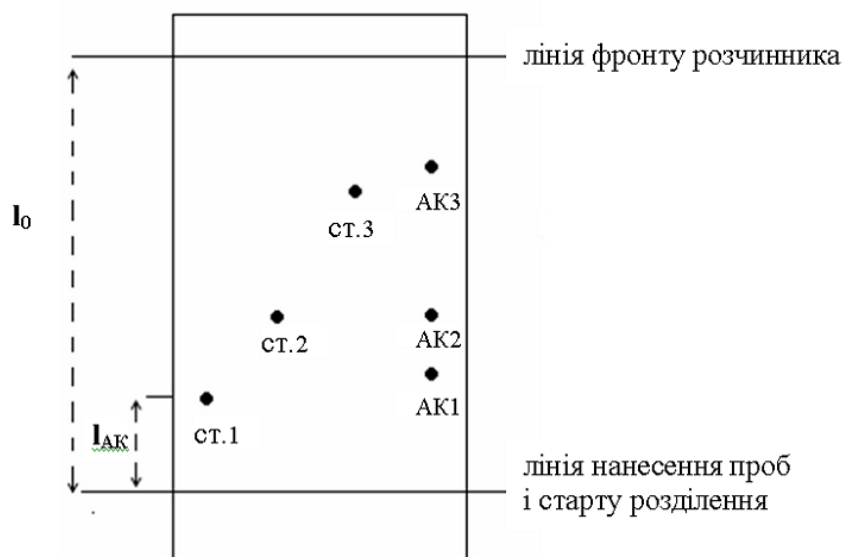


Рис. 3. Схематичне зображення розподілу амінокислот (плями) на хроматографічній пластинці

АК – відстань, яку пройшла амінокислота від лінії нанесення проб;

l_0 – відстань, яку пройшов розчинник від лінії нанесення проб;

ст.1, ст.2, ст.3 – амінокислоти-стандарты;

АК1, АК2, АК3 – амінокислоти суміші.

Значення R_f для амінокислот-стандартів розраховують за формулою: $R_f = l_{\text{СТ}}/l_0$

а для амінокислот суміші за формулою: $R_f = l_{\text{АК}}/l_0$

Лабораторна робота №9

Тема: Виділення глікогену

Мета роботи: Оволодіти методами осадження протеїнів та виявлення глікогену.

Завдання:

1. Виділити глікоген.
2. Провести якісні реакції на глікоген.

Матеріали, обладнання та реактиви

фарфорова чашка, фарфорова ступка, спиртівка, (електрична плитка), штатив з пробірками, піпетки, лійка, фільтри, ваги; свіжа печінка;
10%-ий розчин ацетатної кислоти;
96°-ий етиловий спирт;
1%-ий розчин Йоду;
дистильована вода.

Хід роботи

1. 0,5 г печінки внесіть у фарфорову чашку і додайте 4 мл гарячої дистильованої води та прокип'ятіть упродовж 3-ох хв.
2. Вміст чашки перенесіть у фарфорову ступку і розітріть до отримання гомогенної маси, яку знову перенесіть у фарфорову чашку, прокип'ятіть ще 30 хв (у міру википання рідини додавайте воду). Глікоген переходить у розчин.
3. Для повного осадження протеїнів рідину підкисліть 5-10-ма краплями 10%-ого розчину ацетатної кислоти.
4. Осад відокремити фільтруванням. У фільтраті визначіть глікоген.
5. До 5-ти крапель фільтрату вгесіть 5–10 крапель спирту, глікоген випадає в осад.
6. В одну пробірку внесіть невелику кількість осадженого глікогену, а в іншу – 5 крапель дистильованої води. У кожную пробірку внесіть по 1-2 краплі 1%-ого розчину Йоду. У першій пробірці Йод адсорбується на колоїдних часточках глікогену і, залежно від його кількості, рідина набуває рожевого, червоного

або темнобурого забарвлення. Колір іншої пробірки зумовлений присутністю Йоду (жовто-коричневий).

7. Опишіть результати.

Висновки: _____

Лабораторна робота №10

Тема: Розділення альбумінів і глобулінів яєчного білка

Мета роботи: ознайомлення з методами розділення протеїнів у досліджуваному розчині.

Матеріали, обладнання та реактиви

Скляні палички, штатив з пробірками, хімічні склянки, тримач пробірок, лопатка, фільтри.

нерозведений яєчний білок;

Амонію сульфат (розчин, порошок);

біуретовий реактив.

Хід роботи

1. У пробірку внесіть 20 крапель нерозведеного яєчного білка.
2. До білка внесіть рівний об'єм розчину Амонію сульфату, перемішайте. Отримано напівнасичений розчин Амонію сульфату, глобулін випадає в осад.
3. Відфільтруйте осад через 5 хвилин. У фільтраті залишається яєчний альбумін.
4. Для висолювання альбуміну до фільтрату внесіть подрібнений порошок Амонію сульфату до повного насичення (поки розчинятиметься сіль).
5. Осад альбуміну відфільтруйте і з фільтратом проведіть біуретову реакцію. Відсутність визначеного результату біуретової реакції вказує на відсутність протеїну.
6. Результати роботи внесіть у таблицю.

Назва протеїну	Сіль	Ступінь насичення	Утворення осаду
Глобулін			
Альбумін			

Висновки: _____

Питання для самоконтролю:

1. Амінокислоти – мономери протеїнів. Класифікація.
2. Реакція утворення пептидного зв'язку.
3. Протеїни. Первинна, вторинна, третинна, четвертинна структури протеїнів.
4. Що таке фолдинг протеїнів? Фактори фолдингу протеїнів.
5. Що Вам відомо про антишаперони?
6. «Неправильний» фолдинг протеїнів?
7. Функції протеїнів. Назвіть і охарактеризуйте транспортні протеїни.

ТЕМА 3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЧОВИН. ФОТОМЕТРІЯ

Методи фотометрії застосовуються для визначення концентрації розчинів речовин за поглинанням променів світла в ультрафіолетовій (200–400 нм), видимій (400–760 нм) та інфрачервоній (>760 нм) ділянках спектру. Спектрофотометрія та фотоколориметрія – фізико-хімічні методи дослідження розчинів, що базуються на вимірюванні поглинання світла розчинами.

Розчини багатьох речовин мають характерне забарвлення, яке обумовлене вибіркоvim поглинанням світла йонами та молекулами. Нітрогенвмісні основи і амінокислоти як і хлорофіли, каротиноїди здатні поглинати світло, позаяк є хромофорами. Молекули або частини молекул, які сильно поглинають світло у видимій та УФ-ділянці спектру, називаються **хромофорами**. Інтенсивність поглинання можна виміряти, а отже й обрахувати концентрацію ДНК, РНК, олігонуклеотидів і навіть нуклеотидів чи протеїнів у розчині.

Інколи забарвлення з'являється відразу після розчинення речовин у воді або іншому розчиннику. Однак найчастіше забарвлення індукують, додаючи до розчину реактив, що взаємодіє з речовиною, яку потрібно визначити, і утворює забарвлений розчин. Вимірюючи поглинання світла забарвленим розчином або порівнюючи отримане забарвлення з забарвленням розчину з відомою концентрацією, визначають вміст забарвленої речовини у розчині, що аналізують.

Залежність між інтенсивністю забарвлення розчину і вмістом в ньому забарвленої речовини описується законом Бугера–Ламберта–Бера. Відповідно до закону Бугера–Ламберта–Бера, оптична густина поглинання розчину прямо пропорційна концентрації поглинаючої речовини. Нуклеїнові кислоти поглинають УФ-випромінювання у ділянці 240–290 нм з максимумом за 260 нм. Хромофорами є нітрогенвмісні основи нуклеїнових кислот, особливо піримідинові.

Піримідини поглинають УФ-світло у 10–20 разів інтенсивніше, ніж хромофори амінокислот – триптофан, тирозин та фенілаланін (таблиця 1).

Як наслідок цього закону, найважливішою характеристикою забарвленого розчину є **оптична густина поглинання розчину (A)**.

Для визначення концентрації $C_{\text{досл}}$ забарвленого розчину потрібно провести вимірювання його оптичної густини $A_{\text{досл}}$ за допомогою фотоелектроколориметру або спектрофотометру. Крім

того, потрібно визначити оптичну густину ($A_{ст}$) стандартного розчину з відомою концентрацією ($C_{ст}$). Товщина шару розчинів в обох випадках повинна бути однаковою.

Концентрацію дослідного розчину обчислюють за формулою:

$$C_{досл} = C_{ст} (A_{досл} / A_{ст})$$

Отже, за даною формулою ми можемо визначити $C_{досл}$, якщо нам відома $C_{ст}$.

Таблиця 1

Спектральні параметри хромофорних груп протеїнів і ДНК

№	Хромофор	$\lambda_{макс}$, нм	$\epsilon_{макс}$, $M^{-1} cm^{-1}$
1	Триптофан	279,5	$5,6 \cdot 10^3$
2	Тирозин	275	$1,38 \cdot 10^3$
3	Фенілаланін	257	$1,8 \cdot 10^3$
4	Аденін	260	$13,4 \cdot 10^3$
5	Урацил	260	$8,2 \cdot 10^3$
6	Тимін	260	$7,4 \cdot 10^3$
7	Гуанін	260	$7,2 \cdot 10^3$
8	Цитозин	260	$5,55 \cdot 10^3$

ϵ – коефіцієнт молярної екстинції

Для визначення показників оптичної густини використовують електричні прилади типу **фотоелектроколориметрів** (КФК-2, КФК-2МП, КФЛ-3 тощо) або **спектрофотометрів** (СФ-26, СФ-47, PD-303, ULAB тощо).

Правила роботи з фотоелектроколориметром КФК-2. Фотоелектроколориметр КФК-2 (колориметр фотоелектричний концентраційний) належить до однопроменевих приладів, призначених для вимірювання оптичної густини та пропускання світла за фіксованих довжин хвиль в межах від 315 до 980 нм.



Рис. 1. Фотоелектроколометр

Монохроматичні світлові потоки утворюються за допомогою набору світлофільтрів з визначеними максимумами пропускання світла. Спрощена оптична схема приладу наведена на рисунку 2.

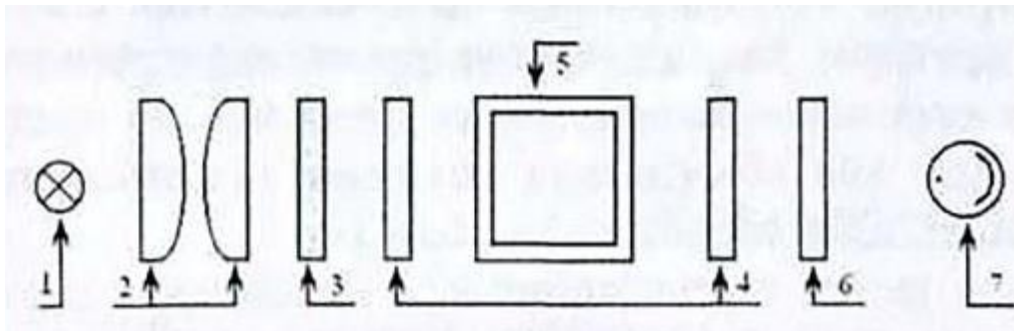


Рис. 1. Оптична схема КФК-2

Як джерело світлового потоку в приладі використовується галогенна лампа (1). Промені світла проходять через конденсор (2) для створення паралельного потоку, один з одинадцяти світлофільтрів (3), за допомогою яких створюється монохроматичний потік світла, і захисне скло (4). Далі промені світла потрапляють у кювету з дослідним або контрольним розчином (5), де відбувається поглинання світла, і потрапляють на фотоелемент (7), електричний сигнал з якого через електронну схему індикується мікроамперметром. Шкала мікроамперметра має поділки для відліку

пропускання світла у відсотках (від 5 до 100 %, верхня шкала) та оптичної густини (від 0 до 1,3, нижня шкала).

Світлофільтри – це забарвлені стекла, що пропускають промінь світла від лампи лише в певному інтервалі довжин хвиль і практично повністю поглинають промені інших довжин хвиль. На практиці вибирається той світлофільтр, при якому спостерігається максимальне світлопоглинання. Як вже було згадано, для ДНК максимум поглинання за $\lambda = 260$ нм у ділянці спектру 240–290 нм.

Для проведення вимірів потрібно мати дослідний розчин, контрольний розчин (чистий розчинник або суміш реактивів без дослідної речовини) та стандартний розчин для калібрування приладу. Порядок роботи з приладом наступний:

1. Вмикають прилад у мережу струму за допомогою кнопки «Мережа» і дають йому прогрітися упродовж 30-ти хв (під час прогрівання приладу кришка кюветної камери повинна бути відкритою).

2. Встановлюють у світловий потік світлофільтр з необхідною довжиною хвилі (ручка з правого боку панелі приладу) та чутливість схеми (ліва ручка з правого боку панелі). (Увага! Значення довжин хвиль від 315 до 540 нм на шкалі мають чорний колір, а від 590 до 980 нм – червоний. На шкалі чутливості ліва частина позначена цифрами 1, 2 та 3 чорного кольору, а права частина має ті ж самі значення червоного кольору. Якщо використовуються короткохвильові світлофільтри з чорним маркуванням, то на шкалі чутливості перемикач також встановлюється на одне із значень чорного кольору, і навпаки).

Значення чутливості спочатку встановлюють в положення «1».

3. Перемикач кювет (внизу в центрі панелі) переводять у положення «1».

4. У тримач кювет вставляють кювети з контрольним розчином (так, щоб потік світла проходив через неї в положенні «1» перемикача) та дослідним розчином.

5. За контрольним розчином настроюють прилад на 100 % пропускання або 0 оптичної густини за допомогою ручок настройки з правого боку панелі. Якщо стрілка вимірювача не доходить до поділки «100» (шкала пропускання) або «0» (шкала оптичної густини), перемикач чутливості переводять в положення «2» або «3».

1. Переводять перемикач кювет в положення «2» і проводять відлік пропускання оптичної густини.

2. Дослідний розчин у другій кюветі замінюють стандартним і повторюють вимірювання оптичної густини або пропускання світла.

Правила роботи зі спектрофотометром СФ-26.

Спектрофотометр СФ-26 (рис. 3) призначений для вимірювання коефіцієнту пропускання дослідного зразку (Т) в ультрафіолетовій та видимій частинах спектру.



Рис. 3. Спектрофотометр СФ-26

Світловий потік створюється лампою розжарювання у видимій частині спектру або дейтерієвою лампою в ультрафіолетовій частині. Монохроматичний світловий потік створюється за допомогою тригранної призми, яка розкладає біле світло на спектр. Введення певних променів в кюветну камеру здійснюється поворотом призми та регулюванням ширини щілини, через яку проходить світло (чим менша щілина, тим точніше виділяється монохроматична частина світла). В монохроматичний потік випромінювання по чергово вводяться контрольний та дослідний взірці.

Спектрофотометр використовує проходження світла через розчин для визначення концентрації розчиненої в розчині речовини. Прилад працює на основі простого принципу, за яким світло з відомою довжиною хвилі проходить через взірець, кількість пропущеної енергії світла вимірюється на фотоелементі з іншого боку від взірця.

Конструкція однопроменевого спектрофотометра включає джерело світла, призму, тримач взірця та фотоелемент (рис. 4). До кожного з елементів приладу приєднані відповідні електричні або механічні системи для контролю інтенсивності освітлення, довжини хвилі і для перетворення отриманої фотоелементом енергії в коливання напруги. Коливання напруги фіксується на метричній

шкалі, або записується на приєднаний комп'ютер для подальших досліджень.

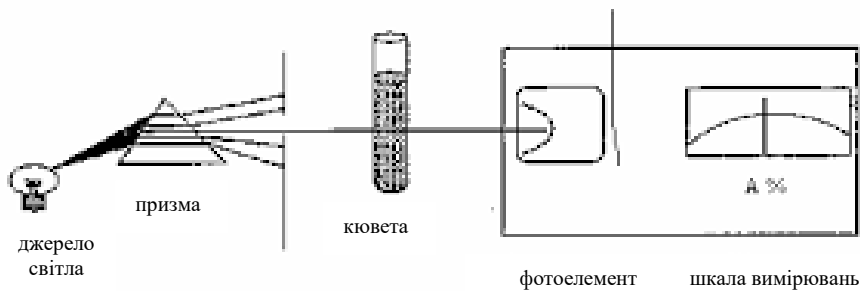


Рис. 4. Схема проходження світла

Послідовність роботи на спектрофотометрі наступна:

1. Встановити у робоче положення фотоелемент та джерело світла, які відповідають обраному спектральному діапазону вимірювання.

2. Закрити фотоелемент (ручка шторки в положенні «Закр.»).

3. Увімкнути тумблер «Мережа», після чого повинні загорітися лампа «Мережа» та одна з ламп «Д» (дейтерієва) або «Н» (розжарювання) відповідно до обраного джерела світла.

4. Прогріти прилад упродовж 1 год.

5. Встановити ручку «КОМПЕНСАЦІЯ» в положення «0».

6. Встановити потрібну довжину хвилі за допомогою барабану, який знаходиться над тумблером, в сторону збільшення довжини хвилі.

Якщо за цього шкала повернеться на більший кут, ніж потрібно, то барабан повертається назад на декілька поділок, і знову підводиться до потрібного значення.

7. Встановити ручку «Чутливість» в положення «1» (робоче положення).

8. Встановити у тримач кювет кювети з контрольним та дослідними розчинами.

9. У світловий потік ввести контрольну кювету і за допомогою ручки «Щілина» підвести стрілку гальванометра на «0» поглинання або «100» пропускання.

10. Ввести у світловий потік дослідну кювету і провести відлік оптичної густини або пропускання світла розчину.

Увага! Під час прогріву приладу, зміни кювет, налаштування

довжини хвилі та темпового «0» перемикач шторки фотоелементів повинен знаходитися у положенні «Закр.», а під час вимірів – у положенні «Відкр.».

Правила роботи на спектрофотометрі *Granum 722*.

Спектрофотометр моделі 722 складається з шести частин (рис. 5).

1. **Джерело світла:** вольфрамова галогенна лампа, яка випромінює світло в діапазоні довжини хвиль 330–1000 нм.

2. **Монохроматор:** виділяє випромінювання необхідної довжини хвилі та прибирає зайві хвилі.

3. **Кюветна камера:** для розміщення кювет зі стандартними та дослідними розчинами.

4. **Детектор:** перетворює світло, що пройшло через дослідний розчин, у електричний струм.

5. **Мікропроцесор:** перетворює електричний сигнал в цифрову форму.

6. **Дисплей:** відображає отримані дані в одиницях поглинання, пропускання або концентрації.



Рис. 5. Спектрофотометр *Granum 722* та блок-схема спектрофотометра

Світло від лампи фокусується на вхідній щілині та потрапляє у монохроматор, де призма розкладає його у спектр. Світло обраної довжини хвилі фокусується на вихідну щілину монохроматора коліміруючим дзеркалом. Далі через один з фільтрів, які дають змогу прибрати паразитне випромінювання другого порядку, промінь проходить через кюветну камеру та потрапляє на детектор – кремнієвий фотодіод. Електричний сигнал, який генерується ним, обробляється мікропроцесором і результат відображається на рідкокристалічному дисплеї у цифровій формі.

Органи управління та контролю. Основні органи управління та контролю спектрофотометра моделі 722 показані на Рисунку 6.

Мережевий вимикач розташований на задній стінці приладу.

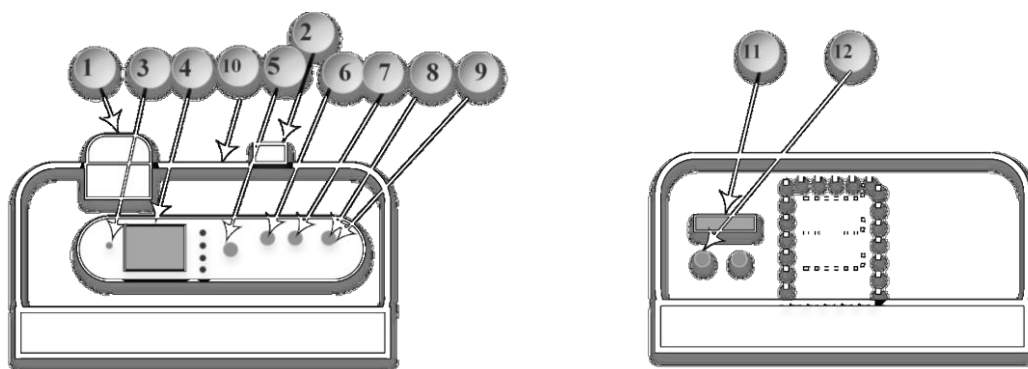


Рис. 6. Основні органи управління та контролю приладу

1. **Кюветне відділення.** В кюветотримач встановлюються кювети з калібрувальними та дослідними розчинами.
2. **Ручка налаштування довжини хвилі.** Використовується для налаштування потрібної довжини хвилі.
3. **Індикатор включення приладу (ON/OFF)**
4. **Рідкокристалічний дисплей.** Відображає результати вимірів в одиницях поглинання або пропускання, значення концентрації та фактора.
5. **Чотири червоних світлодіоди статусу** справа від цифрового індикатора вказують, який з режимів – вимір оптичної густини, коефіцієнта пропускання, значення фактору або концентрації – активний у поточний момент.
6. **Кнопка вибору режимів роботи.** Дозволяє вибрати режим виміру оптичної густини або коефіцієнта пропускання, установки значення концентрації або фактору.
7. **Кнопка «100».** Використовується для налаштування 0 од. оптичної густини або 100 % пропускання під час калібрування. Прилад необхідно знову калібрувати після кожної зміни довжини хвилі.
8. **Кнопка «0».** Призначена для налаштування «0» приладу в режимі пропускання. Налаштування «0» проводять після кожної зміни довжини хвилі.
9. **Кнопка «PRINT».** Призначена для передачі результатів на принтер або комп'ютер через RS-232 порт.

10. Кнопка **«КОНЦЕНТРАЦИЯ/ФАКТОР»**.

Використовується у режимі «Концентрація» для налаштування на дисплеї значення концентрації або відомого фактору.

11. **Вікно для зчитування ДОВЖИНИ ХВИЛІ**. Відображає встановлену довжину хвилі. Ціна найменшого ділення 2 нм.

12. **Роз'єм RS-232 С інтерфейсу**. Розташований на задній стінці приладу.

13. **Аналоговий вихід**. Роз'єм з двома гніздами на задній стінці приладу.

Як працювати з приладом?

Визначення оптичної густини та коефіцієнту пропускання

1. Підключити прилад до мережі. Ввімкнути прилад та прогріти не менше 15 хв.

2. Обертанням ручки вибору довжини хвилі встановити необхідну.

3. Налаштування довжини хвилі необхідно виконувати ручкою налаштування довжини хвиль від коротких довжин хвиль до більш довгих. Якщо під час налаштування значення довжини хвилі пропущене, необхідно знову повернутися на 20–30 нм до більш коротких та повторно підвести до необхідного значення.

4. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «MODE». Поставити у кюветну камеру непрозору кювету (чорний кубик), опустити кришку кюветної камери та натиснути кнопку «0». На дисплеї повинно з'явитися значення 0.00 ± 0.01 . Повторно натиснути кнопку «0», якщо значення відрізняється від вказаного. Забрати непрозору кювету.

5. За допомогою кнопки «MODE» вибрати режим поглинання (А, од. опт. густини або пропускання (Т, %)).

6. Заповнити кювету водою або розчином контрольного взірця, згідно з обраною методикою.

7. Помістити кювету в кюветний відсік та натиснути кнопку «100». На дисплеї повинно висвітитися значення 0.00 ± 0.01 (режим виміру оптичної густини).

8. Помістити у кюветний відсік кювету з досліджуваним розчином. Зчитати з дисплею результат в одиницях оптичної густини або відсотках коефіцієнта пропускання (відповідно до обраного режиму).

9. Вийняти кювету з кюветотримача.
10. Провести наступні виміри відповідно до 8, 9.
11. За отриманими результатами вимірів обрахувати згідно з обраною методикою потрібну величину.

Визначення концентрації.

Використання режиму «С/Стандарт»

1. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «MODE». Поставити у кюветний відсік непрозору кювету (чорний кубик), опустити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку «0». На дисплеї повинно з'явитися значення 0.00 ± 0.01 . Повторно натиснути кнопку «0», якщо значення відрізняється від вказаного. Вийняти непрозору кювету.
2. Натискаючи кнопку «MODE» встановити режим оптичної густини (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «A»).
3. Помістити кювету з контрольним взірцем в кюветотримач і опустити кришку кюветного відсіку.
4. Натиснути кнопку «100» (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися 0.00 ± 0.01 .
5. Забрати контрольний взірець з кюветного відсіку.
6. Внести кювету зі стандартним розчином.
7. Натискаючи кнопку «MODE», вибрати режим виміру концентрації (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «C»).
8. Використовуючи кнопки «INC» та «DEC», встановити на дисплеї значення концентрації стандарту та натиснути на кнопку «ENT».
9. Вийняти кювету зі стандартним розчином.
10. Вставити кювету з досліджуваним розчином, опустити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплею результат в одиницях концентрації.

Використання режиму «С/Фактор»

1. Встановити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки «MODE». Внести до кюветного відсіку непрозору кювету, опустити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку «0». На дисплеї повинно з'явитися значення 0.00 ± 0.01 . Повторно натиснути кнопку «0», якщо значення відрізняється від вказаного. Вийняти непрозору кювету.

2. Натискаючи кнопку «MODE», встановити режим оптичної густини (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «A»).
3. Помістити кювету з контрольним взірцем у кюветотримач, опустити кришку кюветного відсіку.
4. Натиснути кнопку «100» (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися 0.00 ± 0.01 .
5. Вийняти контрольний взірець з кюветного відсіку.
6. Внести кювету зі стандартним розчином.
7. Натискаючи кнопку, вибрати режим фактору (повинен загорітися червоний світлодіод навпроти «F»).
8. Використовуючи кнопки «INC» та «DEC», встановити на дисплеї значення фактора (0–1999) та натиснути на кнопку «ENT».
9. Внести кювету з досліджуваним розчином, опустити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплея результат у одиницях концентрації.

Основи кількісного визначення концентрації ДНК за допомогою спектрофотометрії, передбачення похибок.

Задля спектрофотометричного визначення концентрації ДНК вимірюють оптичну густину поглинання (A) розчину ДНК за довжини хвилі 260 нм. Одна (кожна) оптична одиниця відповідає концентрації ДНК 50 мкг/мл.

Звідки це значення?

Існує лінійна залежність між оптичною густиною поглинання (A), (оптичною щільністю, OD) і концентрацією макромолекул:

$$A = OD = \epsilon c l,$$

де ϵ – коефіцієнт молярної екстинкції, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

c – концентрація, моль/л

l – довжина оптичного шляху проходження світла через кювету, см.

ϵ – чисельно дорівнює поглинанню 1 M розчину за довжини оптичного шляху в 1 см і тому виражений у $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

Якщо довжина оптичного шляху $l = 1$ см, A називають оптичною щільністю – OD за певної довжини хвилі світла λ .

$$OD_{\lambda} = \epsilon \times c$$

У розчинах НК максимальна фотометрична абсорбція спостерігається за 260 нм і прямо корелює з концентрацією ДНК або

РНК. Вона позначається A_{260} або OD_{260} . Коефіцієнт молярної екстинкції НК – це сума молярних коефіцієнтів поглинання кожного з нуклеотидів. Значення ϵ зменшується від вільних нітрогенвмісних основ до дволанцюгової ДНК за рахунок стекінг-взаємодії.

Для великих молекул застосовують середній коефіцієнт екстинкції. Так,

для дволанцюгової ДНК середній коефіцієнт молярної екстинкції – $50 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$,

для одноланцюгової ДНК – $33 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$,

для РНК – $40 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$,

для олігонуклеотидів – $40 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Отже, якщо довжина шляху проходження світла через кювету дорівнює 10 мм, довжина хвилі 260 нм, $OD_{260} = A = 1$, то

$C_{\text{дволанцюгової ДНК}} = 50 \text{ мкг/мл}$;

$C_{\text{одноланцюгової ДНК}} = 33 \text{ мкг/мл}$;

$C_{\text{РНК}} = 40 \text{ мкг/мл}$;

$C_{\text{олігонуклеотидів}} = 40 \text{ мкг/мл}$;

Перед тим, як дослідити концентрацію ДНК у розчині, потрібно оцінити чистоту досліджуваного взірця. Він може, крім ДНК, містити РНК, амінокислоти, цукориди та інші сполуки, які спотворюватимуть отриманий результат.

Оцінюючи чистоту препарату ДНК, вільного від РНК, вимірюють оптичну щільність розчину (OD) за довжини хвиль 260, 280 та 235 нм, тобто на максимумах поглинання розчинів ДНК, протеїнів та поліцукоридів, відповідно.

Оскільки для протеїнів максимум поглинання міститься за довжини хвилі 280 нм, співвідношення A_{260}/A_{280} використовується для визначення чистоти нуклеїнових кислот. Чиста ДНК повинна мати величину співвідношення 1,8; РНК – 2,0. Поглинання за 235 нм відображає забруднення взірця цукоридами, пептидами, фенолами або ароматичними сполуками. При фотометруванні чистих взірців, співвідношення A_{260}/A_{235} повинно становити приблизно 2,2.

Поглинання за 325 нм може бути використане для виявлення присутності клітинного гомогенату у розчині або для виявлення того факту, що забрудненою є кювета.

OD_{260} стерильної дейонізованої води дорівнює нулю, і цей нуль використовують для встановлення «оптичного нуля» спектрофотометра, робота якого ґрунтується на порівнянні двох

потоків світла: один – через розчинник, інший – через речовину, яка в ньому розчинена. Застосування стерильної води пов'язано з тим, що присутність у розчиннику мікрофлори або нуклеаз, може призвести до отримання помилкових результатів вимірювань. Відомо, що вимірювання у воді призводять до відхилень до 14 % і зниження OD_{260}/OD_{280} .

Також точність вимірювання знижується при занадто великих і малих поглинаннях (концентраціях), як було встановлено емпірично.

Тому краще вимірювати відношення OD_{260}/OD_{280} у низькосольових буферних розчинах, при нейтральному рН, наприклад, у TE (10 – 100 мМ трис (скорочена назва хімічної сполуки трис-(гідроксиметил)-амінометана $(HOCH_2)_3CNH_2$), 1мМ ЕДТА, рН 7,4 - 8,0) або 20 мМ Na_3PO_4 та 0,1 М NaCl, рН 7,5 - 9,0, або 100 мМ K_2HPO_4 , рН 8,2.

Вибір кювети. Кількість розчину нуклеїнової кислоти, що використовується для вимірювання А, залежить від ємності кювети. Кювету вибирають, виходячи з передбачуваної величини концентрації взірця, фактора розведення і доступного об'єму взірця. Наприклад, для кювети з об'ємом меншим, ніж 0,2 мл використовують для дослідження 5 мкл ДНК розчиненої у 195 мкл води.

Калібрування спектрофотометра

Важливим є наступне:

- ✓ фотометрувати контрольний розчин (встановити стандарт для відліку). Контрольним розчином може бути вода, або буферний розчин ($A_{260} = 0$);
- ✓ стежити, щоб стандартний розчин періодично оновлювався;
- ✓ провести фотометрування розчину, що містить відому кількість чистої нуклеїнової кислоти, для того, щоб перевірити надійність стандарту.

Відкалібрувавши спектрофотометр, кювету зі взірцем закривають кришкою, вимірюють величину А. Для нівелювання похибки, вимірювання слід повторити, принаймні, двічі. Значення показників A_{260} менші, ніж 0,02, або між 1 і 1,5 (залежно від приладу) не рекомендується брати до уваги через можливість високої похибки.

Лабораторна робота №11

Тема: Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК у розчині

Мета роботи: навчитись визначати спектрофотометрично концентрацію ДНК.

Завдання:

1. Розрахунок концентрації ДНК у розчині.

Матеріали та обладнання, реактиви.

Обладнання, яке використовується для роботи, повинно бути стерильним, всі залишкові кількості ДНК винести за межі робочого місця.

Спектрофотометр, кювети (1 см), епендорфи, автоматичні дозатори, наконечники, рукавички без пудри.

Розчин ДНК з невідомою концентрацією в буфері TE;

Буфер TE (10мМ Tris–HCl, рН 8,0; 1мМ ЕДТА; 100мМ NaCl)

dH₂O;

детергент.

Найменша концентрація ДНК, яку можна визначити спектрофотометрично – 0,1 мкг/мл. Для визначення, зазвичай, беруть аліквоту (лат. *aliquoties* – кілька частин, кратний) досліджуваного розчину ДНК. Наприклад, 1 мкл і розводять у 100 та більше разів. Пізніше перераховують отримане значення концентрації розчину. Важливо, щоб у розведеному взірці було більше, ніж 10 нг ДНК. У взірці ДНК не повинно бути РНК.

Хід роботи

1. Мікропіпеткою відберіть 1 мкл взірця ДНК, та розведіть препарат, додаючи 130 мкл буфера TE, що містить 100 мМ NaCl.
2. Візьміть кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно відмийте її детергентом, ополосніть dH₂O (дистильованою водою).
3. Перемістіть у кювету розведений препарат.

4. Розведений взірець фотометруйте за $\lambda = 260$ нм. проти буферу ТЕ. Отримане значення повинно бути у межах 0,005–2,5. У іншому випадку взірець концентрують або розводять.
5. Розрахуйте концентрацію ДНК, використовуючи коефіцієнт перерахунку (таблиця 1), за формулою: $C[\text{мкг/мл}] = \text{OD}_{260} \varepsilon$

Таблиця 1.

Значення ε для розрахунку концентрації ДНК

	ε (для досліджуваного розчину)	$\varepsilon_{1:130}$ (для розведеного зразку)
ДНК дволанцюгова	50	6,5
ДНК одноланцюгова	37	4,81

6. Розрахуйте відношення величини OD розчину, виміряної за 260, до величини OD розчину, яку одержали після вимірювання за 280 нм ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$), і відношення величини OD розчину, виміряної за 260, до величини OD розчину, яку одержали після вимірювання за 230 нм ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$). Ці результати свідчать про чистоту НК. Для чистої ДНК $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1,8 - 1,9$ і $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{235}=2,2 - 2,5$.

Висновки: _____

Лабораторна робота №12

Тема: Спектрофотометричне визначення концентрації ДНК і РНК у розчині

Мета роботи: навчитись визначати спектрофотометрично концентрацію нуклеїнових кислот у розчині.

Завдання:

1. Розрахунок концентрації ДНК у досліджуваних взірцях.
2. Розрахунок концентрації РНК у досліджуваних взірцях.

Матеріали та обладнання, реактиви.

Обладнання, яке використовується для роботи, повинно бути стерильним, всі залишкові кількості ДНК винести за межі робочого місця.

Спектрофотометр, кювети, епендорфи, автоматичні дозатори, наконечники, рукавички без пудри.

Виділені препарати нуклеїнових кислот;

dH₂O;

детергент;

96°-ий етанол;

3М CH₃COONa.

Хід роботи

1. Візьміть кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно відмийте її детергентом, ополосніть dH₂O (дистильованою водою).
2. Виділені високомолекулярні взірці ДНК перемішайте перед нанесенням. По 5 мкл кожного із взірців виділеної РНК перед нанесенням переосадіть: внесіть по 2,5 об'ємів до 0,15 М.
3. Розведіть виділені взірці ДНК у 40 разів (25 мкл ДНК і 975 мкл dH₂O), а отримані препарати РНК у 10 разів (100 мкл РНК і 900 мкл dH₂O).
4. На приладі виміряйте поглинання OD dH₂O, яке використовується як референс, в ділянках із довжинами хвиль 260, 280 і 230 нм.
5. Виміряйте поглинання отриманих розчинів ДНК і РНК за вищезазначених довжинах хвиль.

6. Ретельно відмийте кювету детергентом, ополосніть dH₂O. Виміряйте поглинання dH₂O в ділянці з довжиною хвилі 330 нм.
7. Виміряйте поглинання отриманих розчинів ДНК і РНК за 330 нм.
8. Розрахуйте концентрацію ДНК і РНК у взірцях на основі поглинання за 260 нм і довжини оптичного шляху – 1 см:
 $OD_{260} = 1$ відповідає 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК і 40 мкг/мл РНК.
 Концентрацію НК розрахуйте за формулами:

$$C_{\text{ДНК}} (\text{мкг/мкл}) = [OD_{260} \times 50 \text{ мкг/мл} \times 40 (\text{ступінь розведення})] / 1000 (\text{мкл});$$

$$C_{\text{РНК}} (\text{мкг/мкл}) = [OD_{260} \times 40 \text{ мкг/мл} \times 10 (\text{ступінь розведення})] / 1000 (\text{мкл}).$$

9. Розрахуйте відношення величини OD, що вимірювали за 260, до величини OD, яку одержували за 280 нм (OD_{260}/OD_{280}), і відношення величини OD, що вимірювали за 260, до величини OD, яку одержували за 230 нм (OD_{260}/OD_{230}), що свідчать про чистоту НК.
10. Розведіть взірці ДНК і РНК dH₂O до концентрації 50 нг/мкл і зберігайте за -20 °C до наступних маніпуляцій або упродовж року (зокрема, РНК зберігати під 96 %-им етанолом. Це означає додати 2,5 об'єми 96 %-ого етанолу до розчину РНК з dH₂O, зберігати за -20 °C).
11. Зробіть висновок про кількість та якість виділеної ДНК і РНК.

Висновки:

Лабораторна робота №13

Тема: Кількісне визначення протеїнів у розчині методом Бредфорда

Мета роботи: навчитись визначати концентрацію протеїну у досліджуваному розчині методом Бредфорда.

Завдання:

1. Побудувати калібрувальну криву за відомими концентраціями розчину та дослідженими значеннями оптичної густини поглинання.
2. Визначити концентрацію протеїну у досліджуваному розчині за калібрувальною кривою.

Матеріали та обладнання, реактиви.

Фотоелектроколориметр або спектрофотометр, кювети, епендорфи, автоматичні дозатори, наконечники, рукавички без пудри.

реагента Бредфорда. Приготування: барвник *Coomassie brilliant blue R-250* масою 10 мг прогомогенізуйте в 5 мл 95 %-го етилового спирту. Отриманий розчин змішайте з 10 мл 95 %-ї фосфатної кислоти, доведіть водою до кінцевого об'єму 100 мл. Відфільтрований розчин барвника зберігайте за кімнатної температури близько двох тижнів.

розчин БСА (10 мг/мл);

розчин досліджуваного протеїну;

барвник кумасі;

фосфатна кислота.

dH₂O;

детергент.

Барвник *Coomassie Brilliant Blue R-250* за розчинення у фосфатній кислоті має червоно-коричневе забарвлення (аніонна форма), та при зв'язуванні з аргініном і гідрофобними амінокислотними залишками протеїнів, забарвлення змінюється на голубе ($\lambda_{\text{max}} = 595$ нм, катіонна форма). Оптична густина поглинання розчину за 595 нм пропорційна кількості протеїнів у розчині. Суть методу у внесенні барвника до розчину протеїнів і

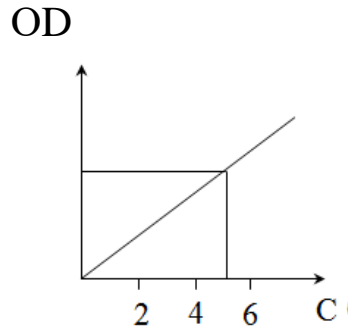
вимірювання оптичної густини поглинання розчину барвника до розчину протеїнів.

Отримане значення порівнюють з калібрувальною кривою, що побудована за оптичними густинами поглинання розчинів з відомою концентрацією бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

Значення концентрації протеїнів можна виміряти у межах від 2 мкг/мл до 120 мкг/мл.

Хід роботи

1. За таблицею 1 приготуйте п'ять взірців розчину БСА з різною концентрацією.
2. До 0,5 мл розчину досліджуваного протеїну внесіть 0,5 мл реагента Бредфорда. Перемішайте, від 5 с до 30 хв зміниться забарвлення.
3. Візьміть кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно відмийте її детергентом, ополосніть dH₂O (дистильованою водою).
4. До контролю – 0,5 мл dH₂O внесіть внесіть 0,5 мл реагента Бредфорда. Перемішайте, від 5 с до 30 хв зміниться забарвлення.
5. Розведений взірець фотометруйте за $\lambda = 595$ нм проти контролю. Отримане значення OD повинно бути у межах 0,005–2,5. У іншому випадку взірець концентрують або розводять.
6. До кожного з приготованих взірців розчину БСА внесіть по 0,5 мл реагента Бредфорда. Перемішайте, від 5 с до 30 хв зміниться забарвлення.
7. Фотометруйте взірці за $\lambda = 595$ нм проти контролю.
8. Отримані значення OD запишіть. Побудуйте криву: на осі абсцис відкладіть значення концентрації протеїна (від 0 до 10 мг/мл, крок – 0,5), на осі ординат – значення OD, що відповідає даній кількості (від 0 до 2,5, крок – 0,05).
9. Розрахуйте концентрацію розчину досліджуваного протеїну за калібрувальною кривою, побудованою за БСА. Для цього на осі ординат відкладіть отримане значення OD розчину досліджуваного протеїну і на перетині з кривою визначіть, якій концентрації воно відповідає.
10. Графік будують на міліметровому папері за прикладом.



Таблиця 1

Співвідношення об'ємів води та розчинів протеїна для побудови калібрувального графіка

№ пробірки	V_{H_2O} , мл	$V_{білка}$, мл	$C_{білка}$, мг/мл
1	-	1	10
2	0,2	0,8	8
3	0,4	0,6	6
4	0,6	0,4	4
5	0,8	0,2	2
6 (контроль)	1	-	0
7 (дослід)	-	1	x

Висновки: _____

Лабораторна робота №14

Тема: Кількісне визначення протеїнів у розчині методом Лоурі

Мета роботи: навчитись визначати концентрацію протеїну у досліджуваному розчині методом Лоурі.

Завдання:

1. Побудувати калібрувальну криву за відомими концентраціями розчину та дослідженими значеннями оптичної густини поглинання.
2. Визначити концентрацію протеїну у досліджуваному розчині за калібрувальною кривою.

Матеріали та обладнання, реактиви.

Фотоелектроколориметр або спектрофотометр, кювети, епендорфи, автоматичні дозатори, наконечники, рукавички без пудри.

Реактив Фоліна. Приготування 1 л реактиву: 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчинити у 700 мл води у круглодонній колбі на 1 л, оснащій пришліфованим зворотнім холодильником Лібіха. Внести 50 мл 50%-вої H_3PO_4 і 100 мл HCl (конц.). Помістити у колбу кілька капілярів (центрів кипіння) і кип'ятити упродовж 10-ти год. Внести 150 г Li_2SO_4 , 50 мл води і кілька краплин бром у (3). Від'єднавши зворотній холодильник, кипятити вміст колби під витяжкою 15 хв для видалення залишків бром у. Охолодити, довести водою до 1 л.

розчин БСА (10 мг/мл);

розчин досліджуваного протеїну;

Реагенти А і В для методу Лоурі: розчин А – 2%-ий Na_2CO_3 ;

розчин В – 5%-ий $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ому Na цитраті;

50%-ва трихлорацетатна кислота;

dH_2O ;

детергент.

Метод Лоурі базується на утворенні кольорових продуктів реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на визначення пептидних зв'язків.

У кислому середовищі під час взаємодії Купруму (11) сульфату з пептидними групами протеїнів –CO–NH– утворюються комплексні сполуки фіолетового забарвлення. Йони Cu^{2+} змінюються на Cu^+ . Одновалентні йони Купруму реагують з реактивом Фоліна, утворюючи нестабільний продукт, який переходить у молібденову синь з максимумом поглинання за 750 нм. Збільшення А пропорційне концентрації протеїна. Метод Лоурі майже у 100 разів чутливіший, ніж біуретовий. Це дає змогу визначати слідові кількості білка (20–50 мкг/мл).

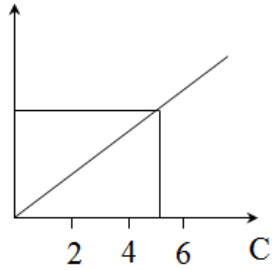
Хід роботи

1. За таблицею 1 (лабораторна робота №13) приготуйте п'ять взірців розчину БСА з різною концентрацією.
2. До 0,8 мл розчину досліджуваного протеїну внесіть 0,2 мл 50%-ої трихлорацетатної кислоти, перемішайте. Зачекайте 10 хв, центрифугуйте 10 хв за 14000 об/хв.
3. Супернатант злийте, внесіть до осаду 150 мкл 1М NaOH, 50 мкл 10%-ого SDS, 0,75 мл розчину D (суміш А і В, 50:1), 50 мкл реактиву Фоліна. Перемішайте і чекайте зміни забарвлення 30 хв.
4. До контролю – 1 мл dH_2O внесіть 150 мкл 1М NaOH, 50 мкл 10%-ого SDS, 0,75 мл розчину D (суміш А і В, 50:1), 50 мкл реактиву Фоліна. Перемішайте і чекайте зміни забарвлення 30 хв.
5. Візьміть кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно відмийте її детергентом, ополосніть dH_2O (дистильованою водою).
6. Взірець (п. 3) фотометруйте за $\lambda = 750$ нм проти контролю. На фотоелектроколориметрі довжина хвилі 750 нм (червоний світлофільтр). Отримане значення OD повинно бути у межах 0,005–2,5. У іншому випадку взірець концентрують або розводять.
7. До кожного з приготованих взірців розчину БСА внесіть по 0,2 мл 50%-ої трихлорацетатної кислоти, перемішайте. Зачекайте 10 хв, центрифугуйте 10 хв за 14000 об/хв.
8. Супернатант злийте з кожної пробірки злийте, внесіть до осадів 150 мкл 1М NaOH, 50 мкл 10%-ого SDS, 0,75 мл

розчину D (суміш A і B, 50:1), 50 мкл реактиву Фоліна. Перемішайте і чекайте зміни забарвлення 30 хв.

9. Фотометруйте взірці за $\lambda = 750$ нм проти контролю.
11. Отримані значення OD запишіть. Побудуйте криву: на осі абсцис відкладіть значення концентрації протеїна (від 0 до 10 мг/мл, крок – 0,5), на осі ординат – значення OD, що відповідає даній кількості (від 0 до 2,5, крок – 0,05).
12. Розрахуйте концентрацію розчину досліджуваного протеїну за калібрувальною кривою, побудованою за БСА. Для цього на осі ординат відкладіть отримане значення OD розчину досліджуваного протеїну і на перетині з кривою визначіть, якій концентрації воно відповідає.
13. Графік побудуйте на міліметровому папері за прикладом.

OD



Висновки: _____

Лабораторна робота №15
Тема: Кількісне визначення протеїнів у розчині за допомогою біуретового реактиву

Мета роботи: навчитись визначати концентрацію протеїну у досліджуваному розчині біуретовою реакцією.

Завдання:

1. Визначити концентрацію протеїну у досліджуваному розчині за калібрувальною кривою.
2. Визначити концентрацію протеїну у досліджуваному розчині за формулою.
3. Порівняти результати двох способів визначення концентрації.

Матеріали та обладнання, реактиви.

Фотоелектроколориметр або спектрофотометр, кювети, пробірки (8 шт.), скляні палички, піпетки, рукавички без пудри.

Біуретовий реактив. Приготування: до 250 мл H_2O внести 0,75 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ і 3 г калій-натрій виннокислового ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$, сегнетова сіль) – перемішати; до розчину внести 150 мл 10% $NaOH$ і 1 г KI . Загальний об'єм доводять дистильованою водою до 1 л.

Стандартний розчин альбуміну (10 мг/мл);

розчин досліджуваного протеїну;

dH_2O ;

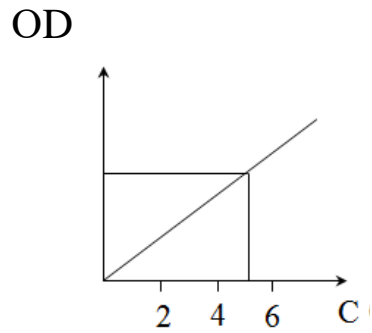
детергент.

Біуретовий метод ґрунтується на утворенні комплексних сполук синьо-фіолетового забарвлення у результаті взаємодії йонів Купруму з пептидними зв'язками протеїна в лужному середовищі. Забарвлений комплекс утворюється лише з пептидами, які містять більше, ніж 4 амінокислотні залишки.

Абсорбцію розчину (прямо пропорційну концентрації пептиду) визначають за 540 – 560 нм. Чутливість методу – 2–10 мг/мл.

Хід роботи

1. Для визначення кількісного вмісту протеїна біуретовою реакцією приготуйте 8 пробірок. 5 з них необхідні для побудови калібрувальної кривої.
2. У 5 пробірок внесіть 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл розчину, який містить альбумін (з концентрацією 10 мг/мл), що відповідає 2, 4, 6, 8, 10 мг відповідно. Загальний об'єм у пробірках доведіть до 1 мл дистильованою водою (таблиця 1, лабораторна робота № 13).
3. У шосту контрольну пробірку внесіть лише 1 мл води, протеїн тут відсутній.
4. У сьому пробірку внесіть 1 мл досліджуваного розчину протеїну.
5. У восьму пробірку внесіть 1 мл стандартного розчину протеїну.
6. У кожену пробірку внесіть по 4 мл біуретового реактиву. Вміст пробірок перемішайте і залишіть на 30 хв за кімнатної температури.
7. Інтенсивність забарвлення визначіть на ФЕКу при зеленому світлофільтрі (540–560 нм) за довжини хвилі 540 нм. Визначення проводять проти розчину з контрольної проби, що містить всі компоненти, окрім протеїну (шоста пробірка).
8. Отримані значення OD запишіть. Побудуйте калібрувальну криву: на осі абсцис відкладіть значення концентрації протеїна (від 0 до 10 мг/мл, крок – 0,5), на осі ординат – значення OD, що відповідає даній кількості (від 0 до 2,5, крок – 0,05).
9. Розрахуйте концентрацію розчину досліджуваного протеїну за калібрувальною кривою. Для цього на осі ординат відкладіть отримане значення OD розчину досліджуваного протеїну і на перетині з кривою визначіть, якій концентрації воно відповідає.
10. Графік побудуйте на міліметровому папері за прикладом.



11. Розрахуйте вміст протеїну в розчинах за формулою:

$$C_{\text{досл}} = C_{\text{ст}} (A_{\text{досл}} / A_{\text{ст}})$$

$C_{\text{досл}}$ – концентрація невідомого розчину протеїну,

$C_{\text{ст}}$ – концентрація стандартного розчину протеїну (100 г/л),

$A_{\text{досл}}$ – екстинкція дослідної проби (невідомого розчину протеїну),

$A_{\text{ст}}$ – екстинкція стандартного розчину протеїну.

Приклад розрахунку.

Якщо екстинкція стандартної проби дорівнює 0,40, а дослідної – 0,28, то: $C_{\text{досл}} = 100 \cdot 0,28 / 0,40 = 70$ (г/л)

Висновки: _____

Лабораторна робота №16

Тема: Визначення вмісту казеїногену у молоці титриметричним методом

Мета роботи: ознайомлення з методом визначення вмісту казеїногену у молоці методом титриметрії

Завдання:

Матеріали та обладнання, реактиви

Складчасті паперові фільтри, конічні колби (50 мл (2 шт.), 200 мл (2 шт.)), скляні палички, циліндри мірні, піпетки, бюретки, крапельниці.

Сепароване молоко;

0,04 н розчин сульфатної кислоти;

1%-ий спиртовий розчин фенолфталеїну;

0,1 моль/л розчин Калію гідроксиду.

Визначення вмісту казеїногену в молоці базується на тому, що казеїноген має кислу реакцію і тому різниця між об'ємом розчину, необхідним для нейтралізації зібраного молока, і об'ємом, витраченим на нейтралізацію сироватки після осадження казеїногену, – це об'єм лугу, який потрібен для нейтралізації казеїногену. Знаючи еквівалентну масу казеїногену, можна визначити його кількість у молоці.

Хід роботи

1. Підготуйте дві колби (колба №1; колба №2) об'ємом 200 мл, підпишіть.
2. У колбу №1 внесіть 40 мл води і 20 мл молока, у колбу №2 – 20 мл води і 10 мл молока.
3. Вміст колби №1 титруйте, постійно перемішуючи, розчином сульфатної кислоти (0,04 н) до випадання казеїногену в осад (титрувати по 1 краплині і щоразу старанно перемішувати!). Фіксуйте кількість витраченого розчину H_2SO_4 .
4. Вміст колби №2 також титруйте розчином сульфатної кислоти, причому її повинно витратитись на титрування у 2 рази менше, ніж для вмісту колби №1 (у колбі №2 також осаджується казеїноген).

5. Розчин у колбі №1 (з осадом казеїногену) доведіть дистильованою водою до загального об'єму 100 мл і фільтруйте у чисту колбу або стакан. З отриманого фільтрату (це сироватка) відбиріть 50 мл і внесіть у чисту колбу на 200 мл.
6. У колбу №2 (в якій міститься розчин і осад осадженого казеїногену) вносять 1 мл розчину фенолфталеїну і титруйте 0,1 н розчином КОН до появи стійкого світлорожевого забарвлення, яке не зникає упродовж 30 с Об'єм КОН, який витрачено на титрування, запишіть (V).
7. У колбу із 50 мл сироватки також внесіть 1 мл фенолфталеїну і титруйте 0,1 н розчином КОН до появи стійкого рожевого кольору. Об'єм КОН, який витрачено на титрування, запишіть (V₁).
8. Масову долю казеїногену у молоці (мг/мл) обчисліть за формулою:

$$C = (V - V_0) * K * Q / V_m,$$

де V – об'єм КОН (мл), який витрачено на титрування молока у колбі №2;

V₀ – об'єм КОН (мл), який витрачено на титрування 50 мл сироватки;

K – коефіцієнт поправки на титр 0,1 н розчину КОН;

Q – маса казеїногену, еквівалентна 1 мл 0,1 н розчину КОН (11,315 мг);

V_m – об'єм молока, який використано для аналізу (у даній лабораторній роботі – 10 мл).

Висновки: _____

Лабораторна робота №17

Тема: Кількісне визначення зелених пігментів спектрофотометричним методом

Мета роботи: ознайомлення з методами екстрагування, кількісного визначення вмісту пігментів, їх концентрації.

Завдання:

1. Екстрагувати пігменти рослин.
2. Обрахувати концентрацію пігментів та вміст хлорофілів у рослинному матеріалі.

Матеріали, обладнання, реактиви

Фарфорові ступки з товчачиками, ваги, фільтр Шотга № 3 або № 4, колба Бунзена, вакуумний насос, мірні пробірки об'ємом 10 або 20 мл, піпетки на 1,5 та 10 мл, мірні циліндри об'ємом 50 та 100 мл, конічні колби, об'ємом 100 мл, спектрофотометр, ножиці, лід.

Досліджувані рослини;

ацетон або інший розчинник;

вуглекислий кальцій (крейда) або Магнію карбонат;

Зелені пігменти – хлорофіли – мають велике значення у процесі фотосинтезу, оскільки є первинними акцепторами сонячної енергії. Від їхньої кількості значною мірою залежить інтенсивність фотосинтезу.

Кількість зелених пігментів може бути визначена за допомогою вимірювання оптичного поглинання при певній довжині хвилі світла. Інтенсивність поглинання світла (оптична густина) залежить від концентрації пігментів у розчині і може бути встановлена за допомогою спектрофотометру. Слід враховувати, що максимум поглинання залежить не тільки від природи пігменту, але і від розчинника, який використовується для екстракції пігментів.

Хід роботи

1. Візьміть наважку (0,025–0,1 г) свіжого рослинного матеріалу і ретельно розітріть її у фарфоровій ступці з невеликою кількістю розчинника (2–3 мл) та крейди (CaCO_3) або MgCO_3 .

2. Ступку закрийте кришкою чашки Петрі зі скла, або пластинку і вміст настоюйте упродовж 2–3 хв. Гомогенат перенесіть на скляний фільтр Шотта № 3 або № 4 (діаметр пор 40 або 16 мкм), який вставте у колбу Бунзена, з'єднану з вакуумним насосом, і профільтруйте. Екстракцію повторіть декілька разів до повного знебарвлення рослинного матеріалу.
3. Фільтрат кількісно перенесіть у мірну пробірку і об'єм фільтрату доведіть до 10 мл розчинником. Отримана витяжка містить суміш зелених та жовтих пігментів. Далі визначіть оптичну густину розчину пігментів, налаштовуючи довжини хвиль, залежно від використаного розчинника (таблиця 1).
4. Візьміть кварцеву кювету на 1 мл, довжина оптичного шляху – 1 см. Ретельно відмийте її детергентом, ополосніть dH₂O (дистильованою водою), внесіть 1 мл екстракту. Фотометруйте проти контролю (розчинник).
5. Результати запишіть.
6. За таблицю 1 розрахуйте концентрацію (C) залежно від використаного для екстракції пігментів розчинника.

Таблиця 1

Значення довжин хвиль для вимірювання вмісту пігментів та формули розрахунку концентрацій залежно від використаного для екстракції пігментів розчинника

Розчинник	Пігмент	Довжина хвилі, нм	Формула розрахунку концентрації, мг/л
Ацетон – 80 % (Вернон)	Хлорофіл а	662	$C_{chl\ a} = 11,63 \cdot OD_{665} - 2,39 \cdot OD_{649}$
	Хлорофіл b	649	$C_{chl\ b} = 20,11 \cdot OD_{649} - 5,18 \cdot OD_{665}$
	Сума		$C_{chl\ a+b} = 6,45 \cdot OD_{665} + 17,72 \cdot OD_{649}$
Ацетон – 80 % (Ліхтенгелер)	Хлорофіл а	663	$C_{chl\ a} = 11,63 \cdot OD_{663} - 2,39 \cdot OD_{646}$
	Хлорофіл b	646	$C_{chl\ b} = 20,11 \cdot OD_{646} - 5,18 \cdot OD_{663}$
	Каротиноїди	479	$C_{kar} = (1000 \cdot OD_{470} - 3,27 \cdot C_{chla} - 100 \cdot C_{chlb}) / 229$
Етанол – 96 % (Вінтерманс де Мотс)	Хлорофіл а	66	$C_{chl\ a} = 13,70 \cdot OD_{665} - 5,76 \cdot OD_{649}$
	Хлорофіл b	649	$C_{chl\ b} = 21,19 \cdot OD_{649} - 4,56 \cdot OD_{665}$

Розчинник	Пігмент	Довжина хвилі, нм	Формула розрахунку концентрації, мг/л
Ацетон – 100 % (Хольм-Ветштейн)	Хророфіл а	662	$C_{chl a} = 9,784 \cdot OD_{662} - 0,990 \cdot OD_{644}$
	Хлорофіл b	664	$C_{chl b} = 21,426 \cdot OD_{644} - 4,650 \cdot OD_{662}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 5,134 \cdot OD_{662} + 20,436 \cdot OD_{644}$
	Каротиноїди	440,5	$C_{kar} = 4,695 \cdot OD_{440.5} - 0,268 \cdot (C_{chla} + C_{chlb})$
Ацетон – 100 % (Шлик)	Хророфіл а	662	$C_{chl a} = 11,70 \cdot OD_{662} - 2,09 \cdot OD_{644}$
	Хлорофіл b	664	$C_{chl b} = 21,19 \cdot OD_{644} - 4,56 \cdot OD_{662}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 7,14 \cdot OD_{662} + 19,10 \cdot OD_{644}$
Етиловий ефір	Хророфіл а	660	$C_{chl a} = 9,93 \cdot OD_{660} - 0,77 \cdot OD_{642.5}$ або $C_{chl a} = 12,3 \cdot OD_{660} - 3,2 \cdot OD_{642} - 67,5 \cdot D_{535}$
	Хлорофіл b	642,5 642	$C_{chl b} = 17,6 \cdot OD_{642.5} - 2,81 \cdot OD_{660}$ або $C_{chl a} = 18,8 \cdot OD_{642} - 1,51 \cdot OD_{660} - 26,8 \cdot OD_{535}$
	Сума		$C_{chl a+b} = 7,12 \cdot OD_{660} + 16,8 \cdot OD_{642.5}$
	Каротиноїди	480	$C_{kar} = (1000 \cdot OD_{480} - 0,52 \cdot C_{chla} - 16,8 \cdot C_{chlb}) / 226$
	Феофітин	535	$C_c = \text{Фефіт} = 109 \cdot OD_{535} - 6,7 \cdot OD_{642} - 3,4 \cdot D_{660}$

7. Вміст хлорофілів у рослинному матеріалі обчислюють за формулою:

$$A = (C \cdot V) / (n \cdot 1000),$$

де А – вміст пігментів в рослинній тканині, мг/г сирої ваги;

С – концентрація пігментів у витяжці, мг/л;

V – об'єм витяжки пігментів, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Використання фізичних методів у молекулярній біології.
2. Принцип роботи спектрофотометра.
3. Алгоритм спектрофотометрування.
4. Метод фотоколориметрування.
5. Методика титрування розчинів.
6. На чому базується метод визначення концентрації нуклеїнових кислот, протеїнів у розчині?
7. Поясніть, коли абсорбція A називається оптичною густиною – OD .
8. Яким чином розраховується концентрація нуклеїнової кислоти, протеїну в пробі на основі поглинання?
9. Навіщо вимірюють відношення значень поглинання OD_{260}/OD_{280} і OD_{260}/OD_{230} ?

ТЕМА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДНК

Метод ПЛР базується на принципі реплікації ДНК. Його поетапно складають усі базові процеси, які відбуваються під час реплікації: денатурація подвійної спіралі ДНК (плавлення ДНК), обмеження визначеного фрагменту ДНК і комплементарна добудова обох ланцюгів. У реакції беруть участь штучно синтезовані олігонуклеотиди (праймери), комплементарні ділянки гена, яку ідентифікують, дезоксинуклеозидтрифосфати, які є будівельним матеріалом для створення обмеженого праймерами фрагменту і ензим *Taq*-полімераза, за допомогою якого відбувається відтворення специфічного фрагменту ДНК. Новосинтезовані фрагменти ДНК слугують матрицею для синтезу нових ланцюгів у наступному циклі ампліфікації – це, власне, ланцюгова реакція. При цьому число сегментів ДНК, обмежених з обох кінців праймерами, із кожним циклом ПЛР збільшується експоненціально (наближається до залежності 2^n , де n – число циклів). Таким чином, якщо у взірці була лише одна дволанцюгова молекула ДНК, то за 30-40 циклів ампліфікації накопичується близько 10-ти копій молекул амплікону. Такої кількості цілком достатньо для візуальної детекції цього фрагменту методом електрофорезу в агарозному гелі.

Структура ПЛР-лабораторії.

Основною умовою успішної роботи ПЛР-лабораторії є відсутність контамінації обладнання, поверхонь і реактивів молекулами ДНК. У приміщенні, де працюють з ДНК або РНК, фрагменти молекул даних кислот можуть знаходитися у повітрі у вигляді аерозолів, а також на поверхнях столів, приладів. Потрапляння ДНК-мішені або ампліконів у реактиви призводить до хибно-позитивних результатів ПЛР.

Через загрозу контамінації ПЛР-лабораторію поділяють на три блоки – пре-ПЛР блок, ПЛР-блок і пост-ПЛР блок. Ці три приміщення забезпечені УФ-лампами.

У пре-ПЛР блоці здійснюють пробопідготовку взірців. У даному приміщенні знаходяться ламінарні бокси для розливання реактивів і виділення ДНК. У пре-ПЛР блоці також знаходиться холодильник для збереження реактивів. Це, так звана, «чиста» зона ПЛР-лабораторії. У «чистій» зоні працюють в чистих халатах, які перевдягають у передбокснику, у змінному взутті, гумових рукавичках, які не виносять у інші зони ПЛР-лабораторії. У ПЛР-

блоці знаходиться ампліфікатор. Пост-ПЛР блок – це приміщення для проведення методів візуалізації результатів ПЛР, зокрема, електрофорезу. Це, так звана, «забруднена зона» лабораторії. ДНК, яка ампліфікується під час ПЛР у великій кількості, знаходиться у буфері для електрофорезу, на наконечниках, на внутрішній поверхні кришечок епендорфів, на дозаторах, на одязі співробітника тощо. Необхідним перед роботою у пост-ПЛР блоці є перевдягання халату і взуття, зміна гумових рукавичок.

Правила роботи та техніка безпеки у ПЛР-лабораторії.

Усі етапи ПЛР у лабораторії повинні проводитися у одному напрямку: від «чистої» зони до «забрудненої». Ні в якому разі не можна переносити обладнання або предмети із «забрудненої» зони у «чисту». Якщо на різних етапах проведення ПЛР використовуються одні й ті ж реактиви, необхідно, щоб у окремих блоках знаходилися різні упаковки, які б не виносилися за межі блоків лабораторії.

Бажано, щоб на етапах підготування взірців і на етапі електрофорезу працювали різні співробітники.

Стерильності необхідно дотримуватися лише на етапі роботи з дослідним матеріалом та з культурою мікроорганізмів. Реактиви для проведення ПЛР не є стерильними, однак під час роботи з ними слід бути дуже уважним, щоб не допустити потрапляння у пробірки з реактивами пилу, тальку з гумових рукавичок, зайвих речовин (кожен раз при роботі з дозатором потрібно користуватися новим наконечником, який ще не був користованим), ДНК та РНК мікроорганізмів. Щоб уникнути цього, епендорфи з реактивами для ПЛР відкривають на якомога менший термін у стерильному боксі. Реактиви зберігають за 18-20°C у холодильнику, а перед роботою залишають розтопитись на льоді за кімнатної температури. Працюють з такими реактивами якомога швидше і одразу ж після роботи переносять у холодильник.

На етапі аналізу продуктів ПЛР важливими є правила безпеки роботи з Етидієм бромистим, який використовується як барвник для нуклеїнових кислот під час електрофоретичного розділення. Необхідно уникати потрапляння бромистого етидію у розчині або порошку у дихальні шляхи, на шкіру і слизові оболонки. Бромистий етидій– канцероген.

Для проведення ПЛР-аналізу необхідні наступні матеріали і устаткування:

ЗОНА 1 (пре-ПЛР, 1 етап) – виділення ДНК із досліджуваного

матеріалу:

- ✓ настільний або стаціонарний бокс із бактерицидною лампою;
- ✓ термостат на 25-100°C;
- ✓ мікроцентрифуга до 2500-6000 g;
- ✓ центрифуга/вортекс;
- ✓ окремий набір автоматичних мікропіпеток перемінного об'єму;
- ✓ одноразові наконечники із аерозольним бар'єром;
- ✓ одноразові поліпропіленові пробірки типу "Eppendorf" об'ємом 0,5 і 1,5 см³.

ЗОНА 2(ПЛР блок 2 етап) – власне ПЛР (ампліфікація):

- ✓ запрограмований термостат (ампліфікатор, термоциклер);
- ✓ настільний бокс або окремий стіл із бактерицидною лампою;
- ✓ окремий набір автоматичних мікропіпеток змінного об'єму;
- ✓ одноразові наконечники;
- ✓ одноразові поліпропіленові пробірки типу "Eppendorf" об'ємом 0,2 або 0,5 см³;
- ✓ штативи для пробірок типу "Eppendorf" об'ємом, відповідно, 0,2 або 0,5 см³;
- ✓ термостат на 95°C;
- ✓ холодильник (2–8°C) або морозильник (-20°C) для взірців ДНК.

ЗОНА 3 (пост-ПЛР-блок, 3 етап) – електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації:

- ✓ камера для горизонтального електрофорезу;
- ✓ джерело постійного струму з напругою 150-200 В;
- ✓ УФ-трансільюмінатор для проявлення гелів;
- ✓ фотоапарат для фотографування гелів або *web*-камера;
- ✓ аквадистилятор;
- ✓ окремий автоматична піпетка на 10–40 мкл з одноразовими наконечниками;
- ✓ мірний циліндр на 1 дм³;
- ✓ колба конічна з термостійкого скла для плавлення агарози;
- ✓ електроплитка чи інше джерело тепла для плавлення агарози;
- ✓ планшети для заливки гелів, гребінки та затискачі;
- ✓ ванночка для розчину бромистого етідію;
- ✓ ємність для дезактивації буферу і гелів, що містять Етидій бромистий.

Виділена нуклеїнова кислота має бути достатньо очищена від протеїнів та інгібіторів термостабільної ДНК-полімерази, і водночас,

зберігати нативність.

Питання для самоконтролю:

1. Реплікація, гіпотези реплікації ДНК.
2. Характеристика ДНК-репліказної системи.
3. Що таке праймер, його роль у процесі реплікації?
4. ДНК-полімераза, її функції.
5. Характеристика транскрипції.
6. Як відбувається зростання ланцюга РНК?
7. Необхідні умови транскрипції.
8. Охарактеризуйте структуру РНК полімерази прокаріот.
9. Охарактеризуйте структуру РНК полімерази еукаріот.
10. Преініціаторний комплекс.
11. Характеристика процесингу, сплайсингу.
12. Охарактеризуйте метод ПЛР.
13. Охарактеризуйте метод електрофорезу.

ТЕМА 5. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕЇНІВ: ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА), РЕНТГЕНОСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ

Метод ІФА чи ELISA-тест (*enzyme linked immunoadsorbent assay*) – визначення за допомогою імуносорбентів, пов'язаних з

1. Здатність ензимів та антитіл зв'язуватись з твердим субстратом;
2. Створення комплексу антитіло-ензим (Ab-F) – кон'югату.

Будь-яку речовину у біоматеріалі, яка володіє властивостями антигену, можна кількісно визначити ІФА. Для проведення цього методу необхідно мати очищений антиген, специфічне антитіло, ензим як мітку для антигена чи антитіла і засіб реєстрації активності ензима (спектрофотометр). Усі компоненти є складовими тест-систем (діагностикумів). Основою ІФА є специфічна взаємодія антитіла з антигеном, при цьому один з компонентів кон'югованих з ензимом, у результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворює забарвлений продукт, концентрацію якого можна визначити спектрофотометрично.



Рентгеноструктурний аналіз.

Головною технікою, яка дозволяє встановити просторову структуру макромолекули з роздільною здатністю до кількох ангстремів, є рентгеноструктурний аналіз. Об'єктом аналізу є кристал, у складі якого однакові макромолекули чи макромолекулярні комплекси утворюють впорядковану тривимірну решітку. Кристали, придатні для рентгеноструктурного аналізу (розміром щонайменше 0,3 мм), готують із перенасичених розчинів макромолекул, контролюючи швидкість зростання кристала за рахунок варіювання концентрації солі, температури, додаючи органічні розчинники тощо. У кристалах протеїнів і нуклеїнових кислот, як правило, залишається значна кількість упорядкованих молекул води. Вузкий рентгенівський промінь буде частково розсіюватись на атомах кристала. Оскільки групи атомів періодично повторюються у кристалі, розсіяні промені будуть інтерферувати між собою, підсилюючи один одного в певних точках на детекторі, що реєструє рентгенівські промені після проходження їх крізь взірець. У результаті на детекторі формується впорядкований розподіл так званих рефлексів – точок високої інтенсивності.

Картина рентгенівського розсіювання містить інформацію щодо просторових позицій атомів у кристалі. Вилучення цієї інформації є досить складним математичним завданням, хоча сьогодні комп'ютерна техніка дозволяє аналізувати рентгенограми досить швидко: лімітуючим кроком рентгеноструктурного аналізу є практичне вирощування кристалів.

Безпосереднім результатом аналізу рентгенограми є складна тривимірна карта електронної щільності. Інтерпретація цієї карти є можливою за умови, що послідовність біополімеру в складі кристала є відомою. Шляхом численних підгонок на комп'ютері ця послідовність (чи послідовності кількох елементів досліджуваного комплексу) узгоджується з електронною картою, результатом чого є встановлення просторової координати кожного атома в макромолекулі. Саме таким шляхом отримано інформацію про структуру численних протеїнів і міжмолекулярних комплексів. Проте, як правило, великі макромолекули виявляються надто складними для того, щоб рентгенівське розсіювання на їхніх кристалах дозволило отримати тривимірну структуру. Для визначення структури більшості

протеїнів, нуклеїнових кислот і комплексів застосовують метод ізоморфних похідних, який потребує набору кристалів макромолекули: вихідний кристал і принаймні два-три кристали, які були б ідентичними, але містили б атоми важких металів, що значно інтенсивніше розсіюють рентгенівське світло.

Лабораторна робота №18

Тема: Визначення присутності антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА

Мета роботи: ознайомлення з методом ІФА, визначення присутності антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА.

Завдання:

1. Дослідити присутність антитіл до тиреопероксидази (АТ ТПО) у сироватці крові ІФА.

Матеріали, обладнання та реактиви

сироватка крові;

автоматичні одно- та багатоканальні дозатори фіксованого або змінного об'єму 5-1000 мкл;

термошейкер;

аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450 нм.

Тест-система:

1. Планшет з іммобілізованим антигеном та мікропробірки для попереднього розведення сироватки, 8x12 лунок;
2. Стрічки для заклеювання планшетів;
3. Розчини для попереднього розведення сироваток і розведення досліджуваного зразку;
4. Набір калібраторів та контролю по 1,0 мл (всього 5 калібраторів: 0, 30, 100, 300, 1000 МОд/мл; 1 контроль)
5. Відмиваючий розчин концентрат 20x, 22 мл
6. Кон'югат, 11 мл
7. Субстрат, 11 мл
8. Стоп-реагент, 11 мл

Розроблено тест-систему для визначення антитіл (АТ) до тиреопероксидази (ТПО) в сироватці крові. У лунку планшета з іммобілізованим антигеном (тиреопероксидази) вносять досліджуваний взірець. АТ до ТПО взірця зв'язується з антигеном на поверхні лунки, утворюючи комплекс антитіло-антиген. Незв'язаний матеріал видаляється промиванням. У лунку вносять кон'югат (антитіла проти IgG людини, мічені пероксидазою). Після чергового відмивання активність ензиму, зв'язаного на

поверхні лунки планшету, проявляється додаванням субстрату, та вимірюється за довжини хвилі 450 нм. Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна кількості АТ до ТПО у взірці.

Хід роботи

1. Помістіть у рамку потрібну кількість стрипів – 12 лунок для калібраторів, контролю та зразків у 2 паралелях;
2. Внесіть у лунки 100 мкл калібраторів, контролю та попередньо розведених досліджуваних зразків з розчином для розведення зразків згідно інструкції до тест-системи («Бест діагностик»);
3. Інкубуйте 30 хвилин за 37°C у термошейкері;
4. Відмийте стрипи 3 рази промиваючим розчином;
5. Внесіть у лунки 120 мкл кон'югату;
6. Інкубуйте 30 хвилин за 37°C у термошейкері;
7. Відмийте стрипи 5 разів промиваючим розчином;
8. Внесіть у лунки 100 мкл субстрату;
9. Інкубуйте 15 хвилин за 20–25°C в темному місці;
10. Внесіть у лунки 100 мкл стоп-реагенту;
11. Виміряйте оптичну щільність (ОЩ) у лунках на аналізаторі імуноферментному при довжині хвилі 450 нм. Бланк фотометра виставляйте проти нульового калібратора.
12. Побудуйте калібрувальну криву і визначіть концентрацію ТПО за допомогою комп'ютерної програми.

Висновки: _____

Питання для самоконтролю:

1. Трансляція. Необхідні компоненти трансляції.
2. Еукаріотична, прокаріотична рибосоми.
3. Функціональні центри рибосоми *Thermus thermophilus*.
4. Посттрансляційна модифікація протеїнів.
5. Принцип ІФА.
6. Рентгеноструктурний аналіз.

ПРИГОТУВАННЯ ОКРЕМИХ РОЗЧИНІВ

Приготування 1М Тріс-НСІ, рН 8,0: розчинити 121,1 г трису у 80 мл H_2O , внести 42 мл конц. HCl . Охолодити розчин до кімнатної температури, довести рН до 8,0 титруванням HCl . Довести об'єм до 1 л. Розчин стерилізують автоклавуванням. Приблизна кількість конц. HCl для приготування розчинів з різним рН: рН 7,4 -70 мл; рН 7,6 – 60 мл; рН 8,0 – 42 мл.

Приготування 0,5М ЕДТА, рН 8,0: внести 186,1 г двозаміщеної солі $\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$ до 800 мл H_2O . Перемішати, довести рН NaOH (приблизно 20 г). Розчин стерилізують автоклавуванням. Динатрієва сіль ЕДТА не розчиниться поки не встановлено рН 8,0.

Приготування 5М NaCl : розчинити 292,2 г NaCl у 800 мл H_2O . Довести об'єм до 1 л. Розчин стерилізують автоклавуванням.

Приготування 3М ацетату Na : розчинити 408,1 г ацетату $\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ в 800 мл H_2O . Довести рН до 5,8 конц. ацетатною кислотою. Довести об'єм до 1 л. Розчин стерилізують автоклавуванням.

Приготування 10% додецилсульфату Na : розчинити 100 г SDS в 900 мл H_2O . Нагріти до 68°C . Довести рН до 7,2 титруванням конц. HCl (кілька крапель). Довести об'єм до 1 л. Працювати під витяжною шафою. Не стерилізують.

Приготування бромистого етидію 1 мг/мл: розчинити 0,1 г бромистого етидію в 100 мл H_2O . Перемішати до повного розчинення.

Приготування 1%-ого агарозного гелю для електрофорезу: 1 г агарози розчинити у 100 мл 1х TAE , нагріти в мікрохвильовій печі до повного розплавлення агарози. Охолодити суміш до 50°C . Внести до агарози 20 мкл бромистого етидію і обережно перемішати, уникаючи утворення пухирців повітря.

Приготування 1х буферу TE : на 100 мл: 1 М Тріс-НСІ , рН 8,0 – 1 мл; 0,5 М ЕДТА , рН 8,0 – 200 мкл; H_2O до 100 мл.

Приготування 6х буферу для нанесення проб: 0,025 %-ий бромфеноловий синій, 30 %-ий гліцерин.

Реактив дифеніламіновий: 1 г дифеніламіну розчинити в суміші 2,75 мл концентрованої сульфатної кислоти і 100 мл концентрованої ацетатної кислоти.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА З ДИСЦИПЛІНИ «БІОЛОГІЯ КЛІТИНИ З ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ»

Базова

1. Боєчко Ф. Ф., Боєчко Л. О., Шмиголь І. В. Основи молекулярної біології: курс лекцій. Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. 255 с.
2. Васько Л. В., Кіптенко Л. І., Гортинська О. М., Гринцова Н. Б. Навчальний посібник для самостійної роботи з курсу «Гістологія, цитологія і ембріологія». МОДУЛЬ І «Основи цитології» «Цитологія в питаннях і відповідях». Суми: СумДУ, 2014. 106 с.
3. Войцехівська О. В., Капустян А. В., Косик О. І. Фізіологія рослин: практикум / За заг. ред. Т. В. Паршикової. Луцьк: Терен, 2010. 420 с.
4. Гиль М. І., Сметана О. Ю., Юлевич О. І. Молекулярна генетика та технології дослідження геному : навч. посіб. Миколаїв : МНАУ, 2014. 280 с.
5. Держинський М. Е., Гарматіна С. М., Данилова О. В. Посібник до лабораторних занять із курсу «Загальна цитологія та гістологія». Київ : Фітосоціоцентр, 2006. 112 с.
6. Дубінін С. І., Пілюгін В. О., Ваценко А. В., Улановська-Циба Н. А., Передерій Н. О. Сучасні проблеми молекулярної біології: підруч. Полтава: ПНУ, 2016. 395 с.
7. Загальна цитологія. Практикум : навч. посіб. / М. Е. Держинський, О. К. Вороніна, Н. В. Скрипник, С. М. Гарматіна, Л. М. Пазюк; упорядкування Н. В. Скрипник. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2011. 126 с.
8. Ключко С. С., Євтушенко В. М., Федосєєва О. В. Загальна гістологія з курсом ембріології : навч.-метод. посіб. для практичних занять студентів 1 курсу медичних факультетів (частина II). Запоріжжя: ЗДМУ, 2017. 93 с.
9. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підруч. / за редакцією академіка НАН України В.П. Широбокова. Вінниця: Нова Книга, 2011. 952 с.
10. Новак В. П., Мельниченко А. П. Цитологія, гістологія, ембріологія: навч. посіб. Біла Церква, 2005. 255 с.

11. Остапченко Л. І., Михайлик І. В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій: навч. посіб. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. 215 с.
12. Остапченко Л. І., Михайлик І. В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій: навч. посіб. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. 215 с.
13. Остапченко Л. І., Синельник Т. Б., Компанець І. В. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти : навч. посіб. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2016. 639 с.
14. Остапченко Л. І., Синельник Т. Б., Компанець І. В. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: методи дослідження : навч. посіб. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2017. 447 с.
15. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підруч. 2-е вид., доп. і перероб. Київ: НУХТ, 2010. 632 с.
16. Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С. Молекулярна організація хромосом: навч. посіб. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 126 с.
17. Сиволоб А. В. Молекулярна біологія: підруч. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2008. 384 с.
18. Сиволоб А. В. Фізика ДНК: навч. посіб. Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2011. 335 с.
19. Стойка Р. С. Методичні вказівки до навчального курсу «Методи клітинної біології»: навч-метод. посіб. Львів: Львівський державний університет, 1996. 79 с.
20. Столяр О. Б. Молекулярна біологія : навч. посіб. Вид. 2-ге доповнене та перероблене Київ : КНТ, 2017. 224 с.
21. Трускавецький Є. С., Мельниченко Р. К. Гістологія з основами ембріології: підруч. Київ : Вища школа, 2005. 327 с.
22. Юлевич О. І . Біотехнологія : курс лекцій. Миколаїв : МДАУ, 2007. 156 с.

Допоміжна

1. Cooper G. M. The cell: a molecular approach: N.Y.: 2000. 112 pp.
2. Douglas R. Green. Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms: N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2011. 220 pp.

3. Gottlieb R. A., Carreira R. S. Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Aug; 299(2). C203-10. doi: 10.1152/ajpcell.00097.2010.
4. Кравців Р. Й., Колотницький А. Г., Буцьяк В. І. Генетична інженерія: навч. посіб. Львів: 2008. 214 с.
5. Мадіч А.В., Шеремета В.І., Гевкан І.І., Сливчук Ю.І., Штапенко О.В., Федорова С.В. Отримання клітинних культур і можливість їх використання в ембріональній біотехнології : Навчально-методичний посібник, 128 с.

Інформаційні ресурси

Розділ Основи молекулярної біології

1. http://biology.org.ua/files/lib/MolBiol_sivolob.pdf
2. <http://eprints.cdu.edu.ua/76/1/%D0%9E%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B8%20%D0%BC%D0%BE%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8F%D1%80%D0%BD%D0%BE%D1%97%20%D0%B1%D1%96%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%97%20%D0%BA%D1%83%D1%80%D1%81%20%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D0%B9%20%28%D0%BA%D0%BD%D0%B8%D0%B6%D0%BA%D0%BE%D1%8E%29%20%D0%9D%D0%9E%D0%92%D0%90.pdf>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=7Hk9jct2ozY>
4. <https://www.youtube.com/watch?v=gG7uCskUOrA>
5. https://www.youtube.com/watch?v=o_-6JXLYS-k
6. <https://www.youtube.com/watch?v=dKubyIRiN84>
7. <https://www.youtube.com/watch?v=Zg54IEWeTyA>
8. https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Cytologiya/Biblioteka/Zagalna_cyto_site/Zagalna_Cytologiya_ta_gistologiya_Dzerzhynskiy.pdf
9. <http://patsudmed.dsmu.edu.ua/attachments/article/25/202003.pdf>
10. http://biol.univ.kiev.ua/posib/bio_memOsMikh.pdf
11. https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Biol_membrany/Ostapchenko_Kompanets_Biol.membrany.pdf
12. <https://www.youtube.com/watch?v=RKmaq7jPnYM>
13. <https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>
14. <https://www.youtube.com/watch?v=URUJD5NEXC8>
15. <https://www.youtube.com/watch?v=d4TJ4NY1IA0>
16. <https://www.youtube.com/watch?v=2aVnN4RePyI&t=326s>

17. <https://www.youtube.com/watch?v=VLJF8Pf8spw>
18. https://library.udpu.edu.ua/library_files/428513.pdf
19. <http://www-biology.univer.kharkov.ua/biosource-ukr.html>

Шемедюк Наталія Петрівна

Молекулярна біологія
навчально-методичний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Підписано до друку 26.02.2024 р. Формат 60x84
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірус”