

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
Кафедра общей и биоорганической химии

Биохимия и молекулярная биология

Методические указания

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета
для студентов специальности Биология*

Ярославль 2005

УДК 577
ББК Е 072я73
Б 63

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2005 года*

Рецензент
кафедра общей и биоорганической химии Ярославского
государственного университета им. П.Г. Демидова

Составители: **Г.А. Урванцева, Е.Л. Грачева**

Биохимия и молекулярная биология: Метод. указания.
Б 63 2-е изд., перераб. и доп. / Сост. Г.А. Урванцева,
Е.Л. Грачева; Яросл. гос. ун-т. - Ярославль: ЯрГУ, 2005. –
55 с.

Приведены вопросы к контрольным работам и коллоквиумам, описание лабораторных работ, выполняемых студентами при изучении курса биохимии.

Предназначены для студентов, обучающихся по специальности 011600 Биология (дисциплина «Биохимия и молекулярная биология», блок ОПД), очной и заочной форм обучения.

УДК 577
ББК Е 072я73

© Ярославский государственный университет, 2005
© Г.А. Урванцева, Е.Л. Грачева, 2005

Раздел I. Белки

Работа 1. Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

В настоящее время метод хроматографии является одним из наиболее простых, быстрых и точных методов анализа сложных смесей веществ. Он основан на различиях в скорости переноса растворенных веществ в системе двух фаз, одна из которых подвижна.

При хроматографии на бумаге неподвижной жидкой фазой является сорбированная на поверхности бумаги вода, а подвижной - смесь различных органических растворителей, насыщенных водой. Разделение веществ методом хроматографии на бумаге происходит в том случае, если эти вещества существенно различаются по своей растворимости в обеих жидких фазах. Метод распределительной хроматографии аминокислот на бумаге заключается в том, что каплю смеси аминокислот или гидролизата белка наносят на стартовую линию хроматографической бумаги, конец которой опускают в смесь органических растворителей. Чем меньше растворимость аминокислот в воде и чем больше их растворимость в органическом растворителе, тем быстрее они движутся за фронтом органического растворителя. Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином.

Подвижность веществ при хроматографии на бумаге характеризуют с помощью коэффициента скорости движения (R_f), представляющего собой отношение расстояния (мм), пройденного веществом от линии старта, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя.

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное растворителем}}$$

Расстояние, пройденное аминокислотой, измеряют от места ее нанесения до середины пятна. R_f является характерной величиной для каждой аминокислоты и постоянен при данных условиях.

Оборудование, реактивы: сушильный шкаф; электрическая плитка; капиллярные пипетки; кювета эмалированная; бутанол, уксусная кислота, вода в соотношении 40:10:50; 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне; 1%-ный раствор меди азотнокислой в ацетоне; смесь аминокислот.

Ход работы

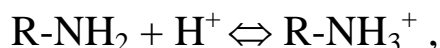
Для проведения анализа берут полоску хроматографической бумаги шириной 1,5 и длиной 12 - 14 см. Смесь аминокислот (фенилаланина и глицина) наносят в виде точки на стартовую линию, проведенную простым карандашом на расстоянии 1 см от короткого края бумаги. Растворы аминокислот наносят специальными капиллярными пипетками, не допуская расплывания нанесенного раствора до пятна диаметром более 0,2 см.

В пробирку, служащую хроматографической камерой, наливают 1 мл верхнего слоя растворителя и закрывают пробирку пробкой. Полоску хроматографической бумаги с нанесенными аминокислотами осторожно помещают в пробирку с растворителем, следя за тем, чтобы растворитель был ниже линии старта. Укрепляют хроматограмму в пробирке, которую ставят в штатив под тягой. Процесс хроматографирования длится 1 - 1,2 часа. По окончании указанного срока отмечают на хроматограмме фронт растворителя и высушивают хроматограмму над плиткой. Затем хроматограмму проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. После испарения ацетона при комнатной температуре хроматограммы прогревают в термостате при 60⁰С до появления пятен аминокислот. Для увеличения устойчивости окраски хроматограммы обрабатывают 1%-ным раствором азотнокислой меди в ацетоне. При этом лиловая окраска производных аминокислот переходит в оранжево-красную. Хроматограмму высушивают на воздухе при комнатной температуре, отмечают расположение аминокислот, вычисляют их R_f-индексы.

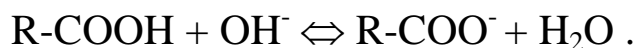
Сделайте рисунок хроматограммы и выводы по результатам опыта.

Работа 2. Определение изоэлектрической точки белков

Вследствие наличия способных к ионизации групп (концевых групп COOH и NH_2 , а также боковых групп дикарбоновых и диаминокислот) молекулы белков обладают электрическим зарядом: положительным и отрицательным. В кислой среде белки имеют суммарный положительный заряд:



в щелочной среде - отрицательный:



При определенном значении pH среды величина положительных и отрицательных зарядов становится одинаковой и суммарный заряд белка оказывается равным нулю. Значение pH , при котором белок не имеет суммарного электрического заряда, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ). В этом состоянии белки наименее устойчивы и легко выпадают в осадок, имеют наименьшее значение вязкости, растворимости, степени гидратации и электропроводности, не способны передвигаться к электрическим полюсам. Каждый белок имеет свое значение ИЭТ: казеин - 4,6 - 4,7; сывороточный глобулин - 5,4; протамины - 10 - 12; и т.д. Существует целый ряд способов определения ИЭТ белков.

Оборудование, реактивы: пробирки, пипетки на 1, 5 и 10 мл, карандаш по стеклу; 0,1 и 0,01 н. растворы уксусной кислоты.

Материалы: 0,5%-ный раствор желатина (растворяют 0,5 г желатина при подогревании в 10 мл 1 н. раствора уксуснокислого натрия и добавляют воды до 100 мл).

Ход работы

В каждую из 8 пронумерованных пробирок по нижеприведенной таблице 1 вносят соответствующие растворы после перемешивания

+ 1 мл танина. В той пробирке, где обнаружится максимальное помутнение среды (визуально или нефелометрически), рН раствора будет соответствовать ИЭТ белка.

Таблица 1

Прибавление, мл	Номера пробирок							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Вода	8,4	7,75	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0
0,01 н. р-р CH_3COOH	0,6	1,25	-	-	-	-	-	-
0,1 н. р-р CH_3COOH	-	-	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Раствор белка (0,5%-ный р-р желатина)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Танин	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
РН	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1	3,8

По результатам опыта сделайте вывод об изоэлектрической точке белка.

Работа 3. Качественные реакции на белки

Методы качественного обнаружения белков основаны на трех типах реакций: а) по пептидным связям белковой молекулы; б) по α -аминогруппе; в) по аминокислотным радикалам.

Примером реакции первого типа служит биуретовая реакция, второго типа - нингидриновая реакция, а к третьему типу относятся многочисленные цветные реакции на радикалы аминокислот. По характеру цветных реакций третьего типа можно судить до некоторой степени о составе белков.

Оборудование, реактивы: баня водяная, пробирки химические, стаканы химические на 100 мл; пипетки, градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл; лакмусовая бумага, хлорид натрия (10%-ный), сульфат аммония (насыщенный), гидроксид натрия (10 и 30%-ном), сульфат меди (1%-ный), нингидрин (1%-ный в ацетоне 95%-ном), α -нафтол (0,2%-ный спиртовой раствор), гипобромид натрия, ледяная уксусная кислота, серная, соляная и азотная кислоты (конц.), нитрит натрия (0,5%-ный), сульфаниловая кислота (5%-ная), карбонат натрия (10%-ный), раствор плюмбита натрия.