

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии**

Выделение и очистка продуктов биотехнологии

Методическое пособие
к лабораторным занятиям,
задания для самостоятельной работы
и контроля знаний студентов

**МИНСК
2014**

УДК 577.113 (076.5)
ББК 28.072 я 73
Б 63

Рекомендовано Ученым советом
биологического факультета
14 марта 2014 г., протокол № 8

Автор - составитель:
Д. А. Новиков

Рецензенты:
кандидат биологических наук, доцент
Р. А. Желдакова
кандидат биологических наук, доцент
А. М. Ходосовская

Выделение и очистка продуктов биотехнологии. Методическое пособие к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / авт.-сост.: Д.А. Новиков. – Минск.: БГУ, 2014. – 70 с.

В методическом пособии приводятся методы выделения очистки и фракционирования нуклеиновых кислот, белков, липидов и некоторых биологически активных соединений из биологического материала, методы количественного и качественного определения содержания биомолекул.

Предназначено для студентов биологического факультета БГУ специальности 1-31 01 01 “Биология” направление 1-31 01 01-03 Биотехнология

УДК 577.113 (076.5)
ББК 28.072 я 73

© БГУ, 2014

ПРЕДИСЛОВИЕ

На современном этапе развития биотехнологии возрастает значение лабораторных исследований, а внедрение в широкую практику новейших приборов и методов значительно повышает требования к качеству как теоретической, так и экспериментальной подготовки специалистов. Работа в современных лабораториях требует профессионально компетентных кадров и систематического повышения их квалификации.

В настоящее время в биотехнологии находят применение огромное число методов и их модификаций. Само собой разумеется, что с разработкой новых методов, многие ранее используемые теряют свое значение в силу недостаточной специфичности, чувствительности или излишней сложности. Точность и ценность получаемых результатов исследования зависят от выбора метода, подготовки посуды, реактивов, особенно калибровочных материалов, условий взятия, подготовки и хранения образцов биологического материала, использования антикоагулянтов, консервантов, замораживания, оттаивания, работы приборов, качества и добросовестности выполнения анализа. При исследовании следует учитывать однородность групп животных, их возраст, пол, клиническое состояние, время взятия образца и целый ряд экзогенных факторов (условия кормления, климат, температуру и влажность среды, возможное физико-химическое и биологическое воздействие и т. д.). Разобраться в нагромождении методических рекомендаций без серьезной подготовки достаточно сложно. Для освоения общих методов выделения, очистки и характеристики чистоты получаемых продуктов биотехнологии, приобретения умений планировать, методически грамотно получать и научно трактовать результаты экспериментов, и предназначено данное учебное пособие.

Лабораторный практикум скомпонован так, что дает возможность на практике освоить фотоэлектроколориметрические и спектрофотометрические методы проведения концентрационного анализа, электрофоретические и хроматографические методы фракционирования для выделения, разделения и количественного определения белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, некоторые методы иммунохимического анализа.

При выполнении работы студент должен самостоятельно сделать расчеты, приготовить реактивы и оборудование, провести эксперимент, результаты обработать, проанализировать, представить в виде таблиц или графиков, оформить в виде отчета, оценить достоинства и недостатки того или иного метода и результаты собственной работы. При прохождении практикума предусмотрено написание и защита рефератов, проведение управляемой самостоятельной работы студентов.

1. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

1.1. Электрофоретическое разделение белков

Принцип метода. Метод основан на том, что молекулы белка обладают электрическим зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом белка, величиной рН и ионной силой окружающей среды. Под влиянием внешнего электрического поля заряженные молекулы передвигаются в растворе к противоположно заряженному полюсу. Скорость перемещения белковых частиц пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна их размеру и степени гидратации.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Оборудование:

1. Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле (рис.1.1; 1.2; 1.3).
2. 2. Источник питания

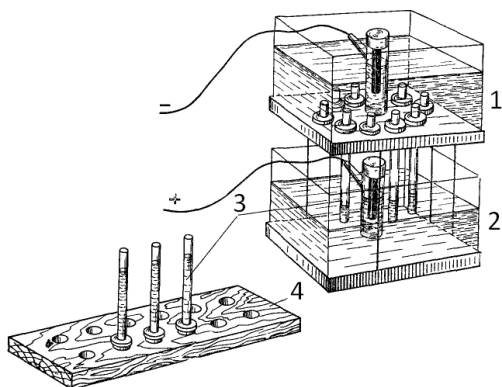


Рис.1.1 – Прибор для электрофореза в полиакриламидном геле в пробирках. 1, 2 — электродные камеры; 3 — пробирки с гелем; 4 — штатив для пробирок.

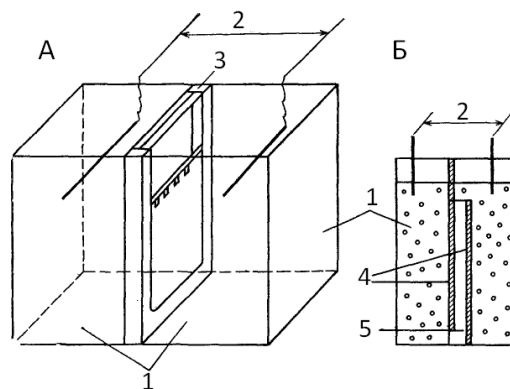


Рис. 1.2 – Схема прибора для вертикального электрофореза в пластинках полиакриламидного геля. А — общий вид прибора; Б — поперечное сечение гелевой ячейки-кассеты. 1 — электродные камеры, заполненные буферным раствором; 2 — электроды; 3 — гелевая ячейка-кассета; 4 — стекла, образующие стенки ячейки; 5 — пластина полиакриламидного геля

Реактивы:

1. ТЕМЕД (коммерческий препарат).
2. 1% раствор персульфата аммония.
3. 0,5% раствор амидового черного 10 Б в 7% растворе CH_3COOH .
4. 0,1% раствор Кумасси R-250, приготовленный на 7% растворе

CH₃COOH.

5. 7% раствор CH₃COOH.

6. 40% раствор сахарозы.

7. Реактивы для разделения белков с pI <7,5:

А) Электродный буферный раствор, рН 8,3; 6,0 г триса и 28,8 г глицина растворяют в воде. Объем доводят до 1 л. При использовании в работе основной раствор разбавляют в 10 раз.

Б) Буферный раствор для приготовления геля, рН 8,9. К 36,3 г триса добавляют 48 мл 1 н раствора HCl и объем доводят водой до 100 мл.

В) Раствор акриламида: 28 г акриламида и 0,735 г N,N'-метиленбисакриламида растворяют в 100 мл воды (сначала растворяют метиленбисакриламид, затем акриламид); раствор стабилен.

Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

Г) Бромфеноловый синий. 1 мг красителя растворяют в 100 мл воды.

7. Реактивы для разделения белков с pI > 7,5

А) Электродный буферный раствор, рН 4,5: 31,2 г β-аланина и 8 мл ледяной уксусной кислоты доводят водой до 100 мл; перед использованием разбавляют в 10 раз.

Б) Буферный раствор для приготовления геля, рН 4,3: 48 мл 1 н раствора КОН смешивают с 17,2 мл ледяной уксусной кислоты. Объем раствора доводят водой до 100 мл.

В) Раствор акриламида: 60,0 г акриламида и 0,4 г метиленбисакриламида растворяют в 100 мл воды.

Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

Г) 0,1% раствор метиленового зеленого.

8. Смесь для получения 7% геля в щелочной буферной системе: смешивают 12,5 мл реактива 6В, 25 мл реактива 6Г, 0,05 мл реактива 1, 10 мл реактива 2. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

9. Смесь для получения 15% геля в кислой буферной системе: 12,5 мл реактива 7В смешивают с 25 мл реактива 7Г, 1 мл реактива 1. Объем раствора доводят водой до 50 мл, после чего к нему добавляют 50 мл 0,28% раствора персульфата аммония.

1.2. Разделение белков методом хроматографии

Принцип метода. Простейшее устройство для хроматографического разделения на колонках изображено на рис. 1.4.

Колонки – полые стеклянные трубки, размер которых зависит от целей работы и способа разделения. В основание колонки впаивают пористую

стеклянную пластинку или перфорированный диск (2). Необходимо следить за тем, чтобы «мертвое» пространство под диском, между ним и основанием колонки, а также внутренний диаметр шлангов, по которым выходящий из колонки элюат поступает в коллектор фракций (рис. 1.4), было минимальным. В противном случае происходит смешивание уже разделенных веществ. Коммерческие колонки снабжены специальными приспособлениями – концевыми адаптерами переменной длины (10), которые позволяют регулировать длину колонки и сводят к минимуму перемешивание элюируемых фракций.

Заполнение колонки. Колонку укрепляют строго вертикально, закрывают нижний кран (зажим) (4) и наливают в нее примерно на 1/3 ее объема дистиллированной воды. Энергичными движениями стеклянного поршня (8) освобождают пространство под регистрирующим устройством и (или) коллектором фракций диском от пузырьков воздуха. На диск с помощью поршня помещают кружок фильтровальной бумаги, по размерам точно соответствующий внутреннему диаметру колонки. Поршень осторожно вынимают, следя за тем, чтобы в колонку не попали пузырьки воздуха. Через воронку или по палочке наливают в колонку густую, тщательно взмученную взвесь используемого сорбента так, чтобы жидкость стекала по стенке колонки и не увлекала в свою толщу пузырьков воздуха. Суспензии дают осесть, через несколько минут открывают кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции взвеси. Во избежание слишком сильного уплотнения сорбента заполнение колонки производят при небольшом давлении (особенно важно следить за этим при работе с гелем сефадекса). Давление определяет величина h – разница между уровнем жидкости над сорбентом в колонке (или присоединенном к ней верхнем резервуаре) и положением конца шланга, по которому элюат вытекает из колонки. Необходимо следить за тем, чтобы наполнение колонки было равномерным.

Заполнив колонку до нужной высоты, закрывают нижний кран (зажим) и дают суспензии осесть, не допуская «высыхания» наполнителя в колонке (для этого над верхним слоем сорбента всегда должен находиться слой растворителя). Следят также за тем, чтобы верхний слой наполнителя имел гладкую горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним иногда помещают кружок фильтровальной бумаги или поролона. Колонку закрывают пробкой с отводом или со стеклянной трубкой и присоединяют к резервуару, как показано на рис. 1.4, содержащему элюирующий раствор. Для поддержания постоянного давления и сохранения постоянной скорости тока жидкости через колонку используют склянку Мариотта или насосы различных конструкций.

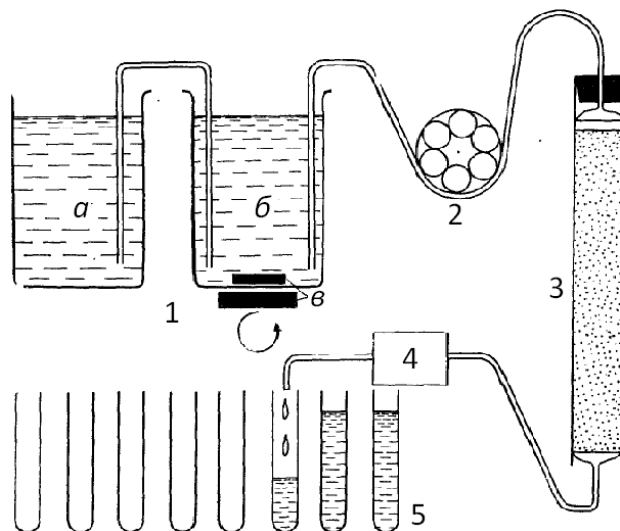


Рис. 1.3 – Схема устройства для колоночной хроматографии.

1 – прибор для создания линейного градиента (а – сосуд с раствором высокой концентрации; б – сосуд-смеситель; в – магнитная мешалка); 2 – перистальтический насос; 3 – колонка; 4 – УФ-детектор; 5 – коллектор фракций.

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

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

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

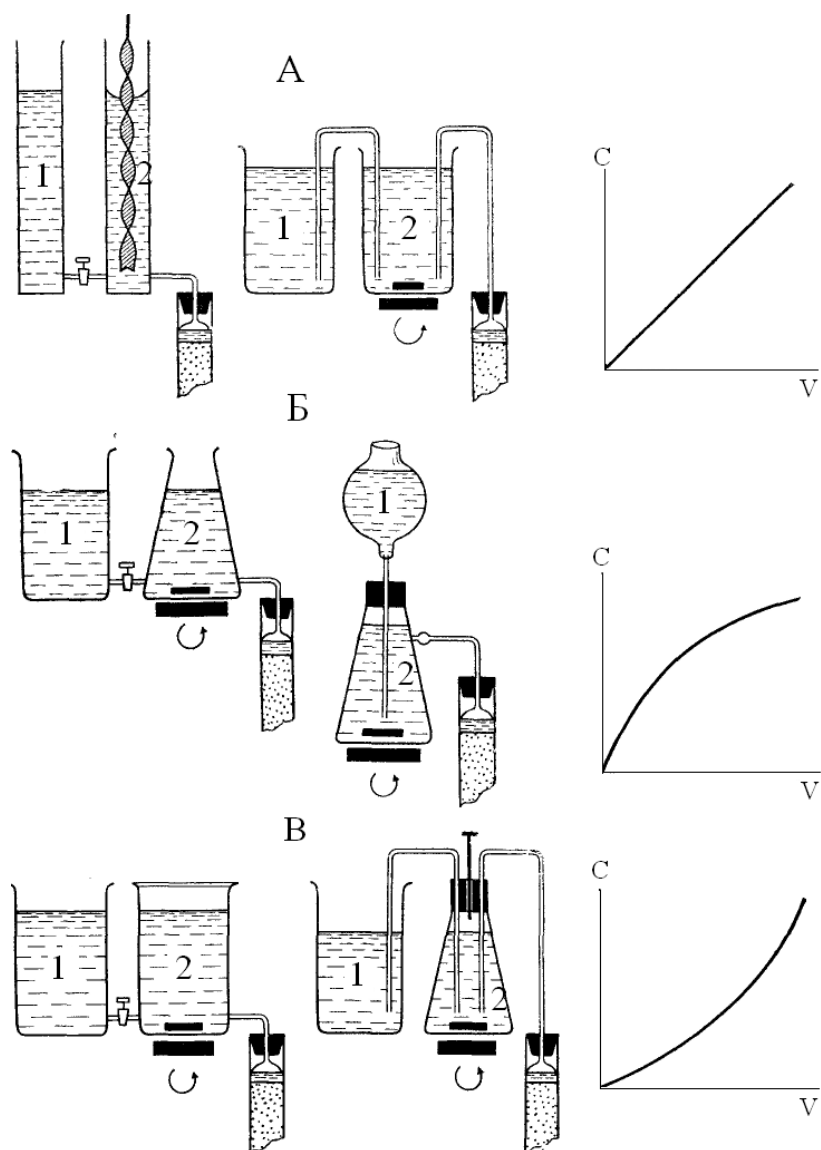


Рис. 1.4 – Приборы для создания градиента концентрации:
 А – линейного, Б – выпуклого, В – вогнутого

При непрерывном градиенте элюции изменение ионной силы и (или) рН элюирующего раствора происходит постепенно, по линейной или нелинейной зависимости от объема протекающей жидкости. Линейное изменение ионной силы или рН элюирующего раствора происходит тогда, когда эти параметры изменяются пропорционально объему протекающей жидкости. Получить линейный градиент можно с помощью прибора, состоящего из двух соединенных между собой одинаковых сосудов, установленных на одном уровне (рис. 1.4, А). В одном сосуде (1) находится буферный раствор со значением ионной силы (или рН), которое должно быть достигнуто к концу опыта, в другом смесителе (2), из которого раствор поступает непосредственно в колонку, вначале находится равный объем исходного буферного раствора. Часто применяют «выпуклый» или «вогнутый» градиенты, при которых ионная сила раствора увеличивается или уменьшается соответственно

по экспоненциальной зависимости. Форму этих градиентов легко получить с помощью простого устройства, изображенного на рис. 1.4, Б, В.

1.2.1 Метод гель-хроматографии

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

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

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др. Набухая в воде, они образуют гели.

Сефадексы – продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам щелочей и разбавленных кислот (до 0,1 н.). Рабочий диапазон рН составляет 2–10. Гели декстрана подвержены действию сильных окислителей, вызывающих образование карбоксильных групп.

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

Реактивы:

1. Натрий-фосфатный или калий-фосфатный буфер – 0,05 моль/л растворы, содержащие 0,05 моль/л KCl, рН 6,5.

2. Сефадекс G-100.
3. Белки с определенной молекулярной массой (Да): яичный альбумин (45000), бычий сывороточный альбумин (68000), рибонуклеаза из поджелудочной железы (12700) цитохром с (13000).
4. Голубой декстран (2000 кДа).
5. Сахароза.

Ход работы.

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

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

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

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

Вытекающий из колонки буферный раствор собирают в пробирки порциями по 1—3 мл. Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку,

начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм. Оптическую плотность растворов, содержащих рибонуклеазу, определяют при 230 нм, голубой декстран — при 650 нм, цитохром С — при 412 нм. После окончания анализа колонку промывают несколькими объемами буферного раствора. Строят профиль элюирования отдельных белковых фракций. Для этого вычерчивают график, на горизонтальной оси которого откладывают номера пробирок (фракций) или объем прошедшей через колонку жидкости, а на вертикальной оси — величины оптической плотности фракций.

Регенерация и хранение сефадекса. Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02% азида натрия, мертиолата или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-кратным объемом 50% этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадекс выдерживают с 2-кратным объемом 96% этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60-80 °С.

1.2.2. Метод ионообменной хроматографии

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

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

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

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

Эффективная сорбция белков происходит при значениях рН, отстоящих не менее чем на единицу от рI. В области рН < рI–1 белки можно хрома-

тографировать на катионитах, а в области $pH > pI + 1$ – на анионитах. Изменение pH в направлении к ИЭТ способствует десорбции белков. При работе с белками используют буферные растворы с низкой ионной силой, но высокой буферной емкостью. Для этого пользуются буферными растворами, pK которых отстоит от величины pH , используемой в эксперименте, не более чем на 0,3–0,5 единиц pH . Хроматографию на анионитах ведут в таких системах, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазод и др.), а для катионитов диссоциируемым компонентом является анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный буфер и др.).

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

Ход работы.

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

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

После описанной обработки ионит уравнивают буферным раство-

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

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

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

Подготовка и заполнение колонки. Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в воде и лишь после уплотнения слоя сорбента уравнивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 2 см.

Подготовка исследуемого материала. Раствор белка, наносимый на колонку, должен иметь тот же состав и те же значения рН и ионной силы, что и исходный буферный раствор, которым уравнивается ионообменник. Образец переводят в исходный буферный раствор, подвергая его предварительно диализу или гель-хроматографии. Если объем пробы, предназначенный для ионообменной хроматографии, невелик, образец можно развести исходным буферным раствором. Нерастворимые компоненты удаляют центрифугированием или фильтрованием. Если исследуемый белок связывается

с ионообменником прочно, объем наносимого белкового раствора значения не имеет, если он связывается слабо, наносимый объем должен быть по возможности небольшим.

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

1.2.3 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Принцип метода. Белки, обработанные концентрированным раствором додецилсульфата натрия в присутствии β-меркаптоэтанола, распадаются на отдельные полипептидные цепи и приобретают отрицательный заряд, значительно превышающий собственный заряд белковой молекулы. При последующем разделении с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле белковые зоны распределяются на электрофореграммах таким образом, что подвижность белковой зоны обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы. Метод дает возможность определять молекулярные массы субъединиц олигомерных белков. Электрофоретическое разделение можно проводить различными методами. Ниже описаны два из них: метод Вебера и Осборн, а также метод, предложенный Лэммли.

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

Метод Вебера и Осборн

Реактивы:

1. Акриламид – 30% раствор, содержащий 0,6% метиленбисакриламида.

Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!

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

3. Буфер для приготовления образцов – 0,02 моль/л натрий-фосфатный буфер, рН 7,2.
4. Электродный буфер – 0,05 моль/л натрий-фосфатный буфер, рН 7,2.
5. Персульфат аммония – 15 мг/мл (готовят непосредственно перед употреблением).
6. ТЕМЕД.
7. Сахароза – 40% раствор.
8. Изопропиловый спирт – 70% .
9. Краситель кумасси R-250 – 0,04% раствор, приготовленный на 20% изопропанол и 10% CH_3COOH .
10. Уксусная кислота – 10% раствор.
11. Додецилсульфат натрия (ДСН) – 10% раствор.
12. β -меркаптоэтанол.
13. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой. В качестве белков-маркеров можно использовать следующие белки: фосфорилаза (91000 Да), бычий сывороточный альбумин (68000 Да), яичный альбумин (42000 Да), химотрипсиноген А (27000 Да), ингибитор трипсина из сои (24000 Да), РНКаза (14000 Да), цитохром с (12000 Да).

Ход работы.

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

Приготовление геля. Сливают в эрленмейеровскую колбочку 10 мл раствора акриламида, 15 мл фосфатного буфера, содержащего 30 мг ДСН, 3,5 мл H_2O , 1,5 мл персульфата аммония и 0,04 мл ТЕМЕД. Далее поступают, как указано на с. 95.

Проведение электрофореза. Разделение можно проводить как в трубочках, так и на пластинах для вертикального электрофореза. После обработки ДСН к образцам добавляют сахарозу (до концентрации 10%) и в качестве лидирующего красителя – бромфеноловый синий (до концентрации 0,001%). Образцы исследуемых белков и белков-маркеров наносят на поверхность геля в объеме от 20 до 100 мкл (каждого или смеси нескольких образцов) и осторожно наслаивают электродный буфер. Нагрузка на гель определяется методом окраски гелей, а также способностью того или иного белка связывать используемый краситель. Как правило, при электрофорезе в трубочках удается обнаружить от 20 до 100 мкг белка, при электрофорезе в пластинке – от 4 до 15 мкг. В электродный буфер катодного отделения добавляют ДСН до концентрации 0,1%. Электрофоретическое разделение про-

водят при комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубочку. При этом сначала устанавливают силу тока – 2 мА на трубочку (напряжение около 50 В), напряжение поднимают до 100–200 В лишь после того, как образцы войдут в гель. При проведении электрофореза в пластине напряженность электрического поля сначала устанавливают равной 6–7 В/см, после проникновения образцов в разделяющий гель напряженность можно увеличивать до 15–20 В/см. Разделение проводят до тех пор, пока краситель не пройдет 4/5 всей длины геля. Обычно это занимает 4–6 ч. После этого электрофорез прекращают, вынимают гель и помещают его для фиксации в 70% изопропанол на 0,5–1 ч. Затем гели прокрашивают раствором кумасси R-250 в течение 2–3 ч. Избыток краски удаляют промыванием 10% раствором CH_3COOH .

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

2. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

2.1. Метод Бенедикта

Принцип метода. Метод Бенедикта аналогичен биуретовому методу, однако позволяет определять белок в диапазоне концентраций от 0,1 до 2 мг в пробе.

Реактивы:

1. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 2 мг белка в 1 мл (стандартный раствор).
2. Реактив Бенедикта: 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 растворяют при подогревании в 40 мл дистиллированной воды. В раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.
3. 3 % раствор NaOH .

Ход работы. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора альбумина готовят растворы белка, содержащие 0,2; 0,6; 1; 1,4;

и 2 мг альбумина в 1 мл. К 1 мл раствора, содержащего 0,2–2 мг белка, добавляют 3 мл 3% раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин определяют оптическую плотность на СФ или ФЭК при 330 нм в 1 см кювете.

На каждую точку проводят два определения, для построения калибровочного графика используют среднее арифметическое.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

2.2 Метод Лоури

Принцип метода. Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью и позволяет определять содержание белка в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг на пробу.

Многие широко используемые биохимические реагенты мешают количественному определению белка по методу Лоури, усиливая фон или нивелируя окраску с белком. К их числу относятся тирозин, триптофан, фенольные соединения, буферы (трис, хепес, глицин, гистидин, цитрат), сахара (глицерин, сахароза, глюкоза), вещества, применяемые для создания градиента (фиколл, метризамид, поливинилпирролидон), тиольные соединения, восстановители, ЭДТА, тритон X-100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В связи с этим, при измерении белка в пробах с неизвестной концентрацией контрольная проба должна содержать все компоненты опытной.

Реактивы:

1. Раствор сывороточного альбумина, содержащий 100 мкг белка в 1 мл (стандартный раствор).
2. 2% раствор Na_2CO_3 в 0,1 н растворе NaOH.
3. 0,5% раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1% растворе цитрата натрия.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива 3 в день определения смешивают с 50 мл реактива 2.
5. 1 н реактив Фолина-Чокальтеу.
6. 1 н раствор NaOH.

Ход работы. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора альбумина готовят растворы белка, содержащие 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг альбумина в 1 мл. К 1 мл исследуемого раствора, содержащего 10 – 100 мкг белка, приливают 2,0 мл рабочего раствора (4), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавляют 0,2 мл реактива Фолина-Чокальтеу, тщательно перемешивают и через 30 мин определяют оптическую плотность раствора при 750 нм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калиб-

ровочному графику.

2.3 Метод Петерсона

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

Реактивы:

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

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

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

3. 5% раствор додецилсульфата натрия (SDS).

4. 0,8 моль/л раствор NaOH.

5. 2 н реактив Фолина-Чокальтеу.

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

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

Ход работы. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора альбумина готовят растворы белка, содержащие 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг альбумина в 1 мл. К 1 мл исследуемого раствора, содержащего от 10 до 100 мкг белка, приливают 1 мл реагента А (6), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавляют 0,5 мл реактива В, тщательно перемешивают и через 30 мин определяют оптическую плотность раствора при 670 нм.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

3 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.

3.1 Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот из тканей животных

Принцип метода. В основе метода выделения суммарной фракции нуклеиновых кислот лежит экстракция их из биологического материала горячей хлорной кислотой.

Реактивы:

0,2 н и 0,5 н растворы HClO_4 .

Ход работы. Измельченную на холоде навеску ткани печени, мозга, селезенки (100—200 мг) помещают в центрифужную пробирку с 10 мл охлажденного 0,2 н. раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием на холоду (3000 г, 10 мин). Супернатант отбрасывают и осадок повторно промывают хлорной кислотой. Такая предварительная обработка материала необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. К осадку добавляют 5-10 мл 0,5 н. раствора HClO_4 и, закрыв пробирку пробками с воздушным холодильником, нагревают их в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию суммарной фракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов. Гидролизат охлаждают и центрифугируют, как описано выше. Осадок подвергают повторной экстракции 0,5 н HClO_4 и центрифугированию в тех же условиях и используют для разделения фракций ДНК и РНК.

3.2 Выделение и очистка ДНК

Принцип метода. Разделение ДНК и РНК при использовании данного метода основано на их различной устойчивости к щелочному гидролизу. Последовательность гидролиза такова, что сначала идет образование фосфоэфирной связи между фосфатной группой и свободной 2'-ОН группой рибозы. Образовавшийся нестойкий фосфотриэфир распадается с образованием нуклеозид-2',3'-фосфата и в дальнейшем образуется смесь 2'- и 3'-мононуклеотидов. ДНК остается стабильной, т.к. образование циклофосфатов невозможно из-за отсутствия гидроксильной группы в 2'-положении дезоксирибозы.

Приведенные ниже методы позволяют из одной навески ткани выделить, разделить и очистить ДНК и РНК.

3.2.1 Метод Мармура

Реактивы:

1. Солевой раствор следующего состава: 0,15 моль/л раствор NaCl ; 0,015 моль/л раствор цитрата натрия; 0,01 моль/л раствор ЭДТА.

Навеску ЭДТА растворяют в воде, доводят рН раствора до 8,0 и затем добавляют остальные компоненты.

2. 20% раствор додецилсульфата натрия (ДСН).

3. 5 моль/л раствор NaCl .

4. Хлороформ.

5. Изоамиловый спирт

6. 70% и 96% растворы этилового спирта.

7. Эфир этиловый.

8. 0,5 н. раствор NaOH .

9. 2% раствор HClO_4 .

10. Концентрированная HClO_4 .

Ход работы. 5 г печени крыс гомогенизируют 1 мин или растирают в ступке с 5-кратным объемом солевого раствора. К гомогенату добавляют 20% раствор ДСН до конечной концентрации 2% и выдерживают 30 мин в термостате при 37 °С. К образовавшемуся вязкому раствору добавляют 5 М NaCl до концентрации 1 М для диссоциации нуклеопротеидного комплекса. Гомогенат переносят в колбу с притертой пробкой и тщательно встряхивают в течение 10-15 мин с 2,5 объемами смеси хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1. Смесь переносят в стеклянные центрифужные стаканы на 50 мл и центрифугируют 30 мин при 800-1000 g. Надосадочная жидкость расслаивается на три фракции: в верхней содержатся нуклеиновые кислоты, в средней (плотной) — белки, в нижней, хлороформной фракции — липиды и другие компоненты.

Верхнюю фракцию осторожно отсасывают с помощью шприца в колбу. Обработку хлороформом и изоамиловым спиртом повторяют еще 2-3 раза, пока раствор нуклеиновых кислот не станет прозрачным. Полученную фракцию нуклеиновых кислот отбирают шприцом и медленно вливают в стакан с двойным объемом охлажденного 96% этилового спирта, помешивая при этом спирт в сосуде круговыми движениями. В результате выпадают белые нитевидные образования — нуклеиновые кислоты. Для более полного осаждения раствор переливают из стакана в стакан со свежей порцией 96% раствора этилового спирта. Нити осторожно переносят палочкой в стакан с небольшим количеством 70% этилового спирта, повторяя процедуру 2 раза с новыми порциями 96% этилового спирта. Затем выделенные нуклеиновые кислоты промывают сначала смесью 96 % этиловый спирт-эфир (1:1), затем эфиром и оставляют сушиться при комнатной температуре на 1 час на фильтровальной бумаге.

Высушенный препарат нуклеиновых кислот подвергают фракционированию. Для этого его растворяют в 0,5 н раствором NaOH из расчета 2-3 мг/мл и выдерживают 15 мин в кипящей водяной бане. Затем раствор охлаждают и нейтрализуют на холоде, добавляя по каплям при помешивании концентрированную HClO_4 . Концентрацию HClO_4 доводят до 2%. Выпавший осадок ДНК отделяют на центрифуге с охлаждением (3000 g, 10 мин). Осадок промывают дважды холодным 2 % раствором HClO_4 и дважды 70% спиртом, затем 10 мл смеси спирт-эфир и эфиром (осадок каждый раз собирают центрифугированием). Осадок ДНК высушивают на воздухе на фильтровальной бумаге и используют для количественного определения содержания ДНК.

3.2.2 Метод А.С. Орлова и Е.И. Орловой

Реактивы:

1. 1 н. раствор NaOH .
2. Насыщенный раствор NaCl в 20 % растворе CH_3COOH .

3. 0,5 н. раствор HClO_4 .
4. 96% раствор этилового спирта.

Ход работы. 100 мг ткани мозга, печени, селезенки крыс помещают в центрифужную пробирку, добавляют 1 мл 1 н. раствора NaOH и при помешивании нагревают в кипящей водяной бане в течение 5 мин. Пробирку с прозрачным, слегка опалесцирующим гидролизатом охлаждают до комнатной температуры и погружают в сосуд со льдом. Добавляют 0,5 мл насыщенного раствора хлористого натрия в 20% растворе уксусной кислоты. Через 3-5 мин выпавший в осадок белок отделяют центрифугированием (4 °С, 600 g, 10 мин). Центрифугат сливают в пробирку, осадок белка растворяют на холоде в 1 мл 1 н. раствора NaOH и белки вновь осаждают добавлением 0,5 мл NaCl . Раствор центрифугируют в тех же условиях. Центрифугаты объединяют и приливают в стакан с тройным объемом охлажденного этанола. Раствор оставляют на 1 ч в холодильнике, после чего осадок ДНК собирают центрифугированием на холоду (600g, 10 мин). К осадку добавляют 5 мл 0,5 н. раствора HClO_4 , закрывают пробками с воздушными холодильниками и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. Гидролизат используют для качественного и количественного определения содержания ДНК.

3.2.3 Метод Шмидта-Тангаузера

Реактивы:

1. 0,5 н. раствор HClO_4 .
2. 5 н. раствор KOH .
3. 96% раствор этилового спирта.
4. Этиловый эфир.
5. Хлороформ.
6. 0,14 моль/л. раствор NaCl .

Ход работы. 1 г печени крыс гомогенизируют на холоду в 0,14 моль/л. растворе NaCl (1:5) и при охлаждении добавляют к гомогенату равный объем 0,5 н. HClO_4 . Смесь центрифугируют при 2500-3000 об/мин в течение 10 мин на холоду. Осадок, содержащий нуклеиновые кислоты, растирают стеклянной палочкой и добавляют к нему 20 мл смеси этанол-хлороформ (3:1), пробку центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин. К полученному осадку добавляют 10 мл смеси этанол-эфир (1:1) и центрифугируют в тех же условиях. К осадку добавляют 10 мл эфира и центрифугируют как описано выше.

Осадок, содержащий нуклеиновые кислоты и белки, высушивают на воздухе и подвергают далее щелочному гидролизу. Для этого к осадку добавляют 5-10 мл 0,5 н. раствора KOH и проводят мягкий гидролиз в течение 1 ч при 37 °С. К охлажденному до 0-4 °С раствору прибавляют концентрированную охлажденную HClO_4 до конечной концентрации 0,5 н (приблизительно 0,2 мл 5 н. HClO_4 на каждый мл гидролизата), 5 мин выдерживают пробу на ледяной бане, а затем центрифугируют при 2500 об/мин. В осадке оказываются ДНК, белки, малорастворимая соль KClO_4 , а в надосадочной

жидкости остаются продукты гидролиза РНК.

Осадок промывают 20 мл 0,5 н раствора HClO_4 , центрифугируют при 2500 об/мин 10 мин и оставляют для определения количества ДНК.

3.2.4 Выделение дезоксирибонуклеопroteина из селезенки крыс

Принцип метода.

Выделение дезоксирибонуклеопroteина (ДНП) основано на том, что ДНП нерастворим в воде, но хорошо растворяется в щелочных и солевых растворах, поэтому при нейтрализации щелочных растворов или при разведении водой солевых растворов он выпадает в осадок. Обнаружить ДНК в ДНП можно с помощью качественной реакции на дезоксирибозу.

Реактивы:

1. 5% раствор NaCl
2. 0,4% и 10 % растворы NaOH
3. 1% раствор CuSO_4
4. Дифениламиноновый реактив. 1 г дифениламина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.

Ход работы. 0,5 г селезенки крыс растирают в фарфоровой ступке, постепенно добавляя небольшими порциями 15 мл 5% раствора NaCl . Содержимое ступки фильтруют через марлевый фильтр. Затем в стакан наливают 85 мл дистиллированной воды и медленно, при помешивании стеклянной палочкой, вливают в воду полученный фильтрат. Нерастворимый в воде ДНП выпадает в осадок, нити его наматывают в виде комка на стеклянную палочку. Собранный ДНП осторожно вынимают вместе с палочкой, переносят в чистую пробирку и растворяют в 2 мл 0,4% раствора NaOH , следя за тем, чтобы произошло полное растворение ДНП.

Качественное обнаружение ДНП в растворе.

В пробирку вносят 5-10 капель раствора ДНП, добавляют двухкратный объем дифениламинонового реактива, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 5-10 мин. Жидкость постепенно приобретают синее окрашивание, обусловленное реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

3.2.5 Выделение и гидролиз рибонуклеинов из клеток дрожжей

Принцип метода.

Рибонуклеопroteинами богаты дрожжи, печень, почки и поджелудочная железа. При гомогенизации ткани нуклеопroteины растворяются в разбавленных растворах щелочей и выпадают в осадок при подкислении раствора.

Реактивы:

1. Диэтиловый эфир;

2. 0,4 % раствор NaOH
3. 5% раствор CH_3COOH

Ход работы: 2,5 г пекарских дрожжей увлажняют в ступке с 1 мл дистиллированной воды и 1 мл диэтилового эфира и, добавляя немного стеклянного порошка или песка, растирают с раствором NaOH в течение 5 минут, после чего фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют 10 мин при 2500 об/мин. Фильтрат или центрифугат переливают в стакан и к нему по каплям добавляют раствор CH_3COOH до полного осаждения нуклеопротеина (обычно расходуют 10-15 мл раствора). Осадок отделяют центрифугированием.

Гидролиз рибонуклеопротеинов дрожжей

Принцип метода.

Гидролиз нуклеопротеинов происходит при кипячении с разбавленной серной кислотой.

Реактивы:

1. 5% раствор H_2SO_4
2. 10% раствор NaOH
3. 1% раствор CuSO_4
4. Аммиак
5. 1% раствор оксида серебра в аммиаке
6. 1% спиртовой раствор тимола
7. Концентрированная H_2SO_4
8. 2,5% раствор молибдата аммония

Ход работы. Гидролиз проводят при кипячении нуклеопротеинов с разбавленной серной кислотой. Осадок нуклеопротеинов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5% серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком. Всего расходуют не более 20-25 мл раствора. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипячения. Кипятят 1,5 ч, после чего охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят качественные реакции на пуриновые основания, полипептиды, пентозы и фосфорную кислоту.

Обнаружение белков и полипептидов

Ход работы. Для выявления белка с частью фильтрата (2 мл) проводят биуретовую реакцию, добавляя 2 мл 10% раствора NaOH до щелочной реакции по лакмусу. Затем вносят 3 капли 1% раствора CuSO_4 и наблюдают появление фиолетовой окраски.

Обнаружение пуриновых оснований

Ход работы. К 2 мл фильтрата добавляют концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции на лакмус и приливают 1 мл аммиачного раствора окиси серебра. Через несколько минут выпадают хлопья серебряных солей пуриновых оснований.

Обнаружение пентоз (реакция Молиша)

Ход работы. К 1 мл фильтрата добавляют 3 капли спиртового раствора тимола и по стенке пробирки осторожно наслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет. Окраска более выражена на границе раздела слоев.

Обнаружение фосфорной кислоты

Ход работы. К 1 мл фильтрата приливают 2 мл молибденового реактива, нагревают до кипения и кипятят 3 мин. Появляется желтое окрашивание, обусловленное образованием фосфорномолибденово-кислого аммония. При стоянии выпадает желтый осадок.

3.2.6 Выделение ДНК из цельной крови

Принцип метода.

Метод предполагает получение высокополимерной ДНК, свободной от белков. Под действием водонасыщенного фенола на нуклеопротеиды осуществляется их депротеинизация. Обработка фенолом обеспечивает также инактивацию нуклеаз, что позволяет получать ДНК в нативном состоянии.

Реактивы:

1. Лизирующий буфер для эритроцитов: 10,9 г сахарозы, 0,1 г $MgCl_2$, 1 мл Тритона X-100, 24,2 г основного триса растворяют в 100 мл дистиллированной воды, рН доводят до 7,6 концентрированной HCl .

2. Лизирующий буфер для лейкоцитов: 25 ммоль/л ЭДТА, 75 ммоль/л хлорида натрия, рН 8,0.

3. 10% раствор додецилсульфата натрия.

4. 1 моль/л раствор трис- HCl , рН 8,0.

5. Насыщенный раствор фенола в 1 моль/л растворе трис- HCl , рН 8,0.

6. Смесь хлороформ-изоамиловый спирт (24 мл хлороформа смешивают с 1 мл изоамилового спирта, тщательно перемешивают).

7. 3 моль/л раствор ацетата аммония.

8. 96% и 70% растворы этилового спирта.

Ход работы. 8 мл цельной крови крыс смешивают с 30 мл охлажденного лизирующего буфера для эритроцитов и центрифугируют на холоду при 4000 об/мин в течение 10 мин. К полученному осадку добавляют 10 мл охлажденного лизирующего буфера для лейкоцитов и центрифугируют, как описано выше.

К полученному осадку добавляют 40 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и 400 мкл трис- HCl (рН 8,0). Смесь тщательно перемешивают и инкубируют при 37 °С в течение 12 часов.

После окончания инкубации к пробе добавляют 500 мкл раствора фенола и перемешивают в течение 10 мин до однородной массы, после чего пробу центрифугируют (8 мин, 10 000 об/мин). К полученному супернатанту добавляют 250 мкл раствора фенола и 250 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт, тщательно перемешивают до получения однородной

массы и центрифугируют 8 мин при 10 000 об/мин.

К полученному супернатанту добавляют 500 мкл смеси хлороформ-изопропанол, перемешивают в течение 5 мин и центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 3 мин. К супернатанту добавляют 40 мкл 3 моль/л раствора ацетата аммония и 1 мл охлажденного 96% этилового спирта. Перемешивают, наблюдая преципитацию ДНК, и центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Осадок дважды промывают 1 мл 70% раствора этилового спирта, каждый раз центрифугируя пробу при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Остаток спирта осторожно сливают. Полученный препарат ДНК высушивают при комнатной температуре на фильтровальной бумаге.

3.2.7 Выделение ДНК из эпителиальных клеток ротовой полости человека методом щелочного лизиса

Реактивы:

1. 50 ммоль/л раствор NaOH.
2. 1 моль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0.
3. Изопропиловый спирт.
4. 96% этиловый спирт.
5. 10 ммоль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0.

Ход работы. Прополаскивают ротовую полость 10 мл дистиллированной воды в течение 3 мин, после чего собирают жидкость в стаканчик. Собранную жидкость, содержащую эпителиальные клетки ротовой полости, разливают по 1 мл в чистые пробирки типа эппендорф. Проводят центрифугирование при 12 000 об/мин в течение 4 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость сливают, к осадку добавляют 200 мкл 50 ммоль/л раствора NaOH. Проводят щелочной лизис эпителиальных клеток в течение 10 мин при температуре 95 °С, после чего пробы охлаждают до 4 °С на ледяной бане, к каждой пробе приливают по 20 мкл охлажденного 1 моль/л раствора Трис-HCl, pH 8,0, после чего пробы центрифугируют 6 мин при 12 000 об/мин.

180 мкл надосадочной жидкости переносят в чистые пробирки и проводят переосаждение клеток в тех же условиях после добавления 750 мкл охлажденного изопропилового спирта. Надосадочную жидкость сливают. К осадку добавляют 500 мкл охлажденного 96% этилового спирта. Смесь тщательно суспендируют, центрифугируют в течение 2 мин при 12 000 об/мин., после чего в пробирку добавляют 500 мкл охлажденного 96% этилового спирта и центрифугируют еще в течение 4 мин.

Надосадочную жидкость тщательно отбирают, к осадку добавляют 200 мкл 10 ммоль/л раствор Трис-HCl, pH 8,0 и тщательно суспендируют. Полученную суспензию инкубируют в течение 15 мин. при 55 °С и используют для определения концентрации ДНК в пробах и степени ее очистки.

Для определения степени очистки ДНК от углеводов, белков и иных примесей проводят измерение оптической плотности раствора нуклеиновой

кислоты при 230, 260, 280 нм на СФ-26 в кварцевой кювете на 1 см.

Отношение поглощения при 260 и 280 нм указывает на степень очистки ДНК от примесей белковой природы. Препарат ДНК считается чистым, если данное соотношение приблизительно равно 1,8.

Отношение поглощения при 260 и 230 нм указывает на степень очистки ДНК от примесей углеводной природы. Препарат ДНК считается чистым, если данное соотношение приблизительно равно 1,8-2,2.

При проведении измерения концентрации ДНК в пробе, 100 мкл раствора нуклеиновой кислоты вносят в кварцевую кювету с 1 мл 10 ммоль/л раствором Трис-НСl, рН 8,0. Значение концентрации ДНК в исходном растворе рассчитывают по формуле:

$$c=50 \cdot A_{260} \cdot (V+v)/v,$$

где с- концентрация ДНК (мкг/мкл),

A_{260} – значение поглощения при 260 нм,

V – объем буфера (мкл),

v- объем образца,

50 – коэффициент пересчета.

Среднее значение концентрации ДНК составляет 400 мкг/мкл.

3.3 ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Чистоту препаратов нуклеиновых кислот определяют по величине поглощения в ультрафиолете и по величинам отношений $E_{260}:E_{230}$ и $E_{260}:E_{280}$. Для очищенных препаратов ДНК эти показатели должны быть в пределах 2,1-2,4.

Для характеристики препаратов нуклеиновых кислот используют также величины гиперхромного эффекта и температуры плавления ДНК.

3.3.1 Определение величины гиперхромного эффекта по содержанию ГЦ-пар

Принцип метода. Известно, что в ультрафиолетовой области спектра ДНК поглощает лучи с максимумом при 260 нм примерно на 40% меньше, чем смесь нуклеотидов, характерная для данного образца ДНК. Гиперхромный эффект обусловлен упорядоченным расположением азотистых оснований в цепи ДНК, допускающим комплементарные взаимодействия между основаниями. При денатурации ДНК связи, стабилизирующие азотистые основания в определенном положении, разрушаются, что приводит к увеличению поглощения в ультрафиолетовой области спектра, равному при максимальном нарушении структуры ДНК 40% по сравнению с нативными образцами ДНК.

Таким образом, критерием нативности может служить величина поглощения (E_p) на 1 моль фосфора в кювете на 1 см. Нативные препараты

ДНК имеют E_p не выше 6200 – 6600. Более высокие значения характеризуют денатурационные сдвиги.

Реактивы:

0,003 % раствор ДНК в 0,2 моль/л растворе NaCl. В работе можно использовать как коммерческие препараты ДНК, так и ее образцы, полученные в результате ее выделения различными способами.

Ход работы. В кварцевую кювету на 1 см наливают 3 мл раствора ДНК и измеряют оптическую плотность при 260 нм. Значение E_p рассчитывают на участок молекулы ДНК, содержащий 1 моль фосфора при ширине кюветы в 1 см, по формуле:

$$E_p = D / (C_p \cdot l),$$

где D – оптическая плотность раствора ДНК, C_p – молярная концентрация фосфора в ДНК, определенная как описано в разделе 2.3., l – ширина кюветы в см.

3.3.2 Определение температуры плавления ДНК

Принцип метода. Исследование температурной зависимости E_p является тестом на нативность ДНК. Резкий одномоментный прирост значения E_p в узком температурном интервале характерен для нативных образцов ДНК, которые характеризуются упорядоченностью водородных связей в молекуле. В денатурированных препаратах ДНК, где водородные связи неупорядочены и разрушаются постепенно, нарастание величины E_p также происходит постепенно при различных температурах.

Реактивы:

Буфер для растворения ДНК, содержащий 15 ммоль/л раствор NaCl, 1,5 ммоль/л раствор цитрата натрия, pH 7,0.

Ход работы. 20 мкг ДНК, растворенной в буфере, помещают в 1 см кварцевую кювету для СФ-26. Определение оптической плотности ведут при 260 нм в промежутке от 25 до 95 °С с интервалом 5 °С, причем препарат ДНК выдерживают при каждой температуре 5 мин.

По результатам измерения строят кривую плавления. Для этого по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора при измеряемой температуре (t) к оптической плотности при 25 °С, а по оси абсцисс – температуру. Точку плавления ($T_{пл}$) ДНК находят по кривой плавления. Она соответствует середине зоны подъема кривой относительной оптической плотности (рис.2.2).

Зависимость между точкой плавления и содержанием ГЦ-пар в ДНК определяют по формуле:

$$C_{гц} = (T_{пл} - 69,3) \cdot 2,44,$$

где $C_{гц}$ – содержание ГЦ-пар в молярных процентах, а 69,3 и 2,44 – постоянные коэффициенты.

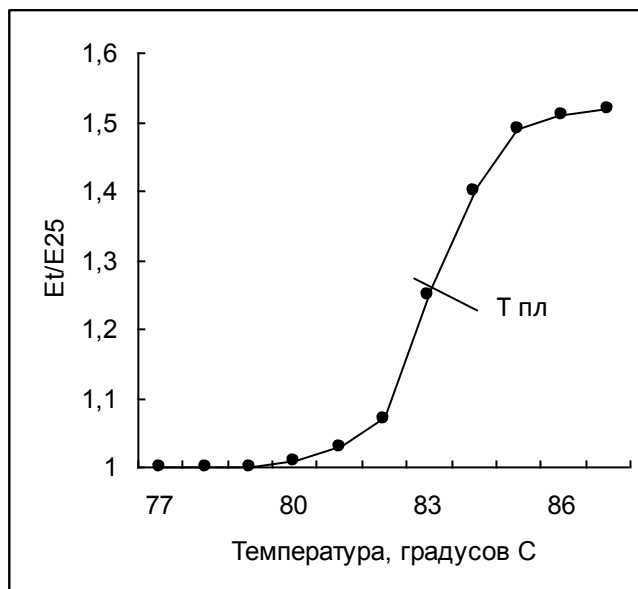


Рис.3.1. Пример кривой плавления ДНК

3.4. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот

Для электрофоретического разделения различных полинуклеотидов используют эффект молекулярного сита, присущий полиакриламидному, агарозному и агаровому гелям. Метод позволяет также определить молекулярную массу полинуклеотида и установить, является ли он рибо- и дезоксирибонуклеотидом.

3.4.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Принцип метода. Наиболее часто при электрофорезе нуклеиновых кислот используют агарозный гель. Средний радиус пор геля агара зависит от его концентрации. Поры достаточно велики, поэтому при электрофоретическом разделении нуклеотидов с концентрацией ниже 2% эффект молекулярного сита обычно ничтожен. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул нуклеиновых кислот, чтобы лишь ограничить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют разные гели с концентрацией 0,4-2,0% агарозы. Крупные молекулы ДНК и РНК разделяются в агаровом геле в соответствии с размерами вследствие фильтрующего эффекта геля.

Благодаря дешевизне, нетоксичности реактивов и прочности электрофорез в агаровом геле широко используется для фракционирования нуклеиновых кислот.

Оборудование:

1. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном.

2. Источник питания ПЭФА -1 УХЛ 4.2.
3. Источник УФ-света
4. Видеоденситометр Bio Rad 620.
5. Иммунологический планшет с ячейками на 100 мкл.
6. Цифровой фотоаппарат.

Реактивы:

1. Агароза.
2. Буфер разделяющий (электродный): 0,1 моль/л трис-фосфатный или 89 ммоль/л трис-боратный буфер (рН 8,0), содержащий 1ммоль/л ЭДТА.
3. Буфер для агарозного геля: 0,1 моль/л ацетатный, рН 5,5.
4. 0,025% раствор бромфенолового синего в 30% растворе глицерина.
5. 0,05% водный раствор бромистого этидия.

ВНИМАНИЕ! Бромистый этидий — сильный мутаген. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках.

6. ДНК фага λ (коммерческий препарат) или препараты ДНК, полученные в результате различных способов выделения.

7. 7% раствор сахарозы.

Ход работы.

Приготовление геля. Для приготовления геля к 0,45 г агарозы приливают 50 мл буфера для агарозного геля, нагревают взвесь в бане с кипящей водой или в микроволновой печи до тех пор, пока агароза не растворится. Охлаждают раствор до 50 °С и добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,005%.

Электрофоретическую камеру устанавливают строго горизонтально при помощи уровня и винтов. Пипеткой наливают по краям ограничителей 1 мл раствора агарозы для герметизации камеры (ограничители устанавливаются таким образом, чтобы толщина агарозного геля после полимеризации составляла 0,5 см).

После герметизации камеры выливают в отсек электрофоретической камеры, определенный ограничителями, остальной теплый раствор агарозы и немедленно вставляют рядом с одним из концов геля гребенку, от зубцов которой в геле останутся лунки для проб. Необходимо, чтобы между дном кармана и основанием геля оставался слой агарозы толщиной 1 мм, т. е. чтобы дном лунки служил агарозный гель (рис. 2.4).

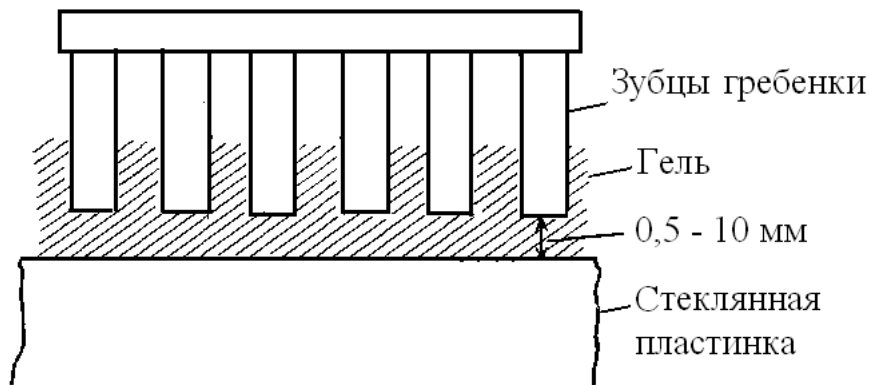


Рис. 3.2. Гребенка, вставленная в гель

После того как гель полностью затвердеет (о полимеризации геля для электрофореза судят по появлению матового оттенка через 30 - 45 мин при комнатной температуре), осторожно, чтобы не повредить гель, извлекают гребенку и ограничители.

Добавляют в зависимости от толщины геля и величины камеры 400-600 мл электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

Максимальное количество ДНК, которое можно внести в лунку, зависит от числа фрагментов ДНК в пробе и их размеров. Минимальное количество ДНК, которое можно обнаружить при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием, составляет 2 нг при ширине полосы 0,5 см. Если лунка будет переполнена и в полосе указанной ширины будет содержаться более 200 нг ДНК, то полоса окажется расплывчатой и будет иметь шлейф. Этот дефект особенно выражен при разделении крупных фрагментов ДНК.

В иммунологической планшете либо в любой другой удобной емкости небольшого объема смешивают 40 мкл пробы, содержащей 5 мкг ДНК, с 5 мкл буфера для нанесения пробы, состоящим из 0,025% раствора бромфенолового синего в 30% растворе глицерина и 5 мкл 7% раствора сахарозы для последующего внесения пробы в лунки геля. Это необходимо для того, чтобы по границе его продвижения по агарозному гелю можно было судить о времени окончания электрофореза. Кроме этого, благодаря увеличению плотности системы за счет глицерина или сахарозы, наносимые образцы легко занимают лунку геля, вытесняя при этом буфер. После тщательного перемешивания образца в ячейке иммунологического планшета, автоматической пипеткой отбирают 35 мкл смеси и вносят ее в лунку агарозного геля (вносить необходимо очень аккуратно, во избежание повреждения кармана). Закрывают электрофоретическую камеру крышкой с электродами, подключают ее к соответствующим полюсам источника постоянного тока, учиты-

вая, что ДНК движется к положительно заряженному электроду, и включают источник питания.

Электрофорез проводят при силе тока 35-55 мА, комнатной температуре и напряжении 5 В/см² в течение 1,5-2,5 ч. После окончания электрофореза, выключают источник питания, достают электроды, извлекают гель с пластиковой подложкой, сливают электрофоретический буфер.

Фотографирование и сканирование геля для обработки результатов ведут в УФ-свете, благодаря использованию флуоресцирующего красителя бромистого этидия (рис.2.5).

Молекула этого вещества является плоской и интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 300 и 360 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Бромистый этидий можно использовать для обнаружения как двух-, так и одноцепочечных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Однако сродство красителя к одноцепочечной нуклеиновой кислоте гораздо меньше, чем к двухцепочечной; поэтому флуоресценция в первом случае оказывается более слабой.

Количественный анализ электрофореграмм проводят с использованием программы ImageMaster, по интенсивности и ширине зоны флуоресценции геля.

3.4.2 Электрофорез рибонуклеиновых кислот в полиакриламидном геле

Принцип метода. Возможность электрофоретического разделения РНК в полиакриламидном геле определяется тем, что размер его пор, а следовательно и его свойства как молекулярного сита, варьируют в широком диапазоне, благодаря чему в этой среде можно разделять нуклеиновые кислоты различной молекулярной массы.

Оборудование:

- 1 Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле.
- 2 Источник питания

Реактивы:

1. Акриламид
2. N,N'-метиленабисакриламид
3. Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)
4. 10% раствор персульфата аммония
5. 40% раствор сахарозы
6. 0,25% раствор бромфенолового синего
7. Трис-ацетатный буфер следующего состава: 0,12 моль/л Трис,

0,06 моль/л ацетата натрия, 3 ммоль/л ЭДТА. рН буфера доводят до 7,8 ледяной уксусной кислотой.

8. 1 моль/л раствор уксусной кислоты

9. 0,2% раствор метиленового синего в 0,4 моль/л ацетатного буфера.

Ход работы. В пластиковую рамку ячейки-кассеты, представленной на рис.6, вставляют два стекла. Ячейку герметизируют с помощью специальных прокладок из силиконовой резины.

Готовят смесь для полимеризации. Для этого к 2,4 г акриламида и 0,13 г N,N'-метиленбисакриламида прибавляют 33,3 мл трис-ацетатного буфера (рН 7,8), 50 мл дистиллированной воды и 0,08 мл ТЕМЕД. Все тщательно перемешивают и вносят 0,8 мл 10% раствора персульфата аммония – катализатора полимеризации, доливают дистиллированную воду до метки (100 мл). Еще раз хорошо перемешивают и заливают смесь для полимеризации в зазор между стеклами и сразу же между стеклами вставляют специальную пластинку, так называемую «гребенку». Ее зубцы образуют углубления на поверхности геля, в которые затем вносят анализируемые образцы. Процесс полимеризации проводят без доступа кислорода, для чего после добавления в камеру полимеризуемой смеси на нее наслаивают буферный раствор. Перед заполнением электрофоретической камеры буферным раствором трис-ацетатный буфер (рН 7,8) разбавляют водой в отношении 1:2.

После окончания полимеризации удаляют одну из герметизирующих прокладок, гребенку вынимают, а ячейку вставляют в прибор. После сборки прибора электродные камеры заполняют буферным раствором, а в лунки на поверхности геля микропипеткой наносят 0,03 мл раствора, содержащего РНК, 40% раствор сахарозы (ее конечная концентрация 20%), 0,01 мл 0,25% водного раствора бромфенолового синего. Сахароза повышает плотность раствора РНК по сравнению с плотностью буфера и обеспечивает надежный контакт исследуемого образца с поверхностью геля.

После нанесения образца прибор подключают к источнику тока и проводят электрофорез при 100 В. После того, как маркерный краситель бромфеноловый синий, вносимый с образцом, достигнет нижней границы пластины, источник питания выключают, сливают электродный буфер и вынимают гелевую ячейку. Из ячейки вынимают уплотнительные прокладки, аккуратно отделяют одно стекло от другого и переносят пластину геля в плоскую кювету или пластмассовую коробку.

Фиксацию геля проводят 1 моль/л раствором уксусной кислоты в течение 15 мин, а окрашивание – 0,2% раствором метиленового синего в 0,4 моль/л ацетатном буфере (рН 4,7) в течение 4 ч. Избавляются от красителя отмывкой геля 1 моль/л раствором уксусной кислоты.

Полученную электрофореграмму фотографируют с помощью цифрового фотоаппарата и электрофореграмму сканируют.

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ФРАКЦИИ ЛИПИДОВ

4.1. Выделение общей фракции липидов по методу Фолча и соавторов

Принцип метода. Липиды экстрагируют из тканей или выделенных субклеточных образований хлороформ-метаноловой смесью, экстракт отмывают от водорастворимых примесей и высушивают, после чего определяют массу осадка.

Реактивы: смесь растворителей хлороформ – метанол (2 : 1).

Ход работы. Навески тканей: мозг – 200 мг, другие ткани – 300 – 350 мг, сыворотку крови – 1 мл помещают в мерную колбу объемом 25 мл с притертой пробкой, куда наливают 10–15 мл свежеприготовленной смеси хлороформа и метанола (2 : 1). Содержимое колбы энергично перемешивают в течение 3–5 мин, доводят хлороформ-метаноловой смесью до метки, снова перемешивают и через 5–10 мин фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Для проверки полноты экстракции липидов необходимо повторное экстрагирование. Для этого остаток ткани на фильтре обрабатывают дополнительно 5 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1). Обычно при этом в экстракте не удается обнаружить присутствия липидов, что свидетельствует о полноте экстракции.

Для удаления нелипидных водорастворимых примесей, извлеченных хлороформ-метаноловой смесью, липидный экстракт промывают дистиллированной водой. В небольшой стаканчик, высотой 6–7 см и диаметром 3 см, наливают 10–20 мл дистиллированной воды; в этот же стаканчик специальной пипеткой объемом 10 мл, соединенной с резиновой грушей или шприцем, переносят липидный экстракт в количестве 10 мл, причем кончик пипетки должен быть опущен под воду (при этом следует избегать бурного перемешивания жидкостей). Затем в стаканчик доверху доливают воду и опускают на дно большого сосуда, содержащего 500–600 мл воды. Большой сосуд закрывают стеклом и систему оставляют на ночь. При этом водорастворимые примеси диффундируют в воду. На следующий день в системе ясно различаются три фазы: верхняя – водно-метаноловая (прозрачная), нижняя – хлороформная (мутная), а на границе между ними – более или менее плотная, в зависимости от исследуемой ткани, белая пленка, содержащая липиды.

Маленький стаканчик вынимают из сосуда, верхний водно-метаноловый слой осторожно отсасывают с помощью автоматической пипетки или пипетки с грушей таким образом, чтобы не повредить белую пленку; после отсасывания над пленкой обычно остается слой жидкости в 2–3 мм. Следует отметить, что часть (небольшая) липидов теряется с водно-метаноловой фракцией.

В стаканчик приливают по каплям 3 мл метанола для растворения пленки. Если при этом пленка полностью не растворяется и раствор не становится прозрачным, то снова добавляют метанол по каплям до тех пор, пока муть не

исчезнет. После растворения липидной пленки раствор количественно переносят в предварительно взвешенный на аналитических весах сухой и чистый бюкс, в котором производят высушивание липидного экстракта. Сначала ведут выпаривание на водяной бане, а затем сушат в термостате при 50–60 °С до постоянной массы. Параллельное высушивание проб в вакуумном эксикаторе дает такие же результаты. После повторного взвешивания бюкса с осадком липидов определяют массу этого осадка. Содержание липидов рассчитывают в г/кг массы исследованного органа (учесть разведение).

4.2 Выделение общей фракции липидов методом М.А. Креховой, М.К. Чехрановой

Принцип метода. При отсутствии метанола или хлороформа можно применять способ экстракции общей фракции липидов по М.А. Креховой, М.К. Чехрановой (1971) смесью этанол-гексан.

Реактивы: растворители: этанол, гексан.

Ход работы. В большую химическую пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы, эритроцитарной массы) или по 200 мг измельченной ткани, добавляют 2,5 мл этанола, смесь хорошо перемешивают, затем добавляют 5,0 мл гексана. Содержимое пробирки встряхивают и приливают 2,5 мл дистиллированной воды (для удаления нелипидных примесей), еще раз тщательно встряхивают и центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Верхний гексановый слой отбирают для выпаривания и дальнейшего исследования.

Выпаривание органической фазы проводят при температуре 60–70°С в кипящей водяной бане до момента окончания испарения растворителя. Сухой остаток липидов взвешивают и рассчитывают содержание общей фракции липидов в образце в мг/кг ткани или мг/л сыворотки (плазмы) крови. После взвешивания липиды растворяют в 0,5 мл хлороформа для разделения методом тонкослойной хроматографии. Хлороформенный экстракт можно хранить в плотно закупоренной посуде в течение недели.

4.3 Метод экстракции липидов спиртово-эфирной смесью (по Блюру)

Принцип метода. Метод аналогичен предыдущему, но для экстракции применяют смесь других полярных (этиловый спирт) и неполярных (диэтиловый эфир) растворителей. В результате данный метод не обеспечивает полной экстракции фосфолипидов, ганглиозидов и протеолипидов.

Реактивы:

1. Смесью этилового эфира и диэтилового эфира (3 : 1).
2. Петролейный эфир.

Оборудование: пипетки на 1, 5 и 10 мл; колбочки с притертой пробкой на 50 и 100 мл; воронки; пробирки с притертой пробкой; бумажные

фильтры; роторный испаритель; водяная баня; аналитические весы.

Ход работы. В плоскодонную колбу вносят необходимый объем сыровотки крови (1—3 мл или больше) или 1-2 г тканей, заливают 20 объемов спиртово-эфирной смеси, перемешивают и оставляют на 12 ч при комнатной температуре. Экстракцию можно ускорить кратковременным подогревом (2—3 мин) при температуре 40 °С. Липидный экстракт отфильтровывают от выпавшего белка и концентрируют выпариванием на роторном испарителе. Затем липиды экстрагируют тремя порциями петролейного эфира, отбрасывая нерастворимый осадок. Концентрацию липидов в экстракте определяют взвешиванием одним из изложенных выше методов.

Экстракт используют для определения главным образом холестерина и триацилглицеринов, поскольку фосфолипиды экстрагируются не полностью.

4. 4 Разделение общей фракции липидов методом тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография – это эффективный аналитический метод. Она нашла широкое применение для разделения преимущественно низкомолекулярных веществ: липидов, аминокислот, нуклеотидов, витаминов и др. Разделение веществ при тонкослойной хроматографии происходит благодаря различной способности адсорбироваться на поверхности сорбента, это обусловлено особенностями строения функциональных групп, входящих в структуру отдельных липидов. Метод используют как для качественного, так и для количественного изучения липидных компонентов.

Исследуемый образец наносят на тонкий слой силикагеля, закрепленного на пластинке из фольги, пластика или стекла. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с небольшим количеством растворителя. Фронт растворителя поднимается по пластинке под действием капиллярных сил, увлекая вещества, содержащиеся в образце. Скорость продвижения разделяемых веществ зависит от их распределения между неподвижной (гидрофильный силикагель) и подвижной (неполярный растворитель) фазами и растворимости в последней. Хроматографический процесс заканчивают в тот момент, когда растворитель достигает верхнего края пластинки. Пластинку с силикагелем высушивают, анализируемые вещества проявляют с помощью соответствующих красителей. Для каждого вещества разделенного образца рассчитывают величину R_f . Полученные значения R_f сравнивают со значениями R_f контрольных веществ (свидетелей) или данными литературы и идентифицируют соединения, присутствующие в образце.

Приготовление пластинок. Пластинки тонкого закрепленного слоя силикагеля готовят заранее следующим образом.

Стеклопластинки (лучше фотопластинки) размером 17,5 - 13 см тщательно моют свежеприготовленной хромовой смесью и ополаскивают много раз водопроводной водой, затем 3–5 раз дистиллированной, вытирают чистой марлей, протирают этиловым спиртом и хранят в чистом полиэтиленовом

пакете в отдельной коробке.

Неподвижной фазой при разделении служит силикагель КСК, для закрепления силикагеля используют химически чистый гипс – CaSO_4 . Силикагель измельчают в шаровой мельнице с фарфоровыми шарами. Шары предварительно моют соляной кислотой и водой. Обычно 1 кг силикагеля перемалывают около 5 ч. Затем силикагель просеивают через металлическое или капроновое сито (100–200 меш) и хранят в склянке с притертой пробкой. (Размеры частиц адсорбента, силикагеля определяют условными единицами меш. По числу меш, приходящихся на 2,54 см длины сита, определяют размеры отверстий сита. При 50 меш размеры отверстий будут равны 0,254 мм, при 60 – 0,211, при 150 – 0,084, при 200 – 0,063 мм. Поэтому для получения определенного размера частиц используют соответствующие сита). Гипс также размалывают или растирают в ступке и просеивают через сито.

Для приготовления сорбционной массы 6 г силикагеля и 0,35 г гипса энергично встряхивают 3–5 мин в колбочке (можно с резиновой пробкой, защищенной пленкой). Смесь высыпают в ступку, постепенно, при тщательном растирании, небольшими порциями по 3–5 мл добавляют дистиллированную воду – всего 15–17 мл. Смешивание силикагеля и гипса с водой заканчивают в течение 1,5–2 мин (следить по секундомеру). Полученная масса должна быть однородной и без пузырьков воздуха.

Готовую смесь тонкой непрерывной струей выливают в центр пластинки и покачиванием пластинки распределяют ее ровным слоем по всей поверхности. Пластинку сушат при комнатной температуре 24 ч на столике с уровнем, а затем активируют в сушильном шкафу при 105 °С в течение 40 мин. Если пластинки не используют сразу, их хранят в эксикаторе над CaCl_2 .

Для проведения хроматографии можно использовать готовые пластины различных фирм, предназначенные для разделения липидов.

Подготовка хроматографической камеры. Разгонку общей фракции липидов проводят смесью растворителей гексан – диэтиловый эфир – ледяная уксусная кислота в соотношении 78 : 25 : 2 или гексан–диэтиловый эфир–муравьиная кислота в соотношении 80 : 80 : 2 в любом герметически закрытом сосуде с плоским дном. (Крышку можно притирать к краю стенки сосуда смазкой.)

Стенки камеры для лучшего насыщения выстилают фильтровальной бумагой и в камеру наливают смесь растворителей. Во время разгонки бумага на вид должна быть сухая. **Следите**, чтобы она не погружалась в растворитель, иначе последний будет перетекать на пластинку. Желательно плотно закрытую камеру оставить на 2–3 ч для насыщения парами растворителя.

Нанесение экстракта на пластинку. Липиды, выделенные из тканей, растворяют в 1 мл хлороформа. Хлороформный экстракт липидов наносят на пластинку с помощью микропипетки. Линия старта должна быть на расстоянии 1,5 см от нижнего края пластинки, расстояние между точками нанесения 1–2 см (не менее). Раствор наносят очень маленькими каплями, не прика-

саясь пипеткой к пластинке, либо в одну точку, либо узкой горизонтальной полоской (8 мм), капля к капле. При нанесении необходимо получить возможно наименьший диаметр пятна, не нарушив слой силикагеля. Общий объем наносимого экстракта—0,05–0,1 мл.

На эту же пластинку в отдельные точки наносят свидетели: 1% хлороформные растворы холестерина, фосфатидилэтаноламина и триацилглицеринов (свиное сало) в количестве 0,04–0,05 мл. Величина R_f зависит от количества нанесенного на пластинку вещества, (лучший результат достигается при нанесении на пластинку 0,5–1,0 мг вещества). В случае необходимости разделения больших количеств веществ можно использовать препаративное разделение липидов методом тонкослойной хроматографии. Этим способом можно разделить 50 мг и более смеси веществ.

Разделение и проявление. После нанесения липидов пластинку помещают в камеру, погружая ее в растворитель на 5 мм. Камеру герметически закрывают. Разгонка продолжается 50–60 мин при комнатной температуре. Подъем жидкости не должен быть выше 10–12 см, так как при большом подъеме происходит диффузия пятен и наблюдается колебание величины R_f .

После разгонки пластинку высушивают на воздухе в течение ~30 мин до исчезновения запаха растворителей. Хроматограмму проявляют, осторожно опрыскивая *из стеклянного* (или *пластикового*) пульверизатора 10% спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты, и затем, через 1–2 мин выдерживают ее в сушильном шкафу при температуре 80–100 °С до появления на желтом фоне синих пятен липидов. Избыток проявителя может привести к заметному увеличению окраски фона.

Расположение липидов на хроматограмме следующее: отчетливо обнаруживаются 7–8 пятен. В первом пятне у старта находятся фосфолипиды, выше – не идентифицированные соединения, в третьем пятне содержится холестерин, затем моно-, ди-, триацилглицерины соответственно, в последнем пятне – эфиры холестерина. Между ди- и триацилглицеринами располагаются свободные жирные кислоты, но они не проявляются фосфомолибденовой кислотой (проявители свободных жирных кислот: родамин или 0,2% спиртовой раствор 2,6-дихлорфлуоресцина – пятна визуализируются в ультрафиолете).

Вместо фосфомолибденовой кислоты можно использовать способ проявления липидов в парах иода. Иод присоединяется к липидам по месту двойных связей и окрашивает их в темно-желтый цвет (интенсивность окраски зависит от длительности проявления). В последнем случае проявляются все липиды. Для этого сухую пластинку помещают на несколько минут в закрытый сосуд (можно эксикатор), наполненный кристаллами иода (*под тягой!*).

4.5 Выделение фосфолипидов из яичных желтков

Принцип метода. Яичные желтки, обрабатывая ацетоном, освобождают от всех липидов, за исключением фосфолипидов. Последние из остатка

экстрагируют смесью хлороформа и метилового спирта, осаждают ацетоном и хроматографируют на колонке с окисью алюминия. Полученные фракции подвергаются анализу с использованием тонкослойной хроматографии. Вся работа по выделению фосфолипидов проводится в холодной комнате.

Реактивы:

1. Яичные желтки – 10 шт.
2. Этиловый спирт.
3. Метиловый спирт.
4. Ацетон.
5. Хлороформ.
6. Петролейный эфир.
7. *n*-бутиловый спирт.
8. Фосфорно-молибденовая кислота.
9. Нингидрин.
10. Al_2O_3 .

Ход работы. Яичные желтки тщательно отделяют от белка и гомогенизируют в течение 10 мин с 400 мл ацетона, гомогенат оставляют в холодильнике на ночь. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, суспендируют в 400 мл ацетона и снова отделяют центрифугированием. Обработку ацетоном повторяют. Затем осадок наносят тонким слоем на фильтровальную бумагу и высушивают до исчезновения запаха ацетона (1–2 ч).

Высушенный порошок заливают 200 мл смеси хлороформ – метанол (1 : 1). Проводят экстрагирование фосфолипидов при встряхивании на механической качалке в течение 30 мин. Раствор центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Центрифугат отделяют и сохраняют. Обработку осадка повторяют. Если центрифугирование не дает полного просветления надосадочной жидкости, проводят фильтрацию на воронке Бухнера. Центрифугаты (фильтраты) объединяют и выпаривают на роторном испарителе.

После выпаривания смесь фосфолипидов растворяют в 50 мл петролейного эфира и добавляют 20-кратный объем (1000 мл) ацетона. Перемешивают и оставляют на ночь. Осадок отфильтровывают на воронке Бухнера, растворяют в 50 мл петролейного эфира и осаждение повторяют. Растворы в петролейном эфире обычно бывают мутными. После повторного осаждения и фильтрации осадок промывают прямо на фильтре, используя 200 мл ацетона.

4.6 Хроматографическое разделение фосфолипидов яичных желтков на колонке Al_2O_3

Приготовление колонки. Колонка диаметром 2,5 см и высотой не менее 50 см заполняется за 1–2 сут до разделения фосфолипидов. На дно ее помещают плотный слой стеклянной ваты толщиной 1 см, затем приливают суспензию из 170–190 г Al_2O_3 в смеси метанол – хлороформ (1 : 1). При заполнении колонки следует слегка постукивать по ней деревянной палочкой для

равномерного оседания слоя адсорбента. Сверху можно положить бумажный фильтр.

Полученную смесь фосфолипидов (10–15 г) растворяют в смеси метанол – хлороформ (1 : 1) и наносят на колонку. Фосфатидилхолин с примесью лизофосфатидилхолина и сфингомиелина вымывается 500 мл смеси метанол – хлороформ (1 : 1). Первые 150 и последние 100 мл отбрасывают. После выхода фосфатидилхолина колонку промывают той же смесью (100 мл). Фосфатидилэтаноламин с примесью фосфатидилсерина вымывается 500 мл смеси этанол – хлороформ – вода (5 : 2 : 2). Первые 200 мл отбрасывают. Оба элюата упаривают на ротаторном испарителе досуха и получают приблизительно 5 г фосфатидилхолина и 2,5 г фосфатидилэтаноламина.

4.7. Анализ фосфолипидов яичных желтков с помощью тонкослойной хроматографии

Для тонкослойной хроматографии можно использовать пластинки «Силуфол» (15 · 15 см) или приготовленные, как описано выше и стандартные камеры. Разгонку проводят в смеси растворителей : хлороформ – метанол – вода (65 : 25 : 4).

На две пластинки на расстоянии 1,5 см от их нижнего края наносят микропипеткой хлороформные растворы фракций фосфатидилхолина (в одно пятно) и фосфатидилэтаноламина (в другое пятно) в количестве около 1–5 мкмоль. Пластинки помещают в камеру (предварительно за 2–3 ч до этого для насыщения камеры в нее помещают растворитель). После разделения одну пластинку проявляют 5% спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты (с фосфатидилхолином образуются синие пятна на желтом фоне), другую – 0,3% раствором нингидрина в *n*-бутаноле, содержащем 3 % уксусную кислоту. Проявляются все фосфолипиды, имеющие свободную аминогруппу (фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин), в виде розовых пятен на белом фоне.

5. Очистка IgG из крови кролика

Реактивы:

(NH₄)₂SO₄ – кристаллический;

Na-фосфатный буфер, 0,1 моль/л, pH 7-7,2 - 3 л;

Ход работы. Отцентрифугировать кровь кролика (3000 об/мин – 15 мин), получить сыворотку крови. К 1 объему сыворотки крови добавить такой же объем Na-фосфатного буфера pH 7 – 7,2. Рассчитать количество и насыпать кристаллический (NH₄)₂SO₄ до 33% насыщения. Сыворотку с (NH₄)₂SO₄ выдержать при температуре 0-5 °С (в холодильнике или во льду) в течение 30 мин – 1 ч периодически перемешивая, затем отцентрифугировать (3000 об/мин – 15 мин). Супернатант отбросить, осадок растворить в том же объеме Na-фосфатного буфера pH 7 – 7,2, который добавляли к сыворотке

крови. Процедуру высаливания повторить еще два раза. Полученный после центрифугирования осадок IgG растворить в минимальном количестве Na-фосфатного буфера рН 7 – 7,2 и поставить на диализ в стакан с Na-фосфатным буфером рН 7 – 7,2. Далее IgG можно разводить Na-фосфатным буфером рН 7 – 7,2 до необходимой концентрации белка в растворе (концентрацию белка контролировать биуретовым методом) и использовать для решения поставленных задач.

6. Тонкослойная хроматография органических кислот

Среди современных хроматографических методов анализа и препаративного разделения органических и биоорганических соединений заметное место занимает тонкослойная хроматография. В процессе разделения веществ данным методом, анализируемая смесь перемещается вместе с подвижной фазой по тонкому слою порошкообразного сорбента, нанесенного на стеклянную или алюминиевую пластинку.

К преимуществам метода можно отнести использование простых и недорогих приспособлений, быстрое (в отличие от бумажной хроматографии) и эффективное разделение веществ, а также широкая область применения – от качественного и полуколичественного анализа до препаративной очистки.

Методом ТСХ можно обнаружить следы соединений, пользуясь легкодоступными сорбентами и обнаруживающими реагентами. Кроме того, с помощью ТСХ можно контролировать результаты разделения, проведенного другими способами, например перегонкой, колоночной хроматографией и др.

Качественный анализ смесей методом ТСХ позволяет определить а) число компонентов в анализируемом образце, б) подвижность каждого компонента относительно фронта растворителя (величина R_f) или какого-нибудь стандарта.

ТСХ можно использовать для разделения как свободных кислот, так и их производных. Для обнаружения пятен можно использовать различные реагенты и технические приемы.

Оборудование:

1. Пластинки SILICA GEL 60 фирмы MERK.
2. Хроматографическая камера: высокий стакан с гладким верхним срезом и стеклом для герметизации.
3. Пульверизатор.
4. Тонкий капилляр для нанесения образцов на пластинку.
5. Мерные цилиндры на 10мл и на 50мл.
6. Автоматический дозатор на 20мкл.
7. Суховоздушный термостат.

Реактивы:

1. этиловый спирт 96%, хч
2. н-бутиловый спирт, хч.
3. аммиак, концентрированный водный р-р
4. бидистиллированная вода
5. винная к-та, хч, 2% р-р в 50% этаноле
6. лимонная к-та, хч, 5% р-р в 50% этаноле
7. аскорбиновая к-та., хч, 5% р-р в 50% этаноле
8. щавелевая к-та, хч, 5% р-р в 50% этаноле
9. янтарная к-та, хч, 5% р-р в 50% этаноле
10. анилин (свежеперегнаный)
11. l-арабиноза, ч.
12. смесь: винная к-та (1 об. часть, лимонная к-та (1 об. часть), щавелевая к-та (1 об. часть), янтарная к-та (1 об. часть)

В хроматографическую камеру заливают систему растворителей: этанол-аммиак-вода (объемное соотношение 50:15:2,5), энергично встряхивают, плотно закрывают и оставляют на 30-60 мин для насыщения камеры парами растворителей.

Нанесение анализируемых образцов на целлюлозную пластинку.

Мягким карандашом проводят линию старта на расстояние 1.5 см от нижнего края пластинки. На этой линии аккуратно, чтобы не повредить слой сорбента, отмечают точки для нанесения проб. Тонким капилляром отбирают 1 мкл анализируемого раствора и мелкими порциями, постоянно подсушивая в токе воздуха, наносят образец в отмеченное точкой место на пластинке. Размер пятна не должен превышать 3 мм в диаметре. Количество вещества нанесенного в одну точку – приблизительно 20-50 мкг.

Проведение хроматографии.

Пластинку с нанесенными образцами осторожно опускают в камеру и погружают в жидкость на глубину около 1 см. Быстро и плотно закрывают камеру стеклом. Хроматографию ведут пока фронт растворителя не дойдет до верхнего края на расстояние 0,5-1 см. Пластинку высушивают в токе теплого воздуха (можно использовать бытовой фен) и еще раз погружают ее в систему растворителей для повторного хроматографирования. Пластинку тщательно высушивают в токе теплого воздуха (феном) и оставляют на воздухе на 10-20 часов до полного удаления растворителей.

Обнаружение

Готовят проявляющую смесь: 0,5 мл свежеперегнанного (бесцветного) анилина растворяют в мл этилового спирта, 0,5 г l-арабинозы растворяют в 5 мл бидистиллированной воды. Два полученных раствора сливают вместе и приливают н-бутанол, доводя объем до 25 мл.

Для проявления пластинку опрыскивают анилин-углеводной смесью. Эту процедуру нужно проводить под тягой. Хроматограмму увлажняют рав-

номерно, не очень обильно. Для развития окраски пятен, пластинку помещают в термостат с температурой 100-110° С. Спустя 10-15 минут, появляются темно-коричневые пятна на светло-желтом фоне, долго сохраняющие окраску при комнатной температуре. Полученную хроматограмму зарисовывают или фотографируют и определяют значения Rf. (отношение расстояния от середины пятна до линии старта к расстоянию от фронта растворителя до линии старта.)

7. Тонкослойная хроматография сахаров

Среди современных хроматографических методов анализа и препаративного разделения органических и биоорганических соединений заметное место занимает тонкослойная хроматография. В процессе разделения веществ данным методом, анализируемая смесь перемещается вместе с подвижной фазой по тонкому слою порошкообразного сорбента, нанесенного на стеклянную или алюминиевую пластинку.

К преимуществам метода можно отнести использование простых и недорогих приспособлений, быстрое (в отличие от бумажной хроматографии) и эффективное разделение веществ, а также широкая область применения – от качественного и полуколичественного анализа до препаративной очистки.

Методом ТСХ можно обнаружить следы соединений, пользуясь легкодоступными сорбентами и обнаруживающими реагентами. Кроме того, с помощью ТСХ можно контролировать результаты разделения, проведенного другими способами, например перегонкой, колоночной хроматографией и др.

Качественный анализ смесей методом ТСХ позволяет определить а) число компонентов в анализируемом образце, б) подвижность каждого компонента относительно фронта растворителя (величина Rf) или какого-нибудь стандарта.

ТСХ можно использовать для разделения как свободных сахаров, так и их производных. Для обнаружения пятен можно использовать различные реагенты и технические приемы.

Оборудование:

1. Стеклопластинки фирмы MERK со слоем целлюлозы, не содержащей флуоресцентного маркера.

2. Хроматографическая камера: высокий стакан с гладким верхним срезом и стеклом для герметизации.

3. Тонкий капилляр для нанесения образцов на пластинку.

4. Автоматический дозатор на 20 мкл.

5. Мерный цилиндр на 25 мл.

6. Пульверизатор

7. Суховоздушный термостат.

Реактивы:

1. н-бутанол (хч)
2. уксусная кислота (хч)
3. бидистиллированная вода
4. сахараза 1% р-р в 50% этаноле
5. фруктоза 1% р-р в 50% этаноле
6. глюкоза 1% р-р и 50% этаноле
7. смесь сахараза : фруктоза : глюкоза –1 : 1 : 1
8. анилин (свежеперегнаный)
9. дифениламин ЧДА
10. этиловый спирт 96%
11. концентрированная ортофосфорная к-та ЧДА

Приготовление смеси для системы разделения.

40 мл н- бутанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды наливают в хроматографическую камеру, энергично встряхивают и плотно закрывают стеклом. Время насыщения камеры парами растворителя 30 – 60 мин.

Нанесение анализируемых образцов на целлюлозную пластинку.

Мягким карандашом проводят линию старта на расстояние 1.5 см от нижнего края пластинки. На этой линии аккуратно, чтобы не повредить слой сорбента, отмечают точки для нанесения проб. Тонким капилляром отбирают 1 мкл анализируемого раствора и мелкими порциями, постоянно подсушивая в токе воздуха, наносят образец в отмеченное точкой место на пластинке. Размер пятна не должен превышать 3 мм в диаметре. Количество сахара нанесенного в одну точку –приблизительно 10мкг.

Проведение хроматографии.

Пластинку с нанесенными образцами осторожно опускают в камеру и погружают в жидкость на глубину около 1 см. Быстро и плотно закрывают камеру стеклом. Хроматографию ведут до тех пор пока фронт растворителя не дойдет до верхнего края на расстояние 0,5-1 см

Значения R_f (отношение расстояния от линии старта до середины пятна к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя) у сахаразы, фруктозы и глюкозы различаются незначительно. Поэтому после однократного проведения хроматографии пластинку хорошо высушивают в токе теплого воздуха и повторяют всю процедуру еще 2 раза.

Обнаружение.

Готовят проявляющий анилиндифениламинфосфатный реактив: 5мл 4% спиртового раствора анилина, 5мл 4% спиртового раствора дифениламина и 1мл концентрированной ортофосфорной к-ты тщательно перемешивают и заливают в пульверизатор. Хорошо высушенную пластинку опрыскивают проявляющей смесью. Это делают в вытяжном шкафу, пластинку увлажняют аккуратно и не очень обильно. Проявленную хроматограмму высушивают под тягой и помещают в термостат, нагретый до 80°C. Через 10-20 мин на бе-

лом фоне появляются серо-синеватые пятна сахаров. Полученную картину зарисовывают (фотографируют или сканируют) и определяют значения R_f .

8. Получение этилового спирта из виноматериалов

Одним из важных биохимических процессов является спиртовое брожение – превращение сахара в этиловый спирт.

Этиловый (винный) спирт – одно из важнейших исходных веществ в пищевой промышленности и современной промышленности органического синтеза.

Технология процесса получения этилового спирта известна с древнейших времен.. Сырьем служат различные сахаристые вещества, например виноградный сахар (глюкоза), содержащийся в различных плодах и ягодах и крахмал в больших количествах присутствующий в клубнях картофеля, зернах ржи, пшеницы и кукурузы. Для превращения в глюкозу, крахмал предварительно подвергают гидролизу.

Спиртовое брожение протекает под действием ферментов, вырабатываемых дрожжевым грибом. Реакция идет по схеме:



Из сброженного сырья этиловый спирт выделяют методом перегонки.

Прямоточная перегонка при атмосферном давлении

Перегонка служит важнейшим методом разделения и очистки жидких веществ. В простейшем случае перегонка заключается в нагревании жидкости до кипения и конденсации ее паров в виде дистиллята в холодильнике. Такой метод перегонки называют прямоточной перегонкой при атмосферном давлении и применяют в случае, когда температуры кипения веществ, входящих в состав смеси, значительно различаются между собой.

Материалы и оборудование:

1. Круглодонная колба емкостью 0,5 л.
2. Насадка Вюрца.
3. Холодильник Либиха.
4. Алонж
5. Приемные плоскодонные колбы (3 шт.)
6. Резиновые трубки.
7. Ртутный термометр до 100°C.
8. Железный штатив с лапками.
9. Керамические центры кипения.
10. Исходный виноматериал.
11. Мерный цилиндр на 50 мл
12. Набор ареометров
13. Электроплитка

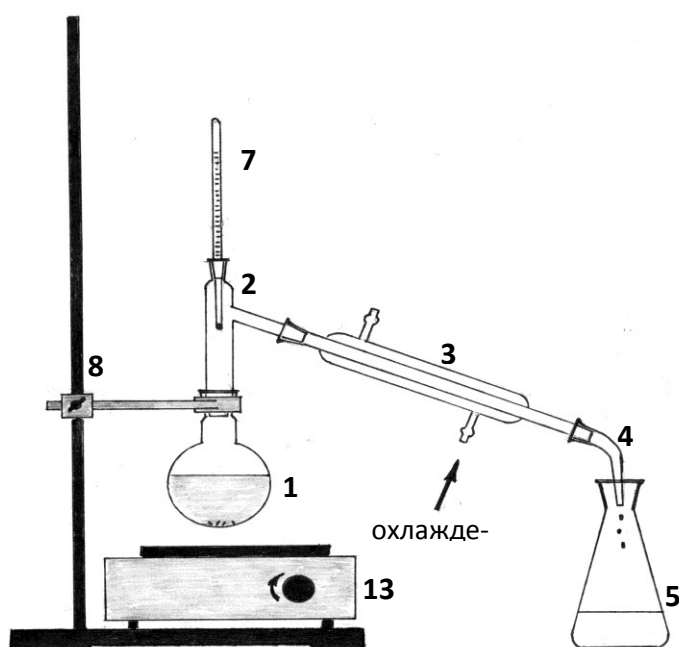
Ход работы

В круглодонную колбу (1) наливают жидкость, с тем расчетом, чтобы она занимала не более 2/3 объема колбы. В противном случае возможен переброс жидкости в приемник во время кипения. На дно колбы бросают несколько центров кипения (осколки фарфора, стеклянные капилляры)..

Колбу укрепляют в железном штативе (8), зажимая лапкой в области шлифа. Снизу помещают электроплитку (13) с хорошим терморегулятором. Присоединяют насадку Вюрца (2) и термометр (7). Его ртутный шарик должен находиться несколько ниже отверстия отводной трубки (на 0,5 см), в этом случае он будет полностью омыт парами кипящего вещества.

Холодильник (3) посредством резиновых трубок подключают к водопроводному крану. Соединяют шлифы отводной трубки насадки Вюрца и холодильника.

Убедившись, в прочности соединения колбы с холодильником и правильном положении термометра, подставляют приемник (5) и включают электроплитку. Чтобы снизить потери отгоняемого вещества к нижнему шлифу холодильника присоединяют алонж (4).



Нагрев колбы нужно производить очень аккуратно, избегая перегрева.

Отмечают время начала кипения и через каждые 5 мин записывают показания термометра.

Отдельно собирают фракции, кипящие при температуре 77-90°; 90-95° и 95-100°С. Измеряют объем фракций и удельный вес.

Определяют содержание этилового спирта в каждой фракции. Для этого используют таблицу.

Плотность водных растворов спирта

Плотность, г/литр	Эт. спирт об.%	Плотность, г/литр	Эт. спирт, об.%
0,9976	1	0,9339	50
0,9962	2	0,9299	52
0,9933	4	0,9259	54
0,9906	6	0,9217	56
0,9882	8	0,9174	58
0,9858	10	0,9131	60
0,9835	12	0,9086	62
0,9813	14	0,9040	64
0,9792	16	0,8993	66
0,9772	18	0,8945	68
0,9752	20	0,8896	70
0,9732	22	0,8846	72
0,9713	24	0,8795	74
0,9691	26	0,8743	76
0,9669	28	0,8690	78
0,9647	30	0,8635	80
0,9623	32	0,8579	82
0,9598	34	0,8512	84
0,9571	36	0,8462	86
0,9542	38	0,8400	88
0,9512	40	0,8336	90
0,9481	42	0,8268	92
0,9448	44	0,8196	94
0,9413	46	0,8117	96
0,9377	48	0,8033	98
		0,7936	100

9. Выделение и очистка меланиновых пигментов

Меланины – собирательное название группы нерегулярных высокомолекулярных природных и синтетических биополимеров полиароматической природы, образующихся при окислительной полимеризации фенольных соединений (тирозина, диоксифенилаланина, катехоламинов и др.). Меланиновые пигменты широко распространены в природе и встречаются у животных, растений, микроорганизмов и грибов. Меланин из культурного винограда темных сортов (эномеланин) выделяется из виноградных выжимок способом, предусматривающим высвобождение их из меланопротеинового комплекса, что резко повышает биологическую активность биополимера.

При производстве черных сортов чая на стадии технологического процесса, связанного со скручиванием листьев и последующей ферментацией происходит разрушение клеток и увеличение интенсивности и глубины окислительных процессов. В результате этого катехины, галловая кислота, аминокислоты, альдегиды, спирты и другие ароматические соединения окисляются до хинонов, неферментативная полимеризация которых приводит к образованию высокомолекулярных окрашенных биополимеров, легко экстрагируемых щелочными растворами. Образующиеся конденсированные полифенольные соединения обладают рядом биологических активностей: антиоксидантной, генопротекторной, гепатопротекторной, фотопротекторной и др. Выделение и очистка этих пигментов из биотехнологических продуктов производства черного чая включает методы экстракции и последующей гелехроматографии.

Оборудование.

Стеклянные стаканы на 1, 3 и 5 литров, марлевый фильтр, иономер, технические весы, аналитические весы, разновесы, весы для уравнивания центрифужных пробирок, центрифуга РС-6, 8 центрифужных пробирок на 150 мл, 120 стеклянных пробирок на 5 мл, полупроницаемая мембрана (нитро- или ацетатцеллюлозные мембраны (целлофан)), хроматографическая колонка (90 x 2,5 см), перистальтический насос, коллектор фракций, спектрофотометр СФ-26, кварцевые кюветы ($l_k=1,0$ см), лиофилизатор.

Реактивы.

1. Гидроксид натрия (1н и 0,01н);
2. концентрированная соляная кислота;
3. дистиллированная вода
4. сорбенты для гелехроматографии Sephadex G-75 (Toyopearl HW-65, Spheron-100 или макропористые стекла (МПС-1150-II-56)).

Все растворы готовят на дистиллированной воде.

Сырье: 100 грамм черного грузинского чая.

Экстракция. Измельченные листья черного чая (100 г) заливают двумя литрами раствора для экстракции (1н NaOH) и, при постоянном перемешивании механической мешалки, оставляют на 48 часов при комнатной температуре. По истечении указанного срока полученный раствор фильтруют через двойной слой марли и центрифугируют (15 мин при 5000 об/мин) для удаления крупных частиц. К полученному супернатанту при постоянном перемешивании медленно добавляют концентрированную соляную кислоту до pH 2. Выпавший хлопьевидный осадок светло-коричневого цвета промывают дистиллированной водой до нейтральной среды. Экстрагированный пигмент осаждают центрифугированием (10 мин при 5000 об/мин) и растворяют в минимальном объеме 0,01н NaOH. Описанную процедуру повторяют трижды.

Диализ. Перед началом диализа изготавливают диализатор. Вырезают из целлофана круг диаметром 25 – 30 см. Складывают его в форме мешочка, вставляют в отверстие стеклянную трубочку (длиной 8 – 10 см и диаметром 0,5 – 0,8 см) так, чтобы верхний конец трубки выступал из мешочка на 1,5 – 2 см, а нижний был бы погружен внутрь на 1/3. Мешочек туго завязывают на трубке шнурком. До работы диализатор следует сохранять наполненным дистиллированной водой и погруженным с помощью держателя для пробирок в стакан с водой так, чтобы он не касался стенок и дна стакана. Перед работой воду из диализатора выливают.

С помощью воронки вливают в диализатор 100 мл полученного раствора пигмента из черного чая и погружают его на 2/3 в пятилитровый стакан с дистиллированной водой (отношение объема диализуемого раствора к объему воды должно быть не менее 1/20). Оставляют раствор пигмента диализоваться на 24 часа при постоянном перемешивании и пятикратной смене дистиллята.

Диализный мешок вынимают из стакана и содержимое его фильтруют через бумажный фильтр.

Гель-фильтрация. Готовят колонку (2,5 x 90 см), заполненную Sephadex G-75 (Toyopearl HW-65, Spheron-100 или макроперистыми стеклами (МПС-1150-П-56)) и уравновешенную 0,01н гидроксидом натрия. Для этого 15 г сефадекса G-75 предварительно заливают в литровом стакане 0,5 л 0,01 н раствором гидроксида натрия, хорошо перемешивают и оставляют на 24 часа. Через сутки набухший сефадекс (объем его увеличивается примерно в 15 раз) промывают пять раз 0,01 н NaOH. Затем гель сефадекса в течение 0,5 часа деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом. Заполнение колонки гелем ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно через воронку по стенке колонки, что предохраняет от захвата им воздуха. С этой же целью, а также для обеспечения необходимой плотности геля, сразу после внесения геля создается рабочее давление, подключая к колонке сосуд с элюирующим раствором (0,01 н NaOH). Этим же раствором в течение 12 часов ведут промывку колонки.

Перед внесением раствора пигмента снимают верхний адаптер, устанавливают уровень элюирующего раствора вровень с поверхностью геля и отключают перистальтический насос. Осторожно, стараясь не взмутить верхний слой геля, шприцом наслаивают на него 5 мл раствора конденсированного полифенола, т.е. 2% от общего объема геля в колонке. Включают перистальтический насос и вводят нанесенный раствор пигмента в гель. Отключают насос и, осторожно по стенке колонки наслаивают при помощи шприца элюент, подключают к колонке верхний адаптер, из которой подается элюирующий раствор, и начинают элюцию, включив насос.

Собирают фракции по 3 мл при помощи коллектора фракций. Элюцию ведут со скоростью 60 мл в час, что достигается изменением скорости работы перистальтического насоса. Элюцию заканчивают после сбора 100 - 120

фракций. Содержание пигмента в исследуемых фракциях определяется спектрофотометрически на спектрофотометре СФ-26 при 280 нм, толщине кюветы 1,0 см против 0,01 н NaOH.

На основании полученных данных строят кривую зависимости оптической плотности от объема выхода (“номера” фракции). Фракции, входящие в отдельные пики, объединяют, подвергают диализу и высушивают лиофильно.

Идентификация пигментов

Меланины в выделенном и высушенном виде представляют собой черный или коричневый порошок с металлическим блеском. До настоящего времени удовлетворительных тестов для идентификации меланинов нет, поскольку их извлечение из клеток затруднено из-за высокой устойчивости к действию химических соединений. Поэтому для идентификации пигментов меланиновой природы применяется набор тестов, включающих данные о наличии свободных радикалов, продуктов щелочного десмолиза, растворимости пигментов в воде и органических растворителях, изменение окраски под действием сильных окислителей.

О принадлежности пигментов к меланинам, судят на основании изучения ряда их физико-химических свойств. Это *способность растворяться* в типичных для этих пигментов растворителях (растворах щелочи, концентрированных H_2SO_4 и HNO_3), *обесцвечиваться* под воздействием сильных окислителей (H_2O_2 , $Na_2S_2O_4$, $KMnO_4$ и бромной воды), *взаимодействовать* с $FeCl_3$. Меланины не растворяются в обычных органических растворителях (спирты, ароматические растворители, серный эфир, этилацетат, хлороформ, пиридин, диметилформамид, тетрагидрофуран).

Данные, характеризующие взаимодействие пигментов с рядом соединений, приведены в таблице.

Физико-химические свойства меланиновых пигментов

Реактивы	Пигменты
NaOH 0,5%-ный	Р
HCl разведенная	НР
H_2SO_4 концентрированная	Р
HNO_3 концентрированная	Р
Хлорэтан	НР
Диметилформамид	СР
Бутанол нормальный	Р
Диэтиловый эфир	НР
Ацетон	НР
Хлороформ	НР
H_2O_2	О
Бромная вода	О
$KMnO_4$	О
Аммиачные ионы	+

Примечание: P — растворяется; NP — не растворяется; SP — слабо растворяется; O — окисляется; + — реакция положительная

- Как показали исследования, 0,1%-ные растворы пигментных препаратов в 0,1N NaOH в присутствии 10% перекиси водорода окислялись и обесцвечивались в течение суток.

- При добавлении перманганата калия окраска щелочных растворов изменялась с черной, черно-коричневой либо коричневой на зеленую, а затем происходило обесцвечивание раствора и выпадение осадка.

- При добавлении к щелочным растворам пигментов дитионита натрия (сильного восстанавливающего агента) в концентрации 2 мг/мл происходило изменение степени окисленности препаратов. Это выражалось в изменении тангенса угла наклона прямой спектра поглощения в интервале длин волн 250-500 нм. Если для исходных 0,01% растворов в 0,1н NaOH значения tg угла наклона были равны 0,0025 (для чая); 0,0024 (оксидат торфа), то после добавления $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ эти величины составили 0,0028 и 0,0025, соответственно.

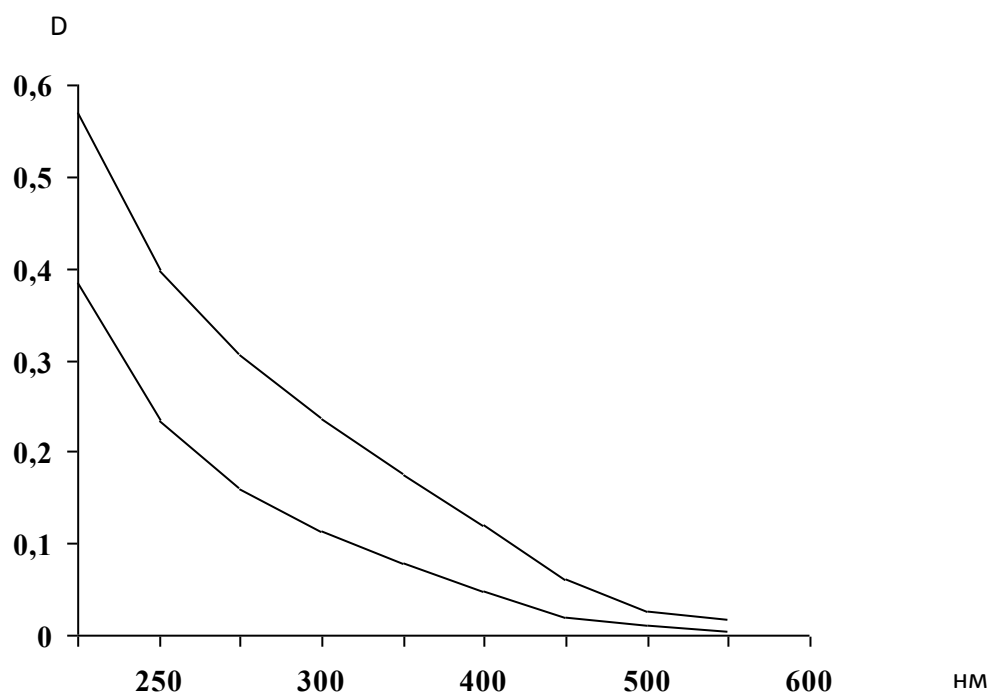
- В присутствии FeCl_3 в концентрации 0,5 – 1,0 мг/мл из 0,01%-ных щелочных растворов пигментов (0,1н NaOH) происходило выпадение хлопьевидного осадка, который растворялся при добавлении избытка хлорида железа.

Результаты данных идентификационных тестов указывают на присутствие в исследуемых пигментах хиноидных и фенольных структур и подтверждает их принадлежность к меланинам.

- Поглощение света природными пигментами имеет фундаментальное значение и определяет основную функцию меланинов. Спектры поглощения меланинов из чая и оксидата торфа имеют форму наклонных прямых, ниспадающих с увеличением длины волны, характерных для меланинов грибно-го происхождения. Щелочерастворимые фракции пигментов изучаемых грибов поглощают слабее в видимой области спектра. Значения тангенса углов наклона спектров поглощения 0,001% растворов меланинов в 0,1 н NaOH в волновом диапазоне 250-500 нм составляли 0,0024 и 0,0025 соответственно. Спектры поглощения растворов меланинов в видимой и ультрафиолетовой областях спектра представлены на рис. 9.1.

Примечательно, что полученные спектры не имеют максимумов, иногда отмечаемых для природных феомеланинов при 500-550 нм и природных алломеланинов при 450 нм. Кривые поглощения не являются линейными, что отмечается в преимущественных случаях для микроскопических грибов.

- Определение содержания меланинов в чае и оксидате торфа;
- определение концентрации растворов меланинов спектрально.



Спектр поглощения в УФ- и видимой областях 0,001% раствора меланинов из чая (1) и оксидата торфа (2)

1

2

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алейникова Т. Л., Рубцова Г. В., Павлова Н. А.* Руководство к практическим занятиям по биологической химии / Под ред. *Е. С. Северина* – М., МГУ, 2000.
2. Биологические мембраны. Методы. /Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза. – М.: Мир, 1990.
3. *Болдырев А.А.* Биохимия мембран. Введение в биохимию мембран. /А.А. Болдырев. – М.: Высшая школа, 1986.
4. *Боуэн Т.* Введение в ультрацентрифугирование. - М.: Мир, 1973.
5. Введение в биомембранологию. Учебное пособие /Под ред. А.А. Болдырева. – М.: Изд. МГУ, 1990.
6. *Владимиров Ю.А., Осипов А.Н., Клебанов Г.Н.* Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного излучения // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – № 1. – С. 103-113.
7. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М., 1982.
8. *Геннис Р.* Биомембраны: молекулярная структура и функции /Р. Геннис. Пер. с англ. – М.: Мир, 1997.
9. *Голиков С.Н., Саноцки И.В., Тиунов Л.А.* Общие механизмы токсического действия. Л: Медицина. – 1986. – 280 с.
10. Детерман Г. Гель-хроматография. М., 1970.
11. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. – М., Мир, 1991.
12. *Дэвени Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1976.
13. Жидкостная колоночная хроматография /Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. М., 1978.
14. Иммунологические методы. /Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987.
15. Иммунохимия в клинической лабораторной практике. /Под ред. А.М. Уорда, Дж.Т. Уичера. М.: Медицина, 1981.
16. *Камышников В.С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: в 2 т. – 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 463 с.
17. *Калинин Ф.Л.* Справочник по биохимии. - Киев: Наукова Думка, 1982.
18. *Кейтс М.* Техника липидологии. М.: Мир, 1975.
19. *Кольман Я., Рем К.Г.* Наглядная биохимия. – М: Мир, 2000.
20. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. –1990. –Т. 36, № 2. –С. 88-91.
21. *Костюк В.А., Потапович А.И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Мн.: БГУ, 2004. – 179 с.

22. *Куксис А.* Липиды // Хроматография. Практическое приложение метода// под ред. Э. Хефтмана. М., 1986 Ч. 1. С.130.
23. *Кульберг А.Я.* Молекулярная иммунология. М.: Высшая школа, 1985.
24. *Кушманова О. Д., Ивченко Г. М.* Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. – М., Медицина, 1983.
25. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам /Под ред. О. Микеша. М., 1982.
26. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., 1971.
27. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учеб. пособие / под ред. М. И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.-272 с.
28. Методы практической биохимии /Под ред. Б. Уильямса, К. Уилсона. М., 1978.
29. *Михайлов А.Т., Смирский В.Н.* Методы иммунохимического анализа в биологии развития. М.: Наука, 1991.
30. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков /Под ред. А. Нидервайзера, Г. Патаки. М., 1974.
31. Новые методы иммуноанализа. /Под ред. Д. Кэти. М.: Мир, 1991.
32. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М., 1981.
33. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., 1985.
34. *Петров Р.В.* Иммунология. М.: Высшая школа, 1983.
35. Практикум по биохимии /Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой – М., МГУ, 1989.
36. Препаративная биохимия липидов /Под ред. Л. Д. Бергельсона, Э. В. Дятловицкой. М., 1981.
37. *Прохорова М. И.* Большой практикум по углеводному и липидному обмену / М. И. Прохорова, Э.Н. Тупикова. Изд-во Ленингр. ун-та, 1965.
38. *Прусик З.* Электромиграционные методы //Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам /Под ред. О. Микеша. М., 1982. Т. 2.
39. *Руанет В.В.* Теория и техника лабораторных работ. Специальные методы исследования : Учебное пособие / Под ред. проф. А.К. Хетагуровой. М.: ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава», 2007.
40. *Скоупс Р.* Методы очистки белков. М., 1985.
41. Современные методы в биохимии /Под ред. акад. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977.
42. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991.

43. Уильяме Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. М.: Мир, 1978.
44. Филиппович Ю. Б. Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович. М.: Просвещение, 1975.
45. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М., 1980.
46. Хроматография. Практическое приложение метода / Под ред. Э. Хефтмана. М., 1986.
47. Чиркин А. А. Практикум по биохимии: учеб. Пособие / А. А. Чиркин. Минск: Новое знание, 2002.
48. Шелудько Н.С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия // Цитология. 1974. Т. 15. С. 597.
49. Электрофоретические методы анализа белков /Под ред. Р.К. Саляева, П.Д. Решетова. Новосибирск, 1981.
50. Энкерт Р., Рэнделл Д., Огастин Дж. Физиология человека. – М., Мир, 1991, Т. 1 –2.
51. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды и белки. М., 1985.
52. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T-4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 681.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПРЕДИСЛОВИЕ	3
1. МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ	4
1.1. Электрофоретическое разделение белков	4
1.2. Разделение белков методом хроматографии	5
1.2.1 Метод гель-хроматографии	9
1.2.2. Метод ионообменной хроматографии	11
1.2.3 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия	14
2. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ	16
2.1. Метод Бенедикта	16
2.2 Метод Лоури	17
2.3 Метод Петерсона	18
3 ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.	18
3.1 Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот из тканей животных	18
3.2 Выделение и очистка ДНК	19
3.2.1 Метод Мармура	19
3.2.2 Метод А.С. Орлова и Е.И. Орловой	20
3.2.3 Метод Шмидта-Тангаузера	21
3.2.4 Выделение дезоксирибонуклеопротеина из селезенки крыс	24
3.2.5 Выделение и гидролиз рибонуклеинов из клеток дрожжей	22
3.2.6 Выделение ДНК из цельной крови	24
3.2.7 Выделение ДНК из эпителиальных клеток ротовой полости человека методом щелочного лизиса	25
3.3 Характеристика препаратов нуклеиновых кислот	26
3.3.1 Определение величины гиперхромного эффекта по содержанию ГЦ-пар	26
3.3.2 Определение температуры плавления ДНК	27
3.4. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот	28
3.4.1 Электрофорез ДНК в агарозном геле	28
3.4.2 Электрофорез рибонуклеиновых кислот в полиакриламидном геле	31
4. ПОЛУЧЕНИЕ ОБЩЕЙ ФРАКЦИИ ЛИПИДОВ	32
4.1. Выделение общей фракции липидов по методу Фолча и соавторов	32
4.2 Выделение общей фракции липидов методом М.А. Креховой, М.К. Чехрановой	34
4.3 Метод эстракции липидов спиртово-эфирной смесью (по Блюру)	34

4. 4	Разделение общей фракции липидов методом тонкослойной хроматографии	35
4.5	Выделение фосфолипидов из яичных желтков	37
4.6	Хроматографическое разделение фосфолипидов яичных желтков на колонке Al_2O_3	38
4.7.	Анализ фосфолипидов яичных желтков с помощью тонкослойной хроматографии	39
5.	ОЧИСТКА IGG ИЗ КРОВИ КРОЛИКА	39
6.	ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ	40
7.	ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ САХАРОВ	42
8.	ПОЛУЧЕНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА ИЗ ВИНМАТЕРИАЛОВ	44
9.	ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ	46
	ЛИТЕРАТУРА	52