

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра биохимии и микробиологии

О.А. Науменко

ФЕРМЕНТЫ И СИНТЕЗ БИОПОЛИМЕРОВ

Методические указания

Рекомендовано редакционно – издательским советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология

Оренбург
2018

УДК 577.15 (076.5)

ББК 28.072я7

Н 34

Рецензент – доцент, кандидат биологических наук О.Я. Соколова

Науменко, О.А.

Н 34

Ферменты и синтез биополимеров: методические указания /
О.А. Науменко; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2018.-
30 с.

Методические указания содержат теоретический материал по теме Выделения и очистки органических соединений, методы приготовления клеточных экстрактов, вопросы к лабораторным работам в соответствии с требованиями рабочей программы.

Методические указания предназначены для обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 Биология, магистерской программы «Биохимия и молекулярная биология». Методические указания являются вспомогательным материалом для учебно - исследовательской работы обучающихся.

УДК 577.15 (076.5)

ББК 28.072я7

©Науменко О.А., 2018

©ОГУ, 2018

Содержание

1 Методы выделения и очистки органических соединений	4
1.1 Разделение суспензий	4
1.2 Извлечение органических веществ	4
1.3 Разделение твердых смесей и очистка твердых веществ.....	8
1.4 Разделение жидких смесей и очистка жидких органических веществ ..	12
2 Приготовление клеточного экстракта	18
2.1 Клеточный экстракт.....	18
2.2 Методика приготовления клеточных экстрактов	18
3 Выделение ДНК.....	23
3.1 Изучение субклеточного распределения ДНКазы (фермента-маркера ядерной фракции) в животных тканях.....	23
3.2 Изучение субклеточного распределения кислых протеаз (ферментов-маркеров лизосом) в животных тканях.....	26
Список использованных источников	29

1 Методы выделения и очистки органических соединений

1.1 Разделение суспензий

Выделение органических веществ чаще всего начинается с разделения жидких и твердых фаз.

Органические вещества, находящиеся в осадке, в большинстве случаев, отделяют от маточных растворов фильтрованием. Как правило, органические соединения хорошо растворимы в органических растворителях. Поэтому промывание осадка, образовавшегося в фильтре, необходимо производить как можно меньшими количествами промывной жидкости.

При отделении твердой фазы от жидкой, пользуются стеклянной воронкой, с вложенным в нее бумажным фильтром. Для ускорения; фильтрования этот процесс проводят, создавая перепад давления между областями над и под фильтром, что в лабораторных условиях достигается путем создания разряжения под фильтром. В этом случае применяют цилиндрическую воронку с сетчатым дном (воронка Бюхнера) и колбу Бунзена. На сетчатое дно воронки накладывают бумажный фильтр, по размерам, точно совпадающий с поверхностью дна воронки, а колбу подключают к вакуум насосу. Перед началом фильтрования фильтр смачивают растворителем.

1.2 Извлечение органических веществ

Существует ряд методов, которые можно использовать как для извлечения твердых, так и жидких органических соединений. К ним

следует отнести, например, экстракцию, адсорбцию, хроматографию и ряд других.

Для извлечения из жидких и твердых смесей какого-либо вещества методом экстракции применяют растворитель - экстрагент, хорошо растворяющий данное вещество и не растворяющий сопутствующие ему примеси, или наоборот.

Извлечение веществ из растворов (большой частью из водных) обычно осуществляют встряхиванием с растворителем в делительной воронке.

Экстрагент - растворитель не должен растворяться в воде и образовывать легко расслаивающиеся эмульсии. Растворитель берется в количестве $1/5 - 1/3$ объема раствора. После отстаивания разделяют два образовавшихся слоя. Нижний слой сливают через кран делительной воронки, а верхний выливают через верхнее отверстие. Чаще всего для экстракции применяют следующие растворители: диэтиловый эфир, петролейный эфир, бензол (используется в небольших количествах для аналитических целей, т.к. является высокотоксичным веществом). Перечисленные экстрагенты легче воды и поэтому располагаются над слоем минеральной (водной) фазы при смешивании и разделении. Хлористый метилен, хлороформ - растворители тяжелее воды, располагаются при смешивании под слоем минеральной (водной) фазы. Для лучшего извлечения целесообразно экстрагировать несколько раз небольшими порциями растворителя или использовать экстракторы непрерывного действия.

1.2.1 Экстракция применяется для очистки веществ или разделения смеси веществ. Экстракцией (или извлечением) называют процесс перевода вещества из одной жидкой или твердой фазы в другую жидкую фазу. Экстракция может осуществляться в двух режимах: периодическом и непрерывном.

Экстракция в системе «твердое вещество — жидкость». Для извлечения из смеси твердых веществ только одного компонента необходимо так подобрать растворитель, чтобы в нем растворялся только данный компонент и не растворялись другие компоненты. Чем лучше измельчен образец, тем полнее извлекается из него требуемое вещество.

Периодическая экстракция из твердого образца называется мацерацией. Измельченное твердое вещество смешивают с подходящим растворителем, встряхивают или перемешивают в течение некоторого времени, которое подбирается экспериментально.

Затем растворитель отделяют фильтрованием или декантацией. Для полноты извлечения операцию повторяют несколько раз небольшими порциями свежего растворителя.

1.2.2 Непрерывная экстракция (перколяция) проводится в перколяторах.

В нижнюю часть воронки перколятора помещают кусочек ваты и заполняют ее экстрагируемым твердым материалом. Подаваемый сверху растворитель просачивается через твердое вещество. Кран воронки открывают настолько, чтобы уровень жидкости в воронке оставался постоянным, а над слоем экстрагируемого материала все время находился слой растворителя. Широкое применение для экстракции вещества из твердого образца получил экстрактор Сокслета, позволяющий вести непрерывную экстракцию сравнительно небольшим количеством растворителя.

Экстрагируемый материал помещают в бумажном патроне в экстрактор. В колбу наливают необходимое количество растворителя и нагревают его до кипения. Пары растворителя, поднимаясь по боковой трубке, конденсируются в обратном холодильнике, и растворитель стекает каплями на экстрагируемый материал. Когда экстрактор заполнится растворителем до уровня сгиба сливki трубки сифона, экстракт сбрасывается по сифону в перегонную колбу и процесс повторяется. Таким

образом, экстрагируемый материал обрабатывается порцией чистого растворителя, а экстрагируемое вещество скапливается в перегонной колбе. Этот метод применим, когда экстрагируемое вещество выдерживает длительное нагревание без разложения.

Экстракция в системе «жидкость—жидкость». В системе из двух несмешивающихся жидкостей вещество распределяется между двумя жидкими фазами в соответствии с законом распределения Нернста. Чем больше разницы в растворимости, тем большее количество вещества находится в одной из фаз. Растворитель для экстракции вещества из жидкой фазы (экстрагент) должен растворять вещество лучше, чем жидкость, в которой оно растворено.

Экстракцию веществ растительного и животного происхождения в основном проводят из водных растворов. Для этих случаев рекомендуют такие экстрагенты, как этиловый спирт, петролейный эфир, бензол, толуол, хлороформ, растворимость которых в воде менее 1%. Часто применяемые в этих целях диэтиловый эфир, этилацетат, бутанол ограниченно растворимы в воде (7% - 8%).

1.2.3 Периодическая экстракция проводится в делительной воронке, куда помешают раствор экстрагируемого вещества и добавляют к нему экстрагент в количестве не более трети объема образца. При этом делительная воронка должна быть заполнена не более чем на две трети объема. Воронку закрывают пробкой и содержимое встряхивают, придерживая пробку и кран. При встряхивании внутри воронки может возникнуть небольшое избыточное давление. Поэтому для уравнивания давления периодически, повернув воронку краном вверх, открывают кран и эту операцию повторяют, пока не перестанет возникать избыточное давление. Только после этого воронку сильно встряхивают в течение 1—2 мин и закрепляют в штативе, давая возможность наиболее полно разделиться двум фазам. Нижний слой, имеющий большую плотность, сливают через кран в колбу-приемник, а верхний слой - либо через верхнее

отверстие, либо через кран в другой приемник. Если первым сливается водный слой, то отводную трубку лучше просушить фильтровальной бумагой. Некоторые растворители образуют стойкие эмульсии.

Для разрушения образовавшейся эмульсии либо добавляют небольшие количества противовспенивающих веществ (например, низших спиртов), либо насыщают солями, либо фильтруют. После разделения фаз нижний слой выпускают через кран воронки, предварительно открыв пробку. Верхний слой сливают через горло воронки. Для более полного извлечения экстракцию повторяют несколько раз небольшими порциями свежего экстрагента.

1.2.4 Непрерывная экстракция (перфорация) в системе «жидкость - жидкость» осуществляется в специальных приборах - перфораторах. Принцип действия перфоратора аналогичен описанному для экстрактора Сокслета.

1.3 Разделение твердых смесей и очистка твердых веществ

Применяют различные способы разделения и очистки твердых смесей, выбор метода определяется свойствами веществ, подвергаемых разделению очистке или с характером примесей, степенью требуемой чистоты и т.п. Кристаллизация (перекристаллизация) — важный способ очистки твердых органических веществ. Наряду с кристаллизацией из расплава (зонная плавка) и парообразного состояния (возгонка) распространенной экспериментальной операцией является кристаллизация из раствора.

1.3.1 Кристаллизация из раствора. Метод основан на том, что большинство веществ растворяется при нагревании лучше, чем на холоде, и вещества различаются по растворимости в одном и том же растворителе. При охлаждении горячего насыщенного раствора вещество выделяется в виде кристаллов, содержание примесей в которых меньше, чем в исходном

растворе, таким образом, происходит очистка основного вещества от примеси.

Успех кристаллизации во многом зависит от правильного выбора растворителя. Растворимость вещества в выбранном растворителе при нагревании и на холоде должна существенно различаться. Для выбора растворителя пользуются справочными данными о растворимости очищаемого вещества или проводят подбор опытным путем. В пробирку помещают несколько крупинок вещества и добавляют 2-3 капли растворителя. Если вещество растворяется уже на холоде, то данный растворитель не подходит. В случае, когда растворение на холоде идет плохо, пробирку осторожно нагревают до полного растворения пробы. Если после охлаждения выпадают кристаллы, то растворитель пригоден для кристаллизации. Желательно, чтобы температура кипения растворителя была на 10°C -15°C ниже температуры плавления вещества. В противном случае вещество может выделиться в виде масла (расплава).

Когда не удастся подобрать индивидуальный растворитель, кристаллизацию проводят из смеси растворителей. При этом руководствуются эмпирическим правилом: «подобное растворяется в подобном», иными, словами, полярные вещества хорошо растворяются в полярных растворителях а неполярные - в неполярных. Для составления смеси, как правило, выбирают два растворителя: «хороший» (хорошо растворяющий вещество) и «плохой» (растворяющий плохо). Сначала вещество растворяют в «хорошем» растворе и к горячему раствору по каплям прибавляют «плохой» растворитель до появления исчезающей мути.

Если при охлаждении вещество не выделяется из раствора, то создают искусственные центры кристаллизации, добавляя несколько кристалликов того же вещества (затравку) или потирая стеклянной палочкой о стенки сосуда. При медленном охлаждении образуются хорошо оформленные кристаллы, а при быстром охлаждении и перемешивании -

мелкие. При быстрой кристаллизации может произойти осаждение основного вещества с примесями.

Экспериментально перекристаллизацию осуществляют следующим образом: вещество помещают в круглодонную колбу и добавляют к нему растворитель, в заведомо недостаточном количестве, для полного растворения (так, чтобы он едва покрыл твердое вещество). Смесь нагревают до кипения с обратным холодильником. Затем добавляют по каплям растворитель небольшими порциями (лучше по каплям) до полного растворения твердого вещества. После каждого добавления растворителя дают возможность содержимому в колбе кипеть в течение нескольких минут для растворения твердого вещества. Растворитель добавляют из пипетки через отверстие холодильника, либо вставляют в это отверстие капельную воронку и добавляют через воронку.

Для большинства жидкостей характерна склонность к перегреву, и поэтому они кипят с сильными толчками. Во избежание этого в колбу до начала нагревания вносят «кипелки», способствующие равномерному кипению жидкости. Если нагревание прерывается и содержимое колбы охлаждается, то перед возобновлением нагревания надо внести в колбу новые «кипелки», поскольку поры «кипелок» при охлаждении заполняются жидкостью и их эффективность снижается. Нельзя вносить «кипелки» и другие пористые материалы (активированный уголь, силикагель и т. п.) в горячую жидкость. Это может привести к ее бурному вскипанию и выбросу из колбы. Через холодильник небольшими порциями постепенно добавляют растворитель до полного растворения вещества. Если вещество содержит окрашенные примеси; в колбу для перекристаллизации добавляют немного (на кончике шпателя) активированного угля, кипятят несколько минут и подвергают горячему фильтрованию. Фильтрат охлаждают, выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают небольшим количеством холодного растворителя, из которого проводилась перекристаллизация, и сушат.

Если вещество содержит заведомо хуже растворимую примесь, то не стремятся добиться полного растворения при кипячении и явно растворяющуюся часть отфильтровывают в горячем виде. Вещество выделяют из фильтрата, как и в предыдущем случае.

Чистоту полученного продукта устанавливают по его температуре плавления в сравнении со справочными материалами. Если температура плавления вещества не известна, его перекристаллизовывают до достижения постоянной температуры плавления.

Низкий выход очищаемого вещества указывает на то, что используемый растворитель не был идеальным или его было взято слишком много. В таких случаях из фильтрата (маточного раствора) можно дополнительно выделить кристаллы после удаления избытка растворителя на ротаторном испарителе охлаждении оставшегося раствора. Как правило, эти последующие порции вещества менее чистые, чем выделенные ранее.

1.3.2 Возгонка. Очень эффективным, но специфическим способом очистки твердых веществ является возгонка (сублимация).

Возгонкой называют процесс испарения твердого вещества последующей конденсацией паров в твердую фазу, минуя жидкую. Возгону подвергаются лишь те вещества, упругость пара которых в твердом состоянии достаточно велика при температуре ниже их температуры плавления. Давление паров увеличивается при нагревании, поэтому скорость возгонки возрастает повышением температуры. Однако повышать температуру можно до определенного предела во избежание разложения вещества. Снизить температуру возгонки можно, проводя процесс в вакууме.

В лабораторной практике используют различные способы возгонки, простейшем случае берут фарфоровую чашку и воронку с диаметром несколько меньшим диаметра чашки. Носик воронки затыкают ватой. Хорошо измельченное и высушенное вещество помещают на дно чашки тонким ровным слоем. Для предотвращения падения возогнанного

вещества обратно в чашку, ее накрывают кружком фильтровальной бумаги с отверстиями. Чашу медленно нагревают на песчаной бане. Для лучшей конденсации паров вещества на внешнюю поверхность воронки кладут мокрый лист фильтровальной бумаги или оборачивают ее мокрой ватой.

Для конденсации паров можно использовать круглодонную колбу, через которую с помощью двух трубок пропускают ток холодной воды. Для проведения возгонки в вакууме используют прибор на шлифах снабженный пальчиковым холодильником.

Преимущество возгонки заключается в снижении потерь очищаемого вещества. Так, потери при перекристаллизации не только неизбежны, обычно во много раз превышают то количество примесей, которое должно быть удалено. Напротив, при возгонке нередки случаи, когда выход чистого продукта достигает 98% - 99 %. Поэтому применение возгонки особенно желательно при работе с малыми количествами веществ

1.4 Разделение жидких смесей и очистка жидких органических веществ

Одним из важнейших методов очистки и выделения жидких органических веществ является перегонка.

1.4.1 Перегонкой называют процесс, отделения жидких веществ от нелетучих примесей или отделения друг от друга летучих веществ с различной температурой кипения. Это достигается путем нагревания жидкостей до кипения, а затем образовавшийся пар отводят и конденсируют охлаждением.

С помощью перегонки осуществляют очистку и разделение летучих веществ. Перегонка применима лишь тогда, когда перегоняемое вещество устойчиво при температуре кипения. При этом жидкость нагревают до температуры кипения и пары ее конденсируются в виде дистиллята в холодильнике.

Перегонку применяют для удаления растворителя, для разделения нескольких веществ, для очистки от примесей и т.д. Различают три основных способа перегонки:

- 1) простая перегонка при обычном давлении;
- 2) при пониженном давлении (перегонка в вакууме);
- 3) перегонка с водяным паром.

1.4.1.1 Простая перегонка. Она эффективна в тех случаях, когда температуры кипения входящих в состав смеси веществ существенно различаются (не менее 80°C - 100°C) или когда основное вещество нужно отделить от нелетучих примесей. Типичный прибор для простой перегонки при атмосферном давлении (рисунок 1) состоит из круглодонной длинногорлой колбы (1) с отводом, колба Вюрца или круглодонная колба, соединенная с переходником Вюрца, прямого холодильника(3), аллонжа(4) и колбы-приемника(5).

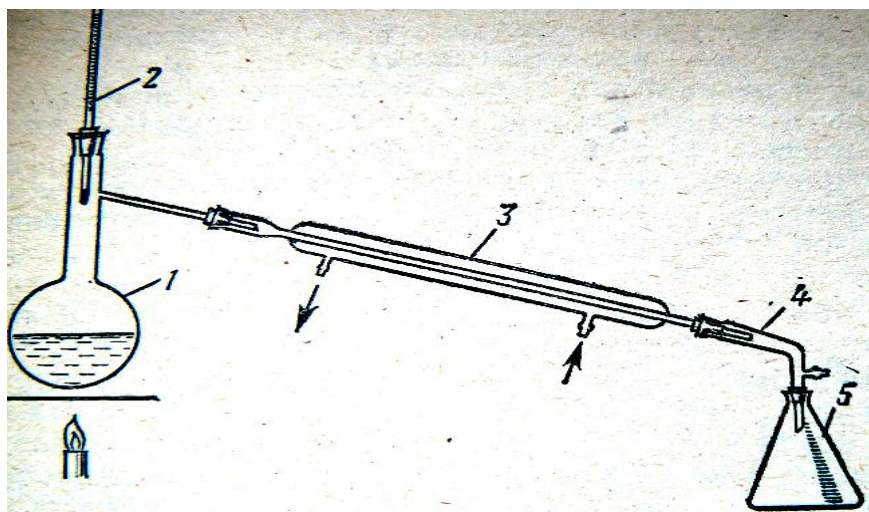


Рисунок 1- Прибор для простой перегонки

Аллонж представляет собой изогнутую, суженную с одного конца трубку, которую надевают на нижний конец холодильника. С помощью аллонжа конденсат направляют в приемник, в качестве которого обычно используют плоскодонную колбу. В горло колбы Вюрца вставляют термометр(2) для определения температуры паров перегоняемого вещества.

Ртутный шар для термометра должен находиться на 0,5 см ниже отверстия отводной трубы колбы. Перегонку нельзя проводить досуха. В колбе всегда должно оставаться небольшое количество жидкости.

В течение всей перегонки вещества температура паров должна оставаться постоянной. Если в ходе перегонки температура поднимается, значит, перегоняется смесь веществ. В начальный момент перегонки температура обычно бывает ниже ожидаемой. Это может быть связано либо с инерцией ртутного термометра, либо с тем, что в первый момент перегоняются более летучие примеси. Поэтому первые порции дистиллята (до достижения постоянной температуры перегонки) собирают отдельно. После того как температура установилась, собирают основную фракцию вещества. Как только температура вновь начинает возрастать, приемник меняют для сбора другой фракции.

Температура кипения вещества зависит от давления. Указанные в справочниках значения температур кипения приведены к нормальному атмосферному давлению. Если перегонку ведут при давлении, отличном от 760 мм.рт. ст., то температура кипения перегоняемого вещества будет отличаться от справочной. В связи с этим нужно всегда фиксировать величину атмосферного давления, при котором производят перегонку.

Методом простой перегонки часто приходится очищать растворители после проведения экстракции, представляющие водно-органические смеси. Если различие в температурах кипения компонентов смеси велико (80°C и более), то в паровой фазе будет содержаться почти исключительно низкокипящий компонент, и такую смесь можно разделить простой перегонкой. Основу органической фазы, как правило, составляет растворитель, который содержит примеси экстрагента и экстрагируемого вещества. Метод можно применять, если примеси нелетучи или имеют температуру кипения, жидкости отличающуюся от температуры кипения самого растворителя.

1.4.1.2 Фракционная перегонка. Фракционную перегонку проводят в приборе, похожем на прибор для простой перегонки, но снабженном дефлегматором. Жидкость, подлежащую перегонке, вносят в колбу Вюрца через воронку носик которой должен быть ниже отвода колбы (или переходника) Вюрца. Прибор для перегонки обязательно должен иметь сообщение атмосферой. Часто используют аллонж, который соединяется с хлоркальциевой трубкой. Хлоркальциевые трубки предотвращают попадание паров влаги во внутреннее пространство прибора или сосуда, обеспечивая при этом сообщение с атмосферой. Хлоркальциевая трубка имеет шарообразное утолщение, в которое между двумя ватными тампонами помещают кусочки безводного хлорида кальция, натронной извести или другого подходящего осушителя.

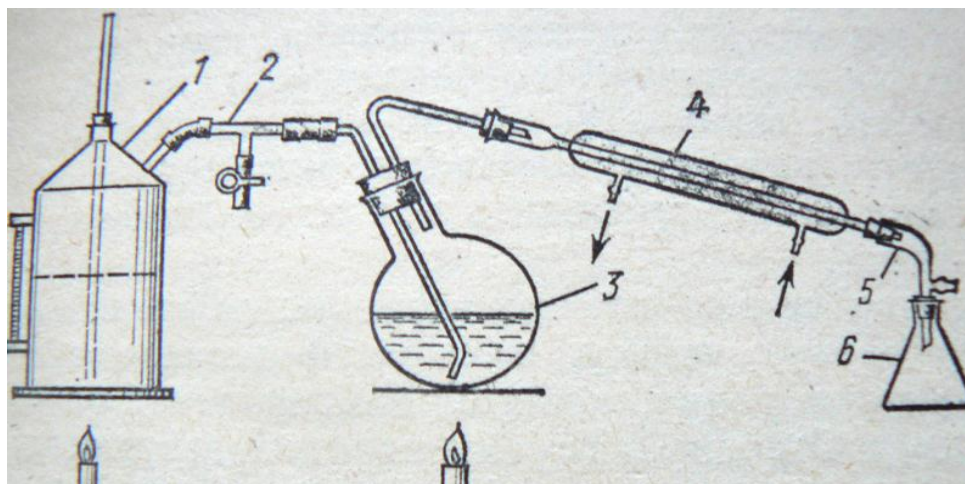


Рисунок 2 - Прибор для перегонки паром (фракционной перегонки)

При нагревании смеси двух жидкостей восстанавливается равновесие между жидкой и паровой фазами. В паровой фазе при любой температуре содержится больше низкокипящего компонента, чем в жидкой. Получаемый конденсат паров собирают в виде нескольких фракций. Температурный интервал сбора каждой фракции и число фракций подбирают эмпирически, при этом перегонную колбу заполняют не более чем на две трети объема. В результате нескольких циклов перегонки удастся разделить смесь на индивидуальные компоненты. Для повышения

эффективности разделения смеси и, следовательно повторных перегонки используют дефлегматоры.

1.4.1.3 Перегонка в вакууме. Этот вид перегонки применяется тогда, когда температура кипения соединения при атмосферном давлении слишком высока (выше 200°C) или оно разлагается при температуре кипения. При этом используется свойство всех веществ снижать температуру кипения с уменьшением давления. Для приблизительной оценки температуры кипения вещества в вакууме руководствуются следующим эмпирическим правилом: при уменьшении внешнего давления вдвое температура кипения вещества фракционной перегонки понижается на 15°C - 20 °C.

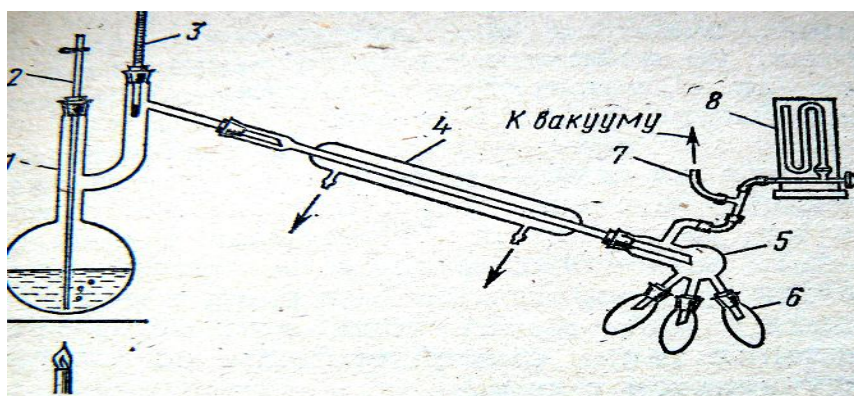


Рисунок 3 - Прибор для перегонки в вакууме

Прибор для перегонки в вакууме (рисунок 3) отличается от прибора для полного разделения смеси на индивидуальные компоненты при атмосферном давлении тем, что в качестве перегонной колбы используется колба с насадкой Кляйзена, снабженная капилляром с очень маленьким внутренним диаметром. Через этот капилляр в вакуумированную изолирующей рубашкой насадкой поступает воздух, и таким образом капилляр выполняет ту же роль, что и «кипелки» при простой перегонке.

Для перегонки в глубоком вакууме и при высоких температурах предпочтительно использовать цельнопаянные перегонные колбы —

обычную колбу Кляйзена, колбу Кляйзена с дефлегматором, колбу Фаворского (рисунок 4).

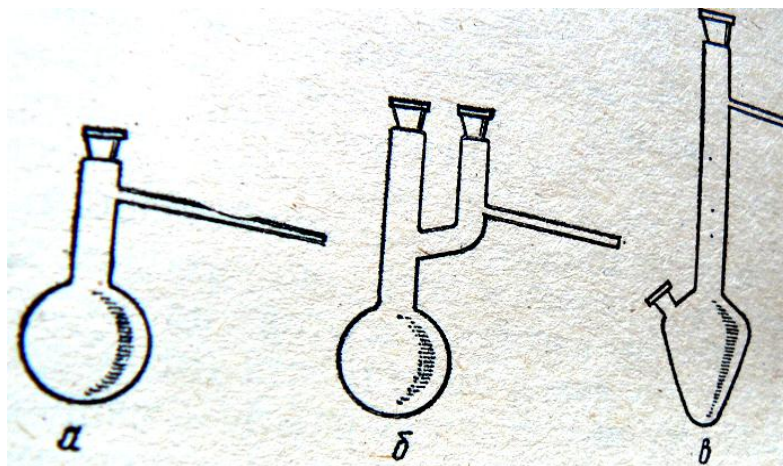


Рисунок 4 - Цельнопаянные перегонные колбы: а - колба Кляйзена, б - колба Кляйзена с дефлегматором, в- колба Фаворского

Отбор фракций при фракционной вакуумной перегонке производят помощью специальных аллонжей различных конструкций, называемы «пауками». Паук позволяет менять приемник, не отключая систему от вакуума.

2 Приготовление клеточного экстракта

2.1 Клеточный экстракт

Экстракт (клеточный экстракт, бесклеточная система)-это разрушенные механическим или химическим (осмотический шок) способом клетки, использующиеся для воспроизведения биохимических процессов «впробирке». Для получения экстрактов используются клетки определённого типа, чаще всего, клетки проростков пшеницы или ретикулоцитов кролика.

Проведение экспериментов в клеточных экстрактах позволят контролировать влияние отдельных компонентов на протекание таких сложных процессов как репликация ДНК и транскрипция. При последующем фракционировании экстрактов могут выделяться большие количества отдельных белков, например, факторов инициации трансляции.

Впервые клеточный экстракт был получен в конце XIX века. В 1897 году немецкие химики братья Ганси Эдуард Бюхнер показали, что бесклеточный экстракт дрожжей катализирует ферментацию [1].

2.2 Методика приготовления клеточных экстрактов

Цель работы: изучить методику приготовления клеточных экстрактов

Реактивы и оборудование: лизисный буфер (10 мМ Tris-HCl (pH 8,0)), 1 М NaCl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,5%-ный тритон X-100, 0,3 мМ PMSF, шприцы с разным диаметром отверстия игл (0,8, 0,7, 0,6, и 0,4 мм), лед, центрифуга, мешки с размером пор, соответствующим 1,5 кДа (Sigma), глицерин 9%.

Методика выполнения работы:

Все операции проводятся на льду. Для лизирования размороженные во льду клетки смешивают с лизисным буфером (10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 М NaCl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,5%-ный тритон X-100, 0,3 мМ PMSF) в объемном соотношении 1:5.

Смесь подвергают гомогенизации, последовательно пропуская через шприцы с разным диаметром отверстия игл (0,8, 0,7, 0,6, и 0,4 мм). Через каждую иглу смесь пропускают два раза. Полученные гомогенаты центрифугируют в течение 20 мин. при 14000Чг при температуре 4°C.

Супернатант диализируют в мешках с размером пор, соответствующим 1,5 кДа (Sigma) против 2 смен по 1 л 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) при 15°C в два этапа: первый - в течение 2 ч., второй в течение ночи. К экстрактам добавляют ДТТ до концентрации 1 мМ и глицерин до 9%, расфасовывают порциями по 1 мл и хранят при -70°C.

Вопросы к лабораторной работе

1. Что такое клеточный экстракт.
2. Какие реактивы и оборудование необходимы для его приготовления.
3. Где используется клеточный экстракт.
4. Расскажите методику приготовления клеточного экстракта.
5. Приготовьте клеточный экстракт лука.

2.3 Частичная очистка ФМСФ-КП из печени крыс фракционированием сульфатом аммония

Оборудование и реактивы: пробирки, автоматическая пипетка, гомогенизатор, стеклянные стаканы на 50 и 100 мл, набор для определения фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП): откалиброванная по спирту пипетка на 10 мкл, пипетка на 2 мл, стеклянная воронка, цилиндр на 250 мл с притертой пробкой,

гомогенизатор, 50 мМ натрий-ацетатный буфер с 50 мМ NaCl (pH 5,6), спиртовой раствор ФМСФ, раствор дансил-фен-лей-арг (DNS-FLR), 1 н HCl, хлороформ, кристаллический сульфат аммония, набор растворов для определения белка по Лоури, печень животного.

4 г печени животного гомогенизируют на льду в 20 мл буфера. Гомогенат центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для удаления пленок. В пробирку отбирают 200 мкл центрифугированного гомогената и добавляют 3,8 мл буфера. Перешивают и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка в гомогенате. Все дальнейшие операции производят на льду. Измеряют объем оставшегося центрифугированного гомогената. Добавляют кристаллический сульфат аммония до достижения 10 % концентрации и тщательно перемешивают. Выпавший осадок отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течении 10 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают и измеряют объем. К осадку добавляют исходный буфер до полного растворения, затем разводят этим же буфером в 10 раз и помещают на лед, в дальнейшем используя для определения активности и количества белка.

К надосадочной жидкости добавляют кристаллический сульфат аммония до достижения 20 % концентрации, центрифугируют, отделяют осадок, растворяют его в буфере, разводят в два раза буфером и помещают на лед. Повторяют операцию по высаливанию, добавляя сульфат аммония к надосадочной жидкости до достижения 60 % концентрации. Осадок, отделенный центрифугированием ресуспендируют в исходном буфере и разбавляют в десять раз. Во всех фракциях, гомогенате и конечном супернатанте определяют активность по следующей схеме.

Таблица 1

Опыт (–)	Контроль (+)
150 мкл буфера	140 мкл буфера
50 мкл гомогената	50 мкл гомогената
–	10 мкл раствора ФМСФ (добавляют специально откалиброванной стеклянной пипеткой)
Преинкубация 8 минут при 37°C	
50 мкл раствора DNS-FLR	50 мкл раствора DNS-FLR
Инкубация 30 мин при 37°C	
50 мкл 1 н HCl	50 мкл 1 н HCl

После окончания реакции в каждую пробирку добавляют 1,5 мл хлороформа и интенсивно встряхивают штатив в течение 60 сек. Затем пробы центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин для разделения фаз. Отбирают хлороформную фракцию и измеряют величину флюоресценции на флюориметре ($\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=530$ нм). Количество белка в пробе определяют методом Лоури. Активность ФМСФ-КН рассчитывают как разность флюоресценции проб, не содержащих ФМСФ, и проб, содержащих ФМСФ, и выражают в нМ продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка. Формула для расчета активности:

$$a = \frac{\Delta fl * 1000}{[белок] * 100 * 30 * 0,05}$$

Содержание отчета

1. Определите степень очистки ФМСФ-КП.

Таблица 2

Фракция	Гомогенат	10%	20%	30%	40%	50%	60%
Активность							
Степень очистки	100%						

3 Выделение ДНК

3.1 Изучение субклеточного распределения ДНКазы (фермента-маркера ядерной фракции) в животных тканях

Оборудование и реактивы: центрифуга с охлаждением; ФЭК; гомогенизатор; печень животного; пипетки; ДНК; 0,1 М NaOH; 0,01% раствор крезолового красного; 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 М трис-буфер рН 7,4 (среда А); 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 μ М $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ рН 5,0 (среда Б); набор растворов для определения белка по Лоури.

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по следующей схеме.

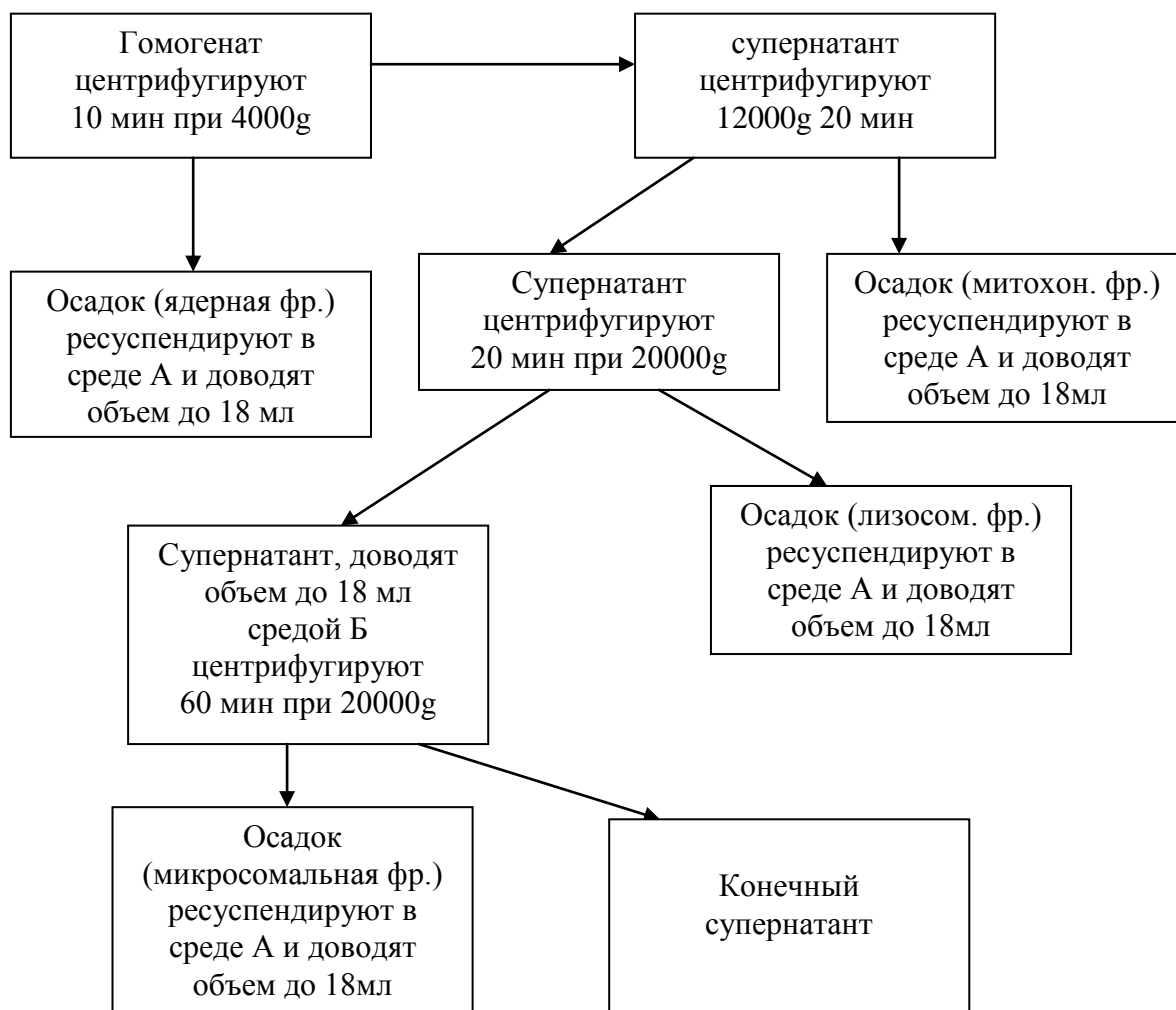


Рисунок 5 – Схема центрифугирования и отбора фракций

Ресуспендирование проводят гомогенизированием полученных осадков в 4-6 мл среды гомогенизации (б), затем полученную суспензию переносят количественно в мерный цилиндр на 20 мл и объем суспензии доводят до 18 мл; таким образом, концентрация субклеточных структур достигает исходной (как в гомогенате) концентрации.

Активность ДНКазы определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по следующей схеме.

Таблица 3

1 мл раствора ДНК (1 мг/мл)
1 мл 0,01% раствора крезолового красного
1 мл буфера А
Преинкубация 8 минут при 37 °С
1 мл нагретого раствора фракции

Смесь быстро переливают в фотометрическую кювету (L=1 см) и измеряют оптическую плотность на ФЭК при 590 нм против буфера А. После измерения смесь немедленно переливают в исходную пробирку и инкубируют 20 мин при 37°С. Измеряют оптическую плотность системы после инкубации. Количество белка определяют по Лоури.

Содержание отчета

1. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы.

Таблица 4

Фракции	Г	Я	ТМ	ЛМ	Р	С
Анализируемые пробы	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.
Оптическая плотность, в каждой параллели и среднее						
$A_{оп} - A_{кн}$						
Активность на 1 мг ткани						
Активность фракции в % от гомогената	100 %					
Количество белка на 1 мг ткани						
Белок в % от белка гомогената	100 %					
Относительная удельная активность фракций						

3.2 Изучение субклеточного распределения кислых протеаз (ферментов-маркеров лизосом) в животных тканях

Оборудование и реактивы: центрифуга; печень животного; пипетки; 0,01 М фосфатный буфер, содержащий 0,32 М сахарозы, pH 7,55; 100 мМ натрий-ацетатный буфер pH 3,3; 8% раствор гемоглобина; 5% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ); тирозин кристаллический; 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 М трис-буфер pH 7,4 (среда А); 0,32 М р-р сахарозы, содержащий 0,01 мМ MgCl₂·6H₂O pH 5,0 (среда Б).

Навеску ткани 2 г переносят в стакан гомогенизатора и добавляют 20 мл среды Б, гомогенизируют. Отбирают 2 мл на определение активности фермента и содержания белка в гомогенате. Центрифугирование и отбор фракций для анализа производят по схеме, приведенной в работе № 11.

Активность кислых протеаз определяют в исходном гомогенате, ядерной, митохондриальной, лизосомальной, микросомальной и растворимой клеточной фракции по следующей схеме.

Таблица 5

Опыт	Контроль
200 мкл фракции	200 мкл фракции
600 мкл NaAc буфера, pH 3,3	800 мкл NaAc буфера, pH 3,3
Преинкубация 8 минут при 37°C	
200 мкл 8% раствора гемоглобина	—
Инкубация 40 минут при 37°C	
1 мл 5 % ТХУ	1 мл 5 % ТХУ

Пробы центрифугируют 30 мин при 4000 об/мин. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и определяют количество образовавшегося

тирозина спектрофотометрически при 280 нм. Количество белка в супернатанте определяют спектрофотометрически при 280 нм. Активность фермента определяют по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика

Готовят рабочий раствор тирозина с концентрацией 100 мкг/мл. Затем производят его разведение в соответствии со схемой.

Таблица 6

№ пробирки	V р-ра тир	V р-ра воды	Конц, мкг/мл	D _{ср}
1	0,5	4,5		
2	1	4		
3	1,5	3,5		
4	2,0	3		
5	2,5	2,5		
6	3,0	2,0		
7	3,5	1,5		
8	4,0	1,0		
9	4,5	0,5		
10	5,0	0,0		

Содержание отчета

1. Расчет полученных данных представляют в виде таблицы.

Таблица 7

Фракции	Г	Я	ТМ	ЛМ	Р	С
Анализируемые пробы	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.	Оп. Кн.
Оптическая плотность, в каждой параллели и среднее						
A _{оп} – A _{кн}						

Продолжение таблицы 7

Количество тирозина по калибровочной кривой						
Активность на 1 мг ткани						
Активность фракции в % от гомогената	100%					
Количество белка на 1 мг ткани						
Белок в % от белка гомогената	100%					
Относительная удельная активность фракций						

Список использованных источников

1 Андреев, Г.И. Основы научной работы и оформление результатов научной деятельности: учебное пособие / Г.И. Андреев, С.А. Смирнов, В.А. Тихомиров. – М.: Финансы и статистика, 2003.

2 Барышева, Е. С. Практические основы биохимии [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Е. С. Барышева, О. В. Баранова, Т. В. Гамбург; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: Kb). - Оренбург: ОГУ, 2011. -AdobeAcrobatReader 5.0 Издание на др. носителе [Текст].- № гос. регистрации 0321103142.

4 Владимирова, Е. Г. Техническая биохимия [Электронный ресурс]: метод. указания к лаб.практикуму / Е. Г. Владимирова, Е. В. Бибарцева, О. П. Кушнарцева; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т", Каф. профилакт. медицины. - Электрон. текстовые дан. (1 файл: Kb). - Оренбург: ОГУ, 2013. -AdobeAcrobatReader 6.016

6 Дудко, А. В. Биохимия [Электронный ресурс]: электронное гиперссылочное учебное пособие / А. В. Дудко, А. Д. Стрекаловская, Е. С. Хайруллина; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: 245 Mb). - Оренбург: ОГУ, 2015. -Архиватор 7-Zip

7 Коваленко, Л.В. Биохимические основы химии биологически активных веществ: [Электронный ресурс]: учебное пособие / Л.В. Коваленко. - 2-е изд. (эл.). - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний,2012. - 229 с. - (Учебник для высшей школы). - ISBN 978-5-9963-1100-2.

8 Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебное пособие / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. - Электрон.

текстовые дан. - Логос, 2010.

10 Рогожин, В. В. Практикум по биологической химии: учеб. -метод. пособие / В. В. Рогожин. - СПб.: Лань, 2006. - 256 с.

11 Соколова, О. Я. Биохимические основы биологических процессов [Электронный ресурс]: лабораторный практикум: учебное пособие для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по направлению подготовки 020400.62 Биология, профиль подготовки "Биохимия" / О. Я. Соколова, Е. В. Бибарцева, О. А. Науменко; М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Оренбург. гос. ун-т". - Электрон. текстовые дан. (1 файл: 11315 Kb). - Оренбург: ОГУ, 2014. - AdobeAcrobatReader 6.0 -ISBN 978-5-7410-1267-3.

12 Сайт кафедры микробиологии и вирусологии Сибирской государственной медицинской академии. Режим доступа: <http://www.ssmu.ru>

13 Национальный центр биотехнологической информации. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

14 Издательство Springer. Режим доступа: <http://www.springerlink.com>

25 Биохимия: учеб.для студентов мед. вузов / под ред. Е. С. Северина.- 5-е изд. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 766 с.