

Т. А. Кукулянская
Н. М. Орел



БИОХИМИЯ

СПРАВОЧНИК СТУДЕНТА



УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ
ПОСОБИЕ

Т. А. Кукулянская
Н. М. Орел

БИОХИМИЯ

СПРАВОЧНИК СТУДЕНТА

Учебно-методическое пособие для студентов
биологического факультета, обучающихся
по специальности 1-31 01 01 «Биология»
специализации 1-31 01 01-02 05 «Биохимия»

МИНСК
БГУ
2011

УДК 577.1(035)(075.8)
ББК 28.072я2я73
Б63

С о с т а в и т е л и:
Т. А. Кукулянская, Н. М. Орел

Рекомендовано ученым советом
биологического факультета
29 сентября 2009 г., протокол № 2

Р е ц е н з е н т ы:
кандидат биологических наук, доцент *С. Б. Бокуть*;
кандидат биологических наук, доцент *Е. А. Храмова*

Биохимия : справочник студента : учеб.-метод. пособие для студен-
Б63 тов биол. фак., обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология»
специализации 1-31 01 01-02 05 «Биохимия» / сост. : Т. А. Кукулянская,
Н. М. Орел. – Минск : БГУ, 2011. – 83 с.
ISBN 978-985-518-396-0.

В справочнике по биохимии приводятся данные об основных свойствах химических веществ, правилах приготовления растворов и реактивов. Кратко изложены методические указания для проведения количественного и качественного исследования биополимеров, основные правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.

Предназначено для студентов биологического факультета. Будет полезно для магистрантов, аспирантов, специализирующихся по биохимии и смежным дисциплинам молекулярно-биологического направления.

УДК 577.1(035)(075.8)
ББК 28.072я2я73

ISBN 978-985-518-396-0

© БГУ, 2011

ПРЕДИСЛОВИЕ

Экспериментальные приемы, используемые в биохимии, очень разнообразны. При проведении исследований в рамках лабораторных практикумов, выполнении курсовых и дипломных работ, магистерских диссертаций широко используются методы количественной регистрации показателей, описываемые в соответствующих пособиях и руководствах. Как правило, для постановки эксперимента недостаточно записи конкретной методики, и на практике приходится привлекать большое количество дополнительной справочной литературы. Для облегчения подготовки и проведения эксперимента предлагается настоящее пособие.

Справочник по биохимии представляет собой информационное учебно-практическое издание, предназначенное для широкого круга студентов, магистрантов, аспирантов, специализирующихся по биохимии и смежным дисциплинам молекулярно-биологического профиля. Он содержит основные общепринятые биохимические сокращения, единицы Международной системы единиц (СИ), правила приготовления растворов, прописи буферных смесей, плотности и концентрации кислот. В нем приведена информация о физико-химических свойствах аминов, аминокислот, пептидов, углеводов, наиболее распространенных жирных кислот, витаминов и их активных форм, нуклеотидов и др. Охарактеризованы некоторые реагенты, применяемые в биохимических экспериментах. В справочник включены основные биохимические показатели нормы у человека и у крысы, наиболее часто используемые методы количественного определения, высаливания, осаждения и очистки белков, электрофоретические методы анализа белков и нуклеиновых кислот, классификация ферментов и единицы ферментативной активности, другая полезная информация. Особое внимание обращается на соблюдение требований безопасного выполнения работ, для этого приводится инструкция по охране труда при работе с химическими веществами в лабораториях биологического факультета.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЕ

абс. – абсолютный	комн. т. – комнатная температура
аморф. – аморфный	конк. – конкурентный
атм. – атмосфера (ед. измерения)	конц. – концентрированный
ац. – ацетон	крист. – кристаллы, кристаллический, кристаллизация
безвод. – безводный	лед. – ледяной
бел. – белый	медл. – медленно
бесцв. – бесцветный	м/м – масса на массу
в-во – вещество	м/об – масса на объем
водн. – водный	м. р. – малорастворимый
возд. – воздух	минер. – минеральный
восплам. – воспламеняющийся	тах – максимум
вязк. – вязкий	min – минимум
газ. – газовый	нейтр. – нейтральный
гигр. – гигроскопичный	неорг. – неорганический
гидрол. – гидролиз	неуст. – неустойчивый
гор. – горячий	н. р. – нерастворимый
давл. – давление	о. – очень
ДМСО – диметилсульфоксид	о. п. р. – очень плохо растворимый
ДМФА – диметилформамид	об. – объем
ДСН – додецилсульфат натрия	об/об – объем на объем
ед. – единица	окисл. – окислять(ся), окисление
жидк. – жидкость	опр. – определение
ИК – инфракрасный	опт. – оптимум
инерт. – инертный	орг. – органический
исп. – испарять(ся), испарение	ос. – осадок
кисл. – кислый, кислота	отн. – относительно
кол-во – количество	

перекр. – перекристаллизовывать
петр. эф. – петролейный эфир
пир. – пиридин
плотн. – плотность
погл. – поглощение
р. – растворимый
разб. – разбавленный
разл. – разлагаться, с разложением
(после $t_{пл}$ или $t_{кип}$)
раств. – раствор, растворимый
раств-ль – растворитель
раст-сть – растворимость
р-ция – реакция
смеш. – смешивающийся
т. – точка
тв. – твердый
темп. – температура
тепл. – теплота
тол. – толуол
ТСХ – тонкослойная хроматография

ТХУ – трихлоруксусная кислота
укс. – уксусная
ум. – уменьшать(ся)
усл. – условия
уст. – устойчивый
УФ – ультрафиолет
ФАД – флавинадениндинуклеотид
флуор. – флуоресценция (А – максимум
возбуждения, F – максимум
флуоресценции)
ФМН – флавиномононуклеотид
хол. – холодный, на холоде
х. р. – хорошо растворимый
х. ч. – химически чистый
чувств. – чувствительность
щел. – щелочной
экв. – эквивалентный
экстр. – экстрагированный
эф. – диэтиловый эфир
 ∞ – неограниченно смешивающийся

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЕ

КоQ₁₀ – коэнзим Q₁₀ (убихинон)
 ϵ_{max} – коэффициент молярной экстинкции в максимуме поглощения
 ϵ_{min} – коэффициент молярной экстинкции в минимуме поглощения
 ϵ_{λ} – коэффициент молярной экстинкции при длине волны λ
C – молярная концентрация
 E_o – стандартный окислительно-восстановительный потенциал, В
 E_a – энергия активации, ккал/моль
 ΔF – изменение свободной энергии, ккал/моль
 ΔG – изменение свободной энергии при температуре 25 °С и рН 7, ккал/моль
I – ингибитор, ингибирование
 M_r – относительная молекулярная масса
S – константа седиментации в воде при температуре 20 °С
 $T_{пл}$ – температура плавления, К
 $T_{кип}$ – температура кипения, К
 $T_{разл}$ – температура разложения, К

$t_{\text{зам}}$ – температура замерзания, °С
 $t_{\text{кип}}$ – температура кипения, °С
 $t_{\text{пл}}$ – температура плавления, °С
 $t_{\text{разл}}$ – температура разложения, °С
 V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции (в условиях насыщения фермента субстратом)

ОСНОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ, ПРОИЗВОДНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ И КОНСТАНТЫ

Основные единицы СИ

Величина	Единица СИ	Сокращение	Примечание
Длина	метр	м	$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м} = 0,1 \text{ нм}$
Масса	килограмм	кг	
Время	секунда	с	
Сила тока	ампер	А	
Температура	кельвин	К	$^{\circ}\text{C} = \text{K} - 273,2$
Сила света	кандела	кд	
Количество вещества	моль	моль	

Производные величины

Величина	Единица	Сокращение	Размерность	Примечание
Частота	герц	Гц	с^{-1}	
Объем	литр	л	10^{-3} м^3	
Сила	ньютон	Н	$\text{кг} \cdot \text{м} \cdot \text{с}^{-2}$	
Давление	паскаль	Па	$\text{Н}/\text{м}^2$	$1 \text{ бар} = 10^5 \text{ Па}$ $1 \text{ мм рт. ст.} = 33,3 \text{ Па}$
Энергия, работа, количество тепла	джоуль	Дж	$\text{Н} \cdot \text{м}$	$1 \text{ калория} = 4,1868 \text{ Дж}$
Мощность	ватт	Вт	$\text{Дж}/\text{с}$	
Количество электричества	кулон	Кл	$\text{А} \cdot \text{с}$	
Напряжение	вольт	В	$\text{Вт}/\text{А}$	

Величина	Единица	Сокращение	Размерность	Примечание
Концентрация	молярность	М	моль/л	
Молекулярная масса	дальтон	Да	$1,6605 \cdot 10^{-24}$ г	
Молярная масса	грамм	г	–	
Относительная молекулярная масса	–	M_r	–	безразмерна
Скорость реакции	моль/с	моль/с		
Каталитическая активность	катал	кат	моль/с	$1 \text{ E} = 1,67 \cdot 10^{-8}$ кат
Удельная активность	–	–	кат/(кг фермента)	Е/(мг фермента)
Коэффициент седиментации	сведберг	S	10^{-13} С	
Радиоактивность	беккерель	Бк	расп/с	$1 \text{ кюри (Ки)} = 3,7 \cdot 10^{10}$ Бк

**Множители и приставки
для кратных и дольных единиц**

Множитель	Приставка	Сокращение	Пример
10^9	гига	Г	ГГц = 10^9 Гц
10^6	мега	М	МПа = 10^6 Па
10^3	кило	к	кДж = 10^3 Дж
10^{-3}	милли	м	мМ = 10^{-3} моль/л
10^{-6}	микро	мк	мкВ = 10^{-6} В
10^{-9}	нано	н	нкат = 10^{-9} кат
10^{-12}	пико	п	пм = 10^{-12} М

Базовые константы

Газовая постоянная R	$R = 8,314 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$
Число Авогадро N	$N = 6,0225 \cdot 10^{23}$
Константа Фарадея F	$F = 96\,480 \text{ Кл/моль}$

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И РЕАКТИВОВ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Растворы – это однородные (гомогенные) системы, состоящие из двух и более компонентов (составных частей) и продуктов их взаимодействия.

По точности выражения содержания вещества растворы делят на неточные (приблизительные) и точные.

Неточные растворы. Численным выражением состава приблизительных растворов в соответствии с Международной системой единиц (СИ) является *массовая доля растворенного вещества* – безразмерная физическая величина, равная отношению массы растворенного вещества к общей массе раствора. На практике также применяют численное выражение состава раствора в виде массово-объемных отношений его компонентов.

Для получения более полного представления о приготовлении приблизительных растворов обратимся к рассмотрению наиболее часто используемых их аналогов, объединяемых термином «процентное содержание».

Под *процентным содержанием* принято понимать определенную массу или объем вещества (г или мл соответственно), содержащихся в 100 г или в 100 мл раствора. Это общее определение понятия процентного содержания включает несколько разновидностей. В зависимости от единиц (объема или массы), используемых для обозначения, различают массовое (весовое), массо-объемное (весо-объемное), объемное, объемно-массовое (объемно-весовое) процентные содержания.

Массовое (весовое) процентное содержание (%) показывает сколько граммов вещества содержится в 100 г раствора и вычисляется по формуле:

$$\% = a/(a + б),$$

где a – массовая доля растворенного вещества; $б$ – количество растворителя в граммах (в сумме составляют 100 г).

Например, 20%-ным раствором NaCl называют такой раствор, в 100 г которого содержится 20 г NaCl и 80 г воды. Для получения раствора этого вида процентного содержания навеску вещества вносят в химический стакан, в который затем вливают 80 мл воды (при комнатной температуре масса 1 мл воды составляет примерно 1 г).

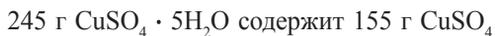
Массо-объемное (весо-объемное) процентное содержание ($\text{г}^\circ\%$) представляет собой отношение массовой доли растворенного вещества в граммах к 100 мл раствора. Размерность этого вида процентного содержания – г/мл (м/об). Например, 20 $\text{г}^\circ\%$ -ный раствор NaCl содержит 20 г соли в 100 мл раствора. Для его получения навеску соли (20 г) вносят в мерный цилиндр или мензурку и доливают водой до метки. В случае водных растворов численно одинаковые массовые и массо-объемные процентные растворы по массовой доле вещества в единице объема различаются не очень сильно, ими можно пренебречь. Однако при использовании неводных растворов различия по массовой доле вещества в единице объема могут быть весьма значительными. Так, в 10 $\text{г}^\circ\%$ -ном растворе жира в тетрахлорметане (жидкости плотностью 1,6 кг/л) на 10 г жира приходится около 90 мл растворителя, тогда как в 10%-ном растворе значительно меньше – 56 мл.

Объемное процентное содержание (об%, или $^\circ$ – градус) есть отношение объемной доли (мл) вещества к 100 мл раствора. Размерность объемного процентного содержания – мл/мл (об/об). Например, 20 об%-ный (20 $^\circ$) раствор этилового спирта содержит 20 мл абсолютного (безводного) спирта и 80 мл воды. Следует иметь в виду, что при смешивании разных жидкостей, бесконечно растворяющихся друг в друге (как, например, в случае спирта и воды), в силу явления контракции (т. е. взаимного проникновения молекул одного вещества через промежутки между молекулами другого) конечный объем раствора может составлять менее 100 мл.

Объемно-массовое (объемно-весовое) процентное содержание отражает объемную долю (мл) вещества, содержащуюся в 100 г раствора. В лабораторной практике используется редко.

Приготовление процентных растворов из *кристаллогидратов*:

1-й способ (точный). Предварительно рассчитывают массовое (весовое) количество кристаллогидрата, в котором содержится заданное количество вещества. Пусть, например, требуется приготовить 5%-ный раствор CuSO_4 из кристаллогидрата ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) этого вещества. Для расчета необходимо его навеску исходят из того, что на одну молекулу CuSO_4 приходится пять молекул воды – относительная молекулярная масса (M_r) $\text{H}_2\text{O} = 18$, а M_r $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ составляет 245 (155 приходится на чистую соль и $90 (18 \cdot 5)$ – на воду). Путем решения пропорции:



находят требуемую навеску кристаллогидрата (x):

$$x = 5 \cdot 245/155 = 7,9 \text{ г.}$$

На этикетке бутылки, в которой хранится такой раствор, должно быть написано: «5%-ный (или 5 г%-ный) раствор CuSO_4 ». Это значит, что в 100 г (или 100 мл) раствора содержится 5 г CuSO_4 , а не его кристаллогидрата.

2-й способ (условный). Часто, готовя процентные растворы, ведут расчет исходя из массы кристаллогидрата. Например, для приготовления 5%-ного раствора отвешивают 5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и приливают к этому количеству воду до объема 100 мл. По существу, такой раствор не является 5%-ным. На этикетке сосуда, в котором он хранится, должна быть надпись:

5%-ный (или 5 г%) раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Следует иметь в виду, что неправильное хранение кристаллогидратов (в частности, из-за плохой герметичности посуды) может приводить к постепенному выходу кристаллизационной воды из кристаллической решетки (выветривание). При этом часть вещества, особенно на поверхности кристаллов, переходит в аморфное состояние. Такой реактив не пригоден для приготовления растворов ни первым, ни вторым способом. В данном случае требуется предварительно перекристаллизовать его (т. е. восстановить кристаллическую структуру реагента) или, если это позволяют химические свойства вещества, прокалить, переведя его таким образом в аморфное состояние.

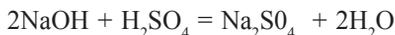
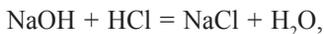
Поскольку в соответствии с требованиями СИ в качестве единицы массы и объема раствора используют «кг» и «л», то для приготовления таких растворов сразу производят расчет массовой или объемной доли растворенного вещества на кг или л раствора (размерность таких растворов будет г(кг)/кг, г(кг)/л или мл(л)/л соответственно) или значения отдельных видов процентного содержания умножают на 10, при этом массовое (весовое) и объемное процентное содержание преобразуются в массовое и объемное отношение с размерностью г(кг)/кг и мл(л)/л соответственно, а массо-объемное (весо-объемное) процентное содержание – в массовое содержание с размерностью г(кг)/л.

Для приготовления неточных растворов используются аптекарские, технические (техно-химические) весы и мерная посуда (цилиндры, мензурки).

В случае если возникает потребность в получении приблизительных растворов путем разбавления более концентрированных, можно воспользоваться простым и быстрым способом, определяемым *правилом «креста»*.

Пусть необходимо разбавить 20%-ный (200 г/л) раствор NaCl до 5%-ного (50 г/л). Составляют первую запись:

20
 ↘
 5
 ↗
0



следующие объемы растворов кислот: 1 л 1 моль/л раствора HCl или 0,5 л 1 моль/л раствора H₂SO₄. Очевидно, на нейтрализацию 0,5 л 2 моль/л раствора NaOH потребуется 0,5 л 2 моль/л раствора HCl, или 0,5 л 1 моль/л раствора H₂SO₄, или 0,25 л 2 моль/л раствора H₂SO₄ и т. д.

Для получения растворов точной концентрации применяют исходные вещества (т. е. реактивы квалификации «х. ч.», строго отвечающие своей химической формуле), фиксаналы, точную мерную посуду и весы для очень точного взвешивания (аналитические, полумикрохимические, микрохимические). Поскольку не всегда удастся получить точный раствор нужной концентрации путем растворения приготовленной навески вещества или содержимого некоторых фиксаналов, его приходится проверять путем титрования, находить коэффициент поправки и при необходимости исправлять.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

1. Ацетилхолина, 2%-ный нейтральный раствор. Готовят 2%-ный раствор ацетилхолинхлорида или бромида и нейтрализуют его 0,005 н раствором NaOH до pH 8,1.

2. Бензидин, 0,1%-ный раствор. 50 мг солянокислого бензидина растворяют в мерной колбе емкостью 50 мл примерно в 35–40 мл ацетатного буфера при нагревании до 70–80 °С в водяной бане.

После растворения охлаждают до комнатной температуры и доводят объем до метки ацетатным буфером. Раствор фильтруют в темную склянку и хранят не более 7 дней, не охлаждая его ниже 16 °С, так как бензидин может выпасть в виде кристаллов. Если раствор желтеет, то он непригоден.

3. Гипосульфит, 0,005 н раствор. Для приготовления 0,005 н раствора йодноватокислого калия отвешивают 0,3567 г KIO₃ и растворяют в мерной колбе на 2 л бидистиллированной водой, которую приливают до метки. Каждый раствор проверяют по титрованному раствору KIO₃. Проверку титра раствора гипосульфита калия производят, отмеривая в колбочку 2 мл раствора йодноватокислого калия, прибавляя 2 мл 3%-ного раствора тройного хлорцинкйодистого калия, 2 капли раствора крахмала и титруя выделенный йод раствором гипосульфита из микробюретки.

4. Глюкоза, 1 мг/мл стандартный раствор. 50 г глюкозы разводят в мерной колбе до 50 мл 0,25%-ным раствором бензойной кислоты.

5. 2,4-Динитрофенилгидразин, 0,1%-ный раствор. 20 мл концентрированной соляной кислоты доводят дистиллированной водой до 100 мл (приблизительно 2 н HCl). В колбу Эрленмейера отвешивают 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина и добавляют постепенно 100 мл приготовленного 2 н раствора соляной кислоты до полного растворения 2,4-фенилгидразина. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике.

6. Диазореактив. Готовят в день проведения работы из основного раствора сульфаниловой кислоты. 0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 100 мл. Сохраняют в темной склянке. Этот основной раствор сульфаниловой кислоты может сохраняться в течение 2 недель. 1,5 мл основного раствора сульфаниловой кислоты наливают в стоящую во льду мерную колбу на 50 мл, добавляют 1,5 мл 5%-ного раствора азотистокислого натрия. Через 5 мин добавляют при помешивании еще 5 мл 5%-ного раствора азотистокислого натрия. Через 1 мин постепенно добавляют воду (при охлаждении) до метки. Перемешивают и оставляют раствор во льду на 15 мин. Раствор диазореактива может сохраняться во льду в течение суток.

7. КОН, 1 н спиртовой раствор. 1 объем 11 н раствора КОН смешивают с 10 объемами 90%-ного этилового спирта. Готовят в день анализа.

8. Железосинеродистый калий (красная кровяная соль $[K_3Fe(CN)_6]$). Растворяют 1 г феррицианида калия и 1 г NaOH в 50 мл воды.

9. Индигокармина раствор. 1 г индигокармина растирают в фарфоровой ступке, растворяют в 50 мл концентрированной серной кислоты, осторожно доводят водой до 1 л, фильтруют и хранят в темной склянке.

10. Йода 0,1 н основной раствор. 1,27 мл йода и 3,23 мл йодистого калия растворяют в 100 мл воды. Сохраняется в темной склянке в холодильнике в течение 6 месяцев.

11. Йода 0,025 н рабочий раствор. Отмеривают 25 мл основного 0,1 н раствора йода, добавляют 17 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до метки 100 мл. Можно хранить в течение 3 месяцев в холодильнике.

12. Насыщенный раствор NaCl. 30 г хлористого натрия растворяют в 100 мл воды и осаждают 10%-ным раствором NaOH.

13. Пировиноградная кислота, раствор. 50 мг пировиноградной кислоты или 62,5 мг натриевой соли пировиноградной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Раствор содержит 0,5 мг пировиноградной кислоты в 1 мл.

14. Реактив Фоля. К 5–10%-ному раствору уксуснокислого свинца прибавляют 10%-ный раствор NaOH до растворения образовавшегося осадка.

15. Реактив Феллинга. Готовят отдельно два раствора:

- а) 200 г K_2Na -виннокислого и 150 г NaOH разводят в мерной колбе на 1 л;
- б) 40 г медного купороса разводят в мерной колбе на 1 л.

Перед применением смешивают равные объемы этих растворов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МОЮЩИХ СМЕСЕЙ

Смесь Комаровского. К 100 мл 6 н раствора HCl добавляют 100 мл 5–6%-ного раствора H_2O_2 .

Хромовая смесь:

1-й способ: 200 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 1 л HNO_3 конц. (избегать попадания в хромовую смесь этанола и метанола, окисляющих $Cr_2O_7^{2-}$ -ион до Cr^{3+} (раствор окрашивается в зеленый цвет и непригоден для применения)).

2-й способ: 6 г $Na_2Cr_2O_7$ растворяют в 100 мл H_2O + 100 мл H_2SO_4 (1,84). Хромовую смесь, приготовленную на H_2SO_4 , не применяют, если посуда загрязнена солями Ва.

Марганцовокислый К на серной кислоте. К 100 мл 4%-ного раствора $KMnO_4$ непосредственно перед употреблением для мытья добавить (для разогревания и усиления окислительных свойств) 3–5 мл H_2SO_4 конц. (HCl брать нельзя, так как образуется $Cl_2 \uparrow$). *Смесь используют однократно!*

Если после мытья образуется бурый налет на посуде, то его удаляют раствором щавелевой кислоты, 5%-ным раствором $NaHSO_3$ или $FeSO_4$.

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ПЛОТНОСТЬ И КОНЦЕНТРАЦИЯ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ

Относительная плотность и концентрация растворов азотной кислоты

Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г	Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г
1,100	2,985	17,10	1,440	17,06	74,68
1,200	6,159	32,34	1,460	18,53	79,98
1,300	9,795	47,48	1,480	20,21	86,05
1,340	11,49	54,07	1,500	22,39	94,09
1,360	12,42	57,57	1,510	23,50	98,10
1,380	13,42	61,27	1,520	24,04	99,67

**Относительная плотность и концентрация
растворов соляной кислоты**

Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г	Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г
1,100	6,037	20,01	1,160	10,03	31,52
1,110	6,673	21,92	1,170	10,74	33,46
1,120	7,317	23,82	1,180	11,45	35,38
1,130	7,981	25,75	1,190	12,15	37,23
1,140	8,648	27,66	1,200	12,87	39,11
1,150	9,327	29,57			

Относительная плотность и концентрация растворов аммиака

Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г	Относительная плотность	Молярность раствора	Содержание (г) на 100 г
0,960	5,58	9,91	0,910	13,35	24,99
0,950	7,10	12,74	0,900	14,97	28,33
0,940	8,63	15,63	0,890	16,59	31,75
0,930	10,18	18,64	0,882	18,10	34,95
0,920	11,75	21,75			

**Удельные веса и молярные концентрации
концентрированных кислот и аммиака**

Реактив	Относительная плотность	Содержание (г) на 100 г	Молярность раствора
Соляная кислота	1,18	35,4	11,3
Азотная кислота	1,40	65,6	14,5
Серная кислота	1,84	95,3	18,0
Хлорная кислота	1,15	70,0	11,6
Фосфорная кислота	1,69	85,0	14,7
Уксусная кислота	1,05	99,5	17,4
	1,07	80,0	14,3
Раствор аммиака	0,90	15,0	28,3

БУФЕРНЫЕ СМЕСИ

Глицин – HCl буфер (0,05 моль/л); pH 2,2–3,6
(глицин, $M_r = 75,07$)

pH	Глицин 0,2 моль/л, мл	HCl 0,2 н, мл	pH	Глицин 0,2 моль/л, мл	HCl 0,2 н, мл
2,2	50	44,0	3,0	50	11,4
2,4	50	32,4	3,2	50	8,2
2,6	50	24,2	3,4	50	6,4
2,8	50	16,8	3,6	50	5,0

Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

Na-ацетат – лимонная кислота буфер (0,2 моль/л); pH 3,6–5,8
(Na-ацетат · 3H₂O, $M_r = 136,09$)

pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	Лимонная кислота 0,2 н, мл	pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	Лимонная кислота 0,2 н, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Ацетатный буфер (0,2 моль/л); pH 3,6–5,8
(Na-ацетат · 3H₂O, $M_r = 136,09$)

pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH ₃ COOH 0,2 моль/л, мл	pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH ₃ COOH 0,2 моль/л, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Цитратный буфер (0,1 моль/л); pH 3,0–6,2

(лимонная кислота · H₂O, M_r = 210,14; Na₃-цитрат · 2H₂O, M_r = 294,12)

pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH ₃ COOH 0,2 моль/л, мл	pH	Na-ацетат 0,2 моль/л, мл	CH ₃ COOH 0,2 моль/л, мл
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	5,4	5,1	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,7
4,4	9,9	10,1	6,2	1,6	18,4
4,6	8,9	11,1			

Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (Na-фосфатный буфер) (0,1 моль/л); pH 5,8–8,0

(Na₂HPO₄ · 2H₂O, M_r = 178,05; Na₂HPO₄ · 12H₂O, M_r = 358,22;

NaH₂PO₄ · H₂O, M_r = 138,0; NaH₂PO₄ · 2H₂O, M_r = 156,03)

pH	Na ₂ HPO ₄ 0,2 моль/л, мл	NaH ₂ PO ₄ 0,2 моль/л, мл	pH	Na ₂ HPO ₄ 0,2 моль/л, мл	NaH ₂ PO ₄ 0,2 моль/л, мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,5	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

K-фосфатный буфер (0,05 моль/л); pH 5,8–8,0

(KH₂PO₄, M_r = 136,09)

pH	KH ₂ PO ₄ 0,2 моль/л, мл	KOH 0,2 моль/л, мл	pH	KH ₂ PO ₄ 0,2 моль/л, мл	KOH 0,2 моль/л, мл
5,8	5	0,36	7,0	5	2,91
6,0	5	0,56	7,2	5	3,47
6,2	5	0,81	7,4	5	3,91
6,4	5	1,16	7,6	5	4,24

pH	KH_2PO_4 0,2 моль/л, мл	КОН 0,2 моль/л, мл	pH	KH_2PO_4 0,2 моль/л, мл	КОН 0,2 моль/л, мл
6,6	5	1,64	7,8	5	4,45
6,8	5	2,24	8,0	5	4,61

Объем довести дистиллированной водой до 20 мл.

Трис-НСІ буфер (0,05 моль/л); pH · 7,2–9,1
(трис-(оксиметил)-аминометан, $M_r = 121,14$)

pH		Трис 0,2 моль/л, мл	НСІ 0,2 моль/л, мл
при 23 °С	при 37 °С		
9,10	8,95	25,0	5,0
8,92	8,78	25,0	7,5
8,74	8,60	25,0	10,0
8,62	8,48	25,0	12,5
8,50	8,37	25,0	15,0
8,40	8,27	25,0	17,5
8,32	8,18	25,0	20,0
8,23	8,10	25,0	22,5
8,14	8,00	25,0	25,0
8,05	7,90	25,0	27,5
7,96	7,82	25,0	30,0
7,87	7,73	25,0	32,5
7,77	7,63	25,0	35,0
7,66	7,52	25,0	37,5
7,54	7,40	25,0	40,0
7,36	7,22	25,0	42,5
7,20	7,05	25,0	45,0

Объем довести дистиллированной водой до 100 мл.

Боратный буфер (0,2 моль/л); pH 7,4–9,0
($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (бура), $M_r = 381,43$; борная кислота, $M_r = 61,84$)

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 моль/л, мл	Борная кислота 0,2 моль/л, мл
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 моль/л, мл	Борная кислота 0,2 моль/л, мл
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

Боратный буфер (0,05 моль/л); pH 9,3–10,1
($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (бура), $M_r = 381,43$)

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 моль/л, мл	NaOH 0,2 моль/л, мл
9,3	50	0,0
9,4	50	11,0
9,6	50	23,0
9,8	50	34,0
10,0	50	43,0
10,1	50	46,0

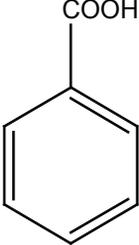
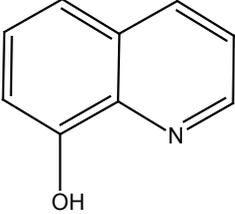
Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

Глициновый буфер (0,05 моль/л); pH 8,6–10,6
(глицин, $M_r = 75,07$)

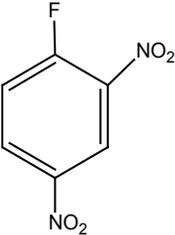
pH	Глицин 0,2 моль/л, мл	NaOH 0,2 моль/л, мл
8,6	50	4,0
8,8	50	6,0
9,0	50	8,8
9,2	50	12,0
9,4	50	16,8
9,6	50	22,4
9,8	50	27,2
10,0	50	32,0
10,4	50	38,6
10,6	50	45,5

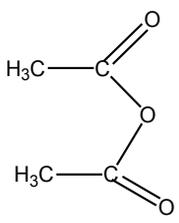
Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

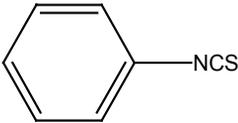
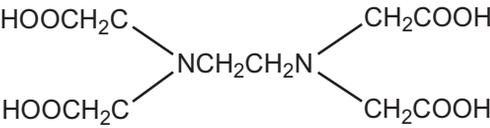
ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ РЕАГЕНТОВ

№ п/п	Название и формула	Свойство
1	Ацетальдегид (этаналь) CH_3CHO	Бесцв. восплам. жидк. M_r 44,1; $t_{\text{пл}}$ $-121,1$; $t_{\text{кип}}$ 21 ; раст-сть: ∞ H_2O , этаноле, эфире
2	Ацетон (3-гидроксипропанон-2) $\text{CH}_3\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$	M_r 88,1; $t_{\text{пл}}$ -72 ; $t_{\text{кип}}$ 148; раст-сть: х. р. H_2O , этаноле; м. р. эфире
3	Бензойная кислота (бензолкарбоновая кислота) 	M_r 122,1; $t_{\text{пл}}$ 122; $t_{\text{кип}}$ 249; раст-сть: $0,18^4$, $0,29^{20}$, $6,8^{95}$ H_2O ; $47,1^{15}$, 66^{78} этанол; 40^{15} эфире; $\epsilon_{230} = 11600$, $\epsilon_{273} = 970$ в H_2O
4	Бычий сывороточный альбумин (БСА)	M_r 67000; pI 4,7; раст-сть: р. H_2O
5	Виннокислый К,Na (сегнетова соль) $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Гидрат: M_r 282,2; $t_{\text{пл}}$ 122; $t_{\text{кип}}$ 249; раст-сть: 26^0 , 66^{26} H_2O ; о. п. р. этаноле
6	8-Гидроксихинолин (8-хинолинол; 8-оксихинолин) 	M_r 145,2; раст-сть: м. р. H_2O ; комплексы с Mg и Ca умеренно р., др. н. р.

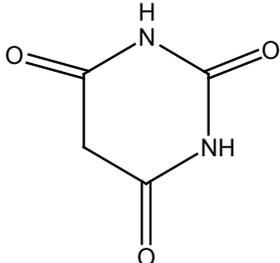
№ п/п	Название и формула	Свойство
7	Глиоксилловая кислота (оксоэтановая кислота) ОНССООН	M_r 74,0; $t_{пл}$ 122; $t_{кип}$ 249; раст-сть: 26 ⁰ , 66 ²⁶ H ₂ O; о. п. р. этаноле
8	Глицеральдегид (2,3-дигидроксипропаналь, глицириновый альдегид) $ \begin{array}{ccc} \text{CHO} & & \text{CHO} \\ \vdots & & \vdots \\ \text{H} \blacktriangleleft \text{C} \blacktriangleright \text{OH} & \text{HO} \blacktriangleleft \text{C} \blacktriangleright \text{H} \\ \vdots & & \vdots \\ \text{CH}_2\text{OH} & & \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{D - форма} & & \text{L - форма} \end{array} $	M_r 90,1; раст-сть: 3 ¹⁸ H ₂ O; о. п. р. этаноле, эфире
9	Глицерин (1,2,3-тригидроксипропан) $ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	M_r 92,1; $t_{зам} \sim 0$; $t_{кип}$ 290 (разл.); раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле; н. р. хлороформе
10	Дитиотрейтол (<i>трео</i> -2,3дигидрокси-1,4-мер- капобутан) $ \begin{array}{ccccccc} & \text{H} & & \text{H} & & & \\ & & & & & & \\ \text{HS}_2\text{C} & - \text{C} & - & \text{C} & - \text{CH}_2\text{SH} \\ & & & & & & \\ & \text{OH} & & \text{OH} & & & \end{array} $	M_r 154,3; pK 8; 9,5; $t_{пл}$ 43; раст-сть: х. р. H ₂ O; м. р. этаноле, эфире
11	Додecilсульфат натрия (ДСН; лаурилсульфат натрия; SDS) [CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₂ OSO ₃]Na	M_r 288,4; раст-сть: р. H ₂ O; этаноле; анионное ПАВ
12	Лимонная кислота $ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{HO} \text{C} - \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array} $	M_r 192,1; раст-сть: 146 ²⁰ , 525 ¹⁰⁰ H ₂ O; 62 ²⁵ этаноле

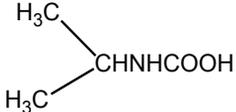
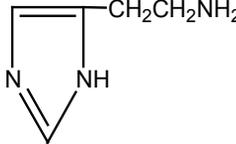
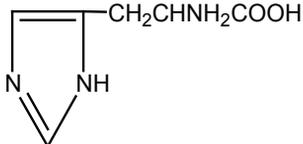
№ п/п	Название и формула	Свойство
13	2,4-Динитрофторбензол (1-фторо-2,4-динитробензол, ДНФБ) 	M_r 186,1; $t_{пл}$ 26; $t_{кип}$ 130; раст-сть: р. бензине, эфире, орг. раств-лях; 0,16 ¹⁵ H ₂ O; ДНФ-соединения: $\lambda_{max} \sim 365$ нм, разл. на свету
14	Метанол (метильный спирт; древесный спирт, карбинол) CH ₃ OH	M_r 32,0; $t_{кип}$ 64,7; раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле, эфире, орг. раств-лях; восплам. яд
15	2-меркапптоэтанол (моногиоэтиленгликоль) HSCH ₂ CH ₂ OH	M_r 78,1; $t_{кип}$ 157 ⁷⁴⁸ (разл.), 68 ²⁰ ; раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле, ацетоне
16	Молочная кислота (2-гидроксипропионовая кислота) CH ₃ HC(OH)COOH	Гигр. крист. или сироп; M_r 90,1; $t_{пл}$ 28–30; $t_{кип}$ 122,15; раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле, эфире; н. р. хлороформе
17	Муравьиная кислота (метановая кислота) HCOOH	Бесцв. жидк. M_r 46,0; $t_{пл}$ 8,4; $t_{кип}$ 100,8; раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле, эфире
18	Натрия борогидрид (натрия тетрагидроборат) NaBH ₄	M_r 37,8; гигр. крист.; образует дигидрат. $t_{пл}$ 36–37; раст-сть: р. H ₂ O, метаноле; м. р. этаноле, тетрагидрофуране
19	Пероксид водорода H ₂ O ₂	M_r 34,0; $t_{пл}$ –1,7; $t_{кип}$ 152; раст-сть: р. ∞ H ₂ O; р. этаноле, эфире
20	Пировиноградная кислота (2-оксопропионовая кислота) CH ₃ C(O)COOH	Бесцв. жидк. M_r 90,1; $t_{пл}$ 13,6; $t_{кип}$ 165 (разл.); раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле, эфире; уст. при хранении без доступа воздуха; соль Na: M_r 110,0; раст-сть: р. H ₂ O

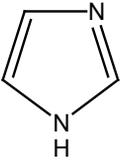
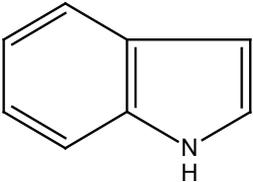
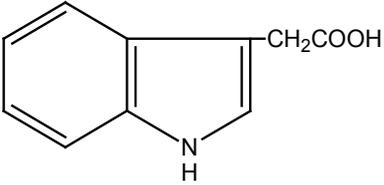
№ п/п	Название и формула	Свойство
21	Полиэтиленгликоль (ПЭГ, α -гидро- ω -гидро-ксиполи(окси-1,2-этандиол)) $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n \geq 4$	ПЭГ 400 ($n = 8,2-9,1$): M_r 340-420; ПЭГ 4000 ($n = 68-84$): M_r 3500-4500; раст-сть: р. H_2O , ароматические углеводороды; м. р. алифатические углеводороды
22	Полиоксиэтиленовые эфиры на основе производных сорбита: твин 20 (ПЭГ ($n = 20$), сорбитанмонолаурат); твин 40 (ПЭГ ($n = 20$), сорбитанмонопальмитат); твин 60 (ПЭГ ($n = 20$), сорбитанмоностеарат); твин 80 (ПЭГ ($n = 20$), сорбитанмоноолеат)	Неионные ПАВ; критическая конц. мицеллообразования: твин 20-60 мг/л; твин 40-29 мг/л; твин 60-27 мг/л; твин 80-13 мг/л; раст-сть: х. р. H_2O ; р. этаноле, метаноле
23	Тиомочевина (тиокарбамид) NH_2CSNH_2	M_r 76,1; образует раств. комплексы с тяжелыми металлами; сильный восстановитель
24	Тритон X-100 (ПЭГ ($n = 9, 10$), n -(трет-октил)фенол)	M_r 625; неионное ПАВ; критическая конц. мицеллообразования 250 кмоль/л
25	Уксусная кислота (этановая кислота) CH_3COOH	Бесцв. жидк.; M_r 60,1; $t_{\text{пл}}$ 16,6; $t_{\text{кип}}$ 118,2; раст-сть: ∞ H_2O , этаноле, эфире; р. орг. раств-лях
26	Уксусный ангидрид (этановый ангидрид) 	M_r 102,1; едкая жидк.; $t_{\text{пл}}$ -73; $t_{\text{кип}}$ 139; раст-сть: медл. р. H_2O ; ∞ этаноле; р. хлороформе, бензине

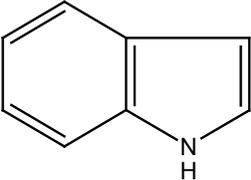
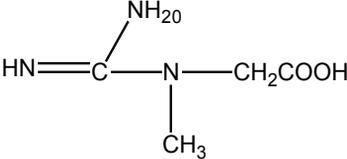
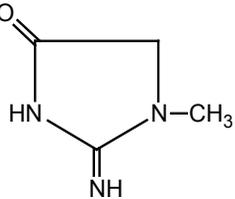
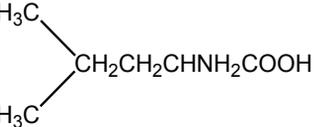
№ п/п	Название и формула	Свойство
27	Фенилизотиоцианат (ФИТЦ) 	M_r 135,2; $t_{пл}$ -21 ; $t_{кип}$ 95^{12} ; раст-сть: р. этаноле, эфире; н. р. H_2O
28	Фенилуксусная кислота (α -толуиловая кислота) $C_6H_5CH_2COOH$	M_r 136,2; $t_{пл}$ $76-77$; $t_{кип}$ 266 ; раст-сть: $1,6^{20} H_2O$; 186 этаноле; 151 элоро- форме; х. р. эфире
29	Фенол (карболовая кислота) C_6H_5OH	Бесцв. крист.; M_r $94,1$; $t_{пл}$ 43 ; $t_{кип}$ 182 ; раст-сть: $6,7^{16}$, $\infty^{66} H_2O$, ∞ этаноле; х. р. эфире; р. хлороформе; $\epsilon_{210,5} = 6200$, $\epsilon_{270} = 1450$ в H_2O
30	Формальдегид (метиналь) $HCHO$	Бесцв. газ; едкий запах; M_r $30,0$; $t_{пл}$ -92 ; $t_{кип}$ -21 ; раст-сть: х. р. H_2O , этаноле, эфире. Формалин – это $37-47\%$ -ный водн. раствор, обычно содержащий $10-15\%$ -ный метанол в качестве стабилизатора; разб. раствор уст. при $2^\circ C$ в течение 1 недели
31	Этанол CH_3CH_2OH	M_r $46,1$; $t_{пл}$ $-117,3$; $t_{кип}$ $-78,5$; раст-сть: ∞H_2O , орг. раств-лях; восплам.
32	Этилендиаминтетрауксусная кислота (этиленди- аминтетраацетат; ЭДТА) 	M_r $292,2$

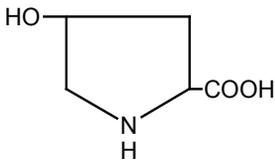
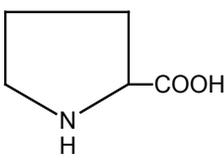
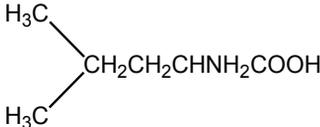
ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АМИНОВ, АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

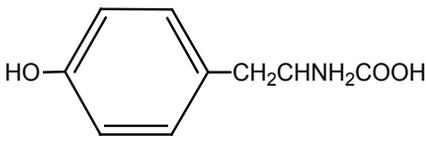
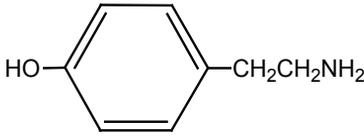
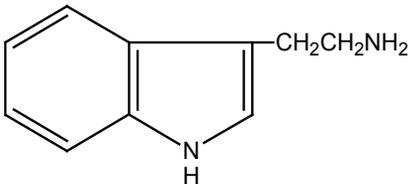
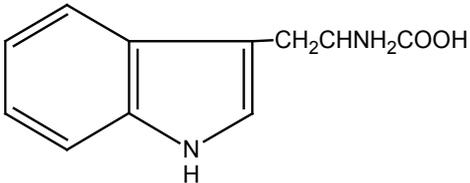
№ п/п	Название и формула	Свойство
1	L-Аланин (α -аминопропионовая кислота) $\text{CH}_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$	M_r 89,09; раст-сть: 16,65 ²⁵ , 28,5 ⁷⁵ H_2O ; н. р. эфире, уксусной кислоте; pI 6,0
2	β -Аланин (β -аминопропионовая кислота) $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	M_r 89,09; раст-сть: 54,53 ²⁵ H_2O ; оптически неактивен
3	L-Аргинин (α -амино- δ -гуанидинвалериановая кислота) $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$	M_r 174,21; раст-сть: 15 ²¹ , 28,5 ⁷⁵ H_2O ; н. р. эфире, этаноле; pI 10,76
4	L-Аспарагиновая кислота (α -аминоянтарная кислота) $\text{COOHCH}_2\text{HNH}_2\text{COOH}$	M_r 133,10; раст-сть: 0,5 ²⁵ , 2,875 ⁷⁵ H_2O ; pI 2,77
5	L-Аспарагин $\text{COOHCH}_2\text{HNH}_2\text{COOH}$	M_r 132,12; раст-сть: 2,99 ²⁵ , 24,09 ⁷⁵ H_2O ; pI 5,41
6	Ацетилхолин $-\text{OH}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OOCCH}_3$	M_r 163,21; раст-сть: р. H_2O ; уксусной кислоте
7	Барбитуровая кислота (лактам) 	M_r 128,09; раст-сть: с. р. H_2O ; р. HCl , слабой HNO_3 , о. р. щелочах; при высокой температуре разлагается

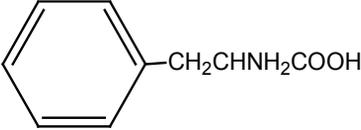
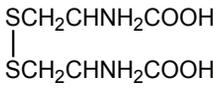
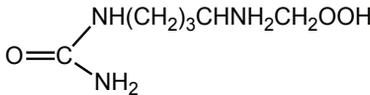
№ п/п	Название и формула	Свойство
8	L-Валин (α -аминоизовалериановая кислота) 	M_r 117,15; раст-сть: 8,85 ²⁵ , 10,24 ⁶⁵ H ₂ O; н. р. эфире. <i>pI</i> 5,96
9	Гистамин (β -аминоэтилглиоксамин) 	M_r 111,15; раст-сть: р. H ₂ O; этаноле; н. р. эфире
10	L-Гистидин (α -амино- β -имидазолпропионовая кислота) 	M_r 155,16; раст-сть: 4,16 ²⁵ H ₂ O; о. с. р. этаноле; н. р. эфире; <i>pI</i> 7,64
11	Глицилглицин NH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ COOH	M_r 132,12; раст-сть: о. р. тепл. H ₂ O; о. с. р. этаноле; н. р. эфире; <i>pI</i> 5,56
12	Глицин (аминоуксусная кислота) CH ₂ NH ₂ COOH	M_r 75,07; раст-сть: 24,99 ²⁵ , 54,39 ⁷⁵ H ₂ O; 0,00023 ²⁵ уксусной кислоте; <i>pI</i> 5,87
13	L-Глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая кислота) COOHCH ₂ CH ₂ NH ₂ COOH	M_r 147,13; раст-сть: 0,85 ²⁵ , 5,53 ⁷⁵ H ₂ O; <i>pI</i> 3,22
14	L-Глутамин CONH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ COOH	M_r 146,15; раст-сть: 4,25 ²⁵ , H ₂ O; н. р. эфире, хлороформе; уксусной кислоте; <i>pI</i> 3,65

№ п/п	Название и формула	Свойство
15	L-Глутатион (L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин) $\text{COONCH}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{CONHCH}_2\text{COOH}$ <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{NH}_2 \end{array}$ $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_2\text{SH} \end{array}$ </div>	M_r 307,32; раст-сть: р. H_2O ; н. р. этаноле, эфире; pI 2,83
16	L-Изолейцин (α-амино-β-метилвалериановая кислота) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CHNH}_2\text{COOH}$	M_r 131,17; раст-сть: 4,12 ²⁵ , 6,08 ⁷⁵ H_2O , гор. уксусной кислоты; н. р. эфире; pI 6,02
17	Имидазол 	M_r 68,09; раст-сть: о. р. H_2O , этаноле; р. эфире; $t_{\text{кип}}$ 256 °C
18	Индол (2,3-бензопиррол) 	M_r 117,16; раст-сть: р. гор. H_2O , этаноле, эфире, бензине; $t_{\text{кип}}$ 253–354 °C
19	Индолилуксусная кислота (β-индолилуксусная кислота, гетероауксинбензопиррол) 	M_r 175,18; раст-сть: о. р. этаноле; р. ацетоне, эфире; н. р. H_2O , хлороформе

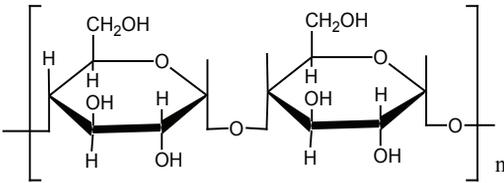
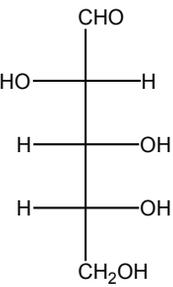
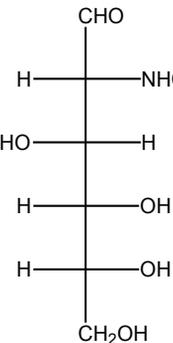
№ п/п	Название и формула	Свойство
20	Кадаверин (1,5-пентадиамин, пентаметилендиамин) 	M_r 102,18; раст-сть: р. H_2O ; с. р. этаноле, эфире; $t_{кип}$ 178–180 °С
21	Креатин (β-метилгуанидоуксусная кислота, метилгликоциамин) 	M_r 131,14; раст-сть: 1,09 ¹⁰ , 1,35 ¹⁸ H_2O ; н. р. эфире
22	Креатинин (1-метилгликоциамидин) 	M_r 113,12; раст-сть: 8,7 ¹⁶ , H_2O , 0,98 ¹⁶ этаноле
23	L-Лейцин (α-аминоизокапроновая кислота) 	M_r 131,17; раст-сть: 2,20 ²⁵ , 2,66 ⁵⁰ H_2O ; pI 6,04
24	L-Лизин (α,ε-диаминокапроновая кислота) $NH_2(CH_2)_4CHNH_2COOH$	M_r 146,19; раст-сть: о. р. H_2O ; с. р. этаноле; н. р. эфире; pI 9,74

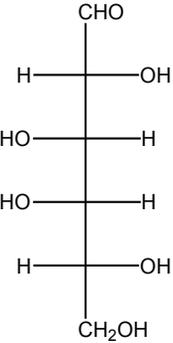
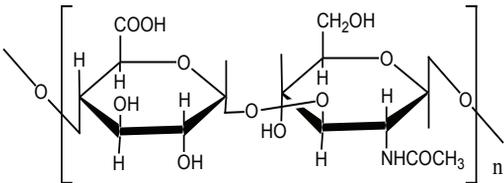
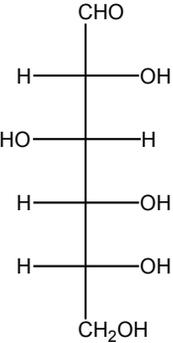
№ п/п	Название и формула	Свойство
25	L-Метионин (α -амино- γ -метилмеркаптомасляная кислота) $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	M_r 149,21; раст-сть: 3,25 ²⁵ , H_2O ; н. р. эфире, этаноле; pI 5,74
26	D,L-Окспиролин (γ -окси-пирролидинкарбоновая кислота) 	M_r 131,13; раст-сть: о. р. H_2O ; р. метаноле; с. р. этаноле; pI 5,83
27	L-Орнитин (α , δ -диаминовалериановая кислота) $\text{CH}_2\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	M_r 132,16; раст-сть: о. р. H_2O , этаноле; с. р. эфире
28	D,L-Пролин (2-пирролидинкарбоновая кислота) 	M_r 115,13; раст-сть: 132,3 ²⁵ , 293 ⁶⁵ H_2O ; н. р. эфире, <i>n</i> -пропаноле, <i>n</i> -бутаноле; pI 6,3
29	L-Серин (α -амино- β -оксипропионовая кислота) 	M_r 105,09; раст-сть: 25 ²⁰ H_2O ; pI 5,68
30	Таурин (2-аминоэтансульфоная кислота) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	M_r 125,15; раст-сть: 10,48 ²⁵ , 35,76 ⁷⁵ H_2O ; н. р. эфире

№ п/п	Название и формула	Свойство
31	L-Тирозин (β -(<i>n</i> -оксифенилаланин)) 	M_r 181,199; раст-сть: 0,045 ²⁵ , 0,244 ⁷⁵ H ₂ O; р. щелочах; н. р. эфире, ацетоне; <i>pI</i> 5,66
32	Тирамин 	M_r 137,18; раст-сть: 1,05 ¹⁵ H ₂ O, 10 этаноле; с. р. эфире, хлороформе; $t_{\text{кип}}$ 175–178 °С
33	L-Треонин (α -амино- β -окси- <i>n</i> -масляная кислота) $\text{CH}_3\text{CHONCHNH}_2\text{COOH}$	M_r 119,12; раст-сть: 20,5 ²⁵ H ₂ O; н. р. этаноле, эфире, хлороформе; <i>pI</i> 6,16
34	Триптамин (3-(β -аминоэтилиндол)) 	M_r 160,21; раст-сть: о. р. этаноле, ацетоне; с. р. H ₂ O, эфире
35	L-Триптофан (α -амино-3-индолпропионовая кислота) 	M_r 204,22; раст-сть: 1,14 ²⁵ , 2,80 ⁷⁵ H ₂ O; р. гор. пиridине, разб. щелочах; с. р. этаноле; н. р. эфире, хлороформе; <i>pI</i> 5,89

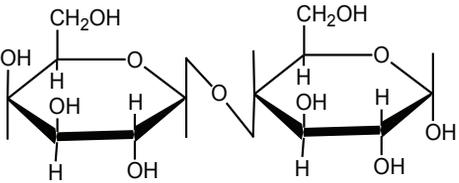
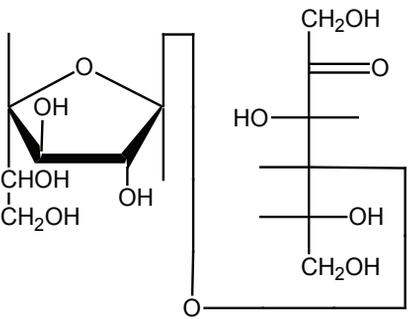
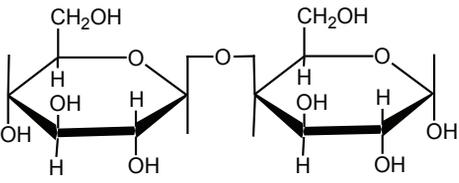
№ п/п	Название и формула	Свойство
36	L-Фенилаланин (α -амино- β -фенилпропионовая кислота) 	M_r 165,19; раст-сть: 2,96 ²⁵ , 6,62 ⁷⁵ H ₂ O; н. р. эфире, этаноле; pI 5,48
37	Холин (β -гидроксиэтил-триметиламмонийгидроксид) HOCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃ OH ⁻	M_r 121,18; раст-сть: о. р. H ₂ O, этаноле; н. р. метаноле; с. р. хлороформе, эфире
38	Цистеамин (β -меркаптоэтиламин) HSCH ₂ CH ₂ NH ₂	M_r 77,4; раст-сть: р. H ₂ O, 95%-ном этаноле
39	L-Цистеин (β -меркаптоаланин) HSCH ₂ CHNH ₂ COOH	M_r 121,5; раст-сть: о. р. H ₂ O, этаноле; р. NH ₄ OH; н. р. этиловом эфире; pI 5,07
40	L-Цистин (α -амино- β -окси- <i>n</i> -масляная кислота) 	M_r 240,29; раст-сть: 0,011 ²⁵ , 0,052 ⁷⁵ H ₂ O; р. минер. кислотах, щелочах; н. р. эфире, хлороформе; pI 4,6
41	L-Цитруллин (α -амино- δ -уреидовалериановая кислота) 	M_r 175,19; раст-сть: р. H ₂ O; н. р. этаноле, метаноле
42	Этаноламин (β -оксиэтиламин) NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	M_r 61,08; раст-сть: ∞ H ₂ O, этаноле; с. р. бензине, лигроине; $t_{кип}$ 172 °C

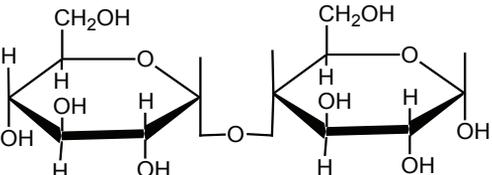
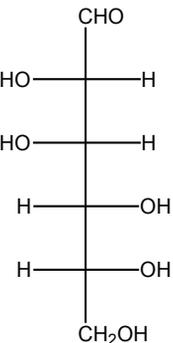
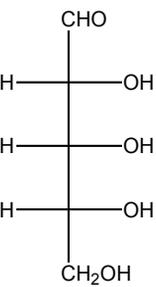
ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОНО-, ОЛИГО- И ПОЛИСАХАРИДОВ

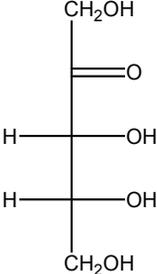
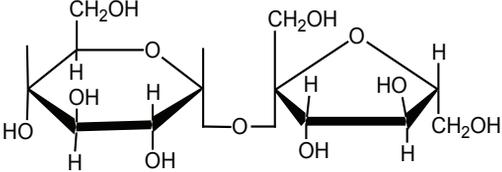
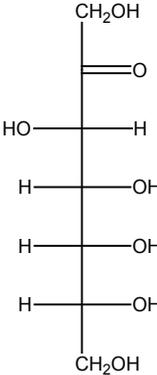
№ п/п	Название и формула	Свойство
1	<p>Амилоза (α-1,4-глюкан)</p> 	<p>$M_r(162,14)_n$; раст-сть: р. гор. H_2O</p>
2	<p>Амилопектин (α-1,4-глюкан, разветвления через α-1,6 связи)</p>	<p>$M_r(162,14)_n \cdot 6 \cdot 10^6$</p>
3	<p>D-Арабиноза</p> 	<p>$M_r 150,14$; раст-сть: р. H_2O; с. р. этаноле; н. р. эфире</p>
4	<p>N-Ацетил-D-глюкозамин</p> 	<p>$M_r 150,14$; раст-сть: р. H_2O</p>

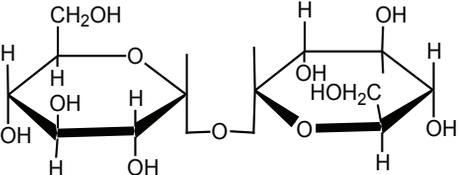
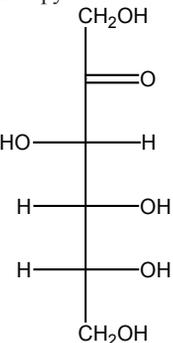
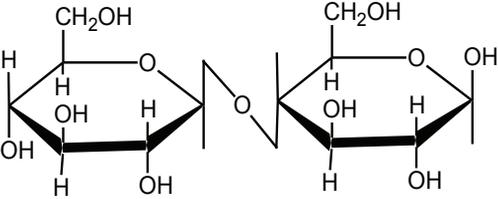
№ п/п	Название и формула	Свойство
5	D-Галактоза 	M_r 180,16; раст-сть: р. 10,68 ²⁵ H ₂ O; с. р. метаноле
6	Гиалурионовая кислота 	M_r (162,14) _n ; раст-сть: р. H ₂ O; н. р. этаноле, ацетоне
7	Гликоген (α-1,4-глюкан, разветвления через α-1,6 связи)	M_r (162,14) _n ·6·10 ⁶ ; раст-сть: р. H ₂ O; н. р. этаноле, этиловом эфире, ацетоне
8	D-Глюкоза 	M_r 180,16; раст-сть: р. H ₂ O; с. р. этаноле; н. р. эфире, ацетоне

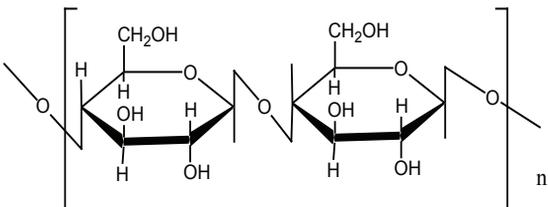
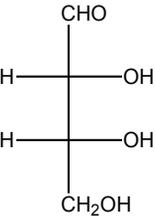
№ п/п	Название и формула	Свойство
9	D-глюконовая кислота $ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	M_r 196,16; раст-сть: р. H_2O ; н. р. этаноле, эфире
10	D-глюкуроновая кислота $ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array} $	M_r 194,16; раст-сть: р. H_2O , этаноле
11	Инулин (β -D-фруктофуранозил-(1,2)- β -D-фруктофуранозид)	M_r (162,14) _n ; раст-сть: с. р. хол. H_2O ; р. tepl. H_2O
12	Крахмал. (смесь амилозы (22–26 %) и амилопектина (74–78 %)).	Раст-сть: н. р. H_2O до температуры 55 °С; р. хол. разб. щелочах

№ п/п	Название и формула	Свойство
13	Лактоза (β-галактопиранозил-(1,4)-глюкопираноза) 	M_r 342,3; раст-сть: 21,6 ²⁵ , 139 ⁸⁹ H ₂ O; н. р. метаноле, этаноле, эфире
14	Лактулоза (β-галактофуранозил-(1,4)-D-фруктоза) 	M_r 342,3; раст-сть: 21,6 ²⁵ , 139 ⁸⁹ H ₂ O; н. р. метаноле, этаноле, эфире
15	Ликобиоза (β-глюкопиранозил-(1,4)-α-галактопираноза) 	M_r 342,3; раст-сть: с. р. H ₂ O

№ п/п	Название и формула	Свойство
16	Мальтоза (α -глюкопиранозил-(1,4)- α -глюкопираноза) 	M_r 342,3; раст-сть: р. 108 ²⁰ H ₂ O; о. с. р. этаноле; н. р. эфире
17	D-Манноза 	M_r 180,16; раст-сть: р. 248 ¹⁷ H ₂ O; н. р. эфире
18	Раффиноза (α -галактопиранозил-(1,6)-сахароза)	M_r 504,4; раст-сть: р. 14,3 ²⁰ H ₂ O; н. р. этаноле
19	D-Рибоза 	M_r 150,14; раст-сть: р. H ₂ O; о. с. р. этаноле

№ п/п	Название и формула	Свойство
20	D-Рибулоза 	M_r 150,14; раст-сть: р. H_2O
21	Сахароза (α -глюкопиранозил-(1,2)- β -фруктофуранозид) 	M_r 342,3; раст-сть: р. 190 ¹⁷ , 487 ¹⁰⁰ H_2O ; с. р. этаноле, метаноле; н. р. эфире
22	D-Седогеуптулоза 	M_r 210,19; раст-сть: р. H_2O

№ п/п	Название и формула	Свойство
23	Трегалоза (1-О- α -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопиранозид) 	M_r 342,3; раст-сть: р. 108 ²⁰ H ₂ O; о. с. р. этаноле; н. р. эфире
24	D-Фруктоза 	M_r 180,16; раст-сть: 375 ²⁰ , 740 ⁵⁵ H ₂ O; р. метаноле, этаноле, пиридину, ацетоне, лед. CH ₃ COOH
25	Хитин	M_r (203,19) _n ~210 000; раст-сть: н. р. H ₂ O; р. конц. минер. кислотах
26	Целлобиоза (β -D-глюкопиранозил-(1,4)-D-глюкопираноза) 	M_r 342,3; раст-сть: р. H ₂ O; н. р. этаноле, эфире

№ п/п	Название и формула	Свойство
27	Целлюлоза (β -1,4-глюкан) 	$M_r (162,14)_n \sim 1,5 \cdot 10^6$; раст-сть: н. р. H_2O , этаноле, этиловом эфире; р. конц. H_3PO_4 , $N(C_2H_5)_4OH$
28	D-Эритроза 	M_r 120,0; раст-сть: р. H_2O , метаноле, этаноле

НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Жирная кислота	Количество углеродных атомов	Количество и положение двойных связей
Масляная	4	—
Капроновая	6	—
Каприловая	8	—
Каприновая	10	—
Лауриновая	12	—
Миристиновая	14	—
Пальмитиновая	16	—
Пальмитолеиновая	16	$\Delta 9-10$
Стеариновая	18	—
Олеиновая	18	$\Delta 9-10$
Линолевая	18	$\Delta 9-10, 12-13$
Линоленовая	18	$\Delta 9-10, 12-13, 15-16$
Арахидиновая	20	—
Арахидоновая	20	$\Delta 5-6, 8-9, 11-12, 14-15$

ЕДИНИЦЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Скорость ферментативной реакции, как и любой химической реакции, определяется количеством веществ, прореагировавших за единицу времени при заданных условиях. Скорость ферментативной реакции зависит от активности фермента, которая может быть выражена в различных единицах:

- *1 катал (кат)* – количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата за 1 с при 25 °С (при оптимальных условиях для данного фермента (рН, [S]));

- *1 международная единица (МЕ)* – количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25 °С (при оптимальных условиях для данного фермента (рН, [S])).

$$1 \text{ ME} = 16,7 \text{ нкат},$$

$$1 \text{ кат} = 6 \cdot 10^7 \text{ ME}.$$

Удельная активность фермента – число единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка.

Если известна молекулярная масса фермента, то можно рассчитать *молекулярную активность* (число оборотов), она характеризуется числом молей субстрата, которое подвергается превращению ферментом в количестве 1 моль за 1 мин. В том случае когда у фермента несколько активных центров, то определяют количество субстрата (в моль), подвергающегося превращению 1 моль каталитических центров (молярная концентрация фермента, умноженная на число активных центров в молекуле фермента) – *активность каталитического центра*.

Классификация ферментов

Класс ферментов	Тип катализируемой реакции
Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные реакции всех типов
Трансферазы	Перенос отдельных атомов и групп атомов
Гидролазы	Гидролитическое расщепление химических связей
Лиазы	Негидролитическое расщепление двойных связей или их образование
Изомеразы	Взаимопревращение различных изомеров
Лигазы	Образование связей (синтез) с затратой энергии АТФ

ОСНОВНЫЕ ВИТАМИНЫ И ИХ АКТИВНАЯ ФОРМА

Буквенное обозначение	Название витамина	Активная форма витамина
Жирорастворимые витамины		
A	Ретинол	Ретиналь
D	Кальциферол	1,25-Дигидроксиколекальциферол
E	Токоферол	α -Токоферол
K	Филлохинон	Дигидрофиллохинон
Водорастворимые витамины		
B ₁	Тиамин	Тиаминпирофосфат (ТПФ)
B ₂	Рибофлавин	Флавинадениндинуклеотид (ФАД) Флавинмононуклеотид (ФМН)
B ₃	Пантотеновая кислота	Коэнзим А
B ₅ (PP)	Никотинамид	Никотинамиддинуклеотид (НАД) Никотинамиддинуклеотид фосфат (НАДФ)
B ₆	Пиридоксин	Пиридоксальфосфат
B ₉	Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая кислота
B ₁₂	Цианокобаламин	Метилкобаламин, дезоксиаденозилкобаламин
H	Биотин	Биоцитин
C	Аскорбиновая кислота	
P	Флавоноиды (рутин, кверцетин)	

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НУКЛЕОТИДОВ

Наименование	pH	λ_{\max} , нм	ϵ , (моль/л) ⁻¹ · см ⁻¹
НАДН	7,5	259	16 900
	7,5	338	6220
НАДФН	7,5	259	16 900
	7,5	338	6220
НАД	7,5	259	17 800
НАДФ	7,5	259	18 000
ФАД (в фосфатном буфере, 0,1 моль/л)	7,0	263	38 000
	7,0	375	9300
	7,0	450	11 300

Наименование	pH	λ_{max} , нм	ϵ , (моль/л) ⁻¹ · см ⁻¹
ФАДН ₂	7,0	450	980
ФМН (в фос- фатном буфере, 0,1 моль/л)	7,0	266	31 800
	7,0	373	10 400
	7,0	445	12 500
ФМНН ₂	7,0	450	870
Аденозин-5'-три- фосфат (АТФ)	2	257	14 700
	7–11	259	15 400
Гуанозин-5'-три- фосфат (ГТФ)	1	256	12 400
	7	253	13 700
	11	257	11 900
Уридин-5'-три- фосфат (УТФ)	2–7	262	10 000
	11	261	8100
Цитидин-5'-три- фосфат (ЦТФ)	2	280	12 800
	7–11	271	9000

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Спектрофотометрические методы анализа основаны на оценке поглощения световой энергии анализируемыми веществами. Между поглощением (A), пропусканием (T) и интенсивностью (I) падающего света существует следующая зависимость:

$$A = -\lg T = \lg I_0/I,$$

где I_0 – интенсивность падающего света; I – интенсивность пропущенного света.

Спектральные свойства веществ определяются их структурными особенностями, а интенсивность светопоглощения – концентрацией вещества в растворе:

$$A = \epsilon lc,$$

где ϵ – коэффициент молярного поглощения (молярной экстинкции); l (см) – длина оптического пути (толщина слоя); c (моль/л) – концентрация вещества в растворе.

Коэффициент молярной экстинкции ϵ численно равен поглощению раствора с концентрацией 1 моль/л при длине оптического пути 1 см. Он имеет размерность (моль/л)⁻¹ · см⁻¹. Для соединений, обладающих высоким уровнем светопоглощения в видимой или УФ области спектра, например, пуринов, пиримидинов, флавиновых и пиридиновых коферментов, гемопротеинов и других $\epsilon \sim 10^3$ – 10^5 .

ИНТЕРВАЛЫ ДЛИН ВОЛН ПОГЛОЩАЕМОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Длина волны поглощаемого излучения, нм	Цвет поглощаемого излучения	Цвет вещества
400–435	Фиолетовый	Желто-зеленый
435–480	Синий	Желтый
480–490	Зеленовато-синий	Оранжевый
490–500	Сине-зеленый	Красный
500–560	Зеленый	Пурпурный
560–580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580–595	Желтый	Синий
595–605	Оранжевый	Зеленовато-синий
605–750	Красный	Сине-зеленый

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НОРМЫ

Наименование показателя, единицы измерения	Показатель нормы у человека	Показатель нормы у крысы
Аланинаминотрансфераза (АлАТ), ммоль/(ч · л)	0,10–0,68	0,46–0,21 (сыворотка)
Аспаргатаминотрансфераза (АсАТ), ммоль/(ч · л)	0,1–0,45	0,9–0,74 (сыворотка)
Альбумин сывороточный, г/л	40–50	27–37
Альфа-амилаза, г/(ч · л)	16–30	–
Белок общий, г/л	65–85	170–245 (печень)
Билирубин, мкмоль/л	8,55–20,52	–
Гистамин, мкмоль/л	0,18–0,72	0,9 ± 0,09 (кровь) 1,44 ± 0,18 (печень)
Глюкоза, ммоль/л	2,75–5,55	4,51–6,6 (кровь) 14,85–42,9 (печень)
Креатинин, ммоль/л	0,044–0,088	0,069–0,132
Креатинкиназа, ммоль P/(ч · л)	до 1,2	до 1,7
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), ммоль/(ч · л)	0,8–4,0	230 ± 3,7 (печень) 14,3 ± 0,6 (сыворотка)
Липиды общие, г/л	4,00–8,00	3,2 ± 0,15 (сыворотка) 59 ± 2,0 (печень)

Наименование показателя, единицы измерения	Показатель нормы у человека	Показатель нормы у крысы
Липопротеины, г/л	3,50–7,50	0,4–0,8 (сыворотка) 10,0–27,0 (печень)
Молочная кислота, ммоль/л	0,56–1,67	1,77–3,25 (кровь) 1,75–4,59 (печень) 5,217–9,88 (мышцы)
Мочевина, ммоль/л	2,50–8,33	2,8–5,3
Пировиноградная кислота, мкмоль/л	45,6–114	114,0–353,4 (кровь) 57,0–239,4 (печень) 273,6–410,4 (мышцы)
Серотонин, мкмоль/л	0,51–1,02	0,62–2,83
Триглицерины, ммоль/л	0,44–1,82	0,35–0,70 (сыворотка) 6,16–9,24 (печень)
Фосфолипиды общие, ммоль/л	2,52–2,91	1,10–1,79 (сыворотка) 18,93–52,0 (печень)
Фосфор неорг., ммоль/л	0,65–1,29	1,45–9,37 (печень) 1,39–9,1 (мозг)
Холестерин, ммоль/л	3,64–6,76	1,09–2,36 (сыворотка) 6,58–8,58 (печень)
Натрий сыворотки, ммоль/л	130–150	135–140
Калий сыворотки, ммоль/л	3,6–5,4	4,5–7,4
Кальций, ммоль/л	2,0–2,75	1,1–2,5
Хлор, ммоль/л	96–108	92–108
Железо, мкмоль/л	14,32–25,06 (♂) 10,74–21,48 (♀)	5,9 ± 0,21 (кровь) 5,9 ± 0,41 (печень) 0,05 ± 0,003 (мышцы)

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Растворимые белки экстрагируют из тканей, осаждают и после растворения осадка в щелочи определяют различными методами.

Биуретовый метод

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди. Позволяет определить от 2 до 10 мг белка в пробе.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, например сывороточного альбумина, содержащий 10 мг в 1 мл.

2. Биуретовый реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10%-ного раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г KI и раствор доводят водой до 100 мл. Хранят в парафинированной или полиэтиленовой склянке.

Ход определения:

К 1 мл раствора, содержащего от 2 до 10 мг белка, добавляют 4 мл биуретового реактива. Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин, после чего колориметрируют на ФЭКе при 540 нм.

Содержание белка в исследуемых пробах рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору белка. Определению мешает присутствие солей аммония.

Мешающие соединения. Пептиды, трис, сахароза и желчные пигменты дают окраску в биуретовой реакции; соли аммония, трис, сахароза и глицерин оказывают влияние на окраску, даваемую белками. Липиды и детергенты могут вызывать помутнение.

МИКРОМЕТОД С РЕАКТИВОМ БЕНЕДИКТА

Позволяет определить от 0,1 до 2 мг белка в пробе.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, например сывороточного альбумина, содержащий 1 мг в 1 мл.

2. Биуретовый реактив для микроопределения (реактив Бенедикта): 17,3 г цитрата натрия и 10 г Na_2CO_3 растворяют при подогревании в небольшом количестве воды. В раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды, и доводят водой до 100 мл.

3. NaOH – 6%-ный раствор.

Ход определения:

К 2 мл раствора, содержащего 0,1–2 мг белка, добавляют 2 мл 6%-ного раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 мин фотометрируют при 330 нм. Предварительно строят калибровочный график по стандартному раствору белка.

МЕТОД ЛОУРИ

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10–100 мкг белка в пробе). На развитие окраски влияет большое количество веществ: компоненты буферных систем (трис-буфер в концентрации 0,2 ммоль, глицилглицин), восстановители (цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01–0,4 ммоль, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 ммоль), детергенты (тритон X-100 в концентрации 0,1–0,2 % вызывает выпадение осадка), сернокислый аммоний в концентрации 0,15 %, сахараза в концентрации 10 % и др.

В связи с этим при построении калибровочного графика для определения белка по Лоури в растворитель для приготовления стандартного раствора белка необходимо включать все компоненты, содержащиеся в анализируемых пробах. В некоторых случаях целесообразно проводить предварительное осаждение белков из растворов, например трихлоруксусной кислотой (ТХУ), с последующим растворением их в щелочных растворах, или очистка белковых растворов от низкомолекулярных компонентов путем диализа или гель-фильтрации на сефадексе G-25.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг в 1 мл.
2. Na_2CO_3 – 2%-ный раствор в 0,1 н растворе NaOH.
3. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,5%-ный раствор в 1%-ном растворе цитрата натрия.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива 3 смешивают с 50 мл реактива 2. Рабочий раствор готовится в день определения.
5. Реактив Фолина – Чокальтеу: 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристаллизованный) и 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу на 200–250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной HCl (х. ч.). Колбу присоединяют к обратному холодильнику (на шлифе), ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г Li_2SO_4 , 5 мл H_2O и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят H_2O до 100 мл, фильтруют и разводят H_2O с таким расчетом, чтобы получился 1 н раствор кислоты (т. е. приблизительно вдвое). Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н раствором NaOH в присутствии фенолфталеина. Реактив может храниться в темной склянке длительное время.
6. CCl_3COOH (ТХУ) – 10%-ный раствор.
7. NaOH – 1 н раствор.

Ход определения:

К 0,4 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 добавляют 0,2 мл реактива Фолина – Чокальтеу, содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 30 мин колориметрируют при 750 нм. Содержание белка рассчитывают по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору.

В случае предварительного осаждения белка к исследуемому раствору добавляют CCl_3COOH (ТХУ) из такого расчета, чтобы конечная концентрация ее была равна 3–4 %. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 10–20 мин. Выпавший осадок белка отделяют центрифугированием и промывают 2%-ным раствором CCl_3COOH . К осадку добавляют 1–2 мл 1 н раствора NaOH и осторожно подогревают до растворения осадка белка. Раствор белка количественно переносят в мерную колбу на 25–50 мл, доводят водой до метки, тщательно перемешивают и проводят определение белка.

Мешающие соединения. Многие широко используемые биохимические реагенты мешают количественному определению белка, усиливая фон или нивелируя окраску с белком. К их числу относятся: тирозин, триптофан и фенольные соединения; буферы (например, трис, хепес, глицин, гистидин, цитрат); сахара (например, сахароза, глюкоза, глицерин); вещества, применяемые для создания градиента (например, фиколл, метризамид, поливинилпирролидон); тиольные соединения; восстановители; ЭДТА; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; тритон X-100.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ В ПРИСУТСТВИИ НЕИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ

Для солубилизации мембранных белков часто используют неионные детергенты, например, тритон X-100, твин-80 и др. Так как эти детергенты влияют на развитие окраски при определении белка с биуретовым реактивом и методом Лоури, от них нужно освободиться. Практически полного удаления детергентов из пробы можно добиться экстракцией их изоамиловым спиртом.

Реактивы:

- 1–5. Как для определения белка методом Лоури.
6. Изоамиловый спирт.
7. Хлороформ.

Ход определения:

0,5 мл раствора белка (10–100 мкг), содержащего тритон X-100, смешивают с 0,5 мл 1 н раствора NaOH и 3 мл рабочего раствора (4). После 10-минутного выдерживания при комнатной температуре к полученной смеси добавляют 3 мл изоамилового спирта и снова тщательно перемешивают. Смесь

центрифугируют 10 мин при 2000 g. Верхний слой, содержащий изоамиловый спирт, осторожно удаляют с помощью шприца. Оставшуюся жидкость (4 мл) помещают в чистую пробирку, доливают 0,38 мл реактива Фолина – Чокалтеу и после тщательного перемешивания к смеси добавляют 2,0 мл хлороформа для удаления следов изоамилового спирта. Все тщательно перемешивают, центрифугируют 15 мин при 2000 g, затем хлороформ удаляют с помощью шприца. Окраска развивается в течение 30 мин, после чего раствор колориметрируют при 750 нм. При построении калибровочного графика в стандартные пробы добавляют те же компоненты, что и в опытные.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С КУМАССИ СИНИМ

Метод основан на связывании с белками кислого красителя кумасси синего, выпускаемого в двух модификациях: *R-250* и *G-250*. При связывании с белками спектр поглощения красителя меняется. Интенсивности окраски имеют линейную зависимость в диапазоне 1–10 мкг белка/мл.

Многие из исследованных соединений (фосфат, цитрат, пирофосфат, ацетат, *HEPES*, *MOPS*, *MES*, *BES*, *PIPES*, трис, какодилат, формиат, дитиотреитол, ЭГТА, глицин, тирозин, а также аденозин, АТФ, тимидин, ДНК, РНК, полиадениловая кислота) не влияют на развитие окраски. Наличие в среде инкубации детергентов вызывает значительное увеличение оптической плотности. Поскольку белки различаются по своей способности связывать красители, желательно строить калибровочный график с использованием того белка, концентрацию которого в дальнейшем предполагают определять.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,05 мг в 1 мл.
2. Раствор красителя. 10 мг красителя (*Coomassie brilliant blue G*) гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в 5 мл 95%-ного спирта. Полученный раствор смешивают с 10 мл 95%-ной фосфорной кислоты, разводят водой до конечного объема 100 мл. Отфильтрованный раствор красителя хранится при комнатной температуре около двух недель.

Ход определения:

1,5 мл раствора, содержащего от 10 до 50 мкг белка, смешивают с 1,5 мл раствора красителя (2). Через 3–5 мин измеряют оптическую плотность при 595 нм, используя в качестве контроля 1,5 мл красителя с 1,5 мл H_2O вместо раствора белка. В описанной модификации A_{595} линейно зависит от количества белка в интервале от 10 до 50 мкг.

Мешающие соединения. Сильнощелочные буферы и детергенты, такие как додецилсульфат и тритон X-100, снижают интенсивность окраски.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Метод основан на способности ароматических аминокислот (триптофана, тирозина и в меньшей степени фенилаланина) поглощать ультрафиолетовый свет с максимумом при длине волны 280 нм. Измеряя величину оптической плотности при этой длине волны, находят количество белка в растворе. Поскольку белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, их поглощение в ультрафиолетовой области спектра может сильно различаться. Условно считают, что при усредненном содержании белка в растворе 1 мг/мл величина оптической плотности при 280 нм равна 1,0 (при толщине слоя жидкости в 1 см). Определению белка данным методом мешает присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

Ход определения:

Измеряют оптическую плотность раствора при 260 нм (для учета поглощения соединений нуклеотидной природы) и 280 нм. Содержание белка рассчитывают с помощью номограммы (рис. 1): экспериментально полученные величины оптической плотности при 260 и 280 нм находят в соответствующих столбцах номограммы и соединяют их прямой линией; точка пересечения этой прямой со шкалой, на которой приведена концентрация белка, определяет содержание белка в исследуемом растворе.

Содержание белка можно найти по формуле Калькара на основе данных определения оптической плотности при 280 и 260 нм по формуле:

$$\text{содержание белка} = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260} \quad (\text{мг/мл}).$$

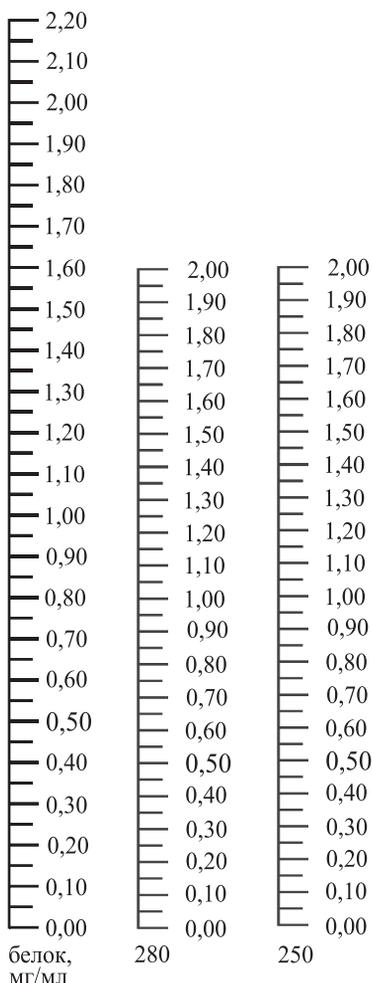


Рис. 1. Номограмма для определения белка

МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ, РАЗДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

ОСАДИТЕЛИ БЕЛКОВ

Вольфрамовая кислота

Раствор А. 10%-ный (м/об) раствор вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде.

Раствор Б. 0,335 моль/л раствор H_2SO_4 .

Образец ткани гомогенизируют с водой до желаемого разбавления, затем добавляют раствор вольфрамата, после чего по каплям, тщательно перемешивая, доливают равный объем серной кислоты. В другом варианте равные объемы растворов А и Б можно смешать перед добавлением к образцу. Смешанный реагент неустойчив; его не следует хранить более двух недель, при появлении осадка готовить заново. Фильтрат, получаемый в результате осаждения вольфрамовой кислотой, имеет рН ~ 6,5.

Приблизительные количества растворов вольфрамата и серной кислоты, необходимые для полного осаждения белка (из тканей крысы) приведены ниже:

Ткань	Количество ткани	Количество H_2O для гомогенизации, мл	Раствор А, мл	Раствор Б, мл
Кровь	1 мл	7	1	1
Плазма	1 мл	8	0,5	0,5
Печень	1 г	7,5	0,75	0,75
Мозг	1 г	3,4	0,3	0,3
Мышца	1 г	2,8	0,6	0,6
Селезенка	1 г	8,1	0,45	0,45

Сульфат цинка – щелочь

1-й способ:

Раствор А. 10%-ный раствор $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Раствор Б. 0,5 моль/л раствор NaOH .

Вместо ZnSO_4 можно использовать сульфат кадмия, однако никаких особых преимуществ как осадитель белка он не дает.

При титровании по фенолфталеину на 10 мл раствора А, разбавленного 70 мл H_2O , расходуется ~ 11 мл раствора Б (в течение достаточно долгого времени должна сохраняться розовая окраска).

1 мл крови разбавляют до 8 мл, добавляют 1 мл раствора А, перемешивают, добавляют 1 мл раствора Б, вновь перемешивают и фильтруют. В случае других тканей реагенты берут в тех же соотношениях, что и при использовании вольфрамовой кислоты.

2-й способ:

Раствор А. К 12,5 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ добавляют 125 мл 0,125 моль/л H_2SO_4 . Общий объем раствора доводят до 1 л водой.

Раствор Б. 0,75 моль/л NaOH.

При титровании по фенолфталеину на 50 мл раствора А расходуется ~ 6,7–6,8 мл раствора Б (в течение достаточно долгого времени должна сохраняться розовая окраска).

К 1 мл крови добавляют 8 мл раствора А и перемешивают, добавляют 1 мл раствора Б, перемешивают и фильтруют. В случае других тканей работают по этой же методике.

3-й способ:

Раствор А. 5%-ный раствор $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Раствор Б. 0,15 моль/л $Ba(OH)_2$.

При титровании по фенолфталеину на 10 мл раствора А, разбавленного 100 мл H_2O , расходуется 10 мл раствора Б (в течение достаточно долгого времени должна сохраняться розовая окраска).

1 мл крови разбавляют 5 мл H_2O , добавляют 2 мл раствора А, перемешивают и добавляют 2 мл раствора Б; раствор перемешивают и фильтруют. В случае других тканей работают по этой же методике.

Трихлоруксусная кислота

При исследовании крови смешивают 1 мл образца с 9 мл 10%-ного (м/об) раствора трихлоруксусной кислоты; раствор центрифугируют или фильтруют. В случае тканевых экстрактов, инкубационных смесей ферментов и других объектов для обеспечения полного осаждения белков обычно достаточно использовать трихлоруксусную кислоту с конечным ее содержанием в белоксодержащем объекте 3–5 % (м/об). Небелковый азот остается в супернатанте. После удаления осадка белка трихлоруксусную кислоту в значительной мере можно удалить из супернатанта путем многократной экстракции диэтиловым эфиром, насыщенным водой.

Хлорная кислота

В случае тканевых экстрактов, инкубационных смесей ферментов и других объектов добавляют такое количество хлорной кислоты, чтобы ее конечное содержание в белоксодержащем объекте составило 3–5 % (0,3–0,5 моль/л). После центрифугирования избыток хлорной кислоты можно осадить в виде калиевой соли, нейтрализуя супернатант раствором КОН. K_2CO_3 или K_3PO_4 при охлаждении до 0 °С (осадок $KClO_4$ удаляют путем центрифугирования). Не следует допускать нагревания реакционной смеси во время центрифугирования, так как растворимость $KClO_4$ гораздо выше при комнатной температуре, чем при 0 °С.

Этанол

Добавляют такое количество этанола, чтобы конечное содержание составило 75–80 % (об/об); смесь нагревают (лучше до кипения в течение 1–2 мин), охлаждают, центрифугируют и декантируют супернатант. Для удаления этанола и липидного материала добавляют 3 объема $CHCl_3$; смесь тщательно перемешивают и центрифугируют. Этанол переходит в слой (нижний) $CHCl_3$.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУЛЬФАТА АММОНИЯ ДЛЯ ВЫСАЛИВАНИЯ БЕЛКА

Ниже указано количество твердого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, который необходимо добавить, чтобы из раствора с известной первоначальной степенью насыщения получить раствор с желаемой конечной степенью насыщения. Все данные отнесены к насыщенному раствору при 0°C (706,8 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 1 л H_2O , т. е. 5,35 моль/л). Количество G_x (в г) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, которое необходимо добавить к 1 л раствора с первоначальной степенью насыщения S_1 , чтобы получить раствор с конечной степенью насыщения S_2 , определяется по формуле:

$$G_x = \frac{G \cdot (S_2 - S_1)}{1 - uGS_2}, \quad (1)$$

где G – масса $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (в г), содержащегося в 1 л насыщенного раствора; S_1 и S_2 – степени насыщения в долях, например $S_1 = 0,5$ и $S_2 = 0,7$; u – парциальный удельный объем $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в насыщенном растворе. В формуле не учитывается изменение парциального удельного объема в зависимости от концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

При добавлении насыщенных растворов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ изменения объемов в результате смешивания незначительны. Объем $V_{\text{нас}}$ (в мл) насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, который необходимо добавить, чтобы увеличить первоначальную степень насыщения S_1 раствора объемом 1 л до конечной степени насыщения S_2 , определяется по следующей формуле:

$$V_{\text{нас}} = \frac{100 \cdot S_1 - S_2}{1 - S_2}. \quad (2)$$

Насыщенные растворы сульфата аммония при различных температурах

Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в насыщенном растворе и другие данные	Температура, $^\circ\text{C}$				
	0	10	20	25	30
Моляльная, моль/1000 г H_2O	5,35	5,53	5,73	5,82	5,91
Процентная, %	41,42	42,22	43,09	43,47	43,85
Массовая, г/1000 мл H_2O	706,8	730,5	755,8	766,8	777,5
Массовая, г/л раствора	514,7	525,1	536,1	541,2	545,9
Молярная, моль/л	3,90	3,97	4,06	4,10	4,13
Плотность, г/см ³	1,2428	1,2436	1,2447	1,2450	1,2449
Кажущийся удельный объем	0,5281	0,5357	0,5414	0,5435	0,5458

Приготовление растворов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Степень насыщения раствора при 0 °С, %	Количество (г) твердого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, которое необходимо добавить на каждые 100 мл исходного раствора																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	10,7	13,6	16,6	19,7	22,9	26,2	29,5	33,1	36,6	40,4	44,2	48,3	52,3	56,7	61,1	65,9	70,7
5	8,0	10,9	13,9	16,8	20,0	23,2	26,6	30,0	33,6	37,3	41,1	45,0	49,1	53,3	57,8	62,4	67,1
10	5,4	8,2	11,1	14,1	17,1	20,3	23,6	27,0	30,5	34,2	37,9	41,8	45,8	50,0	54,4	58,9	63,6
15	2,6	5,5	8,3	11,3	14,3	17,4	20,7	24,0	27,5	31,0	34,8	38,6	42,6	46,6	51,0	55,5	60,0
20	0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,5	17,7	21,0	24,4	28,0	31,6	35,4	39,2	43,3	47,6	51,9	56,5
25		0	2,7	5,7	8,5	11,7	14,8	18,2	21,4	24,8	28,4	32,1	36,0	40,1	44,2	48,5	52,9
30			0	2,8	5,7	8,7	11,9	15,0	18,4	21,7	25,3	28,9	32,8	36,7	40,8	45,1	49,5
35				0	2,8	5,8	8,8	12,0	15,3	18,7	22,1	25,8	29,5	33,4	37,4	41,6	45,9
40					0	2,9	5,9	9,0	12,2	15,5	19,0	22,5	26,2	30,0	34,0	38,1	42,4
45						0	2,9	6,0	9,1	12,5	15,8	19,3	22,9	26,7	30,6	34,7	38,8
50							0	3,0	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,3	27,2	31,2	35,3
55								0	3,0	6,2	9,4	12,9	16,3	20,0	23,8	27,7	31,2
60									0	3,1	6,3	9,6	13,1	16,6	20,4	24,2	28,3
65										0	3,1	6,4	9,8	13,4	17,0	20,8	24,7
70											0	3,2	6,6	10,0	13,6	17,3	21,2
75												0	3,2	6,7	10,2	13,9	17,6
80													0	3,3	6,8	10,4	14,1
85														0	3,4	6,9	10,6
90															0	3,4	7,1
95																0	3,5
100																	0

ДИАЛИЗ

Диализ используют для очистки белков (других высокомолекулярных соединений) от низкомолекулярных примесей или для замены состава среды. Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через полупроницаемые мембраны, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке, приготовленном из полупроницаемой мембраны (концентрация солей, величина рН и другое), будет тот же, что и в окружающем растворе.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Метод основан на том, что молекулы, обладающие электрическим зарядом, величина и знак которого определяются рН, ионной силой окружающей среды, под влиянием внешнего электрического поля передвигаются в растворе к противоположно заряженному полюсу. Скорость перемещения пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна размеру и степени гидратации.

Метод электрофореза белков в полиакриламидном геле обладает большой разрешающей способностью в связи с тем, что разделение смесей идет не только по заряду, но и по размерам и форме частиц. Преимуществами метода являются: химическая стабильность и инертность геля, возможность получения гелей с заданной величиной пор, отсутствие адсорбции и электроосмоса, устойчивость к растворителям, изменениям температуры и рН.

Использование диск-электрофореза в полиакриламидном геле, т. е. электрофореза в неоднородной разделяющей среде, добавляет к этому эффект концентрирования, что позволяет проводить разделение белков из разбавленных растворов без их предварительного концентрирования. Электрофоретическое разделение белков проводят как в трубочках, так и в тонком слое полиакриламидного геля (слабе).

Общие реактивы:

1. ТЕМЕД – реактив стабилен при хранении в холодильнике в неразбавленном виде. К полимеризуемой смеси его добавляют непосредственно перед разливкой.

2. Персульфат аммония $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ – 1%-ный раствор, свежеприготовленный.

3. Амидовый черный 10 Б – 0,5%-ный раствор, приготовленный на 7%-ном растворе CH_3COOH . Раствор стабилен при комнатной температуре.

4. Кумасси R-250 – 0,1%-ный раствор, приготовленный на 7%-ном растворе CH_3COOH .

5. CH_3COOH – 7%-ный раствор.

6. Сахароза – 40%-ный раствор.

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

1–6. Общие реактивы.

7. Электродный буферный раствор, pH 8,3: 6,0 г триса и 28,8 г глицина растворяют в воде и доводят до 1 л. Раствор стабилен при хранении в холодильнике. При использовании в работе основной раствор разбавляют в 10 раз.

8. Буферный раствор для приготовления геля, pH 8,9: к 36,3 г триса добавляют 48 мл 1 н раствора HCl и объем доводят водой до 100 мл. Раствор стабилен.

9. Раствор акриламида: 28 г акриламида и 0,735 г N,N'-метилен-бисакриламида растворяют в 100 мл воды (сначала растворяют метилен-бисакриламид, затем акриламид). Раствор стабилен. **Внимание! Акриламид токсичен. Работу проводят под тягой, в перчатках!**

10. Бромфеноловый синий – 1 мг в 100 мл воды.

Реактивы для разделения белков с $pI > 7,5$:

1–6. Общие реактивы.

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

8. Буферный раствор для приготовления геля, pH 4,3: 48 мл 1 н раствора КОН смешивают с 17,2 мл ледяной уксусной кислоты и доводят водой до 100 мл.

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

9. Раствор акриламида: 60,0 г акриламида и 0,4 г метилен-бисакриламида растворяют в 100 мл воды. **Внимание! Акриламид токсичен. Работу проводят под тягой, в перчатках!**

10. Метиленовый зеленый – 0,1%-ный раствор.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле

Для проведения электрофореза можно использовать прибор, изображенный на рис. 2. Он состоит из двух резервуаров для буферных растворов. В центре резервуаров в специальных держателях закреплены электроды. В дне верхнего резервуара имеются отверстия для стеклянных трубочек, которые укрепляются зажимными кольцами с резьбой (прилагаются к прибору вместе с конусными и резиновыми кольцами-прокладками). Для полимеризации геля тщательно вымытые трубочки фиксируют на специальной подставке из оргстекла. Герметичность сборки проверяется заранее, до заполнения гелем.

Смесь для получения 7%-ного геля в щелочной буферной системе: реактив 8–12,5 мл; реактив 9–25,0 мл; реактив 1–0,05 мл; реактив 2–10,0 мл; доливают водой до 100 мл.

Смесь для получения 15%-ного геля в кислой буферной системе: реактив 8–12,5 мл; реактив 9–25,0 мл; реактив 1–1 мл; доводят водой до 50 мл и добавляют 50 мл реактива 2.

Смесь для полимеризации следует готовить в количестве, необходимом для опыта. Если используют, например, 12 трубочек, нужно приготовить 30 мл смеси. Осторожным вращением колбочки раствор перемешивают и вносят пипеткой в трубочки, укрепленные в подставке, следя за тем, чтобы пузырьки воздуха не попали внутрь полимеризуемого геля. Уровень вносимой жидкости должен находиться на расстоянии 1–1,5 см от верхнего края трубочки. Сверху осторожно насаивают воду (0,2–0,3 мл) для образования ровной поверхности геля.

Полимеризация обычно заканчивается через 20–40 мин, что определяют по образованию хорошо видимой границы между гелем и водой. По окончании полимеризации наслоенную воду удаляют фильтровальной бумагой. Трубочки снимают с подставки и ввинчивают в отверстия дна верхнего буферного резервуара (рис. 2, 1). Верхний резервуар присоединяют к нижнему, предварительно заполненному электродным буферным раствором. Следят за тем, чтобы на концах трубочек не было пузырьков воздуха. На поверхность геля микропипеткой наносят растворы белков. Количество наносимого белка зависит от его гомогенности: для индивидуального белка – 25–50 мкг, для гетерогенных смесей это количество может быть увеличено до 50–250 мкг. Плотность наносимых образцов белка повышают добавлением 40%-ного раствора сахарозы до конечной концентрации 0,5 моль/л (20 %). Это необходимо для предотвращения смешивания белка с электродным буфером. Высокая ионная сила исследуемых образцов мешает четкому разделению белков, поэтому такие растворы следует предварительно обессолить.

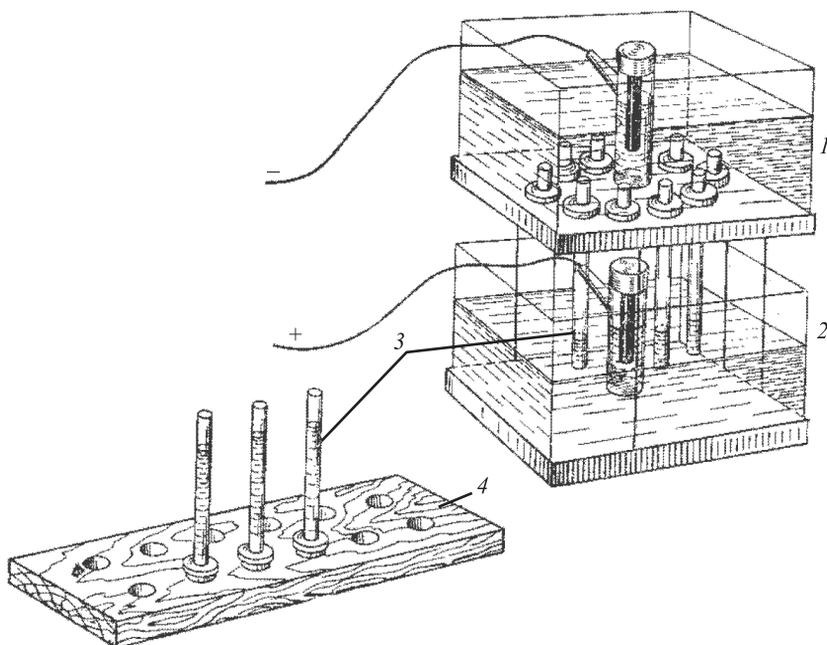


Рис. 2. Аппарат для электрофореза в полиакриламидном геле:
 электродные камеры (1, 2); трубки с гелем (3);
 штатив для заливки геля в трубки (4)

После нанесения образцов белка в трубочки наслаивают электродный буфер, затем заливают буфер в верхний резервуар. При использовании щелочных буферных растворов в них добавляют раствор бромфенолового синего из расчета 0,5–1 мл красителя на 500 мл раствора, а в случае кислых буферов – метиленовый зеленый. Краситель маркирует движущийся пограничный слой во время электрофореза.

Аппарат для электрофореза подключают к соответствующим полюсам источника постоянного тока, учитывая величины изоэлектрических точек разделяемых белков и pH буферной системы. При исследовании лабильных белков аппарат помещают в холодильник. В первые 5–10 мин электрофорез проводят при силе тока 1,5–2,0 мА на трубочку, затем силу тока увеличивают до 4–5 мА. Электрофорез заканчивают, когда окрашенная полоса достигнет нижнего конца трубочки. После завершения электрофореза прибор отключают от источника тока, сливают буферный раствор, трубочки вынимают из прибора и с помощью стальной иглы (под слоем воды) или

водой, вводимой шприцем между поверхностью геля и стенкой трубочки, выталкивают столбик геля в 7%-ный раствор уксусной кислоты. Столбики геля помещают в пробирки и добавляют раствор красителя амидового черного 10 Б. Время окрашивания 5–10 мин. В качестве красителя можно использовать кумасси R-250. В этом случае прокрашивают 1–2 ч при комнатной температуре. После окрашивания избыток красителя отмывают 7%-ным раствором уксусной кислоты, цилиндрики геля сохраняют в том же растворе кислоты.

В некоторых случаях перед разделением опытных смесей до добавления белка предварительно проводят электрофорез, при котором удаляются побочные продукты полимеризации, способные ухудшить электрофоретическое разделение, а также персульфат аммония, ингибирующий активность некоторых ферментов. Условия предварительного электрофореза: сила тока – 3–5 мА, напряжение – 200–400 В, продолжительность – около 60 мин.

Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в пластине полиакриламидного геля имеет ряд преимуществ по сравнению с электрофорезом в трубочках. Использование тонких пластин облегчает эффективное отведение тепла при электрофорезе. Процесс фиксации, прокраски и отмывания занимает значительно меньше времени. Использование одной пластины позволяет в абсолютно идентичных условиях проводить разделение сразу нескольких (10–13) проб белка. На пластины можно наносить меньше белка, чем на цилиндрические гели. В зависимости от используемого красителя, а также от природы белка на пластине полиакриламида удается обнаружить от 5 до 50 мкг белка.

В приборе для вертикального электрофореза в блоке гель полимеризуют в специальной гелевой ячейке-кассете (рис. 3). Для ее создания в выполненную из пластика рамку вставляют два стекла. Зазор между стеклами можно регулировать специальными прокладками толщиной 1, 2 или 3 мм, задающими толщину пластины полиакриламида. Стекла плотно вставляют в рамку и ячейку герметизируют с помощью специальных прокладок из силиконовой резины. В зазор между стеклами заливают смесь для полимеризации.

Если разделение проводят в геле только одного типа, раствор заливают в кассету доверху и сразу же между стеклами вставляют специальную пластинку – «гребенку». Зубцы ее образуют углубления на поверхности геля, в которые впоследствии вносят образцы белка. Если в работе используют

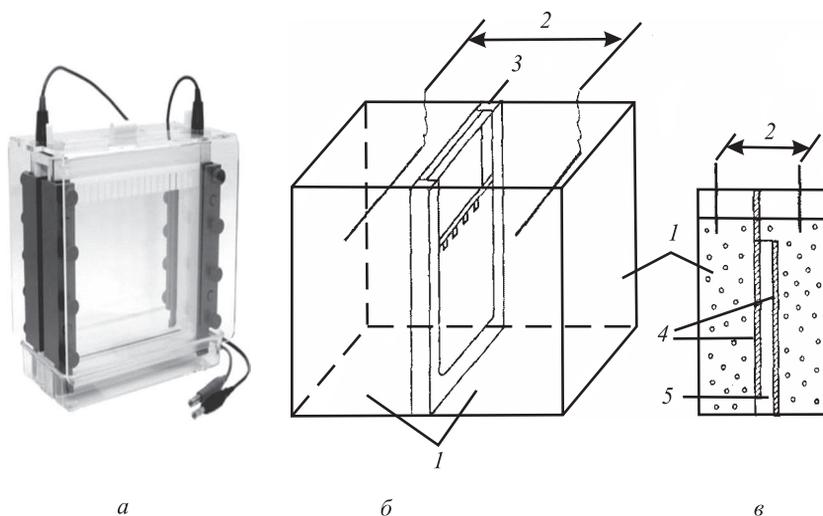


Рис. 3. Прибор для вертикального электрофореза: общий вид (а); схема прибора в пластинках полиакриламидного геля (б); поперечное сечение гелевой ячейки-кассеты (в): электродные камеры, заполненные буферным раствором (1); электроды (2); гелевая ячейка-кассета (3); стекла, образующие стенки ячейки (4); пластина полиакриламидного геля (5)

два типа гелей (концентрирующий и разделяющий), то в кассету сначала на высоту 85–95 мм от дна заливают раствор для полимеризации разделяющего геля. На него осторожно наслаивают воду и кассету оставляют в вертикальном положении до полимеризации геля. Воду удаляют, на поверхность разделяющего геля наносят смесь для полимеризации концентрирующего геля до полного заполнения кассеты и вставляют шаблон-гребенку.

После окончания полимеризации удаляют одну из герметизирующих прокладок (см. рис. 3), вынимают из геля шаблон-гребенку и вставляют ячейку в прибор. Контакт между электродными отсеками в приборе (они расположены с двух сторон от гелевой ячейки) осуществляется через пластинку полиакриламида, верхний конец которой контактирует с правым электродным отсеком, а нижний конец – с левым электродным отсеком (см. рис. 3, в). После сборки прибора электродные камеры заполняют буферным раствором, а в лунки-колодцы на поверхности геля тонко оттянутым капилляром из стекла, тефлоновой или полиэтиленовой трубочки наносят образцы белка. Необходимо, чтобы плотность образцов белка была выше плотности буферного раствора. Поэтому раствор белка готовят на 10%-ном растворе сахарозы. После нанесения образца

прибор подключают к источнику тока и проводят электрофорез. После того как маркерный краситель, вносимый с образцом белка, достигнет нижней границы пластины, источник питания выключают, сливают электродные буферы и вынимают гелевую ячейку. Из ячейки извлекают уплотнительные прокладки, аккуратно отделяют одно стекло от другого и переносят пластину геля в плоскую кювету или пластмассовую коробку. Для фиксации, прокраски и обесцвечивания используют те же растворы, как и в случае цилиндрических гелей. Время прокраски уменьшают в два раза.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Белки, обработанные концентрированным раствором додецилсульфата натрия в присутствии 3-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 их подвижность 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 раствор не отличаются между собой. Обычно используют 0,1 или 0,05 моль/л 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%-ный раствор, содержащий 0,6 % метилен-бисакриламида.

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, pH 7,2.
4. Электродный буфер – 0,05 моль/л натрий-фосфатный буфер, pH 7,2.
5. Персульфат аммония – 15 мг/мл (готовят непосредственно перед употреблением).
6. ТЕМЕД.
7. Сахароза – 40%-ный раствор.
8. Изопропиловый спирт – 70%-ный.
9. Краситель кумасси R-250 – 0,04%-ный раствор, приготовленный на 20%-ном изопропанол и 10%-ной CH_3COOH .
10. Уксусная кислота – 10%-ный раствор.
11. Додецилсульфат натрия (ДСН) – 10%-ный раствор.
12. β -меркаптоэтанол.
13. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой.

В качестве белков-маркеров можно использовать следующие белки: фосфорилаза (91 000 Да), бычий сывороточный альбумин (68 000 Да), яичный альбумин (42 000 Да), химотрипсиноген Л (27 000 Да), ингибитор трипсина из сои (24 000 Да), РНК-аза (14 000 Да), цитохром *c* (12 000 Да) и др.

Подготовка образцов. В растворы опытных и стандартных белков, содержащие 2–5 мг/мл, добавляют 10%-ный 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.

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 настилают электродный буфер. Нагрузка на гель определяется методом окраски гелей, а также способностью того или иного белка связывать используемый краситель. Как правило, при электрофорезе в трубочках удается обнаружить от 20 до 100 мкг белка, при электрофорезе в пластинке – от 4 до 15 мкг. В электродный буфер катодного отделения добавляют ДСН до концентрации 0,1 %. Электрофоретическое разделение проводят при

комнатной температуре и силе тока 8 мА на трубочку. При этом сначала устанавливают силу тока – 2 мА на трубочку (напряжение около 50 В), напряжение поднимают до 100–200 В лишь после того, как образцы войдут в гель. При проведении электрофореза в пластине напряженность электрического поля сначала устанавливают равной 6–7 В/см, после проникновения образцов в разделяющий гель напряженность можно увеличивать до 15–20 В/см. Разделение проводят до тех пор, пока краситель не пройдет 4/5 всей длины геля. Обычно это занимает 4–6 ч. После этого электрофорез прекращают, вынимают гель и помещают его для фиксации в 70%-ный изопропанол на 0,5–1 ч. Затем гели прокрашивают раствором кумасси R-250 в течение 2–3 ч. Избыток краски удаляют промыванием 10%-ным 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 I_a , пройденного данным белком, а по оси ординат – логарифм его молекулярной массы. Определив длину пути, пройденного белком с неизвестной молекулярной массой I_x , пользуясь калибровочным графиком, определяют молекулярную массу исследуемого белка. При проведении электрофореза в трубочках часто трудно получить хорошо воспроизводимые результаты на разных трубочках. 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.

Метод Лэмбли

Реактивы:

1. Акриламид – 30%-ный раствор, приготовленный на 0,4%-ном растворе метилен-бисакриламида. 29,6 г акриламида и 0,4 г метилен-бисакриламида растворяют в воде и объем раствора доводят до 100 мл. Раствор хранят в темной склянке в холодильнике. **Внимание! Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках!**

2. Буфер для приготовления разделяющего геля – 1,5 моль/л трис-НСI буфер, содержащий 0,4 % ДСН, рН 8,8.

3. Буфер для приготовления концентрирующего геля – 0,5 моль/л трис-НСI буфер, содержащий 0,4%-ный ДСН, рН 6,8.

4. Электродный буфер: 0,025 моль/л трис, 0,192 моль/л глицин, рН 8,6. Необходимую навеску глицина растворяют в воде и добавляют сухой трис до рН 8,6, после чего объем раствора доводят водой до нужной величины.

Электродный буфер катодного отделения камеры содержит помимо указанных компонентов ДСН в концентрации 0,1 %.

5. Буфер для приготовления образцов: 0,0625 моль/л трис-НСI буфер, рН 6,8, 2%-ный ДСН, 10%-ный раствор сахарозы (или глицерина), 0,001%-ный бромфеноловый синий. Перед употреблением в указанный раствор добавляют β -меркаптоэтанол до конечной концентрации 5 %.

6. Персульфат аммония.

7. ТЕМЕД.

8. Изопропиловый спирт – 70%-ный раствор.

9. Уксусная кислота – 10%-ный раствор.

10. Кумасси R-250 – 0,04%-ный раствор, приготовленный на смеси: изопропанол – этанол – уксусная кислота – вода в соотношении 2 : 1 : 1 : 6.

11. Набор белков-маркеров с известной молекулярной массой.

Приготовление геля. Для полимеризации 30 мл разделяющего геля (12,5 %) смешивают 12,5 мл раствора акриламида, 7,5 мл буфера разделяющего геля и 10 мл воды. После деаэрирования (5–10 мин на водоструйном насосе) к смеси добавляют 16 мг персульфата аммония и 18 мкл ТЕМЕД. Полученный раствор заливают либо в гелевую ячейку для вертикального электрофореза в пластине, либо в трубки. На поверхность раствора настилают воду. После полимеризации удаляют воду шприцем или фитилем из фильтровальной бумаги. Готовят смесь для концентрирующего геля. Смешивают 4 мл раствора 1 с 5 мл буфера концентрирующего геля и добавляют 11 мл воды (суммарный объем 20 мл). Полученную смесь деаэрируют, добавляют 15 мг персульфата аммония и 16 мкл ТЕМЕД и наносят на вершину уже заполимеризовавшегося разделяющего геля. Обычно длина концентрирующего геля в 5–6 раз меньше длины разделяющего геля. На поверхность полимеризуемых гелей настилают воду.

Подготовка образцов. Исследуемые и стандартные белки-маркеры растворяют в буферном растворе для приготовления образцов в количестве 1–2 мг/мл и нагревают 5–10 мин на кипящей водяной бане. Исследуемые образцы белков не должны содержать ионов K^+ и NH_4^+ .

Электрофорез и обработку электрофореграмм проводят, как описано на стр. 61–62.

Перекристаллизация акриламидов

Осторожно! Акриламид и бисакриламид чрезвычайно токсичны, поэтому следует принимать соответствующие меры предосторожности, чтобы они не попали на кожу, а также чтобы исключить вдыхание мелких кристаллов.

Акриламид. 200 г растворяют в 1 л CHCl_3 , нагревают до кипения и фильтруют без отсасывания с помощью воронки для горячего фильтрования через фильтр ватман № 541. Фильтр охлаждают до комнатной температуры и оставляют на ночь при $t = -15^\circ\text{C}$. Выпавшие кристаллы отделяют путем фильтрования с отсасыванием, используя воронку с охлаждением, и промывают 300 мл холодного CHCl_3 . Кристаллы высушивают на воздухе в умеренно нагретом сушильном шкафу.

Бисакриламид. 100 г растворяют в 500 мл кипящего MeOH и фильтруют без отсасывания через воронку для горячего фильтрования. Фильтр охлаждают до комнатной температуры и оставляют на ночь при $t = -15^\circ\text{C}$. Выпавшие кристаллы собирают путем фильтрования с отсасыванием, используя воронку с охлаждением, и промывают 300 мл холодного MeOH . Кристаллы высушивают на воздухе в умеренно нагретом сушильном шкафу.

МЕТОД ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

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 мелкие 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 т. д.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели *P*, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели *A*) 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 pH 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.

При работе сефадексам дают предварительно набухнуть в избытке растворителя. Время и температура набухания указаны в соответствующих таблицах.

Реактивы:

1. Натрий-фосфатный или калий-фосфатный буфер – 0,05 моль/л раствор, содержащий 0,05 моль/л KCl, pH 6,5.
2. Сефадекс G-100.
3. Белки с определенной молекулярной массой (Да): яичный альбумин (45 000), бычий сывороточный альбумин (68 000), рибонуклеаза из поджелудочной железы (12 700), цитохром *c* (13 000).
4. Голубой декстран (2 000 000 Да).
5. Сахароза.

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

Подготавливают колонку (размером 1,5×50 см³), 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 в целях 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: $h = 20\text{--}50$ 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 *c* 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, 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.).

Для аналитических целей рекомендуется отношение длины к диаметру колонки 10 : 1 или 20 : 1. При обессоливании используют более короткие и широкие колонки. Объем наносимого образца при аналитическом разделении должен быть по возможности небольшим (2–3 % от общего объема колонки – V_0). При обессоливании его можно увеличить до 20–30 %. Рекомендуемая концентрация белка – 1 %. При анализе высокомолекулярных белков концентрацию уменьшают до 0,1–0,5 %.

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 *c* – 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. Многократное использование колонки с сефадексом приводит к замедлению протекания жидкости через нее. В этом случае гель извлекают из колонки, отмучивают его от мелких частиц, и колонку набивают заново.

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

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- или дезоксирибонуклеотидом.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ДНК) В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Наиболее часто при электрофорезе нуклеиновых кислот используют агарозный гель. Средний радиус пор геля 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 ограничивать 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 агарозном геле широко используется для фракционирования нуклеиновых кислот.

Оборудование:

1. Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.
2. Иммунологический планшет с ячейками на 100 мкл.
3. Источник питания ПЭФА-1 УХЛ 4.2.
4. Источник УФ-света
5. Видеоденситометр, цифровой фотоаппарат или другое оборудование для обработки и документирования результатов.

Реактивы:

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

Проведение электрофореза. 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.

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%-ного раствора бромфенолового синего в 30%-ном растворе глицерина и 5 мкл 7%-ного

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, учитывая, 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. 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.

Оценка повреждений ДНК

Большинство генотоксических соединений при их метаболической активации способны активно взаимодействовать с ДНК, вызывая в ней различные повреждения. Эти повреждения, независимо от механизма их возникновения, являются мерой генотоксичности химических соединений. Повреждения можно оценивать, так как при алкилировании ДНК агентами с двумя реакционноспособными центрами (такими как аминоксифенилы бензидинового ряда), N-7-гуанин, благодаря большой реакционной способности, может образовывать ковалентные межнитевые сшивки.

Реактивы:

1. $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л раствор бензидина (БД), приготовленный на 50%-ном растворе диметилформамида. Навеску бензидина растворяют в 100%-ном диметилформамиде, после чего добавляют равный объем дистиллированной воды.

2. 10 ммоль/л раствор пероксида водорода.

3. 0,1 моль/л цитратно-ацетатный буфер (рН 5,5).

4. Пероксидаза из хрена в цитратно-ацетатном буфере (рН 5,5).

5. ДНК фага λ .

Ход работы. Пероксидазное окисление проводят в реакционной смеси. Для этого в ячейки иммунологического планшета приливают 100 мкл рабочего раствора, содержащего пероксидазу из хрена ($1,25 \cdot 10^{-9}$ моль/л), 0,1 моль/л цитратно-ацетатный буфер (рН 5,5), бензидин в концентрациях 10^{-6} моль/л, $8 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, ДНК фага λ (2 мкг на ячейку). Контрольная проба не содержит раствора бензидина. Смесь инкубируют в течение 4 мин при температуре 30 °С, после чего реакцию запускают добавлением H_2O_2 до конечной концентрации 1 ммоль/л. Реакцию проводят в течение 3 мин.

После проведения реакции для установления степени повреждения ДНК продуктами пероксидазного окисления бензидина полученные реакционные системы подвергают электрофорезу в агарозном геле (см. стр. 67).

О наличии или об отсутствии повреждения ДНК судят по интенсивности и ширине зон флуоресценции агарозного геля.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (РНК) В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Возможность электрофоретического разделения РНК в полиакриламидном геле определяется тем, что размер его пор, а также его свойства как молекулярного сита варьируются 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'-метилден-бисакриламид.

3. ТЕМЕД.

4. 10%-ный раствор персульфата аммония.

5. 40%-ный раствор сахарозы.

6. 0,25%-ный 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. Раствор уксусной кислоты, 1 моль/л.

9. 0,2%-ный раствор метиленового синего в 0,4 моль/л ацетатном буфера.

Проведение электрофореза. В пластиковую рамку ячейки-кассеты вставляют два стекла. Дальнейшую работу проводят, как при электрофоретическом разделении белков. Готовят смесь для полимеризации. К 2,4 г акриламида и 0,13 г N,N'-метилен-бисакриламида 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%-ного 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 «гребенку». Процесс полимеризации проводят без доступа кислорода, для чего после добавления в камеру полимеризуемой смеси на нее настилают 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, ячейку вставляют в прибор, электродные камеры заполняют буферным раствором, а в лунки на поверхности геля микропипеткой наносят 0,03 мл раствора, содержащего РНК, 40%-ный раствор сахарозы (ее конечная концентрация 20 %), 0,01 мл 0,25%-ного водного раствора бромфенолового синего. Сахароза повышает плотность раствора РНК по сравнению с плотностью буфера и обеспечивает надежный контакт исследуемого образца с поверхностью геля.

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 достают 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%-ным 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 сканируют и фотографируют с помощью цифрового фотоаппарата.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОХРАНЕ ТРУДА ПРИ РАБОТЕ С ХИМИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ В ЛАБОРАТОРИЯХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА

1. Общие требования безопасности

1.1. К работе с химическими веществами допускаются лица не моложе 18 лет, прошедшие медицинский осмотр (предварительный – при устройстве на работу, периодический – 1 раз в 3 года), не имеющие противопоказаний и допущенные по состоянию здоровья к работе, прошедшие обучение и инструктаж по охране труда:

1.1.1. первичный – на рабочем месте;

1.1.2. повторный – не реже одного раза в 6 месяцев;

1.1.3. внеплановый – при принятии новых нормативных правовых актов, изменений и дополнений в инструкцию; нарушении работником инструкции, что могло привести к несчастному случаю; при поступлении информации о несчастных случаях, происшедших в однопрофильных организациях; целевой – при выполнении разовых работ, не связанных с прямыми обязанностями по специальности (погрузка, разгрузка, уборка территории и т. д.).

1.2. Работник обязан соблюдать правила внутреннего трудового распорядка, правила пожарной безопасности, знать места расположения средств пожаротушения (огнетушители, кошма, одеяло, песок). Загромождение и захламление помещений, проходов, подходов к средствам пожаротушения, кранам выключения воды, шкафам и электрощитам не допускается. Курить разрешается только в специально отведенных местах.

1.3. Запрещается употребление алкогольных, наркотических и токсических средств перед работой и в процессе работы.

1.4. Во время работы на работника могут воздействовать следующие опасные и вредные производственные факторы:

1.4.1. токсичность химических веществ;

1.4.2. опасность получения химических и термических ожогов;

1.4.3. повышенная загазованность воздуха рабочей зоны;

1.4.4. пожароопасность, способность к взрывам легко воспламеняющихся и горючих жидкостей (ЛВЖ и ГЖ);

1.4.5. опасность травмирования осколками стекла;

1.4.6. опасность поражения электрическим током;

1.4.7. недостаточная освещенность рабочей зоны.

1.5. В соответствии с типовыми нормами выдачи средств индивидуальной защиты, приложением № 5 к Коллективному договору 2007–2010 гг., работнику выдается:

№ п/п	Средства индивидуальной защиты	Классификация (маркировка средств индивидуальной защиты по защитным свойствам)	Срок носки в месяцах
1	Халат хлопчатобумажный или с кислотозащитной пропиткой	ЗМи К20Щ20	12
2	Фартук виниловый кислотощелочестойкий с нагрудником	К80Щ50	дежурный
3	Перчатки из поливинилхлорида	КкЩ50	до износа
4	Очки защитные или щиток защитный лицевой	ЗНГ НБХ	до износа
5	Противогаз фильтрующий		дежурный

1.6. Работник обязан:

1.6.1. работать на исправном оборудовании, с исправными приспособлениями, используя их по прямому назначению;

1.6.2. выполнять только ту работу, которая ему поручена и по которой он проинструктирован по охране труда;

1.6.3. во время работы быть внимательным, не отвлекаться посторонними делами и разговорами, а также не отвлекать других;

1.6.4. соблюдать все указания по безопасному обращению с реактивами и растворами, наполнению сосудов и т. п.

1.6.5. сообщать непосредственному руководителю работ о замеченных нарушениях требований безопасности на своем рабочем месте, а также о неисправностях оборудования, приспособлений, средств индивидуальной защиты и не приступать к работе до устранения этих неисправностей. Когда неисправность может устранить сам работник, то он обязан сделать это немедленно, а затем доложить об этом начальнику;

1.6.6. для защиты кожи рук применять силиконовый крем;

1.6.7. соблюдать правила личной гигиены:

1.6.7.1. мыть руки водой с мылом перед приемом пищи, посещением туалета и курением;

1.6.7.2. не хранить пищу на рабочем месте, принимать пищу в специально оборудованном для этой цели помещении;

1.6.8. знать, где находится аптечка с набором медикаментов;

1.6.9. вести журнал производства работ.

1.7. При выполнении работ с химическими веществами в любое время суток в лаборатории должны находиться не менее двух человек, при этом один из них назначается старшим.

1.8. Химические вещества хранить в лабораториях с учетом их суточной потребности, а также по принципу однородности в соответствии с их физико-химическими свойствами.

1.9. Запрещается:

1.9.1. пробовать на вкус химические вещества;

1.9.2. нюхать какие-либо вещества, вдыхая полной грудью, а не направляя к себе пары движением руки;

1.9.3. пользоваться вытяжными шкапами с разбитыми стеклами или с неисправной вентиляционной тягой;

1.9.4. работать без вытяжки с ЛВЖ и ГЖ, летучими веществами, например, соляной, азотной кислотами, аммиачными жидкостями и др.;

1.9.5. нагревать ЛВЖ и ГЖ на открытых электрических плитках;

1.9.6. покидать рабочее место, оставляя без присмотра химические вещества, зажженные горелки и нагревательные приборы;

1.9.7. хранить растворы щелочей, концентрированных кислот, ЛВЖ и ГЖ в тонкостенной стеклянной посуде;

1.9.8. оставлять химические вещества в посуде без этикеток;

1.9.9. проводить химические опыты в грязной или поврежденной посуде;

1.9.10. загромождать рабочие места склянками с реактивами, ненужными приборами;

1.9.11. оставлять не убранные пролитые и рассыпанные на рабочих местах и полу химические вещества;

1.9.12. мыть полы и стены органическими растворителями.

1.10. При каждом несчастном случае, очевидцем которого стал работник, он должен немедленно оказать пострадавшему первую доврачебную помощь, вызвать врача или доставить пострадавшего в ближайшее медицинское учреждение, сообщить руководителю структурного подразделения.

1.11. За нарушение требований инструкции работник несет ответственность согласно Правилам внутреннего трудового распорядка и действующему законодательству Республики Беларусь.

2. Требования безопасности перед началом работы

2.1. Перед началом работы работник должен надеть спецодежду, застегнуть ее на все пуговицы.

2.2. Подготовить средства защиты глаз, органов дыхания и кожи.

2.3. Освободить рабочее место от всех ненужных для работы предметов.

2.4. Провести внешний осмотр приборов, с которыми предстоит работать, проверить их исправность, заземление, целостность сетевого кабеля.

2.5. Проверить целостность посуды.

2.6. Ознакомиться со свойствами реактивов, с которыми будет проводиться работа, изучить инструкцию (методику) по ее выполнению.

2.7. Включить вентиляционную тягу.

3. Требования безопасности во время работы

3.1. Кислоты и щелочи.

3.1.1. Кислоты и щелочи в своем большинстве относятся к веществам повышенной опасности, поэтому в целях предотвращения химических ожогов и отравлений у работников на рабочих местах необходимо иметь соответствующие нейтрализующие вещества.

3.1.2. Расфасовку кислот необходимо производить в специальном помещении, концентрированные кислоты должны поступать в лабораторию в таре емкостью не более 1 литра. Стеклообразные бутылки должны плотно закрываться пробками и заполняться не более 80 % их объема.

3.1.3. Переливать концентрированные кислоты следует только с включенной местной вентиляцией или в вытяжном шкафу при помощи сифонов с грушей или ручных насосов. В случае перерыва действия вентиляции все работы в вытяжных шкафах немедленно прекратить.

3.1.4. Для приготовления растворов серной, азотной и других кислот их необходимо приливать в воду тонкой струей при непрерывном перемешивании. Приливать воду в кислоту **запрещается!**

3.1.5. Не применять серную кислоту в вакуумэксикаторах в качестве водопоглощающего средства.

3.1.6. При работе с плавиковой кислотой следует соблюдать особую осторожность. Попадание кислоты на кожу, в особенности на ногти вызывает сильную боль и трудно заживающие раны. Вдыхание паров плавиковой кислоты вызывает воспаление верхних дыхательных путей и порчу зубов. Для хранения плавиковой кислоты следует применять бутылки из полиэтилена, так как она разрушает стекло.

3.1.7. При смешивании веществ, сопровождающимся выделением тепла, необходимо пользоваться термостойкой стеклянной или фарфоровой посудой. Сосуд с горячей смесью нельзя закрывать плотно пробкой до тех пор, пока он не остынет.

3.1.8. Растворение щелочей следует производить путем прибавления к воде небольших порций вещества при непрерывном помешивании и охлаждении. Щелочь необходимо брать фарфоровыми ложечками, совочками или шпателями, так как она и в сухом виде при попадании на кожу может вызвать ожоги.

3.1.9. Во избежание ожогов полости рта, а также возможности отравления, **запрещается!** набирать растворы кислот и щелочей в пипетку ртом. Для этой цели следует применять резиновую грушу или другие приспособления для отбора проб.

3.1.10. Хромовая смесь, используемая для мытья посуды, вызывает сильные ожоги, а также может причинить тяжелое хроническое заболевание с омертвлением тканей почти до костей, поэтому мыть посуду хромовой смесью необходимо в перчатках, фартуке, защитных очках или маске.

3.1.11. В лабораториях концентрированные растворы кислот хранить в бутылках на противнях под тягой или в нижней части вытяжного шкафа. Недопустимо совместное хранение органических и неорганических кислот.

3.1.12. Хранить твердые щелочи и их растворы необходимо в хорошо закрытой посуде. Бутылки со щелочами нельзя закрывать стеклянными притертými пробками.

3.1.13. Отработанные кислоты и щелочи следует собирать отдельно в специальную посуду и после нейтрализации сливать в канализацию (или другое место, определенное для этих целей).

3.2. Легковоспламеняющиеся и горючие жидкости.

3.2.1. Работник должен помнить, что легковоспламеняющимися жидкостями являются горючие жидкости с температурой вспышки в закрытом тигле не выше 334 °К (61 °С), отличающиеся способностью образовывать паровоздушные смеси, воспламенение которых возможно не только от открытого пламени, но и от предметов, нагретых до температуры, превышающей температуру самовоспламенения данной смеси.

3.2.2. ЛВЖ и ГЖ следует доставлять в лабораторию в закрытой посуде, помещенной в тару с ручками. Емкость стеклянной посуды при работе с ЛВЖ и ГЖ не должна превышать 1 литра.

3.2.3. Запас хранящихся в каждом рабочем помещении ЛВЖ и ГЖ не должен превышать суточной потребности – не более 5 литров. Суточная норма потребности ЛВЖ и ГЖ должна быть согласована и утверждена руководителем структурного подразделения. При выполнении работ с большим количеством (свыше 5 л) огнеопасных жидкостей руководитель структурного подразделения должен получить письменное разрешение проректора, курирующего данное подразделение, согласованное с управлением охраны труда и инспектором Госпожарнадзора.

3.2.4. **Запрещается!** хранение в лабораториях ЛВЖ с температурой кипения ниже 323 К (50 °С) (дивинил, изопрен, диэтиловый эфир и др.) в количествах, превышающих суточную потребность.

3.2.5. Хранить ЛВЖ и ГЖ в лаборатории необходимо в толстостенной стеклянной посуде с герметично закрывающимися пробками, помещенной в специальные металлические ящики с крышками, стенки и дно которых должны быть выложены стеклотканью.

3.2.6. Переливать ЛВЖ и ГЖ следует только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, выключенных электронагревательных приборах и отсутствии рядом окислителей (азотная кислота, бром, перекись водорода, хлораты и др.).

3.2.7. ЛВЖ и ГЖ перед анализом, требующим нагрева, должны быть предварительно обезвожены во избежание вспенивания и разбрызгивания.

3.2.8. При работах, связанных с подогревом и последующей конденсацией и охлаждением паров ЛВЖ и ГЖ (разгонке, кипячении и др.), нужно сначала отрегулировать поток воды, проходящий через холодильник, и только после этого включить электронагревательные приборы.

3.2.9. Производить нагревание и перегонку ЛВЖ необходимо в круглодонных тонкостенных колбах на водяной или масляной бане с использованием электроплиток с закрытой спиралью и регулятором температуры. Электроплитку следует размещать таким образом, чтобы ее можно было легко удалить в случае аварии. Досуха перегонка ЛВЖ **запрещена!**

3.2.10. Отгонка ЛВЖ с использованием вакуум-насосов, роторных вакуумных испарителей, центрифуг должна производиться только после изучения и усвоения исполнителями инструкций по технике безопасности на проведение таких работ.

3.2.11. В случае прекращения подачи воды при работающей установке по перегонке ЛВЖ следует прекратить процесс перегонки, отключить электроэнергию, перекрыть краны подачи воды, опустить баню или колбо-нагреватель.

3.2.12. **Запрещается!** вносить посторонние тела, особенно пористые и порошкообразные (активированный уголь, пензу, капилляры и т. п.) в нагретые ЛВЖ.

3.2.13. Не допускать перегрева реакционной смеси или перегоняемой жидкости, приводящего к слишком бурному ходу реакции или внезапному вскипанию перегретой жидкости.

3.2.14. **Запрещается!** нагревать на водяных банях вещества, вступающие в реакцию, в результате которой может произойти взрыв или выделение паров и газов.

3.2.15. Следует соблюдать особую осторожность при работе с диэтиловым эфиром. Из-за низкой температуры вспышки (20 °С) достаточно очень небольшого источника для его воспламенения или взрыва паров в смеси с воздухом.

3.2.16. Диэтиловый эфир следует хранить в посуде из темного стекла, изолированной от других веществ, в холодном и темном месте, так как при его хранении на свету образуется взрывчатое вещество – пероксиды.

3.2.17. Перед разборкой приборов с ЛВЖ необходимо убедиться в отсутствии вблизи включенных газовых горелок и электронагревательных приборов.

3.2.18. Сосуды, в которых проводились работы с ЛВЖ и ГЖ, после окончания работы должны быть немедленно освобождены от оставшейся жидкости и промыты.

3.2.19. Посуду после органических веществ нельзя мыть хромовой смесью, так как возможны возгорания и взрыв.

3.2.20. **Запрещается!** выливать горючие жидкости в канализацию. Отработанные жидкости следует собирать в соответствии с характером вещества отдельно в специально герметично закрывающую посуду, в которой их в конце рабочего дня удаляют из лаборатории для регенерации или уничтожения в установленном месте.

3.2.21. Спецдежду, загрязненную ЛВЖ и ГЖ, а также окислителями, необходимо немедленно заменить во избежание возможного воспламенения.

4. Требования безопасности в аварийных ситуациях

4.1. При возникновении ситуаций, которые могут привести к аварии или несчастным случаям необходимо немедленно прекратить работу и обеспечить электрооборудование.

4.2. В случае возникновения пожара, работник обязан:

4.2.1. немедленно сообщить в пожарную аварийно-спасательную службу по тел. 101, четко назвать адрес учреждения, место пожара, свою фамилию и должность, а также сообщить о наличии в здании людей;

4.2.3. приступить к ликвидации пожара имеющимися первичными средствами пожаротушения, оповещению людей, их эвакуации и эвакуации материальных ценностей, предотвращению паники;

4.2.3. обеспечить встречу пожарных аварийно-спасательных подразделений;

4.2.4. принять меры по вызову к месту пожара администрации учреждения.

4.3. Возникший пожар следует ликвидировать на месте путем прекращения доступа воздуха к горящей зоне. Для этого использовать углекислотные, порошковые огнетушители, мокрые тряпки, кошму, одеяло, песок.

4.4. При возгорании не растворимых в воде веществ (эферы, углеводороды и их производные, высшие спирты) нельзя применять для тушения воду, так как пожар не только не будет локализован, но даже может усилиться. Многие огнеопасные органические вещества легче воды и при соприкосновении с ней образуют горящую пленку. Следует тушить песком, накрыванием противопожарным полотнищем, порошковыми огнетушителями.

4.5. При возгорании веществ растворимых в воде (низшие спирты, ацетон, диметилформамид, диоксан) их можно гасить водой, а также вышеуказанными средствами.

4.6. При получении травмы на производстве пострадавшего освобождают от действия травмирующего фактора – электрического тока, механизмов и др.,

на месте оказывают первую помощь с использованием средств и медикаментов, имеющихся в аптечке лаборатории, при необходимости отправляют в медицинское учреждение, сообщают о случившемся непосредственному руководителю. Сохраняют рабочее место без изменений на момент получения травмы, если это не угрожает окружающим.

4.7. При проливе концентрированных кислот или растворов щелочей, необходимо место пролива засыпать песком, нейтрализовать слабыми растворами щелочей и кислот (2–3%-ными) соответственно, после этого произвести уборку и проветрить помещение. Осколки разбитого стекла собрать при помощи щетки и совка.

4.8. При случайном разливе горючей жидкости необходимо немедленно выключить все источники открытого огня и электронагревательные приборы (если пролито большое количество горючей жидкости, то отключить источники открытого огня и в соседних лабораториях). Место пролива жидкости засыпать песком, загрязненный песок собрать совком. Ликвидировать аварию, связанную с разливом ЛВЖ и ГЖ, необходимо используя средства индивидуальной защиты. Даже разлив 50 мл ЛВЖ можно считать аварийным, так как это приводит к превышению ПДК в 100 и более раз.

4.9. При ожогах кожи кислотами и щелочами следует быстро промыть обожженное место сильной струей воды на протяжении 10–15 мин, затем наложить примочку из раствора пищевой соды (1 ч. л. на стакан воды) – при ожоге кислотой, и из борной кислоты или столового уксуса (1 ч. л. на стакан воды) – при ожоге щелочью.

4.10. В случае попадания брызг плавиковой кислоты на кожу следует немедленно промыть обожженное место сильной струей воды и приложить компресс из 5%-ного раствора бикарбоната натрия.

4.11. При термических ожогах обожженное место следует присыпать бикарбонатом натрия (содой), крахмалом, тальком или сделать примочки из свежеприготовленных 2%-ных растворов соды, перманганата калия или неразбавленного этилового спирта в зависимости от степени термического ожога.

4.12. При попадании в глаза брызг кислоты или щелочи необходимо их промывать длительное время большим количеством воды, направляя нерезкую струю воды прямо в глаз, а затем промыть 3%-ным раствором пищевой соды (при попадании кислоты) или 2%-ным раствором борной кислоты (при попадании щелочи).

4.13. При попадании в глаза посторонних предметов (стекло и др.) удаление их должен проводить только медицинский работник.

4.14. При порезах рук или других частей тела стеклом необходимо удалить из раны мелкие осколки, после чего промыть ее 2%-ным раствором перманганата калия или этиловым спиртом, смазать йодной настойкой и забинтовать.

4.15. При случайном отравлении хлороформом, толуолом, ксилолами необходимо промыть рот, глаза, нос раствором бикарбоната натрия, дать молоко и затем 10 г окиси магния в 150 мл воды и кислородную подушку.

4.16. При отравлении дихлорэтаном – при легком отравлении пострадавшего вывести на свежий воздух, дать крепкий чай, при приеме внутрь – вызвать рвоту, выпить 8–10 стаканов воды или слабого (розового) раствора перманганата калия и вызвать рвоту, повторить промывание желудка и дать солевое слабительное.

5. Требования безопасности по окончании работы

5.1. Выключить приборы из электросети и произвести разборку лабораторных приборов.

5.2. Вымыть посуду, привести в порядок рабочий стол.

5.3. Закрыть банки с реактивами и поставить их в установленные места хранения.

5.4. Вымыть руки с мылом, снять спецодежду и повесить ее в установленное место.

5.5. Закрыть водопроводные краны, отключить вентиляционную тягу, выключить свет.

5.6. Отключить напряжение в сети общим рубильником (выключателем), если в лаборатории нет приборов и аппаратов, которые работают круглосуточно (термостат, холодильник и др.). На дверях лабораторий, где они находятся, должны быть таблички с надписями «Включен термостат», «Включен холодильник».

ПЕРИОДИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА

1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
IA		IIA		IIIB		IVB		VB		VIB		VIIB		VIIIB		VIIIB		IIB		IIB		IIB	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
1		2																					

ЛИТЕРАТУРА

- Березов, Т. Т.* Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. М. : Медицина, 1990.
- Биохимия : учебник для вузов / под ред. Е. С. Северина. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006.
- Горбачев, В. В.* Витамины, микро- и макроэлементы. Справочник / В. В. Горбачев, В. Н. Горбачева. Минск : Книжный Дом; Интерпрессервис, 2002.
- Комов, В. П.* Биохимия / В. П. Комов, В. Н. Шведова. М. : Дрофа, 2004.
- Коничев, А. С.* Биохимия и молекулярная биология. Словарь терминов / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. М. : Дрофа, 2008.
- Кочетов, Г. А.* Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. М. : Высш. шк., 1980.
- Остерман, Л. А.* Исследование биологических макромолекул изоэлектрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л. А. Остерман. М. : Наука, 1983.
- Остерман, Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот : Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л. А. Остерман. М. : Наука, 1981.
- Остерман, Л. А.* Хроматографические методы исследования / Л. А. Остерман. М. : Наука, 1985.
- Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. М. : МГУ, 1989.
- Проблема нормы в токсикологии / И. М. Трахтенберг [и др.]. М. : Медицина, 1991.
- Рогожин, В. В.* Практикум по биологической химии / В. В. Рогожин. М. : Лань, 2006.
- Справочник биохимика / Р. Досон [и др.]. М. : Мир, 1991.
- Цыганов, А. Р.* Практикум по биохимии / А. Р. Цыганов, И. В. Сучкова, И. В. Ковалева / М. : ИВЦ Минфина, 2007.

Рекомендуемые источники информации в Интернете

- www.chem.qmul.ac.uk/iubmb – биохимическая классификация и номенклатура ферментов. Свободный доступ на сайте Международного союза биохимии и молекулярной биологии.
- www.molbiol.ru – сайт практической молекулярной биологии. Учебники, научные монографии, обзоры, лабораторные практикумы в свободном доступе.
- www.swissprot.com – свободный доступ к международной базе данных по первичным и 3D структурам ферментов.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
Список обозначений, принятых в биохимической литературе	5
Основные единицы измерения, производные величины и константы.....	6
Приготовление растворов и реактивов	8
Относительная плотность и концентрация минеральных кислот	14
Буферные смеси	16
Основные физико-химические свойства некоторых реагентов.....	20
Основные физико-химические свойства аминов, аминокислот и пептидов	25
Основные физико-химические свойства моно-, олиго- и полисахаридов	32
Наиболее распространенные жирные кислоты.....	39
Единицы ферментативной активности.....	40
Основные витамины и их активная форма	41
Спектральные характеристики нуклеотидов	41
Основные понятия спектрофотометрии.....	42
Интервалы длин волн поглощаемого излучения	43
Биохимические показатели нормы	43
Методы количественного определения белка в биологическом материале	44
Методы осаждения, разделения и очистки белков.....	50
Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот.....	67
Инструкция по охране труда при работе с химическими веществами в лабораториях биологического факультета	72
Литература	82

Учебное издание

БИОХИМИЯ:
справочник студента

Учебно-методическое пособие
для студентов биологического факультета,
обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология»
специализации 1-31 01-02 05 «Биохимия»

С о с т а в и т е л и

Кукулянская Татьяна Александровна
Орел Наталия Михайловна

Редактор *Ю. Н. Гойко*
Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Т. К. Раманович*
Корректор *В. И. Богданович*
Компьютерная верстка *Л. Л. Мартыновой*

Подписано в печать 24.01.2011. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 5,11. Уч.-изд. л. 5,4.
Тираж 200 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0494425 от 08.04.2009.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Отпечатано с оригинала-макета заказчика.
Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
ЛП № 02330/0494178 от 03.04.2009.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.