

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Методические рекомендации для
самостоятельной работы обучающихся по дисциплине**

Б1.В.ОД.4.1 Методы биохимических исследований

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

Направленность программы Биохимия

Нормативный срок обучения 4 года

Форма обучения очная

Квалификация (степень) Исследователь. Преподаватель-исследователь

СОДЕРЖАНИЕ

1. Организация самостоятельной работы.....	3
2. Методические рекомендации по самостоятельному изучению вопросов.....	4
3. Методические рекомендации по подготовке к занятиям.....	5
3.1. Лабораторная работа 1.Оборудование биохимической лаборатории.....	5
3.2. Лабораторная работа 2. Методы выделения органелл.....	5
3.3. Лабораторная работа 3. Электрофорез.....	5
3.4. Лабораторная работа 4. Спектральные методы. Методы меченых атомов.....	5
3.5.Лабораторная работа 5. Электрофорез белков.....	6
3.6. Лабораторная работа 6. Спектрофотометрический метод анализа.....	6
3.7. Лабораторная работа 7. Спектрофотометрический метод анализа.....	6
3.8. Лабораторная работа 8. Варианты методик ИФА.....	6
3.9. Лабораторная работа 9 Варианты методик ИФА.....	6
3.10. Лабораторная работа 10. Бумажная хроматография.....	7

1. ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1.1. Организационно-методические данные дисциплины

№ п.п.	Наименование темы	Общий объем часов по видам самостоятельной работы (из табл. 5.1 РПД)				
		подготовка курсового проекта (работы)	подготовка реферата/эссе	индивидуальные домашние задания (ИДЗ)	самостоятельное изучение вопросов (СИБ)	подготовка к занятиям (ПкЗ)
1	2	3	4	5	6	7
1	Тема 1. Общие принципы биохимического исследования. Методы препаративной химии и биохимии	-	-	-	10	10
2	Тема 2. Методы выделения органелл.	-	-	-	10	10
3	Тема 3. Электрофорез	-	-	-	6	6
4	Тема 4. Спектральные методы. Методы меченых атомов	-	-	-	10	10
5	Тема 5. Иммуноферментный анализ	-	-	-	3	3
	Итого	-	-	-	39	39

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САМОСТОЯТЕЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВОПРОСОВ

2.1. Общие принципы биохимического исследования. Методы препаративной химии и биохимии

При изучении вопроса необходимо иметь представление о биохимических методах исследования, которые применяются в биологических науках. Знать, что биохимические исследования проводятся для получения информации о многочисленных химических и физико-химических процессах, протекающих в клетках и тканях живых организмов в норме и при патологии. Необходимо выделить следующие проблемы выделения в индивидуальном виде структурных элементов из живых организмов:

1) Исходный материал (биомасса) состоит из сотен и даже тысяч разных соединений. Разделение такой смеси довольно сложно, мало того, многие индивидуальные компоненты смеси построены довольно однотипно. В связи с этим они мало различаются между собой по физико-химическим характеристикам, например по способности к сорбции на определенном типе сорбента или растворимости, подвижности в электромагнитном поле и так далее.

2) Работа с биологическими объектами зачастую сопровождается необходимостью манипулировать с очень небольшими количествами первоначального вещества. При ничтожно малом количестве исходного материала методы детекции должны быть крайне чувствительными.

2.2. Методы выделения органелл.

Следует знать, что для того чтобы выделить клеточные органеллы, исследуемый образец измельчают и затем гомогенизируют в забуференной среде с использованием гомогенизатора Поттера-Элведжема (тефлоновый пестик, вращающийся в стеклянном цилиндре). Необходимо обратить внимание на то что, для выделения интактных органелл важно, чтобы среда, в которой проводится гомогенизация, была изотонической, т.е. осмотическое давление буфера должно соответствовать давлению внутри клетки. Если раствор гипотоничен, органеллы будут «впитывать» дополнительную воду и лопнут, а в гипертонических растворах они, напротив, сморщиваются. Следует помнить, что в процессе фракционирования важно контролировать чистоту фракций. Присутствие в определенной фракции той или иной органеллы и наличие других компонентов определяют с помощью молекул-маркеров. Обычно это органеллоспецифичные ферменты (ферменты-маркеры). Распределение ферментов-маркеров в клетке отражает локализацию в ней соответствующих каталитических реакций.

2.3. Электрофорез

Изучение данного вопроса необходимо начать с истории возникновения электрофореза. Необходимо обратить внимание на то, что существует множество разновидностей и модификаций данного метода, которые используются в различных областях: электрофорез в свободных средах; электрофорез с подвижной границей; зональный электрофорез без поддерживающей среды; капиллярный электрофорез; зональный электрофорез в поддерживающей среде с капиллярной структурой; электрофорез на фильтровальной бумаге; электрофорез белков на ацетат-целлюлозной мембране; электрофорез в колонках и блоках гранулированной поддерживающей среды; электрофорез белков в ПААГ; электрофорез белков в крахмальном геле; электрофорез белков в агарозном геле. Особое внимание следует уделить таким разновидностям электрофореза как изоэлектрическое фокусирование и изотахофорез.

2.4. Спектральные методы. Методы меченых атомов

При изучении вопроса необходимо хорошо изучить вопросы связанные с радиоактивностью. Особое внимание нужно обратить на один из самых простых и распространенных вариантов метода изотопных индикаторов — метод изотопного разбавления, при котором к анализируемому веществу добавляют дозированное

количество изотопного индикатора и по степени его разбавления судят об исходном количестве вещества. Этот метод позволяет производить определение ничтожно малых количеств трудноопределяемых веществ и, наоборот, больших масс веществ; анализировать сложные смеси, анализ и разделение которых другими методами невозможны. Следует знать, что ведение изотопной метки в определённое положение молекулы устраняет химическую неразличимость атомов, допуская возможность однозначного выяснения механизма тех или иных реакций, для которых обычные химические методы описывают только начальное и конечное состояния.

2.5. Иммуноферментный анализ

При изучении данного вопроса следует иметь ясное представление о генах и антигенах, так как в основе иммуноферментного анализа лежит иммунная реакция антигена с антителом, а присоединение к антителам ферментной метки позволяет учитывать результат реакции антиген-антитело по появлению ферментативной активности или по изменению ее уровня.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЗАНЯТИЯМ

3.1. Лабораторная работа 1. Оборудование биохимической лаборатории.

При подготовке к занятию необходимо повторить технику безопасности при работе с реактивами и оборудованием. Повторить устройство лабораторного оборудования и порядок выполнения экспериментов по аналитической, органической и физколлоидной химии.

3.2. Лабораторная работа 2. Некоторые приемы, используемые при работе с белковыми растворами.

При подготовке к занятию необходимо помнить о том, что свойства белковых растворов определяются большими размерами молекул, т.е. белки являются коллоидными частицами и образуют коллоидные растворы. Следует обратить внимание на то, что белковые растворы в отличие от истинных обладают малой скоростью диффузии.

3.3. Лабораторная работа 3. Способы разрушения клеток.

При подготовке к занятию необходимо повторить строение клетки, её основные органеллы. Следует помнить, что для разрушения клеток чаще всего применяют физические методы. Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок. Разрушение клеток, находящихся в суспензии, происходит либо при вращении лопастей или поршня (блендеры), либо при поступательном движении вверх и вниз поршня или шаров (гомогенизаторы). При гомогенизации разного рода биологических тканей возникает множество частных проблем, которые разрешаются в основном путем проб и ошибок. Достаточную воспроизводимость результатов можно получить лишь при тщательном контроле за такими параметрами, как температура, продолжительность и скорость разрушения клеток, а также применяемое рабочее давление.

3.4. Лабораторная работа 4. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Приступая к выполнению данной работы, необходимо знать, что по механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную и другие. Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное — распределительными, и наоборот. При этом чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, поляризуемости и другим

параметрам, тем больше вероятность проявления другого механизма разделения для таких веществ.

3.5. Лабораторная работа 5. Электрофорез белков.

При подготовке к занятию необходимо знать, что электрофорез белков — способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки, основанный на движении заряженных белковых макромолекул различного молекулярного веса в стационарном электрическом поле. Электрофорез белков применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка. Наиболее распространенным вариантом электрофоретического анализа белков является электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэммли.

3.6. Лабораторная работа 6. Спектрофотометрический метод анализа.

При подготовке к занятию необходимо помнить что, взаимодействие электромагнитного излучения с веществом в оптической (ультрафиолетовой, видимой, инфракрасной) области лежит в основе спектрофотометрического метода. В зависимости от используемой аппаратуры в фотометрическом методе различают спектрофотометрию (анализ по поглощению монохроматического излучения); колориметрию и фотоколориметрию (анализ по поглощению немонохроматического излучения).

3.7. Лабораторная работа 7. Спектрофотометрический метод анализа.

При подготовке к занятию необходимо разобраться в устройстве спектрофотометра, так как его характеристики могут значительно отличаться в зависимости от производителя и задач, для решения которых рассчитан прибор. Однако основные элементы конструкции у всех приборов сходны. Это источник света, монохроматор, кюветное отделение с образцом и регистрирующего детектора. В качестве источника света чаще всего используются ртутные или галогеновые лампы. Монохроматор — устройство для выделения из всего излучаемого спектра какой-то узкой его части (1-2 нм). Монохроматоры могут быть построены на основе разделяющих свет призм либо на основе дифракционной решетки. Также в некоторых приборах могут дополнительно применяться наборы светофильтров. Кюветное отделение может быть оборудовано механизмами для термостатирования, перемешивания, добавления веществ непосредственно в ходе процесса измерения. Для исследований малых объемов веществ может использоваться безкюветная технология, когда образец удерживается за счет сил поверхностного натяжения жидкости.

3.8 Лабораторная работа 8. Варианты методик ИФА

Приступая к данной работе следует помнить, что как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов.

3.9 Лабораторная работа 9. Варианты методик ИФА

Необходимо обратить внимание на то, что принципиальная возможность применения ферментов в качестве меток в ИФА обусловлена чрезвычайно высокой чувствительностью регистрации ферментов в растворе. Если обычными спектрофотометрическими или флуориметрическими методами можно зарегистрировать образование продукта в концентрации 10⁻⁷ моль/л, то концентрация фермента составит при этом 10⁻¹³ моль/л. Причём принципиально возможным является значительное уменьшение пределов обнаружения ферментов как за счёт увеличения времени ферментативной реакции, так и увеличения чувствительности регистрации образовавшегося продукта. В этой связи перспективными являются люминесцентные методы детекции ферментативных реакций, а также методы, основанные на

ферментативном усилении детекции продуктов первичной ферментативной реакции («каскады»).

3.10 Лабораторная работа 10. Бумажная хроматография

Выполняя работу следует помнить, что пятна на хроматограммах могут быть обнаружены по цвету, флуоресценции, с помощью химических реакций, для чего бумагу опрыскивают или погружают в различные реагенты, или же по радиоактивности. Идентификацию проводят обычно путём сравнения с образцами с известными величинами R_f или после элюирования, которое сводится к вырезанию зоны, содержащей пятно, и последующему промыванию её соответствующим растворителем.

Разработал профессор

В.Н.Никулин