МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
Биологический факультет
Кафедра биохимии

ПРОГРАММА

практических занятий по биохимии
для студентов III-го курса зоологических кафедр

Составитель: к.б.н., доцент М.В. Медведева

Программа предназначена для студентов III-го курса кафедр зоологии позвоночных, зоологии беспозвоночных, ихтиологии, энтомологии, Биологической эволюции, антропологии, изучающих биохимию на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

ПЛАН ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ
(2-й семестр III-го курса)

Занятие 1.

Растворы.

Вводная часть

1. Цели и задачи практикума по биохимии.
2. Обзор предлагаемых задач и методов.
3. Основные правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.
4. Основные требования к выполнению и оформлению задач в рамках практикума по биохимии.
5. Литература.

Семинар

Тема: Растворы.
Вопросы:

1. Понятие раствора. Растворимость и предел растворимости. Факторы, влияющие на растворимость.
2. Концентрация раствора и способы её выражения (массовая доля, процентная, молярная, нормальная концентрации). Титр раствора.
3. Свойства воды как растворителя. Динамическая структура воды, влияние растворенных веществ на её свойства. Вода как универсальная среда для химических превращений в живых системах.
4. Основные положения теории электролитической диссоциации. Степень диссоциации и факторы, влияющие на неё. Сильные, средние и слабые электролиты. Понятия кислоты и основания (по Аррениусу, по Бренстеду-Лоури, по Льюису).
5. Равновесные реакции. Константа равновесия и понятие рК, смещение ионного равновесия.
6. Активность и коэффициент активности ионов.
7. Ионное произведение воды, его величина.

8. Водородный показатель (pH). Методы определения pH среды. Колориметрический метод определения pH раствора с помощью индикаторов, кислотно-основные индикаторы.
9. Потенциометрический метод определения pH раствора.
10. Титрование, кривые титрования. Кривые титрования слабой кислоты сильным основанием и слабого основания сильной кислотой. Титрование многоосновных кислот (оснований) и смеси кислот (оснований).
11. Понятие буферных растворов. Кислотно-основные буферные растворы. Уравнение буферных растворов Хендерсона-Хассельбаха. Способы приготовления буферных растворов. Кривые титрования буферных растворов, понятие буферной области. Буферная ёмкость и ее зависимость от концентрации и соотношения компонентов буфера. Основные требования, предъявляемые к буферным растворам. Буферы Гуда. Основные биологические буферные системы.

Решение задач по теме «Растворы».

Занятие 2.

Буферные растворы.

Семинар

Тема: Буферные растворы.
Вопросы:

1. Контрольная работа по теме «Растворы» и «Буферные растворы».
2. Обсуждение непонятных вопросов по теме «Буферные растворы».

Решение задач по теме: «Буферные растворы».

Практическая работа

Цель: Познакомиться с основными принципами приготовления буферных растворов и изучить их основные свойства.

План работы:

1. Приготовить раствор KH_2PO_4 или NaH_2PO_4 с заданной концентрацией.
2. Определить pH приготовленного раствора.
3. Построить кривую титрования приготовленного раствора (зависимость величины pH раствора от количества добавленной щелочи); определить pK приготовленного буфера.
4. Построить зависимость pH раствора от концентрации буфера (при разведении исходного раствора в 2, 4, 8, 16 раз).
5. Определить буферную емкость исходного и одного из разведенных растворов.

Занятие 3.

Аминокислоты и их основные свойства.

Семинар

Тема: Классификация аминокислот, их физико-химические свойства и принципы разделения.

Вопросы:

1. Различные способы классификации аминокислот. Классификация аминокислот на основании их полярности.
2. Физико-химические свойства аминокислот.
3. Кривые титрования аминокислот. Зависимость заряда аминокислот от pH среды. Понятие изоэлектрической точки аминокислоты.
4. Расчет зарядов аминокислот при различных значениях pH.
5. Методы разделения аминокислот, основанные на их свойствах.
6. Разделение аминокислот методом ионообменной тонкослойной хроматографии: принцип метода и предсказание расположения аминокислот на пластине «Фиксион» (расчет зарядов аминокислот).
7. Идентификация аминокислот на пластине «Фиксион». Нингидриновая реакция.

Расчет зарядов аминокислот при различных значениях pH.

Практическая работа

Цель: Разделение аминокислот методом ионообменной тонкослойной хроматографии на пластине «Фиксион».

План работы:

1. Нанесение аминокислот на пластину «Фиксион».
2. Проведение хроматографии.

Занятие 4.

Определение концентрации белка в растворе.

Семинар

Тема: Определение концентрации белка в растворе.

Вопросы:

1. Закон Бугера-Ламберта-Бера и границы его применения.
2. Спектр поглощения белков. Спектрофотометрическое определение концентрации белка по поглощению раствора в ультрафиолетовой области спектра. Влияние светорассеяния и возможных примесей нуклеиновых кислот или нуклеотидов на поглощение белка в растворе. Коэффициенты молярного и весового поглощения. Определение молярной (М) и весовой (мг/мл) концентрации белка. Определение концентрации смеси белков в растворе. Достоинства и недостатки спектрофотометрического метода.
3. Колориметрические методы определения концентрации белка. Калибровочные графики. Белки-стандарты, предъявляемые к ним требования и определение их точной концентрации. Принципы и чувствительность различных колориметрических методов, их достоинства и недостатки.
   - 3.1. Биуретовый метод.
   - 3.2. Микробиуретовый метод.
   - 3.3. Метод Лоури.
   - 3.4. Метод Бредфорда.

Практическая работа

Цель: Определение концентрации белка в растворе

Спектрофотометрическим и микробиуретовым методами и сравнение полученных результатов.

План работы:

1. Проявление аминокислот на пластине «Фиксион» с помощью раствора нингидрина. Определение последовательности расположения разделяемых на предыдущем занятии аминокислот.
2. Спектрофотометрическое определение концентрации белка-стандарта и белка X (с неизвестной концентрацией).
3. Построение калибровочных графиков с использованием белка-стандарта и определение неизвестной концентрации белка X микробиуретовым методом.
4. Сравнение результатов, полученных разными методами.

Занятие 5.

Разделение веществ с различной молекулярной массой методом гель-хроматографии.

Семинар

Тема: Разделение веществ на основании их молекулярной массы.

Вопросы:

1. Общие принципы и виды хроматографии. Колоночная хроматография.
2. Гель-хроматография: принцип метода, геометрия колонок. Коэффициент распределения, K_{av}.
3. Сорбенты для гель-хроматографии. Выбор носителя.
4. Определение неизвестной молекулярной массы белка методом гель-хроматографии.

Практическая работа

Цель: Освоение навыков работы с гель-хроматографической колонкой и разделение на ней веществ с различной молекулярной массой.

План работы:

1. Подготовка колонки к работе и заполнение её сорбентом.

2. Нанесение на колонку смеси веществ с различной молекулярной массой (голубой декстран, цитохром *c*, хромат калия).
3. Элюция веществ с колонки и определение оптической плотности полученных фракций. Построение профиля элюции нанесенных на колонку веществ. Определение свободного объёма колонки (объём элюции голубого декстрана) и объёмов элюции цитохрома *c* и хромата калия. Определение общего объёма колонки.
4. Определение коэффициентов K_{av} цитохрома *c* и хромата калия.

<u>Занятия 6-7.</u>

<u>Разделение белков методом диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.</u>

Цель: Освоение навыков проведения вертикального диск-электрофореза на пластинах полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия и определение неизвестной молекулярной массы белка с помощью белков-маркёров.

Семинар

Тема: <u>Электрофорез белков в полиакриламидном геле.</u>
Вопросы:

1. Принцип метода электрофореза. Общие закономерности движения макромолекул в электрическом поле.
2. Факторы, определяющие электрофоретическую подвижность белков.
3. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ).
    1) Структура и механизм полимеризации полиакриламидного геля.
    2) Электрофорез в нативных условиях. Теория диск-электрофореза.
    3) Диск-электрофорез в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия.
    4) Техника проведения электрофореза. Фиксация белков в геле и их окрашивание. Отмывка гелей.
4. Определение чистоты препарата белка и его молекулярной

массы методом электрофореза в денатурирующих условиях.
5. Другие аспекты применения электрофореза в ПААГ.

Практическая работа занятия 6

План работы:

1. Приготовление пластин гелей для последующего разделения белков.
   Сборка гелевой ячейки.
   Полимеризация разделяющего геля.
   Полимеризация концентрирующего геля и формирование лунок.
2. Приготовление образцов белков с известной концентрацией, но неизвестной молекулярной массой с учетом чувствительности метода.

Практическая работа занятия 7

План работы:

1. Сборка электрофорезной камеры. Заполнение её электродным буфером.
2. Нанесение образцов.
3. Проведение электрофореза.
4. Фиксация белков в геле, их окраска.
5. Отмывка гелей.
6. Анализ полученных результатов. Определение неизвестной молекулярной массы белков.
7. Сканирование и высушивание гелей.

Занятие 8

Измерение удельной активности лактатдегидрогеназы

Цель: Определение удельной активности фермента на примере лактатдегидрогеназы.

Семинар

Тема: Ферменты как биологические катализаторы. Активность фермента и его кинетические параметры.

Вопросы:

1. Ферменты как биологические катализаторы.
2. Строение фермента. Активный и аллостерический центры фермента.
3. Образование фермент-субстратного комплекса. Скорость ферментативной реакции. Понятие начальной скорости ферментативной реакции.
4. Теория стационарного состояния.
5. Уравнение Михаэлиса-Ментен, его допущения и преобразования. Физический смысл константы Михаэлиса.
6. Активность фермента и способы её выражения.
7. Способы измерения ферментативной активности.
8. Спектр поглощения восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH) и использование этого соединения для определения активности ферментов.
9. Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой.

Практическая работа

План работы:

1. Приготовление реактивов для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ).
2. Определение чистоты NADH.
3. Подбор условий для определения удельной активности ЛДГ.
4. Построение зависимости оптического поглощения от времени протекания реакции, катализируемой ЛДГ, для различных количеств фермента.
5. Построение зависимости скорости реакции от количества добавленного в пробу фермента.
6. Определение удельной активности лактатдегидрогеназы.

<u>Занятие 9-12</u>

Семинарские занятия по темам:

1. Углеводы. Метаболизм углеводов.
2. Липиды. Метаболизм липидов.
3. Метаболизм аминокислот.

Для каждой задачи литература представлена в соответствующем методическом пособии.