

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине «**Методы исследования биополимеров**»

Направление подготовки	06.03.01 Биология
Направленность (профиль)	Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь, 2023г.

ВВЕДЕНИЕ

Целью изучения данной дисциплины является усвоение студентами физико-химических принципов, лежащих в основе применяемых в молекулярной биологии методов и приборов, и на этой основе – понимания возможностей и ограничений этих методов и приборов, и, в итоге, формирование навыков эффективного самостоятельного планирования сложных экспериментов по анализу биополимеров, входящих в состав комплексных биологических объектов.

В результате освоения дисциплины студент должен:

иметь представление о наиболее часто используемых способах детекции, идентификации и фракционирования молекул биополимеров, а также лежащих в основе таких способов физико-химических принципах; о физико-химических принципах функционирования приборов и приборных комплексов, используемых в молекулярной биологии; знать основные инструментальные подходы к решению комплексных задач молекулярной биологии, основные принципы их функционирования и использования; уметь предсказывать и объяснять результаты применения физико-химических подходов и созданных на их основе приборов и приборных комплексов для решения задач молекулярной биологии, планировать эксперименты с использованием соответствующих приборов для решения таких задач.

При подготовке к лабораторным занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в лабораторном практикуме, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель работы.
4. Ход выполнения работы.
5. Результаты.
6. Выводы.

Методические рекомендации к оформлению отчетов по лабораторным работам

Лабораторный практикум является неотъемлемой частью химических дисциплин. Выполнение студентами лабораторных работ формирует обобщение, углубление и систематизацию теоретических знаний; умение применять профессионально-значимые знания. Также важнейшей задачей лабораторного практикума является развитие навыков ведения лабораторного журнала, оформления и защиты отчетов по проведенным работам.

Общие рекомендации по ведению лабораторного журнала

В качестве лабораторного журнала следует использовать общую тетрадь объемом не менее 48 листов. Журнал должен быть подписан (указаны ФИО студента, ФИО преподавателя, курс и номер группы). Оформление лабораторного журнала допускается как в рукописном, так и машинописном вариантах. В последнем случае листы с оформленными лабораторными работами должны быть вклеены или подшиты к журналу.

Лабораторный журнал следует заполнять аккуратно, избегая помарок и исправлений. Использование канцелярского корректора в лабораторном журнале не допускается.

Структура отчета по лабораторной работе

Отчет по лабораторной работе состоит из следующих разделов: название работы, цель и задачи работы, приборы и реактивы, ход работы, выводы.

Название работы

Отчет по лабораторной работе должен начинаться с новой страницы. В начале отчета пишется порядковый номер лабораторной работы в семестре, название выполняемой лабораторной работы. Рядом с названием следует указать дату выполнения работы.

Цели и задачи работы

В любой лабораторной работе можно выделить два типа целей, которые ставятся перед студентом. Первые цели – дидактические, к ним относят экспериментальное подтверждение и

проверку существенных теоретических положений дисциплины, а также формирование у студентов практических умений и навыков работы в лаборатории. Вторая группа целей варьируется от работы к работе и заключается в получении тех или иных параметров и проведении опытов в соответствии с тематикой работы. При оформлении отчета студенту следует отразить как дидактические цели, так и экспериментальные цели работы. По желанию студент может написать подробные цели работы или сформулировать общую цель работы, в рамках которой описать конкретные практические задачи. В данном разделе следует указать номера выданных преподавателем заданий.

Приборы и реактивы

Здесь указываются названия реактивов, с которыми студент будет работать. Подготовка раздела осуществляется перед выполнением лабораторной работы и позволяет студенту заблаговременно найти информацию.

При необходимости в данном разделе также приводится описание и схемы оборудования, используемого в работе. На схеме должны быть отражены и подписаны основные конструкционные элементы установки. В случае, если аналогичный прибор ранее использовался студентом при выполнении предыдущих работ, достаточно указать, в отчете к какой лабораторной работе можно найти соответствующую схему.

Ход работы

В разделе приводится краткое описание выполняемых действий от третьего лица. Указываются условия проведения эксперимента, перечисляется алгоритм манипуляций. Описание опыта не должно копировать текст практикума или методических рекомендаций. Описание должно быть составлено таким образом, чтобы читающий мог понять и воспроизвести последовательность действий, выполненных экспериментатором.

Особое внимание при оформлении отчета следует обратить на наблюдения, сделанные в рамках выполнения опыта. Точное и подробное описание наблюдений – залог правильности обсуждения наблюдаемых процессов. При необходимости в разделе «Ход работы» заполняются таблицы экспериментальных данных, на основе которых строятся графики зависимостей. Обратите внимание, каждая таблица, как и каждый график должны иметь название, отражающее приведенные данные. В «шапке» таблицы, а также рядом с осями на графике указывается наименование и единицы измерения физических величин. Все графики и диаграммы необходимо строить с применением ПК (пакеты программ Origin, MS Excel).

Проводимые в рамках выполнения работы расчеты также находятся в данном разделе. Обратите внимание, что при проведении расчетов используемые уравнения сначала записываются в общем виде, с использованием буквенных обозначений, только потом в уравнение подставляют численные экспериментальные или справочные данные. Для всех определенных в работе величин указываются единицы измерения.

Выводы

Важнейшей частью отчета по лабораторной работе является раздел «Выводы». Раздел содержит основные наблюдения и заключения, сделанные при выполнении работы. В разделе необходимо отразить полученные результаты, их соответствие теоретическим представлениям. Результаты измерений следует записывать в виде $(X \text{ среднее} \pm \Delta X)$, указать единицы измерения и относительную погрешность. В выводах по работе приветствуется описание возможных причин погрешностей, а также способов их избежать.

В отчете по лабораторной работе допускается писать выводы для каждого проведенного эксперимента и обобщающий вывод в конце отчета, где нужно систематизировать и обобщить полученные результаты.

Лабораторная работа № 1

Белки. Денатурация белков.

Реакции осаждения белков, в зависимости от применяемого осадителя, могут быть обратимыми и необратимыми.

В случае обратимых реакций белки не подвергаются глубоким изменениям, и получаемые осадки могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе, обычно в воде. Белки при этом сохраняют свои начальные естественные свойства.

При необратимых реакциях осажденные белки подвергаются глубоким изменениям. Получаемые осадки не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе, обычно в воде, т.е. наступает денатурация белков. Обратимые реакции осаждения белков можно получить путем высаливания при помощи нейтральных солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , спиртом (в случае непродолжительного действия его на белок при низкой температуре) и др.

Значение реакций осаждения белков в том, что они дают возможность: 1) изучить свойства белков; 2) освободить жидкость от присутствия белка, что бывает необходимо при некоторых исследованиях; 3) установить наличие белка, например, в моче, при различных заболеваниях; 4) высаливанием с помощью различных концентраций нейтральных солей или спиртом выделить отдельные белковые фракции.

Почти все белки осаждаются при нагревании в нейтральной или слабокислой среде. Более полное и быстрое осаждение белков происходит при достижении изоэлектрической точки.

Реакция высаливания (осаждения белков с помощью больших концентраций нейтральных солей) обусловлена дегидратацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда. Для высаливания различных белков требуется неодинаковая концентрация одних и тех же солей.

Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя с ними солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но нерастворимые в воде. Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка. Выпадение белка в виде осадка связано с денатурацией белковых частиц и образованием комплексных солей белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший в осадок белок растворяется.

Органические кислоты вызывают необратимое осаждение белков. Большое практическое применение получили кислоты трихлоруксусная и сульфосалициловая. Сульфосалициловая кислота, помимо белков, осаждает также продукты их распада - высокомолекулярные пептоны и полипептиды. Трихлоруксусная кислота способна осаждать только белки и не осаждает продукты распада белков. В связи с этим трихлоруксусной кислотой осаждают, например, белки крови, когда хотят отделить их от высокомолекулярных пептидов.

В органических растворителях, таких, как спирт, ацетон и др., белки не растворяются и выпадают в осадок. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Спирт связывает воду, вызывая дегидратацию мицелл белка и неустойчивость их в растворе. При осаждении спиртом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Реакция проходит лучше в присутствии электролита хлористого натрия вследствие снятия заряда с частиц белка. Реакция осаждения белка спиртом или кратковременным действием спирта на холоду обратима. Если осадок быстро отделить от

спирта, то белок сохранит нативное состояние и может быть вновь растворен в воде. При длительном воздействии спирта наступает необратимая денатурация белка.

Осаждение белков алкалоидными реактивами также относится к необратимым реакциям. Механизм осаждения белков алкалоидными реактивами связан с образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными азотосодержащими группами белка. В этом соединении белок является катионом, а алкалоидный реактив – анионом.

1. Осаждение белков кипячением

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор уксусной кислоты; 2) насыщенный раствор хлорида натрия; 3) 10% раствор гидроксида натрия; 4) раствор яичного белка.

Ход работы. В 5 пробирок налить по 5 капель раствора яичного белка.

В1-й пробирке нейтральный раствор белка нагреть до кипения. Жидкость мутнеет (возникает опалесценция), поскольку разрушаются водные оболочки вокруг молекул белка и происходит укрупнение его частиц. Мицеллы белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во 2-й пробирке раствор белка нагреть до кипения и прибавить 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты до слабого подкисления. При стоянии выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию.

В3-ю пробирку добавить 5 капель раствора уксусной кислоты для получения сильноокислой реакции среды. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В4-ю пробирку прилить 5 капель раствора уксусной кислоты и 2 капли насыщенного раствора хлорида натрия и нагреть. Выпадает хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами хлористого натрия.

В5-ю пробирку добавить 2 капли раствора гидроксида натрия, создавая щелочную среду. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

2. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор сульфата меди; 2) 5% раствор ацетата свинца; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора яичного белка прибавить осторожно 1 каплю раствора сульфата меди. Образуется бледно-голубой осадок, нерастворимый

в воде. К другой такой же порции раствора белка прилить вначале 1 каплю раствора сульфата меди, а затем еще 10 капель и наблюдать растворение осадка в избытке реактива. К 5 каплям раствора яичного белка прибавить 2 капли раствора ацетата свинца, образуется осадок, нерастворимый в воде, но легко растворяющийся в избытке осадителя.

3. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная азотная кислота; 2) концентрированная серная кислота; 3) раствор яичного белка

Ход работы. К 5 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки прилить 5 капель раствора белка так, чтобы обе жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется осадок в виде небольшого белого кольца (проба Геллера). Осторожно встряхнуть пробирку и добавить избыток азотной кислоты: осадок не исчезает, так как в избытке

азотной кислоты он не растворяется. Осаждение серной кислотой проводится аналогично реакции с азотной кислотой. К 5 каплям концентрированной серной кислоты осторожно по стенке пробирки налить 5 капель раствора белка. Образуется осадок, растворимый в избытке серной кислоты (при встряхивании).

4. Осаждение белков органическими кислотами

Реактивы, исследуемый материал: 1) 20% раствор сульфосалициловой кислоты; 2) 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка добавить 2 капли раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка. К 5 каплям раствора белка добавить 2 капли раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

5. Осаждение белков органическими растворителями

Реактивы, исследуемый материал: 1) этиловый спирт; 2) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прилить 15-20 капель этилового спирта. Раствор мутнеет. Добавить 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия. При стоянии выпадает осадок белка.

6. Осаждение белков алкалоидными реактивами

Реактивы, исследуемый материал: 1) насыщенный раствор пикриновой кислоты; 2) 1% раствор уксусной кислоты; 3) раствор яичного белка

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прибавить 2 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и 2 капли раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

Указания к оформлению лабораторной работы

Протокол лабораторной работы оформите в виде таблиц.

а) Осаждение белков кипячением.

№ пробирки	Ход реакции	Наблюдаемый результат	Принцип осаждения
------------	-------------	-----------------------	-------------------

б) Осаждение белков различными веществами

Название реакции	Принцип	Ход реакции	Наблюдаемый результат
------------------	---------	-------------	-----------------------

Сделайте вывод о влиянии концентрации водородных ионов и ионов солей на устойчивость в растворе молекул денатурированного при нагревании белка.

«Определение изоэлектрической точки белков».

Цель работы: определить изоэлектрическую точку белков различного природного происхождения.

Изоэлектрической точкой белка называется величина рН среды, при которой суммарный электрический заряд белка равен нулю. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы, нейтральные молекулы белка легко выпадают в осадок. Вследствие этого определение изоэлектрической точки может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее полное и быстрое выпадение белка в осадок. Для получения растворов с различной величиной водородного показателя пользуются буферными растворами.

Опыт 1. Определение изоэлектрической точки белков

Испытуемый материал: раствор клейковины, соевого изолята и молочного белка.

Для определения изоэлектрической точки молочного белка в 7 сухих пробирок наливают последовательно реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 1.

Таблица 1 – Условия проведения эксперимента определения изоэлектрической точки молочного белка (казеина)

№ пробирки	Объем 0,2 М раствора CH_3COOH , мл	Объем $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$, мл	Объем 0,4 % раствора молочного белка в 0,2 М растворе CH_3COONa , мл	pH смеси	Результат
1	1,6	0,4	0,2	3,8	
2	0,8	1,2	0,2	4,1	
3	0,4	1,6	0,2	4,4	
4	0,2	1,8	0,2	4,7	
5	0,1	1,9	0,2	5,0	
6	0,06	1,94	0,2	5,3	
7	0,03	1,97	0,2	5,6	

Растворы тщательно перемешивают. Через 5-10 минут наблюдается помутнение растворов. Наибольшее количество осадка наблюдается в той пробирке, где pH соответствует изоэлектрической точке молочного белка (казеина).

Для определения изоэлектрической точки соевого белка в 6 сухих пробирок последовательно наливают реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 2.

Таблица 2 – Условия проведения эксперимента определения изоэлектрической точки соевых белков

№ пробирки	Объем 0,1 М раствора CH_3COOH , мл	Объем 0,1 М раствора CH_3COONa , мл	Объем 1,0 % раствора соевого белка, мл	pH смеси	Результат
1	0,5	4,0	2,0	5,6	
2	0,5	2,0	2,0	5,3	
3	2,0	4,0	2,0	5,0	
4	2,0	2,0	2,0	4,7	
5	4,0	2,0	2,0	4,4	
6	4,0	1,0	2,0	4,1	

Для определения изоэлектрической точки белков пшеничной клейковины в 6 сухих пробирок последовательно наливают реактивы в количествах (в мл), указанных в таблице 3.

Таблица 3 – Условия проведения эксперимента определения изоэлектрической точки белков пшеничной клейковины

№ пробирки	Объем раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, мл	Объем раствора KH_2PO_4 , мл	Объем 1,0 % раствора клейковины, мл	pH смеси	Результат
1	10,0	0	2,0	9,18	
2	9,9	0,1	2,0	8,67	
3	9,0	1,0	2,0	7,73	
4	6,0	4,0	2,0	6,98	
5	1,0	9,0	2,0	5,91	
6	0,1	9,9	2,0	4,94	

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Лабораторная работа № 2. Методы детекции биополимеров. Качественные реакции на аминокислоты и белки

При взаимодействии белков с определенными реактивами образуются окрашенные продукты реакции, что обусловлено присутствием в белке той или иной аминокислоты или группировки. Эти так называемые цветные или качественные реакции на белки широко используются для установления белковой природы веществ или обнаружения в исследуемых веществах той или иной аминокислоты.

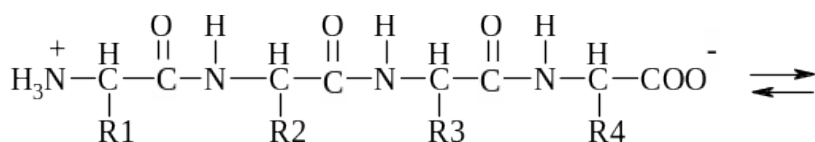
При ознакомлении с цветными реакциями следует обратить внимание на химическую структуру той аминокислоты или химической группировки, присутствие которых в белке обуславливает данную реакцию.

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы:

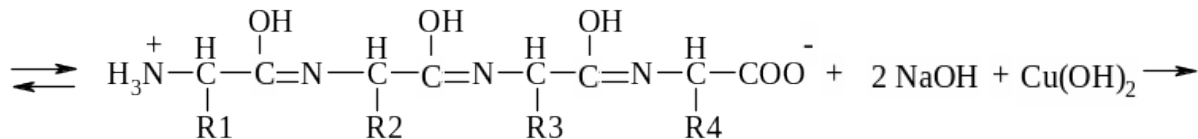
№ п/п	Название реакции	Материал исследований	Ход работы	Наблюдения	Чем обусловлена реакция

ОПЫТ 1. Биуретовая реакция Пиотровского

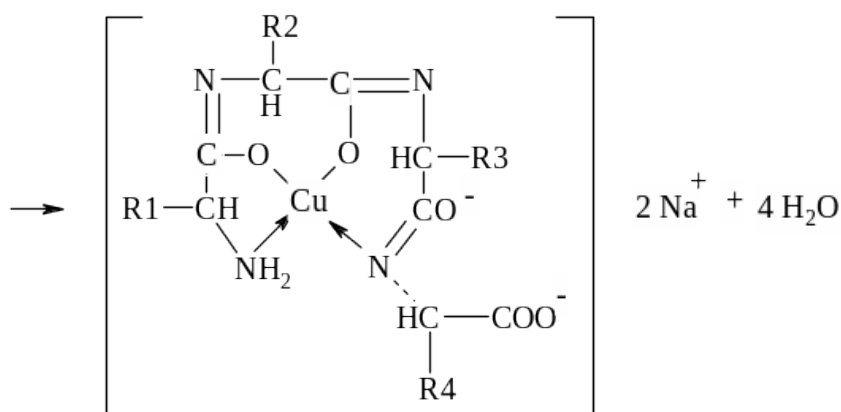
При добавлении к щелочному раствору белка раствора сернокислой меди жидкость приобретает красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет. Реакция обусловлена присутствием в белке пептидных связей, которые с ионами меди образуют окрашенное комплексное соединение. В щелочной среде кетонная форма полипептида переходит в фенольную.



кетонная форма полипептида



енольная форма полипептида



биуретовый комплекс

Фенольная форма полипептида взаимодействует со щелочным раствором медной соли с образованием так называемого биуретового комплекса.

Интенсивность окраски зависит от длины пептида и варьирует от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой. Положительную реакцию дают соединения, содержащие не менее двух пептидных связей.

Ход работы:

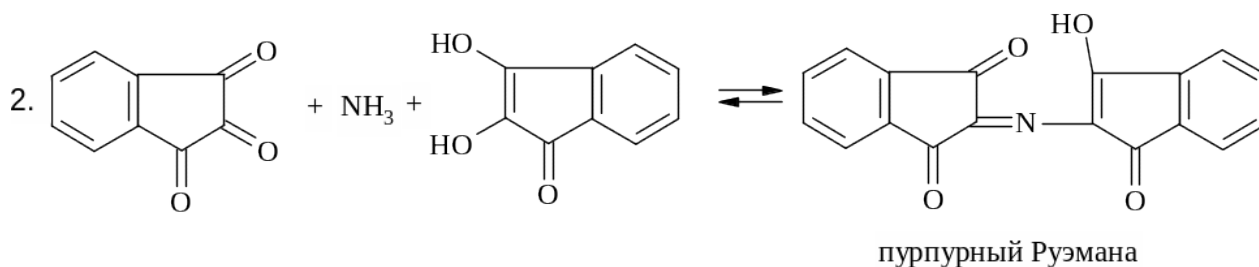
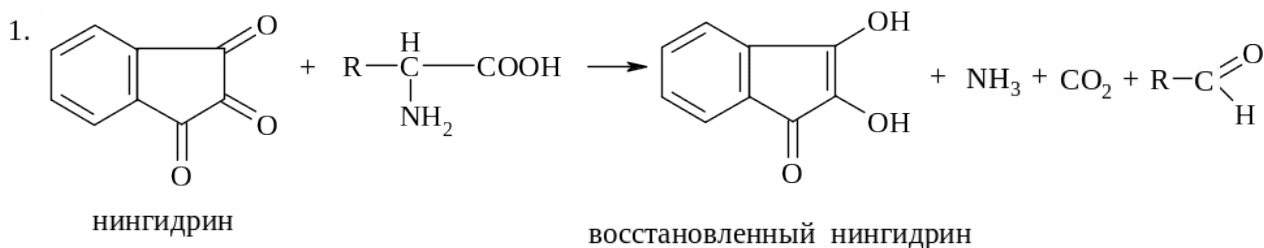
В одну пробирку налить 2 мл раствора яичного белка, в другую столько же раствора желатина. Затем в каждую прибавить равный объем 10%-ного раствора едкого натра и по 2-3 капли 1%-ного раствора сернокислой меди CuSO_4 . Проявляется красно-фиолетовое окрашивание.

ОПЫТ 2. Нингидриновая реакция на α -аминокислоты

Эта реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот, имеющих аминогруппу в α -положении.

Белки, пептиды и аминокислоты образуют с нингидрином соединения синего или сине-фиолетового цвета. α -Аминокислоты, реагируя с нингидрином, окисляются и распадаются с образованием аммиака, альдегида и углекислого газа. Нингидрин восстанавливается и конденсируется с другой молекулой нингидрина и аммиаком. В результате образуется сложное соединение, окрашенное в синий цвет /пурпурный Руэмана/.

Реакция может быть представлена следующим образом:

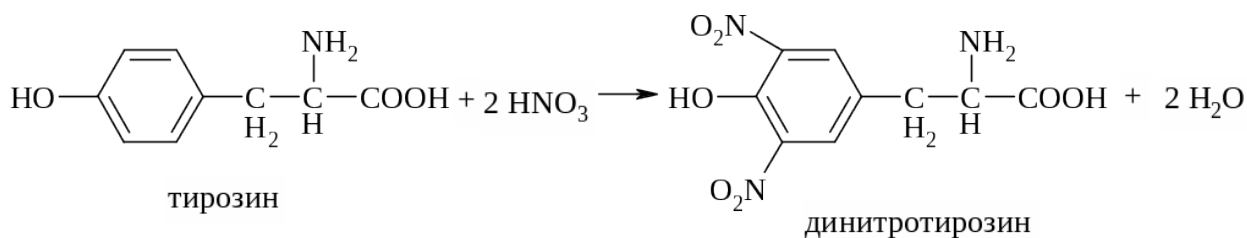


Ход работы:

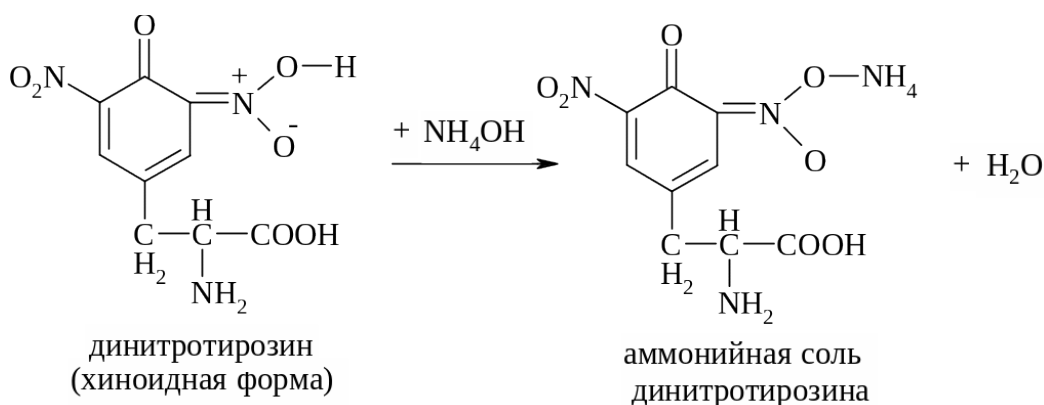
В одну пробирку налить 1-2 мл 1%-ного раствора глицина, в другую столько же раствора яичного белка. В обе пробирки добавить 0,1-ный спиртовый раствор нингидрина (в первую пробирку 5-6 капель, во вторую 10-12 капель) и нагревать около минуты. В пробирке с глицином быстро появляется сине-фиолетовое окрашивание. В пробирке с белком окраска более бледная красно-фиолетовая и развивается медленнее.

ОПЫТ 3. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты

Ксантопротеиновая реакция характерна для некоторых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана). При нагревании белков, содержащих эти аминокислоты, с концентрированной азотной кислотой образуется соединение желтого цвета:



На второй стадии нитропроизводное реагирует с гидроксидом аммония с образованием аммонийной соли желто-оранжевого цвета.



Ксантопротеиновую реакцию, кроме белков, пептидов и циклических аминокислот, дают также многие простые ароматические соединения (бензол, фенол др.)

Ход работы:

1. К 2 мл 0,1%-ного раствора фенола осторожно по стенке прилить 1-2 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно нагреть. Появляется желтое окрашивание.
2. В другую пробирку налить 2 мл яичного белка, прибавить 8-10 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно нагреть. Выпадает осадок, который окрашивается в желтый цвет.

После охлаждения в пробирку осторожно по стенке приливают избыток концентрированного раствора аммиака. Жидкость приобретает желто-оранжевый цвет.

Реакцию проводят под тягой!

3. Те же реакции проводят с раствором желатина. Однако желтое окрашивание с ней не появляется, так как желатин не содержит ароматических аминокислот.

Выводы по лабораторной работе запишите в лабораторный журнал.

Лабораторная работа 3.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ДНК. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле. Окраска ДНК. Растворы.

Электрофорез – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от pH среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т.е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам канала, отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают различные скорости.

Постепенно исходный препарат, состоящий из различных молекул, разделяется на зоны

одинаковых молекул, мигрирующих с одинаковой скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул. Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, образующую сетку геля, что увеличивает сетку геля и снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не могут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратиться.

В настоящее время используют полиакриламидный и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации pH буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца геля, электрофорез прекращают. Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси, кислоты выпадают в осадок в том месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

Часто используют гели в виде тонких пластин, запolyмеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. Кроме того, поскольку гель заливают в форму для полимеризации жидким, то его концентрация, состав буфера и содержание добавок строго одинаковы по всему сечению геля. Следовательно, плотность тока и напряжение электрического поля также одинаковы. Это обеспечивает строго идентичные условия фракционирования разных препаратов и дает возможность достоверного сопоставления их состава путем сравнения положения полос в параллельных треках.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов придают всей ДНК негативный заряд. Это делает ее растворимой в воде и притягивают ее к положительному (+) электроду. Поэтому, если поместить ДНК в электрическое поле, то она будет двигаться от минуса к плюсу. Фрагменты ДНК, имеющие наименьшую длину, приближаются быстрее всего к + электроду, в то время как длинные фрагменты остаются максимально близко к минусу. Наиболее часто используют агарозный гель. Гели различаются по содержанию в них агарозы. Чем больше агарозы, тем более мелкие фрагменты днк можно разделить. Увеличение концентрации агарозы в геле уменьшает скорость миграции днк и позволяет разделять малые фрагменты днк. Чем больше напряжение, тем быстрее проходит фореz

- но слишком сильное напряжение нагреет буфер, а это недопустимо. Конформация ДНК тоже играет важную роль. Релаксированные кольцевые плазмиды (неразрезанные рестриктазами) двигаются с другой скоростью чем линейные или суперскрученные.

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК (DNA ladder, маркеры), содержащих линейные фрагменты ДНК известной длины.

Агароза – это особо чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который получают из морских красных водорослей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*). Гелеобразование идет путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0.3%. При температурах 84-96 °С (а у специальных типов – уже при 70 °С) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость – «плавится». Растворы агарозы затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (36-42 °С). У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30 °С. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой – можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную агарозу предварительно охлаждают до 50-55 °С и уже при этой температуре заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

В агарозе неизбежно содержатся и эфиры серной кислоты. Чем меньше в агарозе заряженных сульфогрупп, тем слабее силы электростатического отталкивания между молекулами полимера и выше их способность к связыванию водородными связями. Их присутствие существенно влияет не только на температуры плавления и застывания гелей, но и на сам процесс электрофореза. В частности, именно эфиры серной кислоты обуславливают сильно выраженное при электрофорезе в гелях агарозы явление эндосмоса, суть которого в следующем: отрицательно заряженные остатки серной кислоты неподвижно связаны с полимерными нитями агарозы. Соответствующие им положительные ионы, находясь в водной фазе под действием электрического поля, мигрируют в направлении катода. Их место занимают катионы, которые увлекают за собой всю массу жидкости, находящейся внутри геля, и вместе с ней – растворенные в водной фазе геля макромолекулы. Электрофорезом в агарозном геле чаще всего разделяют отрицательно заряженные макромолекулы, а эндосмос направлен в противоположную сторону и ухудшает разделение. Поэтому агарозу подвергают специальной очистке, и содержание иона сульфата в продажных препаратах не превышает 0.5%.

Типы агарозы, отличающиеся слабо выраженным эндосмосом, содержат менее 0.3% сульфата. Наличие заряженных сульфогрупп иногда обуславливает еще и не специфическую сорбцию белков на агарозе, в результате чего полосы расплываются с образованием «хвостов». Степень эндосмоса количественно оценивают с помощью коэффициента относительной миграции ($-mr$) – представляющего собой отношение скоростей миграции незаряженного полимера (за счет только эндосмоса) и сходного с ним по структуре полианиона при электрофорезе в агарозе данного типа.

Некоторые типы агарозы по номенклатуре фирмы «Miles»: тип LE – малая степень эндосмоса $-mr = 0.1-0.15$; тип HE – сильно выраженный эндосмос $-mr = 0.23-0.26$.

Агароза с повышенными температурами плавления и гелеобразования (тип HGT) имеет $-mr < 0,1$, именно она чаще всего используется для обычного электрофореза. Специальная технологическая обработка (введение оксиэтильных групп) позволяет получать агарозу с малой степенью эндосмоса и пониженными температурами плавления и затвердевания, например тип LGT, 1%-ный раствор такой агарозы остается жидким при физиологической температуре (37 °С); кроме того плавление геля можно осуществить при температуре более низкой, чем температура денатурации ДНК. Таковую агарозу используют для дальнейшей экстракции ДНК из геля после его плавления.

Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и нагревают до 90-95 °С. Перед заливкой в форму раствор агарозы охлаждают до 50 °С. Выбор концентрации агарозы, т.е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для геля-фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные

гели с концентрацией 0.4-2%. Ниже представлены примерные концентрации гелей агарозы в % для некоторых распространенных объектов фракционирования:

Таблица 1 – Выбор концентрации геля в зависимости от длины разделяемых фрагментов ДНК

Агарозный гель		Полиакриламидный гель (ПААГ)	
Концентрация агарозы, %	Длина фрагментов ДНК, т.п.н.	Концентрация акриламида, %	Длина фрагментов ДНК, п.н.
0,3	5-60	3,5	1000-2000
0,6	1-20	5	80-500
0,9	0,5-7	8	60-400
1,2	0,4-6	12	40-300
1,5	0,2-3	15	25-150
2,0	0,1-2	20	6-100

Нуклеиновые кислоты обладают значительным по величине отрицательным зарядом, величина которого мало зависит от pH окружающей среды, а отношение заряда к массе практически одинаково для всех нуклеиновых кислот.

Поэтому фракционирование идет за счет различия в размерах молекул. Выбор буфера в данной ситуации не играет существенной роли. Используют 0.089М Трис-боратный, 0.05 Трис-фосфатный (редко) и Трис-ацетатный буфер.

Электрофорез нуклеиновых кислот сильно зависит от вторичной структуры. Двунитевая молекула имеет более жесткую структуру, труднее изгибается, проходя через пространственную сетку геля. Однако для молекул с молекулярной массой больше 3.5 млн. дальтон ситуация обратная: двунитевая молекула обладает достаточной гибкостью, чтобы проходить через сетку геля, в то время как одонитевая молекула той же длины сворачивается в хаотический клубок такого размера, что ее продвижение затрудняется. Вирусные и митохондриальные двунитевые ДНК, а также плазмиды бактерий могут иметь структуру замкнутого двунитевого кольца. Нативное состояние такого кольца -

«сверхскрученное». Кольцо в целом сворачивается в «жгут», что сильно увеличивает его компактность (суперскрученная ДНК). Если же хотя бы в одной нити кольца имеется единичный разрыв, то жгут разворачивается, и силами электростатического отталкивания фосфатных групп кольцо расправляется. Компактность молекулы становится меньше, размеры увеличиваются (релаксированная ДНК). Суперскрученная ДНК при электрофорезе всегда мигрирует быстрее релаксированной.

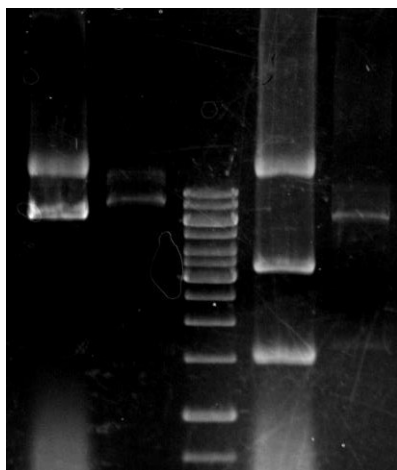


Рисунок 1 – Пример электрофореза нативной (кольцевой) и рестрицированной плазмидной ДНК

Рестрицированная плазмида. Нативная плазмида. ДНК-маркер.

Во многих случаях электрофореза бывает желательно оценить молекулярные размеры фракционируемых нуклеиновых кислот. Для этого удобно иметь набор молекул того же типа, но известной длины. В настоящее время имеется большое количество коммерческих маркеров на основе фага лямбда или DNA ladders, дающие при электрофорезе ряд последовательных полос на треке, соответствующих фрагментам определенной массы (рис. 2). Во многих коммерческих препаратах полосы соответствующие некоторым промежуточным длинам, например, 1 кб, 3 кб содержат большее количество ДНК и поэтому свяжутся интенсивнее, что облегчает идентификацию масс.

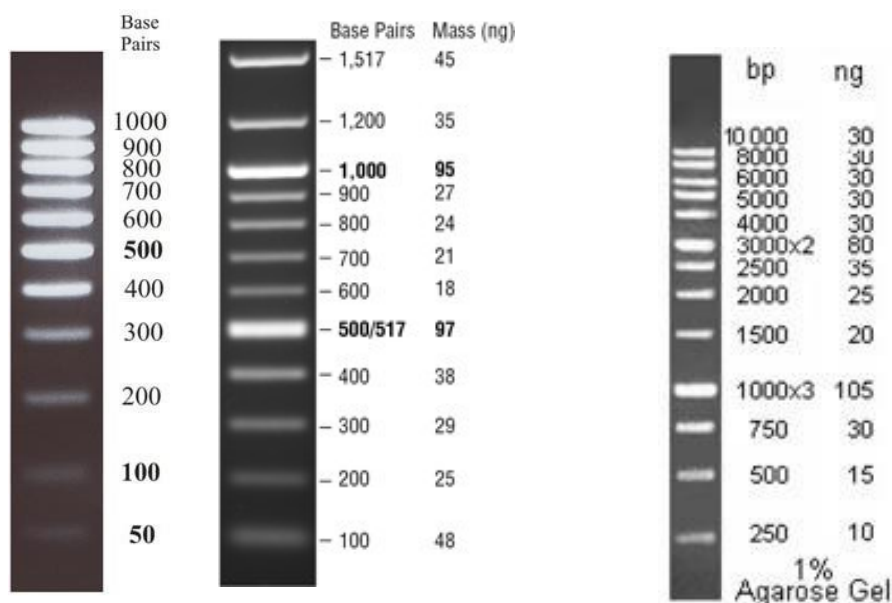


Рисунок 2 – Пример маркеров длин ДНК

В лунки геля наносится проба ДНК, уже содержащий индикаторный краситель. Форму с гелем, содержащим нанесенные образцы переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания (напряжение 1-15 В/см длины геля), и проводят электрофоретическое разделение ДНК в направлении от катода к аноду. Чем ниже напряжение, тем выше разделяющая способность геля, полосы более четкие из-за меньшей диффузии, но электрофорез занимает больше времени. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения (когда индикаторный краситель достиг края геля) вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ-трансиллюминатора (желательно фотографируют).

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

1. Готовят 1x TBE в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.
2. Добавляют к 1 x TBE агарозу в количестве, необходимом для получения 0.8 – 2% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. 1% гель является относительно универсальным.
3. Охлаждают смесь до +/- 50 °C. За время охлаждения агарозы, подготавливают заливочный столик и кювету для электрофореза.
4. Добавляют к раствору агарозы краситель (см. п. 2.3) и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.
5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете.

- Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1.5 мм.
6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1хТБЭ.
 7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.
 8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.
 9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1 – 10В на 1 см геля.
 10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют.

Окраска ДНК

При электрофорезе используется два типа красителей (лидирующие и флюоресцентные).

В качестве лидирующих красителей используют бромфеноловый синий, оранжевый G, крезоловый красный, ксиленцианол. Эти красители движутся в том же направлении что и ДНК, но с разной скоростью (рисунок 3). Зная размер ДНК продукта, можно оценить его положение в геле по положению индикаторных красителей.

Для детекции ДНК в геле используются различные флюоресцентные красители, которые способны связываться с двуцепочечной ДНК и светиться в ультрафиолетовом свете. На сегодняшний день используются разные красители, которые различаются по чувствительности, стоимости и безопасности. Эти красители могут быть добавлены непосредственно в гель, и тогда гель сразу можно просматривать в трансиллюминаторе. Альтернативно, гель можно окрашивать после проведения электрофореза в водном растворе красителя. Так как все красители способны связываться с ДНК, они являются канцерогенами, и при работе с ними используются перчатки.

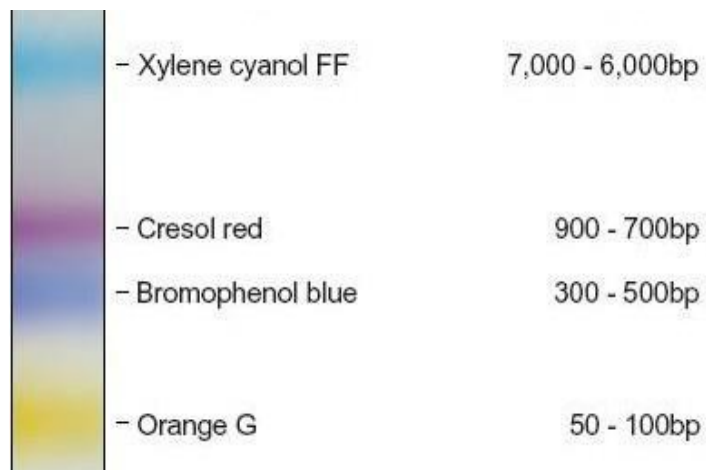


Рисунок 3 – Лидирующие (индикаторные) красители для агарозного электрофореза в 1.2% геле в ТБЕ буфере (по данным www.biotangusa.com)

Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ- излучением с длиной волны 290-330 нм. Это вещество способно встраиваться в двухцепочечные молекулы ДНК и флуоресцировать под ультрафиолетовыми лучами. При помощи цифрового фотоаппарата ДНК-фрагменты записываются и могут быть проанализированы. Бромистый этидий – сильный канцероген, способный проникать через кожу в организм, поэтому следует уделять особое внимание при работе с ним. Также не следует забывать, что бромистый этидий при форе

движется от (+) к (-). Если хочется, чтобы он не уходил из геля, лучше ввести его и в форезный буфер.

SYBR Green I является одним из наиболее чувствительных красителей, применяемых для детекции двуцепочечных молекул ДНК при электрофорезах в агарозных и полиакриламидных гелях. Чувствительность этого красителя приблизительно в 25 раз выше, по сравнению с наиболее распространенным до настоящего времени бромистым этидием (EtBr). При использовании трансиллюминатора с длиной волны 300 нм, с помощью SYBR Green I может быть детектировано 60 пг двуцепочечной ДНК. Кроме этого, SYBR Green I с успехом может применяться при окрашивании синтетических олигонуклеотидов в полиакриламидных гелях, при этом его чувствительность выше, чем у EtBr в 50-100 раз.

Краситель нуклеиновых кислот **Midori Green** относится к новому безопасному классу красителей, применяемых для визуализации двухцепочечных и одноцепочечных молекул ДНК, а также молекул РНК в агарозном геле. Эти красители нового поколения пришли на смену токсичному бромистому этидию (EtBr, потенциальный мутаген), который обычно используется в гель-электрофорезе для визуализации нуклеиновых кислот.

Modori Green Direct используется с голубым светом в гелъдокументирующих системах, а также с обычными ультрафиолетовыми трансиллюминаторами. Пики длины волны возбуждения при этом получаются 290 нм и 490 нм, пик эмиссии – 530 нм. Краситель Midori Green Direct не является канцерогеном и в гораздо меньшей степени обладает мутагенными свойствами, чем бромистый этидий. Кроме того, Midori Green Direct не повреждает латексные перчатки и мембрану клеток и относительно безопасен для окружающей среды.

Растворы

1. 10x TBE буфер (Tris-Borate-EDTA): 108 г Трис основного, 55 г борной кислоты, 9.3 г ЭДТА натриевой соли, довести до 1 литра деионизованной водой. pH 8.3 и не требует доведения.
2. 50x TAE , (Tris-Acetate-EDTA): 242 г Трис основного, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0.5M EDTA, довести до 1 литра деионизованной водой. Довести pH до 8.5.
3. Агароза: для 1% геля - смешать 100 мл воды и 1 грамм агарозы в стеклянной посуде. Доведите раствор до кипения в микроволновой печи при высокой мощности. Вытащите сосуд из печи и размешайте до ресуспендирования осевшей агарозы. Охладите до температуры, комфортной для дальнейшей работы. В мерном цилиндре доведите объем дистиллированной водой до 100 мл. В форму для геля установите гребенку под будущие лунки. Влейте охлажденную агарозу в форму.
4. 6x буфер для внесения в лунку геля: 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксиленцианол, 40% сахара или 40% глицерин в 1x TBE.

Бромистый этидий EtBr: для внесения в гель 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Для окрашивания гелей 0.1 мг/мл в дистиллированной воде.

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Лабораторная работа № 4.

Вертикальный электрофорез

Заливка геля. На рисунке представлены основные элементы установки для проведения вертикального электрофореза в ПААГ. Схематично, установку можно представить как емкость для электродного буфера, которая разделена гелем на два отсека (анодный и катодный). Электрически два отсека связаны лишь гелем, поэтому весь электрический ток, проходящий между катодом и анодом, протекает через пластинку геля. При необходимости сменить

полярность 44 электродов, необходимо поменять подключение токоподводящих проводов к блоку питания. В каждый электродный отсек заливается проводящий буфер (электродный), в котором и проводится электрофорез. При заполнении объёма внутреннего электродного отсека важно, чтобы уровень буфера был выше внутреннего стекла сэндвича и попадал в карманы геля, но при этом буфер не должен переливаться через наружное стекло во внешний электродный отсек. При этом сам гель должен быть залит предварительно, вне камеры. При заливке геля, необходимо учитывать особенности процесса полимеризации, описанные выше. Чаще всего, к ошибкам приводит несоблюдение пропорций катализатора и инициатора реакции полимеризации (ТЕМЕД и ПСА), недостаточная дегазация растворов перед полимеризацией, несоблюдение температурного режима или некачественные реактивы.

Гель для вертикального электрофореза формируется в пространстве между стёклами, разделёнными спейсерами, выбранной толщины. Гель вместе с двумя стеклянными обкладками часто называют сэндвичем. Толщина спейсеров определяет толщину получаемого геля. Чем толще гель, тем больший объём пробы можно нанести на одну дорожку заданной ширины. В более толстом слое геля также легче заметить слабо прокрашенные белковые полосы; таким гелем несколько удобнее манипулировать, т.к. он механически более прочный, чем тонкий гель. Однако, тонкие гели быстрее фиксируются и в них заметно легче происходит отмыв от избытка ДДС- Na , препятствующего связыванию красителя с белком, а после окрашивания такими красителями как Кумасси, в тонких гелях гораздо быстрее отмывается не связавшийся краситель. Кроме того, при работе с тонкими гелями расходуется заметно меньше материала. Сейчас производятся стёкла со стандартными спейсерами толщиной от долей миллиметра до нескольких миллиметров. Объём кармана в геле также зависит от ширины самого кармана.

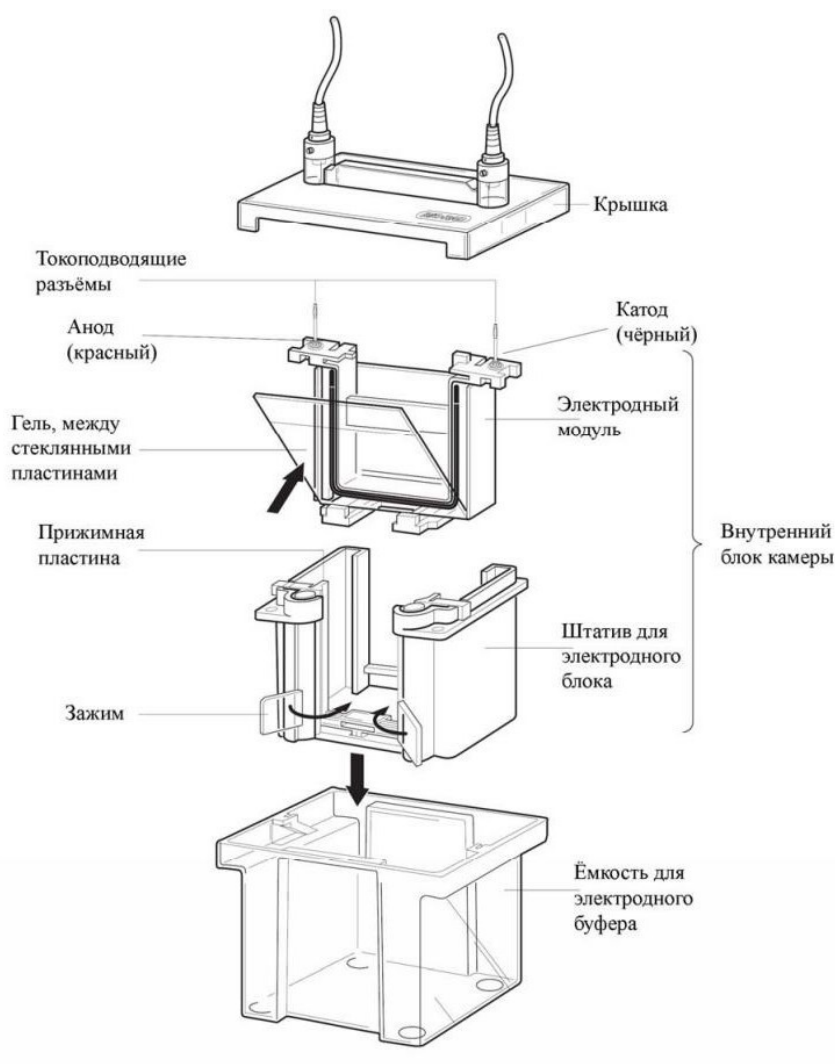


Рис 1. Основные элементы установки для проведения вертикального электрофореза в ПААГ.

Это определяется общим количеством карманов в геле, т.е. выбором гребёнки (толщина гребёнки должна в точности соответствовать толщине спейсеров между стёклами). При заливке геля следует избегать прямого контакта гребёнки с неразбавленным ТЕМЕД-ом, т.к. это может вызвать её повреждение. Перед началом приготовления геля, необходимо убедиться, что используемые стёкла и гребёнки хорошо вымыты и высушены. Перед тем как зафиксировать стёкла в штативе для полимеризации необходимо убедиться, что нижние края обоих стёкол установлены на одном уровне и не образуют ступеньку. Заливка геля в ступенчатой буферной системе.

1. Вставьте гребёнку до упора в пространство между стёклами, закреплёнными в штативе для полимеризации. На расстоянии примерно 1 см от нижнего края гребёнки сделайте отметку на наружном стекле, которая будет указывать уровень заливки нижнего геля, и выньте назад гребёнку.

2. Приготовьте раствор мономеров для разделяющего геля, не добавляя в него ТЕМЕД и ПСА. Проведите дегазацию под вакуумом в течение 15 минут. Не рекомендуется пользоваться слабыми водоструйными насосами.

3. После окончания дегазации, добавьте в раствор мономеров ТЕМЕД и ПСА, аккуратно размешайте и плавно залейте его в пространство между стёклами до отметки. Старайтесь не создавать пузырьков в растворе.

4. Сразу же после заливки раствора, аккуратно нанесите поверх раствора дистиллированную воду, стараясь не перемешивать её с раствором мономера. Не используйте изобутанол!

5. Оставьте гель на 45-60 минут для полимеризации. После полимеризации гель можно оставить на ночь при комнатной температуре, предварительно залив сверху однократным рабочим буфером.

6. Приготовьте раствор мономеров для концентрирующего геля, не добавляя в него ТЕМЕД и ПСА. Проведите дегазацию под вакуумом в течение 15 минут.

7. Перед тем, как заливать гель, аккуратно осушите пространство между стёклами над разделяющим гелем при помощи фильтровальной бумаги. Делайте это, не касаясь поверхности геля.

8. После окончания дегазации, добавьте в раствор мономеров ТЕМЕД и ПСА, аккуратно размешайте и плавно залейте его в пространство между стёклами до верхнего края покровного стекла.

9. Вставьте гребёнку между спейсерами, плавно вдвигая её от верхнего края стекла. Вставить гребёнку будет проще, если делать это под небольшим наклоном: сначала вставить крайнюю дорожку, затем соседнюю и т.д. В итоге гребёнка должна быть жёстко зафиксирована у верхнего края покровного стекла.

10. Оставьте гель на 30-45 минут для полимеризации.

11. Аккуратно извлеките из геля гребёнку и хорошенько промойте карманы дистиллированной водой или электродным буфером.

12. Сполосните штатив и гребёнку дистиллированной водой. Для заливки геля с непрерывной буферной системой сделайте операции, описанные в п.п. 6, 8–12. После сборки электродного блока, его установки в камеру и заливки электродных отсеков буфером можно приступать к нанесению проб.

Один электродный отсек формируется внутри электродного модуля в пространстве между двумя “сэндвичами гелей”. Вторым электродным отсеком служит пространство между электродным модулем и стенками резервуара, которое также заполняется электродным буфером. 48 Подготовка и нанесение проб. При подготовке белковых проб для электрофореза в ПААГ должны учитываться все те же аспекты, что и при подготовке проб для фореа в агарозном геле. Выбор pH, ионного состава и концентрации буфера для проб определяется тем, в каких условиях проводится электрофорез, иными словами, связан с составом рабочего буфера. Так при использовании непрерывной буферной системы можно использовать рабочий буфер, разбавленный в несколько раз, с целью концентрации пробы на входе в гель, о чём говорилось выше. Среди прочих факторов, отметим следующие. Во-первых, необходимо предусмотреть способ оценки скорости миграции образца в геле. Сами по себе растворы белков не поглощают видимый свет, а потому их миграция остаётся невидимой для глаза. Наиболее простой способ обойти эту сложность состоит в том, чтобы ввести в состав пробы лидирующий краситель. Такой краситель должен мигрировать в геле в том же направлении, что и проба; обладать известной (относительной) электрофоретической подвижностью в данных условиях; не взаимодействовать с исследуемыми веществами в составе пробы. При выполнении этих условий подвижность исследуемого белка можно характеризовать в относительных единицах, сравнивая с подвижностью лидирующего красителя. Чаще всего используют отношение расстояний, пройденных красителем и белком. Наиболее популярным лидирующим красителем при разделении кислых белков, а также при разделении белков в присутствии ДДС-Na, является краситель бромфеноловый синий.

Иногда также используется ксиленианол, молекула которого обладает вдвое меньшей электрофоретической подвижностью в сравнении с молекулой бромфенолового синего. В качестве лидирующего красителя при разделении в кислой среде, когда белки несут положительный заряд, могут использоваться метиловый зелёный или пиронин. 49 Рисунок 9. Структурная формула красителя бромфенолового синего. Второй аспект, который нужно

предусмотреть при подготовке пробы, это необходимость её нанесения в карманы геля, заполненные электродным буфером. Для того, чтобы проба компактно легла на дно кармана, её необходимо утяжелить. С этой целью в состав буфера для проб вводят глицерин или сахарозу, в концентрации достаточной для того, чтобы плотность раствора пробы была выше плотности электродного буфера. Концентрация образца в пробе определяется в основном чувствительностью метода, используемого для окраски белковых полос по окончании разделения. Однако при прочих равных условиях рекомендуется наносить по возможности меньший объём пробы на одну дорожку, т.к. чем уже будет белковая полоса, тем лучше будет разрешение в опыте. Это замечание в меньшей степени относится к ступенчатым буферным системам, таким как в методике Лэммли, где принимаются дополнительные меры для сужения белковых зон в геле.

Однако, чрезмерное повышение концентрации белка в пробе, для многих белков, чревато агрегацией. С этим связано несколько особенностей подготовки белковых проб, по сравнению с ДНК. Для предотвращения агрегации белков в пробу можно добавить мочевины в концентрации 4–8 М. Как уже упоминалось выше, нарушая структуру водородных связей в растворе, мочевина предотвращает 50 агрегацию белков. Добавлять мочевины в раствор следует непосредственно перед его использованием, так как при хранении она подвержена разложению. Обстоятельством, ограничивающим применение мочевины, служит тот факт, что её присутствие может привести к денатурации белка, потерей его вторичной и третичной структуры. В качестве альтернативы, можно использовать Тритон X100, добавление которого улучшает растворимость белковых препаратов, но не приводит к их денатурации. Этот детергент можно добавлять как в саму пробу, так и в гель (в концентрации 0.1%). П

При проведении электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии ДДС-Na, важным условием является полная денатурация белка, в противном случае электрофоретическая подвижность белка в геле не будет связана линейным соотношением с логарифмом его молекулярной массы. Основным препятствием при разворачивании белковой молекулы после связывания ДДС-Na являются дисульфидные мостики. Поэтому рекомендуется добавить в пробу β -меркаптоэтанол в концентрации 1-5%, после чего нагревают её в присутствии ДДС-Na на кипящей водяной бане в течение 1.5-2 минут. Если исходный белковый препарат имеется в виде осадка, то его следует сначала растворить в буфере, а потом уже добавлять ДДС-Na из концентрированного раствора. В противном случае на поверхности осадка комплекс белок – ДДС-Na может образовать корку, препятствующую его полному растворению. Имеются данные о том, что результаты электрофоретического разделения по методу Лэммли чувствительны к качеству ДДС-Na. При нанесении проб рекомендуется наносить на несколько дорожек маркерные пробы. Маркером может являться любая молекула белка или полипептида известного размера. Однако удобно выбирать его таким образом, чтобы размер (электрофоретическая подвижность) маркерной пробы была близка к размеру (подвижности) исследуемого образца. При подготовке маркерных проб важно соблюдать в точности те же условия приготовления, что были использованы при подготовке исследуемого образца. В противном случае разница в их электрофоретической подвижности может быть обусловлена, например, различной степенью денатурации. Сейчас производятся коммерческие препараты, содержащие набор фрагментов известной молекулярной массы.

Маркеры удобно наносить на несколько дорожек, например, по краям и в центр геля. Это делается не только для того, чтобы было удобнее оценивать подвижность проб на разных дорожках, но и для контроля идентичности условий в разных частях геля. Так же для контроля целесообразно оставлять хотя бы одну дорожку в геле пустой. Перед нанесением проб рекомендуется промыть объём кармана электронным буфером, при помощи пипетки. Для этого нужно несколько раз энергично перемешать раствор, набирая и выпуская буфер из носика пипетки. Пробы необходимо наносить в пространство между стёклами, по возможности плавно, чтобы образец лёг на дно кармана тонким ровным слоем. Для нанесения проб можно пользоваться микролитровым шприцем Гамильтон, либо обычной автоматической пипеткой, используя оттянутый наконечник. Для удобства нанесения проб, некоторые установки снабжены

специальными направляющими, позволяющими попасть в карман даже в том случае, когда гель практически не виден. При нанесении проб шприцем или пипеткой с оттянутым наконечником не следует погружать их глубоко в карман, чтобы не повредить его дно. Фиксация и окрашивание. После окончания электрофореза, необходимо, прежде всего, предотвратить диффузию разделившихся белковых зон в геле, которая может привести не только к размыванию картины, но и к полному вымыванию образца из геля. Для этого гель помещают в фиксирующий раствор, представляющий собой плохой растворитель для белков, чаще всего это смесь спирта и уксусной кислоты. Находясь в фиксаторе, молекулы белка осаждаются на волокна геля, где и происходит их дальнейшее окрашивание. Вторая цель, которая преследуется при фиксации гелей, содержащих ДДС-Na – это отмыв белка от избытка детергента, который препятствует эффективному связыванию молекул красителя. По этой причине рекомендуется проводить фиксацию при небольшом покачивании, для лучшего перемешивания раствора, в течение 40-60 минут для тонких гелей, а толстые рекомендуется оставлять в фиксаторе на ночь.

Перед тем как поместить гель в фиксатор, рекомендуется отметить положение первой или последней дорожки, например, отщипив один из нижних уголков геля (только нужно помнить который именно). В противном случае, отличить в нём начало от конца может быть весьма затруднительно, поскольку гель совершенно прозрачен и симметричен. Для обнаружения белковых полос в геле чаще всего используют различные методы их окраски непосредственно в геле. При этом необходимо подобрать растворитель таким образом, чтобы не произошло перерастворения белка, выпавшего в осадок в процессе фиксации. По этой причине окраску проводят в кислой среде, чаще всего это растворы уксусной кислоты в концентрации не менее 10%. В этих условиях белки оказываются заряженными положительно за счёт остатков лизина, аргинина и гистидина. Потому для окраски белков, чаще всего, используются кислые красители, содержащие остатки сульфокислоты.

Наиболее распространенным, на сегодняшний день, является краситель Кумасси бриллиантовый голубой (Coomassie Brilliant Blue, рисунок 11). Он связывается с положительно заряженными аминокислотными остатками, преимущественно с аргинином. При связывании с белком максимум его полосы поглощения сдвигается с 495 нм (в свободном состоянии) до 565 нм (в связанном состоянии). Этот краситель плохо растворяется не только в воде, но и в разбавленной уксусной кислоте, поэтому лучше всего его растворять в фиксирующем растворе. При этом сначала проводят растворение красителя в спирте, а затем разбавляют уксусной кислотой. Рабочая концентрация красителя обычно составляет 0.05–0.25 %.

Время окрашивания зависит от толщины геля. Тонкие гели прокрашиваются за 30-40 минут, в толстых плотных гелях может потребоваться несколько часов. Окрашивание проходит быстрее, если ванночку с гелем при этом слегка покачивают. После окрашивания гель помещают в раствор 0.9 Н уксусной кислоты, где в течение нескольких часов проводят отмывание красителя, сорбированного на волокнах геля. При этом, для ускорения процесса, раствор уксусной кислоты можно периодически заменять на свежий, а ванночку с гелем слегка покачивать. Чувствительность метода составляет от долей микрограмма на полосу, до нескольких микрограмм на полосу. В качестве более чувствительного метода, можно предложить окрашивание при помощи нитрата серебра. Этот метод позволяет повысить чувствительность на 1- 2 порядка. Количественную оценку результатов фореа проводят при помощи денситометрии геля или его фотографии. При связывании Кумасси с белком, интенсивность прокрашивания полосы в достаточно широких пределах линейно зависит от количества белка в полосе. Однако, количество красителя, связанного с белком зависит от природы белка и его аминокислотного состава, поэтому при сравнении полос, соответствующих разным белкам, возможны ошибки. Кроме того, при фотографировании геля могут появиться дополнительные ошибки, связанные с нелинейностью чувствительности фотоплёнки.

Тем не менее, результаты электрофореза нужно всегда документировать, прежде всего, фотографируя окрашенный гель. Окрашенные гели можно хранить в растворе 0.9 Н уксусной кислоты достаточно продолжительное время. Однако более надёжными способами консервации является спиртовое высушивание геля или глицериновое замещение. Первый способ заключается

в том, что гель помещают на несколько минут в спирт, где происходит его дегидратация. Гель заметно уменьшается в размерах и становится непрозрачным.

По окончании сушки он напоминает небольшую пластинку белой пластмассы, на которой хорошо видны синие полосы окрашенных белков. Достоинством этого метода является обратимость процесса: сухой гель в любой момент можно снова размочить и он вернётся в исходное состояние. Кроме того, за счёт непрозрачности самого геля, повышается контрастность окрашивания, и полосы становятся более отчётливыми. К недостаткам можно отнести хрупкость геля в сухом состоянии. Другой способ консервации состоит в замещении раствора уксусной кислоты в порах геля на глицерин. Гель при этом сохраняет эластичность и прозрачность.

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Лабораторная работа 5. Приготовление буферных растворов. Денатурирующий электрофорез по методу Леммли (Laemmli).

Буферные растворы.

Большинство буферных растворов может храниться в холодильнике. Исключение составляют ДДС-На, который нужно хранить при комнатной температуре во избежание выпадения в осадок, и ПСА, который необходимо использовать свежеприготовленным. Фиксирующие растворы, растворы уксусной кислоты и красителя Кумасси могут храниться при комнатной температуре. При использовании камер фирмы Bio-Rad для заливки одного разделяющего геля достаточно 5 мл раствора мономеров. Большинство щелочных буферов готовится на основе Трис. “Трис” – это краткое название соединения трис-(оксиметил)-аминометан (trishydroxymethylaminomethane, или 2-амино-2- гидроксиметил-1,3-пропандиол – $C_4H_{11}NO_3$). Оно представляет собой молекулу метана, в которой три атома водорода замещены на три остатка метанола ($-CH_2OH$), а четвёртый – на амино ($-NH_2$) группу: $NH_2C(CH_2OH)_3$. В растворе трис принимает протонированную форму и имеет $pK_a \sim 8.1$, что позволяет его использовать для приготовления слабощелочных буферов, со значениями pH близкими к физиологическим, что особенно удобно для биологических макромолекул.

Ступенчатые буферные системы. Ступенчатые буферные системы в большинстве случаев дают наилучшее разделение как в нативных, так и в денатурирующих условиях. Однако иногда, резкая смена буфера в геле может вызывать агрегацию белковых молекул. В этом случае можно применить нативную непрерывную буферную систему, или непрерывную буферную систему с добавлением мочевины.

Денатурирующий электрофорез по методу Леммли (Laemmli). Ниже приведены составы и способы приготовления растворов, использующихся при проведении электрофореза в присутствии ДДС-На в ступенчатой буферной системе с концентрирующим и разделяющим гелями.

Акриламид/Метиленбисакриламид (30% Т, 2.67% С).

87.6 г акриламида (29.2 г / 100 мл)

2.4 г метиленбисакриламида (0.8 г / 100 мл)

Навески мономеров растворить в 200 мл дистиллированной воды. При необходимости раствор можно подогреть. После полного растворения довести объём раствора до 300 мл. Хранить при температуре $+4^\circ C$.

Додецилсульфат натрия (10% г/мл). Растворить 10 г ДДС-На в 90 мл дистиллированной воды при аккуратном помешивании. Не взбалтывать, т.к. образуется плотная пена! После полного растворения довести объём раствора до 100 мл. Хранить при комнатной температуре.

1.5 М Трис-НСl буфер (pH 8.8).

27.23 г трис-(оксиметил)-аминометан (18.5 г / 100 мл)

80 мл дистиллированная вода

Растворить навеску Трис в 80 мл дистиллированной воды. Довести pH раствора до 8.8 титрованием концентрированной HCl (6-10 N). После полного растворения довести объём раствора до 150 мл. Хранить при температуре +4°C.

0.5 М Трис-HCl буфер (pH 6.8).

6 г трис-(оксиметил)-
аминометан 60 мл
дистиллированная вода

Растворить навеску Трис в 60 мл дистиллированной воды. Довести pH раствора до 6.8 титрованием концентрированной HCl (6-10 N). После полного растворения довести объём раствора до 100 мл. Хранить при температуре +4°C.

Буфер для проб (ДДС-Na).

Буфер для проб удобно готовить как можно более концентрированным, чтобы при нанесении пробы в гель её разбавление, а, как следствие, и увеличение в объёме, было минимальным. Помимо лидирующих красителей, буфер для проб призван утяжелять раствор, наносимый в лунку геля, за счёт увеличения его плотности. Поэтому разбавлять буфер слишком сильно не рекомендуется. Ниже приведён состав буфера для проб при денатурирующем фореze белков. Рекомендуется готовить не более 10 мл буфера для проб. 3.55 мл дистиллированная вода

1.25 мл 0.5 М Трис-HCl, pH 6.8

2.5 мл глицерин

2.0 мл 10% (г/мл) ДДС-Na

0.2 мл 0.5% (г/мл) бромфеноловый синий

————— 9.5 мл Конечный объём

Хранить при комнатной температуре. Перед использованием в буфер для проб можно добавить β-меркаптоэтанола в количестве 50 μл на 950 μл буфера. Пробу необходимо разбавить как минимум в 2 раза буфером для проб и прокипятить на водяной бане в течение 4 минут. Нерастворённые примеси можно осадить при помощи центрифугирования, чтобы не засорились поры геля при входе пробы.

10x Электродный буфер (pH 8.3).

Электродный буфер удобно готовить в виде концентрированного раствора, который разбавляется до рабочей концентрации (1x) непосредственно перед использованием. Ниже приведён состав 10x электродного буфера.

30.3 г трис-(оксиметил)-аминометан

144.0 г глицин

10.0 г ДДС-Na

После полного растворения в дистиллированной воде довести объём до 1 л. Не подводить pH раствора при помощи щелочей и кислот, это повлияет на проводящие свойства буфера! Измерять pH растворов, содержащих ДДС-Na не рекомендуется. Готовый раствор хранится при температуре +4°C. В случае, если в растворе образовался осадок, перед использованием его необходимо прогреть до комнатной температуры до полного перерастворения. Перед использованием разбавить дистиллированной водой в соотношении 50 мл 10x буфера к 450 мл воды и тщательно перемешать.

Персульфат аммония (10% г/мл). Растворить 10 мг ПСА в 90 μл дистиллированной воды. Использовать свежеприготовленным! Раствор может храниться в течение 1-2 дней при температуре +4°C, с частичной потерей активности.

Приготовление геля (10 мл раствора). Приготовить раствор, смешав необходимые количества исходных растворов, за исключением ТЕМЕД и ПСА. Поместить на 15 минут под вакуум для дегазации.

Таблица II. Приготовление растворов мономеров.

% <i>T</i>	H ₂ O _d (мл)	АА/МБА (мл)	*Буфер (мл)	10% ДДС-Na (мл)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

* Буфер разделяющего геля 1.5 М Трис-НСl буфер (pH 8.8)

* Буфер концентрирующего геля 0.5 М Трис-НСl буфер (pH 6.8)

Непосредственно перед заливкой геля добавить в раствор катализатор (ТЕМЕД) и инициатор (ПСА) реакции полимеризации из расчёта на 10 мл раствора:

Разделяющий гель 20 µл 10%ПСА

10 µл ТЕМЕД Концентрирующий гель 3

0 µл 10%ПСА

20 µл ТЕМЕД

После добавления аккуратно перемешать раствор.

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Лабораторная работа 6.

ЭЛЮЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ГЕЛЕЙ АГАРОЗЫ.

Применение метода «ловчей лунки».

Выделение ДНК после гомогенизации геля через иглу Метод «ловчей лунки»

1. В сухую пластиковую подложку для геля вставить две гребенки, закрепленные между собой клейкой лентой так, чтобы при добавлении агарозного раствора образовались лунки точно друг напротив друга.
2. Готовить 1 % агарозный гель (agarose 0,16 г, 10×TBE 16 мл, H₂O 14 мл). 3. Залить раствор на подложку для геля, и дать гелю застыть. Количество использованного геля должно соответствовать образованию слоя толщиной около 3-5 мм.
4. После того, как гель полностью сформировался, аккуратно удалить гребенки и поместить гель в электрофоретическую камеру с 1х TBE буфером, так чтобы гель был покрыт слоем буфера около 5-7 мм.
5. Смешать в плашке 10 мкл ампликона и 3 мкл сахарозы и добавить в лунку.
6. Установить постоянное напряжение электрофореза 80 В.
7. За продвижением полосы ДНК следить с помощью прибора Quantum ST4 под УФ. В момент нахождения целевого фрагмента в «лунке-ловушке» собрать раствор из лунки.
8. Для контроля смесь реампликона (6 мкл) и агарозы (3 мкл) добавить в лунку геля. При напряжении электрофореза 80 В дожидаться вхождения ДНК в гель. Через 5 мин проверить наличие отобранного реампликона под УФ.
9. Собранный раствор из лунки хранить при –20°C.

Выделение ДНК через иглу.

Гель агарозы представляет собой переплетение не сшитых между собой химически пучков нитей, образующих крупнопористую пространственную решетку. Такое своеобразие структуры позволяет осуществить, в частности, выдавливание жидкости из геля вместе с растворенной в ней ДНК. Относительно небольшие (устойчивые к действию срезающих сил) молекулы ДНК можно извлечь из агарозы после энергичной гомогенизации геля путем продавливания его через иглу шприца 26-го калибра.

1. Нужный фрагмент ДНК вырезать стерильным скальпелем из агарозного геля.
2. Поместить кусочек геля в шприц 26-го калибра и продавливать его через иглу.
3. Жидкость собрать в пробирку. Обрывки нитей агарозы осадить центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Растворенная в буфере геля ДНК остается в супернатанте с выходом до 80%.

Выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота с последующей очисткой.

Метод замораживания / оттаивания.

Выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота

1. Нужный фрагмент ДНК вырезать стерильным скальпелем из агарозного геля и поместить его в эппендорф.
2. Пробирку с вырезанным куском геля опустить в жидкий азот на 20 сек.
3. Центрифугировать 6 мин. при 14000 об./мин.
4. Забрать жидкость в новую пробирку, с азотом можно повторить.

5. Для очистки ДНК добавить половину 7,5М объема ацетата аммония, 2 объема 80% спирта.
6. Центрифугировать 12 мин. при 14000 об./мин.
7. Супернатант удалить, к осадку ДНК добавить 500 мкл 80% этилового спирта, центрифугировать 15 мин. при 14000 об./мин. Данный этап повторить дважды.
8. Подсушить пробирку на воздухе или 5-10 мин. при 37°C в суховоздушном термостате для удаления следов спирта.
9. Сухой осадок ДНК растворить в 50-200 мкл ТЕ-буфера или в деионизированной воде до полного исчезновения осадка.

Метод замораживания / оттаивания

1. Срезы геля агарозы толщиной 3-5 мм заморозить при – 20 °С.
2. Поместить между листками парафильма и сжимать пальцами в течение нескольких секунд. До 70% массы геля вытечет в виде жидкости, которую собирают в пробирку. Не следует, однако, допускать охлаждения геля ниже указанной температуры. Под действием давления лед внутри геля плавится, тем большее давление необходимо для его плавления.
3. К остатку геля добавить 50 мкл буфера и сжатие повторить.
4. Агарозу удалить центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Выход ДНК составляет при этом около 70%. Показано, что ДНК с молекулярной массой до 50 млн. (как линейная, так и кольцевая) остается неповрежденной.

Метод выделения ДНК с помощью центрифугирования.

Определение чистоты и концентрации реампликона.

1. Вырезать нужный фрагмент геля и поместить в ПЦР пробирку, в дне которой нужно сделать небольшое отверстие.
2. Вставить ее в эппендорф и поместить в морозильную камеру при –20 °С на 40 мин.
3. По истечении этого времени разморозить.
4. Повторно заморозить при –20 °С два часа.
5. После кратковременного центрифугирования, 5 мин. (1000 g), ДНК-содержащий элюент остается во внешнем эппендорфе.
6. Препарат ДНК растворить в ТЕ-буфере. Растворы нуклеиновых кислот хранить при –20°C. Данный метод достаточно простой в применении, не требует много времени и позволяет выделить одновременно много фрагментов ДНК любого размера. Измеряется концентрация по стандартной методике по объему 1-1,5 мкл полученного реампликона в 1-3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длины волны 260 нм.

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Лабораторная работа 7.

РАЗДЕЛЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМ В ПОЛЕ ЦЕНТРОБЕЖНЫХ СИЛ.

Цель работы

1. Изучение теоретических основ разделения суспензии методом центрифугирования.
2. Изучение устройства и принципа действия осадительной центрифуги.
3. Исследование влияния режимных параметров (числа оборотов ротора, продолжительности процесса) на степень разделения суспензий.

Основы теории разделения суспензии

Механическое обезвоживание неоднородных систем (эмульсий и суспензий) проводят на вакуум-фильтрах (барабанных, дисковых, ленточных), листовых фильтрах, фильтр-прессах, центрифугах и виброфильтрах.

На вакуум-фильтрах из осадков может быть удалено в среднем 80 %, на дисковых – 90 %, а на фильтр-прессах – 98 % общего количества механически связанной воды. Производительность вакуум-фильтров наиболее высокая. Выбор конструкции фильтра зависит от технико-экономических показателей процесса.

Теоретические положения центрифугирования

Под центрифугированием понимают процесс разделения неоднородных систем в поле центробежных сил с использованием сплошных или проницаемых для жидкости перегородок. Процессы центрифугирования проводятся в машинах, называемых центрифугами.

Центрифуга представляет собой в простейшем виде вертикальный цилиндрический ротор со сплошными или перфорированными боковыми стенками. Ротор укрепляется на вертикальном валу, который приводится во вращение электродвигателем, и помещается в соосный цилиндрический неподвижный кожух, закрываемый съемной крышкой; на внутренней поверхности ротора с перфорированными стенками находится фильтровальная ткань или тонкая металлическая сетка.

Под действием центробежных сил суспензия разделяется на осадок и жидкую фазу, называемую фугатом. Осадок остается в роторе, а жидкая фаза удаляется из него.

В отстойных центрифугах со сплошными стенками производят разделение эмульсий и суспензий по принципу отстаивания, причем действие силы тяжести заменяется действием центробежной силы.

В фильтрующих центрифугах с проницаемыми стенками осуществляют процесс разделения суспензий по принципу фильтрования, причем вместо разности давлений используется действие центробежной силы.

В отстойной центрифуге разделяемая суспензия или эмульсия отбрасывается центробежной силой к стенкам ротора, причем жидкая или твердая фаза с большей плотностью располагается ближе к стенкам ротора, а другая фаза с меньшей плотностью размещается ближе к его оси; осадок (или фаза с большей плотностью) образует слой у стенок ротора, а фугат переливается через верхний край ротора.

В фильтрующей центрифуге разделяемая суспензия также отбрасывается к стенкам ротора и фазы разделяются; при этом жидкая фаза проходит сквозь фильтровальную перегородку в кожух и отводится из него, твердая фаза в виде осадка задерживается на внутренней стороне этой перегородки, а затем удаляется из ротора.

Таким образом, общие закономерности центрифугирования имеют сходство с закономерностями отстаивания и фильтрования. Однако процессы в отстойных и фильтрующих центрифугах сложнее соответствующих процессов в отстойниках и фильтрах. Это обусловлено тем, что в центрифугах вместо силы тяжести и разности давлений действует центробежная сила, достигающая больших значений, а вместо плоских слоев жидкости и осадка образуются слои с цилиндрическими граничными поверхностями, усложняющими зависимость хода процесса от геометрических факторов.

Разделение эмульсий в отстойных центрифугах обычно называют сепарацией, а устройства, в которых осуществляется этот процесс - сепараторами. Примером такого процесса является отделение сливок от обрата.

При разделении суспензий в отстойных центрифугах различают процессы центробежного осветления и центробежного отстаивания. В первом случае из жидкости удаляются твердые примеси, содержащиеся в ней в незначительных количествах, например, при осветлении лаков и смазочных материалов. Во втором случае разделяется суспензия, содержащая твердую фазу в большом количестве, в частности суспензия угля в воде.

Разделение суспензий в фильтрующих центрифугах называют центробежным фильтрованием. Аналогично процессам разделения суспензий на фильтрах на фильтрующих центрифугах могут последовательно выполняться операции фильтрования с образованием осадка, промывки и отжима его с целью уменьшения влажности.

Процессы центрифугирования осуществляются периодически или непрерывно.

В связи со сложностью закономерностей центрифугирования и разнообразием конструкций применяемых на практике центрифуг разработка теории процесса и точных методов расчета его затруднительна. Следует считать, что наиболее надежные данные для расчета процесса центрифугирования можно получить на основании опытов по разделению данной эмульсии или суспензии на небольшой центрифуге, конструктивно по возможности воспроизводящей рассчитываемую. Однако в настоящее время установлены основные закономерности, характеризующие процессы центробежного отстаивания и центробежного фильтрования и позволяющие наметить оптимальные условия работы центрифуг.

Центробежная сила и фактор разделения

Создание центрифуг обусловлено стремлением повысить скорость разделения неоднородных систем в поле центробежных сил по сравнению со скоростью разделения этих систем в отстойниках или фильтрах. Поэтому целесообразно оценить в общем виде отношение центробежной силы к силе тяжести. Это можно сделать сравнением ускорений, действующих на тело в центробежном и гравитационном полях, так как применительно к телу определенной массы силы пропорциональны ускорениям.

Разделяющее действие центрифуг возрастает пропорционально величине центробежного фактора разделения, который представляет собой отношение центробежного ускорения к ускорению силы тяжести

$$K_p = \frac{W^2 \cdot r}{g},$$

где W – угловая скорость вращения, выраженная в радианах в секунду.

Если мы числитель и знаменатель этой дроби умножим на массу вращаемого тела, то в числителе мы получим центробежную силу, а в знаменателе силу тяжести. Следовательно, мы можем определить фактор разделения и как отношение центробежной силы к силе тяжести.

Если нам известно значение линейной скорости движения вращаемого тела, то в соответствии с физическим смыслом понятие радиана (центральный угол, опирающийся на дугу, длина которой равна радиусу), угловая скорость вращения:

$$W = \frac{V_{\text{мех}}}{r}$$

Подставляя это значение в (1), получим

$$K_p = \left(\frac{V_{\text{мех}}}{r} \right)^2 \cdot \frac{r}{g} = \frac{V_{\text{мех}}^2}{rg},$$

Если скорость вращения задана числом оборотов в минуту, то угловая скорость вращения:

$$W = \frac{2\pi n}{60} = \frac{\pi n}{30}$$

Подставив это значение в (1), получаем

$$K_p = \left(\frac{\pi \cdot n}{30} \right)^2 \cdot \frac{r}{g} = \frac{\pi^2 \cdot n^2 \cdot r}{900 \cdot g}$$

Скорость осаждения определяется из равенства силы сопротивления и центробежной силы.

В области Стокса для самых мелких частиц при $Re < 2$ скорость осаждения:

$$W_{\text{осажд}} = W_{0\text{осажд}} \cdot K_p \quad (4)$$

где $W_{0\text{осажд}}$ – скорость осаждения данной частицы под действием силы тяжести.

В переходной области ($Re=2 \div 500$):

$$W_{\text{осажд}} = W_{0\text{осажд}} \cdot K_p \cdot 0,715 \quad (5)$$

В автомодельной области ($Re > 500$)

$$W_{\text{осажд}} = W_{0\text{осажд}} \cdot K_p \cdot 0,5 \quad (6)$$

Так как требуемая поверхность осаждения обратно пропорциональна скорости осаждения, то поверхность осаждения в центрифуге меньше поверхности отстойника при равной производительности в области Стокса в K_p раз, в переходной области в $K_p \cdot 0,715$ раз

и в автономной области в $K_p \cdot 0,5$ раз.

Как известно, в общем случае центробежная сила C выражается равенством:

$$\tilde{N} = \frac{\frac{m \cdot v^2}{2}}{r} = \frac{G \cdot v^2}{g \cdot r}, \quad (7)$$

где m – масса вращающегося тела, кг; G – вес вращающегося тела, Н;

v – скорость, м/с;

r – радиус вращения, м.

Окружная скорость вращения определяется равенством:

$$v = \omega \cdot r = \frac{2 \cdot \pi \cdot n}{60} \cdot r, \quad (8)$$

где n – число оборотов в минуту;

ω – окружная скорость вращения, м/сек.

Сопоставляя равенства (7) и (8), найдем:

$$\tilde{N} = \frac{G}{r \cdot g} \cdot \left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{60} \cdot r \right)^2 \quad (9)$$

или

$$C = \frac{G \cdot r \cdot n^2}{900}. \quad (10)$$

Из выражения (10) следует, что увеличение числа оборотов ротора значительно больше влияет на возрастание центробежной силы, чем увеличение диаметра ротора центрифуги.

Из равенства (7) видно, что ускорение в поле центробежных сил составляет ω^2/r . Отношение центробежного ускорения к ускорению силы тяжести называют фактором разделения:

$$K_p = \frac{\omega^2 \cdot r}{g}, \quad (11)$$

приняв величину $G=1$ Н, из соотношений (7), (10), (11) получим:

$$K_p = \frac{r \cdot n^2 \cdot \pi^2}{900 \cdot g} \tag{12}$$

Например, для центрифуги с ротором диаметром 1000 мм ($r = 0,5$ м), вращающимся со скоростью $n = 1200$ об/минуту, фактор разделения составляет:

$$K_p = \frac{0,5 \cdot 1200^2}{900} = 800 \quad (13)$$

Фактор разделения является важной характеристикой центрифуг, так как, при прочих равных условиях, разделяющее действие центрифуги возрастает пропорционально величине K_p . Расчет скорости осаждения в поле

центробежных сил может быть произведен по уравнениям, описывающим скорости осаждения за счет сил тяжести в переходной и автомодельной областях при подстановке в эти уравнения вместо критерия Ar произведение $Ar \cdot K_p$.

Процессы в отстойных центрифугах

В общем случае разделение суспензий в отстойных центрифугах складывается из стадий осаждения твердых частиц на стенках ротора и уплотнения образовавшегося осадка. Первая из этих стадий протекает по законам гидродинамики, вторая - по закономерностям механики грунтов (пористых сред).

При малой концентрации твердых частиц в исходной суспензии (приблизительно не более 4 об. %) наблюдается свободное осаждение их в роторе без образования четкой поверхности раздела между чистой жидкостью и еще нерасслоившейся суспензией. При повышении концентрации образуется ясная граница раздела вследствие стесненного осаждения твердых частиц.

Процессы разделения суспензий в отстойниках и отстойных центрифугах существенно различаются. В отстойниках гравитационное поле однородно, а интенсивность поля центробежных сил возрастает по мере движения частицы к периферии ротора. Это приводит к тому, что при вращении ротора с определенным числом оборотов на частицу действует возрастающая центробежная сила, обуславливающая ускорение ее движения. В отстойниках частицы проходят через постоянные по площади поперечные сечения плоского слоя жидкости, а в отстойных центрифугах они перемещаются через возрастающие по площади поперечные сечения кольцевого слоя. Поэтому закономерности процессов в отстойниках нельзя распространить на процессы в отстойных центрифугах.

Разделяющая способность отстойных центрифуг характеризуется индексом производительности Σ , который является произведением площади цилиндрической поверхности осаждения F в роторе на фактор разделения K_p :

$$\Sigma = F \cdot K_p, \quad (14)$$

откуда

$$\frac{\Sigma}{F} = K_p \quad (15)$$

Учитывая, что фактор разделения выражает отношение скоростей отстаивания частиц в отстойной центрифуге и отстойнике, в соответствии с равенством (15) величину Σ следует считать равной площади отстойника, эквивалентного по производительности для данной суспензии рассматриваемой центрифуге. Индекс производительности K_p отражает влияние всех конструктивных особенностей осадительной центрифуги, определяющих ее разделительную способность.

Рассмотрим выражение для индекса производительности применительно к цилиндрическому ротору центрифуги, в котором находится слой жидкости. На рис.1 дана простейшая схема действия отстойной центрифуги. На практике толщина слоя жидкости h значительно меньше диаметра ротора D , поэтому величину фактора разделения можно отнести к среднему диаметру $(D-h)$. Тогда в соответствии с выражением (3)

$$K_p = \frac{\pi^2 \cdot (D-h)^2 \cdot n^2}{900 \cdot g} \cdot \frac{1}{2}$$

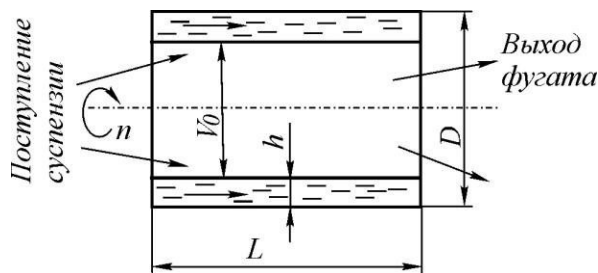


Рис. 1. Схема действия отстойной центрифуги

Площадь цилиндрической поверхности осаждения в роторе:

Отсюда

$$\Sigma = F \cdot K_p = \pi \cdot L \cdot \frac{(D-h)^2 \cdot n^2 \cdot \pi^2}{1800 \cdot g} \quad (17)$$

Если принять, что жидкость в роторе перемещается не по всему кольцевому пространству, занимаемому слоем, а только по тонкой внутренней зоне кольцевого пространства (поверхностный режим течения), то приближенно можно полагать

$$K_p = \frac{r_0 \cdot n^2 \cdot \pi^2}{900 \cdot g} \text{ и } F = 2 \cdot \pi \cdot r_0 \cdot L, \quad (18)$$

где r_0 - радиус свободной поверхности жидкости.

В этом случае

$$\Sigma = F \cdot K_p = 2 \cdot \pi \cdot L \cdot \frac{r_0^2 \cdot n^2 \cdot \pi^2}{900 \cdot g} \quad (19)$$

Равенство (14) применимо при условии, если осаждение твердых частиц суспензии происходит при ламинарном режиме. Вследствие большого значения центробежной силы осаждение частиц в центрифугах может происходить в условиях переходного и турбулентного режимов. Индекс производительности выражается следующим образом:

в переходном режиме

$$\Sigma = F \cdot K_p^{0,715}, \quad (20)$$

в турбулентном режиме

$$\Sigma = F \cdot K_p^{0,5}. \quad (21)$$

Как видно из равенств (20) и (21), в этих случаях площадь отстойника, эквивалентного по производительности рассматриваемой центрифуге, возрастает не пропорционально фактору разделения, а менее интенсивно.

Производительность осадительных центрифуг в действительности оказывается пониженной по сравнению с производительностью, вычисленной на основе рассчитанной скорости осаждения твердых частиц в центробежном поле. Уменьшение производительности объясняется, в частности, следующими причинами: отставанием скорости вращения жидкости от скорости вращения ротора, приводящим к уменьшению центробежной силы, действующей на частицу; неравномерностью течения жидкости вдоль ротора и увлечением осадившихся частиц с его стенок; образованием вихревых зон,

взмучивающих частицы. В связи с этим вводят понятие о коэффициенте эффективности отстойной центрифуги

$$\zeta = \frac{Q_{\text{д}}}{Q_{\text{т}}}, \quad (22)$$

где $Q_{\text{д}}$ и $Q_{\text{т}}$ - действительная и рассчитанная производительности центрифуги, м³/сек. Значение коэффициента $\zeta_{\text{и}}$ для отстойных центрифуг разных конструкций различно и находится опытным путем. Пользуясь соотношением (22), определяют действительную производительность центрифуги.

Устройство центрифуг

По значению фактора разделения центрифуги можно условно разделить на две группы: нормальные центрифуги ($K_{\text{р}} < 3500$) и сверхцентрифуги ($K_{\text{р}} > 3500$).

Нормальные центрифуги применяются главным образом для разделения различных суспензий, за исключением суспензий с очень малой концентрацией твердой фазы, а также для удаления влаги из штучных материалов. Сверхцентрифуги служат для разделения эмульсий и тонкодисперсных суспензий.

Нормальные центрифуги могут быть отстойными и фильтрующими. Сверхцентрифуги являются аппаратами отстойного типа и подразделяются на трубчатые сверхцентрифуги, используемые для тонкодисперсных суспензий, и жидкостные сепараторы, служащие для разделения эмульсий.

Существенным признаком типа центрифуг является способ выгрузки из них осадка. Выгрузка производится вручную, при помощи ножей или скребков, шнеков и поршней, движущихся возвратно-поступательно (пульсирующих), а также под действием силы тяжести и центробежной силы.

По расположению оси вращения различают вертикальные, наклонные и горизонтальные центрифуги. Вал ротора вертикальной центрифуги имеет опору внизу или подвешивается сверху.

В зависимости от организации процесса центрифуги делятся на периодически и непрерывно действующие.

Описание экспериментальной установки

Установка (рис.2) состоит из ротора (1), электродвигателя (2), рабочих кювет (3), пробирок с исследованными системами (4) и пульта управления (5).

На пульте управления смонтирован часовой механизм для автоматического выключения привода центрифуги, тахометр для контроля числа оборотов ротора, пакетный переключатель числа оборотов ротора и кнопка электромагнитного тормоза.

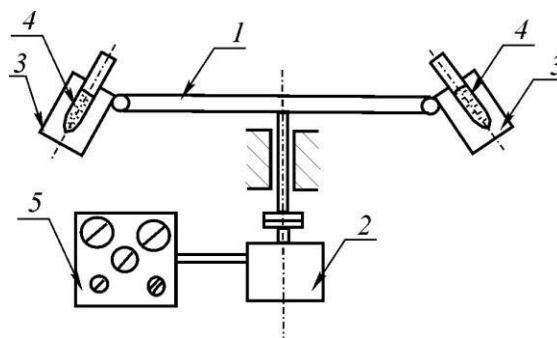


Рис. 2. Схема лабораторной установки

Описание конструкции пробирочной центрифуги

В работе используется центрифуга лабораторная медицинская ОПН-8 (рис.3)



Рис. Центрифуга ОПН-8

Центрифуга лабораторная медицинская ОПн-8 является центрифугой лабораторной периодического действия, обычной, переносной с частотой вращения 8000 об/мин., предназначенной для разделения неоднородных жидких систем плотностью до 2 г/см³ в поле центробежных сил.

Центрифуга предназначена для использования в практике клинической лабораторной диагностики, проведения широкого круга исследований в области медицины и других областях.

Частота вращения ротора центрифуги ОПн-8 регулируется ступенчато в диапазоне от 0 до 8000 об/мин через каждые 100 об/мин.

Подготовка центрифуги к работе

1. Подключить сетевой шнур центрифуги к сети переменного тока.
2. Установить ручкой задатчика механизма отсчета времени (в дальнейшем – часы) требуемое время центрифугирования с учетом времени разгона.
3. Выключатель часов установить в положении включено, при этом на клавише будет видна красная точка.
4. Установить задатчиком частоты вращения ротора требуемое число оборотов.
5. Выключатель цепи питания установить в положение включено, при этом на клавише будет видна красная точка. Ротор начнет вращаться через некоторое время (30...45с) и автоматически достигнет заданной частоты вращения.
6. После истечения заданного времени автоматически отключается напряжение питания электродвигателя, и ротор начнет останавливаться.
7. Выключатель цепи питания установить в положение отключено.
8. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, снять крышку ротора и вынуть пробирки.
9. Для продолжения центрифугирования без смены ротора необходимо заменить центрифугат в пробирках и повторить процесс.

Порядок проведения работы

1. В две пробирки наливаются по 5 мл 0,1N раствора хлорида или сульфата железа (III), а затем к ним добавляются по 5 мл 0,1N раствора аммиака или едкого натра.
2. Пробирки устанавливаются в центрифугу симметрично относительно осевращения в стаканчики ротора центрифуги.
3. Включите центрифугу кнопкой «СЕТЬ».
4. Закройте крышку центрифуги.
5. Установите на центрифуге при помощи соответствующих кнопок частоту вращения (варианты □ 1000, 1500, 2000, 2700 об/мин. и время (от 0 до 10 мин через 1 мин).
6. Выключение происходит через заданный интервал автоматическом режиме.
7. Извлеките любую пробирку из центрифуги и при помощи линейки измерьте высоту осадка, после чего зажав пальцем интенсивно встряхните и поместите обратно. Результаты измерений занесите в табл.1. Возможно повторение процесса со следующей пробиркой и т.д.
8. Опыт повторяют на различной частоте и продолжительности процесса.
9. Определите объём влажного осадка по формуле

$$V_{oc} = V_c - V_{\phi}, \quad (23)$$

где V_c – объём суспензии, мм³; V_{ϕ} – объём фугата, мм³.

$$V_{\phi} = h_1 \frac{\pi d^2}{4}, \quad (24)$$

где h_1 – высота слоя фугата, мм; d – диаметр пробирки, мм.

10. Рассчитайте фактор разделения по формуле (11).

11. Определите степень уплотнения осадка:

$$\Delta = \frac{V_{oc} - V'_{oc}}{V_{oc}} \quad (5)$$

где V_{oc} – первоначальный объём осадка, мм³; V'_{oc} – объём осадка в данный момент времени, мм³.

12. Постройте зависимость изменения объёма влажного осадка от времени центрифугирования $V_{oc} = f(\tau)$ при различных числах оборота ротора.

13. Постройте зависимость степени уплотнения осадка от фактора разделения $\Delta = f(K_p)$.

14. Составьте отчет и сделайте выводы по работе.

Таблица 1. Таблица экспериментальных данных

№ пробирки	Число оборотов, об/мин	Время центрифугирования τ , мин	Высота слоя фугата h_1 , мм	Объемы			Фактор разделения F_r
				суспензии V_c , мм ³	фугата V , мм ³	осадка V_{oc} , мм ³	

Определение погрешностей измерений и расчетов

При обработке экспериментальных данных необходимо правильно оценивать погрешности измерений и расчета.

Экспериментальные установки оснащены измерительными устройствами и приборами, использование которых для измерения того или иного параметра процесса сопряжено с погрешностями. Погрешности могут быть систематическими и случайными. Кроме того, при несоблюдении условий проведения опытов или недостаточном внимании, исполнителя работы могут быть грубые погрешности (промахи). Для оценки точности измерений применяют статистическую теорию ошибок. В частности, удобным вычислительным методом является метод наименьших квадратов. Приведем для примера порядок вычисления погрешностей при прямых измерениях:

1) составить таблицу измерений;

2) найти среднее $\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_1^n x_i$ (где n - число измерений в серии (выборке);

x_i - численное значение измеренной величины);

3) найти единичные отклонения $\Delta X_i = X_i - \bar{X}$;

4) проверить согласие с соотношением $\sum_1^n \Delta X_i = 0$ (сумма всех положительных и отрицательных отклонений от среднего должна равняться нулю);

5) вычислить квадраты отклонений $(\Delta X_i)^2$;

6) найти среднее квадратическое отклонение:

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum_1^n (\Delta X_i)^2}{(n-1)}}$$

7) выявить и исключить из таблицы измерений промахи (приближенно считая промахами измерения, при которых $\Delta X_i > 2S_n$);

8) найти среднее квадратическое отклонение среднего

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_n}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (\Delta X_i)^2}{[n(n-1)]}}$$

0,95); 2) задаться значением надежности (доверительной вероятности α - обычно

3) выбрать из таблицы коэффициент (критерий) Стьюдента $t_{\alpha n}$ при данных α и n (число выборок может быть как угодно большим, но при проведении лабораторных опытов обычно $n = 5 \div 7$, не менее 4);

Таблица 2. Значение коэффициентов Стьюдента $t_{\alpha n}$

Доверительная вероятность	ВЫБОРКА									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0,7	2	1,3	1,3	1,2	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
0,95	12,7	4,3	3,2	2,8	2,6	2,4	2,4	2,3	2,3	2,1
0,99	63,7	9,9	5,8	4,6	4,0	3,7	3,5	3,4	3,3	3,0

4) вычислить погрешность результата измерения

$$\Delta X = s_{\alpha} = t_{\alpha n} \cdot S_X$$

При умножении критерия Стьюдента $t_{\alpha n}$ на S_X определяют, в каком интервале находится истинное значение измеряемой величины (приотсутствии систематической погрешности). Если желательно получить один и тот же интервал погрешности при измерениях, а значит и одинаковый коэффициент $t_{\alpha n}$, например, 3,1, то при $\alpha = 0,95$ достаточно провести три-четыре измерения, а при $\alpha = 0,99$ – десять

12) внести в таблицу окончательный результат: $\bar{X} \pm \Delta X$;

13) найти относительную погрешность (в %): $\varepsilon_x = \left(\frac{\Delta X}{\bar{X}} \right) \cdot 100$.

Пример

Определение погрешностей измерения и расчета

1. Произвели измерение величины параметра "X": 15, 18, 14, 16.
2. Находим среднее значение:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Где n - число измерений в серии; x_i - численное значение измеренной величины;

$$\bar{x} = \frac{15+18+14+16}{4} = 15,75$$

3. Находим единичные отклонения от среднего значения:

$$\Delta x_i = x_i - \bar{x};$$

$$15-15,75=-0,75$$

$$18-15,75=2,25$$

$$14-15,75=-1,75$$

$$16-15,75=0,25$$

4. Проверяем согласие с соотношением:

$$\sum_{i=1}^n \Delta x_i = 0$$

(т.к. сумма всех положительных и отрицательных отклонений от среднего должна равняться нулю);

$$-0,75+2,25-1,75+0,25=0$$

5. Вычисляем квадраты отклонений $(\Delta X_i)^2$:

$$(-0,75)^2 = 0,56$$

$$(2,25)^2 = 5,06$$

$$(-1,75)^2 = 3,06$$

$$(0,25)^2 = 0,0625$$

6. Находим среднее квадратичное отклонение:

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum_1^n (\Delta X_i)^2}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,56 + 5,06 + 3,06 + 0,0625}{3}} = \sqrt{\frac{8,75}{3}} = 1,7$$

7. Выявляем и исключаем из таблицы промахи (приблизительно считая промахами измерения, при которых $\Delta X_i > 2S_n$):

$$(2S_n = 2 \cdot 1,7 = 3,4)$$

$$X_i$$

$$-0,75 < 3,4$$

$$2,25 < 3,4$$

$$-1,75 < 3,4$$

$$0,25 < 3,4$$

8. Находим среднее квадратичное отклонение среднего

$$S_{\bar{X}} = \frac{S_n}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (\Delta X_i)^2}{[n(n-1)]}} = \frac{1,7}{\sqrt{4}} = \frac{1,7}{2} = 0,85.$$

Задаемся значением надежности (доверительной вероятности α -обычно 0,95);

Выбираем из таблицы коэффициент (критерий) Стьюдента $t_{\alpha n}=3,2$.

Вычисляем погрешность результата измерения:

$$\Delta X = \varepsilon_{\alpha} = t_{\alpha n} \cdot S_{\bar{X}} = 3,2 \cdot 0,85 = 2,72$$

Вносим в таблицу окончательный результат: $X \pm \Delta \bar{X}$, т.е. $15,75 \pm 2,72$.

13. Находим относительную погрешность (в %):

$$\varepsilon_x = \left(\frac{\Delta X}{\bar{X}} \right) \cdot 100 \%$$
$$\frac{2,72}{15,75} \cdot 100 = 17,3\%$$

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

Контрольные вопросы

1. Типы и конструкции осадительных центрифуг?
2. Параметры, характеризующие работу центрифуг?
3. Что такое фактор разделения?
4. Что такое индекс производительности?
5. Достоинство и недостатки осадительных центрифуг?
6. Достоинство и недостатки отстойных центрифуг?
7. От чего зависит производительность центрифуги?
8. Из каких основных элементов состоит центрифуга ОПН-8?

Литература

1. Безденежных А.А. и др. Руководство к практическим занятиям по лаборатории процессов и аппаратов химической технологии: Учебное пособие для вузов (Под ред. чл.-корр. АН СССР Романова П.Г. - Л, - Химия, 1990.
2. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. М.-Химия, 1973.
3. Соколов В.И. Современные промышленные центрифуги. М.- Машиностроение, 1967.
4. Шкоропад Д.Е. Центрифуги для химических производств. М.-Машиностроение, 1975.

Лабораторная работа 8.

Бумажная и тонкослойная хроматография (планарная)

В методе бумажной хроматографии разделение смесей происходит на специальной хроматографической бумаге, изготовленной из особо чистой целлюлозы, выполняющей роль неподвижной твердой фазы. Подвижной фазой, в этом случае, обычно служит система из нескольких органических растворителей. Фактически бумажная хроматография является микрометодом, так как применяется в основном для разделения и идентификации очень малых количеств всех классов органических соединений. Особенно широкое применение

метод нашел в биохимии, где часто приходится разделять сложные смеси очень близких по своим свойствам соединений. Лучшие результаты достигаются при разделении сахаров, фенольных соединений, 30 сложных смесей аминокислот, пестицидов, антибиотиков и др. Бумажная хроматография зарекомендовала себя и как эффективный метод разделения микроколичеств неорганических соединений.

Важнейшим преимуществом его являются исключительная простота выполнения и высокая чувствительность. Бумажную хроматографию подразделяют на распределительную и осадочную. Распределительная бумажная хроматография. Для получения хроматограммы на полоске бумаги карандашом отмечают стартовую линию на расстоянии 2 – 3 см от края бумаги и на эту линию наносят каплю анализируемого раствора. Конец бумаги, на который нанесена проба, помещают в растворитель. Под действием капиллярных сил растворитель поднимается по бумаге, увлекая компоненты пробы, которые проходят по бумаге различные расстояния (рисунок 1.6.1).

После окончательного разделения компонентов пробы, когда фронт растворителя достигнет требуемого уровня, бумагу вынимают, отмечают положение линии фронта растворителя, дают растворителю испариться и проводят проявление зон хроматограммы химическим или физическим способами. При химическом способе бумагу обрабатывают реагентом, дающим с разделенными компонентами окрашенные соединения, которые проявляются в виде пятен. При физических способах проявления зон хроматограммы используется способность некоторых веществ флуоресцировать под действием ультрафиолетового излучения. В плоскостных вариантах хроматографии для идентификации веществ в качестве характеристики удерживания используют фактор подвижности R_f – относительную скорость передвижения хроматографической зоны (пятна)

$R_f = h_i / h_s$, который равен отношению расстояния, пройденному веществом h_i , к расстоянию, пройденному растворителем – h_s .

Величина h_i зависит от природы вещества и остается постоянной при не изменяющихся условиях хроматографирования. Фактор подвижности может меняться от 0,0 до 1,0. Лучшая избирательность разделения соответствует значениям от 0,1 до 0,7. Таблицы величин R_f для различных ионов и молекул приведены в специальных справочниках. При помощи таких таблиц по экспериментальным значениям R_f можно определить качественный состав разделяемой смеси.

Количественное определение выполняется по хроматографическим характеристикам (площадь пятна на хроматограмме или интенсивность его окраски) или по методу элюирования (вымывания). При этом хроматограмму разрезают на отдельные части по числу пятен, каждое пятно обрабатывают соответствующим экстрагентом и определяют количество экстрагированного вещества любым подходящим физико-химическим методом: фотометрии, полярографии, люминесценции и др.

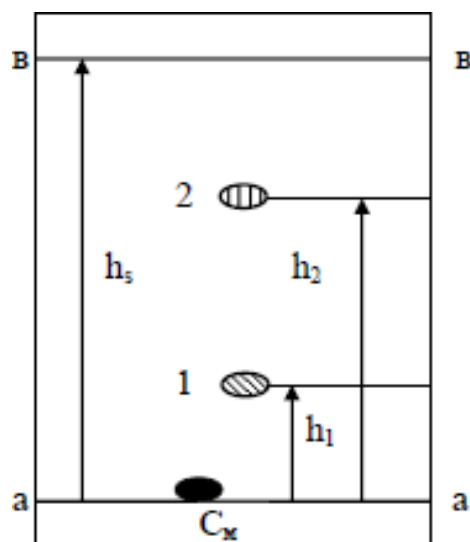


Рисунок 1 – Одномерная хроматограмма разделения двух ионов (или смеси на две группы ионов) методом распределительной бумажной хроматографии: 1, 2 – разделяемые ионы (две группы ионов); а-а – линия старта; в-в – линия фронта растворителя.

Методики, основанные на использовании хроматографических характеристик, многообразны. Более точным является метод градуировочного графика $S = f(\lg C)$, где S – площадь пятна, C – концентрация. В указанных координатах график линейен. Иногда количество компонента в каждом пятне можно определить методом спектроскопии отражения, измеряя интенсивность света, отраженного пятном. Кроме обычной, одномерной, бумажная хроматография бывает двухмерной.

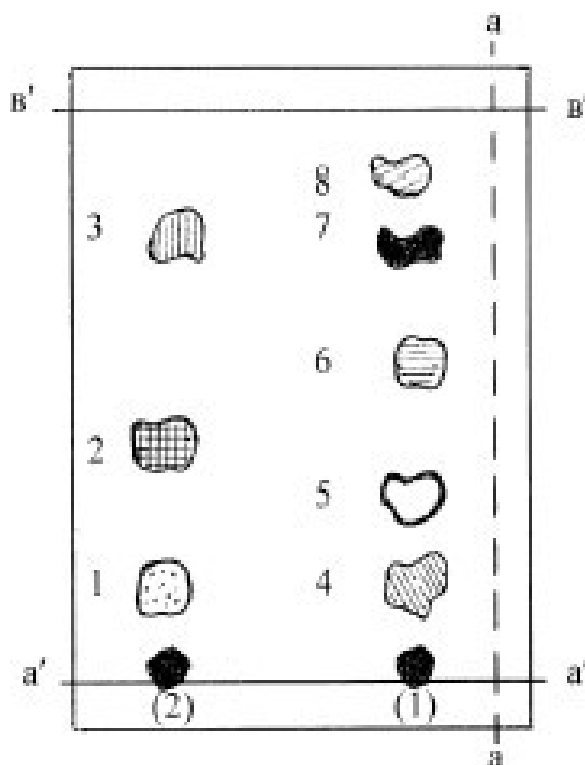


Рисунок 1.6.2 – Двухмерная хроматограмма разделения смеси восьми ионов методом распределительной бумажной хроматографии: 1-8 – разделяемые ионы; (1) и (2) – две группы ионов, разделенных при одномерном хроматографировании; а'-а' – стартовая

линия; в'-в' – линия фронта растворителя; а-а – стартовая линия на одномерной хроматограмме.

В двухмерной хроматографии после одномерного хроматографирования (рисунок 1) хроматографическую бумагу поворачивают на 90° , помещают в другой растворитель и снова проводят хроматографирование (рисунок 2). Такая методика позволяет проводить более тонкие разделения компонентов смеси, неразделяемых при помощи одного растворителя (одномерного хроматографирования). По технике выполнения распределительная бумажная хроматография подразделяется на восходящую, нисходящую и круговую.

В восходящей хроматографии растворитель поднимается снизу вверх под действием капиллярных сил, в нисходящей – растворитель передвигается по слою вниз под действием и капиллярных и гравитационных сил.

В круговой хроматографии в центр горизонтально расположенной бумаги наносится капля анализируемого раствора и растворитель, который под действием капиллярных сил движется в радиальном направлении от центра. Компоненты смеси разделяются, располагаясь на бумаге виде концентрических колец. Осадочная бумажная хроматография. В осадочной бумажной хроматографии разделение осуществляется на хроматографической бумаге, предварительно пропитанной раствором реагента-осадителя, образующего с компонентами анализируемой смеси малорастворимые соединения. Подготовленная таким образом бумага называется импрегнированной и имеет определенный титр (количество миллимолей-эквивалентов реагента, приходящегося на единицу длины или единицу площади бумаги), выражаемый в $\text{моль} \cdot \text{см}^{-1}$ или $\text{моль} \cdot \text{см}^{-2}$. Для проведения количественного анализа «аликвоты» исследуемого и стандартных растворов наносят на бумагу калиброванным капилляром (первичная хроматограмма) и погружают ее конец в хроматографическую камеру с растворителем (например, водой) ниже стартовой линии. При развитии хроматограммы фронт растворителя поднимается вверх и на бумаге, в результате протекания химической реакции между ионами и реагентом, формируются дифференцированные хроматографические зоны продуктов реакции в виде правильных пиков. Последовательность расположения хроматографических зон определяется величинами произведения растворимости образующихся осадков.

В первую очередь формируется зона иона, дающего с импрегнатом менее растворимое соединение (заштрихована). Высота образующихся зон находится в линейной зависимости от концентрации определяемых ионов.

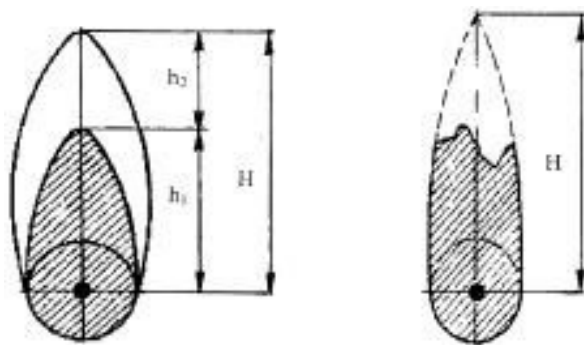


Рисунок 3 – Общая зона пиков после хроматографического разделения смеси двух ионов методом осадочной бумажной хроматографии.

Готовую хроматограмму вынимают из камеры (вторичная хроматограмма), слегка подсушивают на воздухе, а затем с помощью линейки измеряют высоты пиков (h) от центров круговых зон на линии старта до наивысшей точки пиков. По данным измерений стандартных растворов в координатах $h = f(C)$ строят калибровочные графики, пользуясь которыми определяют концентрацию определяемых ионов в анализируемом растворе. Основными этапами выполнения количественного разделения и анализа являются

следующие: – приготовление серии стандартных растворов смесей (см. методические указания к лабораторной работе). – подготовка и приобретение навыков работы с капилляром; – получение первичной хроматограмм; – получение вторичной хроматограммы; – обработка вторичной хроматограммы и построение градуировочного графика; – определение количества разделяемых ионов в исследуемом растворе по градуировочному графику.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) по способу проведения процесса хроматографирования относится к плоскостной хроматографии. Этот достаточно простой, быстрый, высокочувствительный метод разделения и идентификации многих видов неорганических и органические соединений разработан советскими учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер. По технике хроматографирования и обработке хроматограмм ТСХ ничем не отличается от бумажной распределительной хроматографии. Для характеристики сорбционных свойств в ТСХ, также как и в бумажной хроматографии пользуются фактором подвижности R_f .

Хроматографическая подвижность является чувствительной характеристикой веществ, однако она существенно зависит от условий проведения эксперимента. В качестве неподвижной фазы в ТСХ используют тонкий слой (~ 1 мм) порошкообразного сорбента с добавкой связующего, нанесенный на подложку с помощью специального распылителя. Подложки (пластинки) для сорбента обычно изготавливают из стекла, алюминиевой фольги, пластмассы или полиэфирной пленки. Одно из достоинств пленки состоит в том, что она прозрачна примерно до 320 нм и это позволяет проводить прямое фотометрирование многих веществ непосредственно в слое. В качестве сорбента в ТСХ применяют силикагели (оксид кремния), оксид алюминия, крахмал, целлюлозу, ионообменные смолы и некоторые другие вещества с высокой адсорбционной способностью. Выбор растворителя зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений.

Для получения первичной хроматограммы смесь анализируемых веществ растворяют в низкокипящем (50 – 100 °С) растворителе и с помощью откалиброванного стеклянного капилляра или микрошприца наносят на хроматографическую пластинку на расстоянии 1,5 – 2,0 см от её нижнего края. Для того чтобы ровно нанести пятна, пользуются шаблоном. После высыхания образовавшегося пятна пластинку помещают в закрытую камеру с элюентом (подвижная фаза) для получения вторичной хроматограммы. Элюент движется через слой сорбента и увлекает за собой нанесенные на пластинку анализируемые вещества. Скорость перемещения веществ, входящих в анализируемую смесь различна. Она зависит от природы самих веществ, от природы сорбента и используемого элюента. Таким образом осуществляется разделение смеси анализируемых веществ в слое сорбента. Когда фронт элюента приближается на 1,5 – 2,0 см к верхнему краю пластинки, ее вынимают из камеры и сушат на воздухе. Пятна веществ, имеющих окраску в видимой части спектра, сразу отмечают карандашом на хроматограмме. Пятна бесцветных веществ обнаруживают с помощью ультрафиолетового осветителя или проявляющих химических веществ и также отмечают на хроматограмме. Для каждого обнаруженного пятна, также как в бумажной распределительной хроматографии, измеряют пройденное расстояние и рассчитывают значение фактора подвижности R_f . Величина R_f является качественной характеристикой данного соединения, хроматографируемого на данном сорбенте конкретным элюентом в конкретных условиях опыта. Значения R_f , а также окраска пятен в ультрафиолетовом излучении и после химического проявления являются основными параметрами идентификации определяемых веществ. Количественное определение можно проводить двумя способами.

Первый способ – это прямое определение непосредственно на хроматографической пластинке методами спектрофотометрии и флуориметрии.

Другой способ предусматривает экстракцию соединения с пластинки прямым элюированием подходящим растворителем. Для определения компонента в растворе привлекают в основном спектрофотометрию.

Контрольные вопросы

1. Классификация методов бумажной хроматографии. Какую роль играет хроматографическая бумага в этом методе?
2. В чем сущность распределительной хроматографии на бумаге? Дать определение коэффициенту подвижности R_f .
3. Как выполняется качественный и количественный анализ методом распределительной хроматографии на бумаге?
4. Восходящая, нисходящая и круговая хроматография – техника выполнения.
5. В чем сущность осадочной хроматографии на бумаге? Техника хроматографирования.
6. Для чего проводят и какую роль играет процесс импрегнирования хроматографической бумаги?
7. Что такое стартовая линия и хроматографическая зона?
8. Тонкослойная хроматография – основы метода, используемые сорбенты, техника эксперимента.

Лабораторная работа 9.

ПЦР. Пробоподготовка. Расчет реакционной смеси.

Задание 1. Амплификация нуклеотидной последовательности кодирующей целевой белок.

Принцип метода: Метод ПЦР основан на многократном избирательном копировании (амплификации) определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). Копируется участок, который ограничен последовательностями комплементарными прямому и обратному праймерам.

Реактивы: dNTP, прямой праймер, обратный праймер, 10x буфер для ПЦР, ДНКполимераза, стерильная вода, минеральное масло для ПЦР

Расходные материалы: Одноразовые пластиковые наконечники 200 мкл, 1000 мкл, эппендорфы 1.5, 0.6 мл.

Оборудование: термостат твердотельный настольный или водяная баня, автоматические дозаторы переменного объема 0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, миницентрифуга Eppendorf, амплификатор, вортекс

Приготовление растворов: TE буфер – 10 mM трис, 1 mM ЭДТА, pH 8,0. Биологический материал: чашка Петри с колониями лабораторного рекомбинантного штамма *E.coli*, трансформированного плазмидой, несущей ген целевого белка.

Ход работы:

1. Одну колонию с чашки перенесите в 100 мкл TE-буфера. Инкубируйте 10 минут в термостате при 98 °C.
2. Центрифугируйте при 13400 об/мин в течение 1 минуты. Супернатант, содержащий ДНК, используйте для постановки ПЦР (ДНК-матрица).
3. Рассчитайте количество компонентов необходимое для постановки одной реакции ПЦР и приготовления ПЦР-смеси для постановки $n+2$ реакций (положительный и отрицательный контроли).

Компонент	Конечная концентрация	Объем, мкл (1 реакция)	Объем, мкл (n реакций)
dNTP, 10 мкМ каждого	0,2 мкМ		
Прямой праймер, 10 мкМ	0,2 мкМ		
Обратный праймер, 10 мкМ	0,2 мкМ		
10x буфер для ПЦР	1x		
ДНК-полимераза, 2 е.а./мкл	1 е.а.		
Стерильная вода	-		
ДНК-матрица		5 (вносить после)	5 (вносить после)
Суммарный объем	-	50	разнести по 45 мкл

Приготовьте реакционную смесь для ПЦР, смешивая компоненты в указанном в таблице порядке, без добавления ДНК-матрицы. Перемешайте на вортексе и разнесите в пробирки по 45 мкл.

5. Внесите в каждую пробирку 5 мкл ДНК-матрицы: в экспериментальные образцы - супернатант полученный в п.2, в положительный контрольный образец – 5 мкл ДНК плазмиды pQe-30 TagGFP (0.2 нг/мл), в отрицательный контрольный образец внести воду. Сверху добавьте каплю минерального масла, чтобы поверхность была покрыта маслом (для предотвращения испарения). Сбросить капли на вортексе 30 секунд.

6. Перенести пробирки в амплификатор и осуществить амплификацию по следующей программе:

	Температура, °C	Время, сек	N циклов
Начальная денатурация	95	300	1
Денатурация	95	15	24
Отжиг праймеров	60	15	
Элонгация	72	15	
Финальная элонгация	72	120	1

Проведите анализ ПЦР продукта методом гель-электрофореза

Задание 2. При приготовлении смеси для ПЦР обычно ориентируются на рекомендации фирм-производителей, а также общие рекомендации. В таблице ниже указаны усредненные значения компонентов для рутинной ПЦР. Рассчитайте объем каждого из компонентов смеси, если общий объем раствора 20 мкл, а на реакцию вам нужно взять 20 нг матрицы.

Компоненты ПЦР	Стоковый раствор	Рабочий раствор	Объем, мкл
Буфер	10X	1X	
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	
dNTP ₅	2,5 mM	0,25 mM	
Праймеры	1 мкМ	0,1 мкМ	
ДНК-матрица, плазида, 20 нг	0,2 мкг/мкл		
ДНК-полимераза	5 ед.а/мкл	0,1 ед.а/мкл	
Вода			
Общий объём			20

Сделайте выводы. Оформите работу в лабораторный журнал.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы
по дисциплине «**Методы исследования биополимеров**»

Направление подготовки	06.03.01 Биология
Направленность (профиль)	Генетика, селекция и биоинформатика

Ставрополь, 2023г.

ВВЕДЕНИЕ

Целью изучения данной дисциплины является усвоение студентами физико-химических принципов, лежащих в основе применяемых в молекулярной биологии методов и приборов, и на этой основе – понимания возможностей и ограничений этих методов и приборов, и, в итоге, формирование навыков эффективного самостоятельного планирования сложных экспериментов по анализу биополимеров, входящих в состав комплексных биологических объектов.

В результате освоения дисциплины студент должен:

иметь представление о наиболее часто используемых способах детекции, идентификации и фракционирования молекул биополимеров, а также лежащих в основе таких способов физико-химических принципах; о физико-химических принципах функционирования приборов и приборных комплексов, используемых в молекулярной биологии; знать основные инструментальные подходы к решению комплексных задач молекулярной биологии, основные принципы их функционирования и использования; уметь предсказывать и объяснять результаты применения физико-химических подходов и созданных на их основе приборов и приборных комплексов для решения задач молекулярной биологии, планировать эксперименты с использованием соответствующих приборов для решения таких задач.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных.

Методические рекомендации при подготовке к собеседованию

Изучение основных разделов **Методы исследования биополимеров** заканчивается проведением контрольных занятий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Собеседование представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде семинара, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятие могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к собеседованию студенту отводится 1-3 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к лабораторным занятиям рекомендуется изучить контрольные

вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в лабораторном практикуме, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель работы.
4. Ход выполнения работы.
5. Результаты.
6. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке презентаций и докладов

Доклад должен содержать элементы новизны, наряду с фундаментальным аспектом должен быть проведен анализ современного состояния изучаемой проблемы, а также включенность в региональную проблематику.

Доклад должен состоять из введения, теоретической части, заключения, списка литературы и презентации, раскрывающей суть темы в графиках, картинках, схемах, формулах.

Доклад рекомендуется представлять в объеме 1 печатный лист. Текст работы должен быть напечатан через 1,5 интервала на одной стороне стандартного листа белой бумаги (А4). Текст и другие отпечатанные элементы работы должны быть черными, контуры букв и знаков – четкими, без ореола и затенения. Шрифт Times New Roman, кегель 14. Названия глав и параграфов выделяются полужирным шрифтом. Лист с текстом должен иметь поля: слева – 30 мм, справа – 10 мм, сверху – 20 мм, снизу – 20 мм. Нумерация страниц текста делается в правом нижнем углу листа. Проставлять номер страницы необходимо со страницы, где печатается «Введение», на которой ставится цифра «3». После этого нумеруются все страницы, включая приложения.

Между названием главы и названием параграфа этой главы ставится пробел равный двум интервалам, а название параграфа не должно отделяться от текста этого параграфа пробелом. Названия параграфов отделяются от текста предыдущего параграфа пробелом, равным двум интервалам. Каждая глава, а также введение, выводы, приложения и список использованной литературы начинаются с новой страницы. Слово «Глава» не пишется. Главы имеют порядковые номера в пределах всей работы, обозначаемые арабскими цифрами (например: 1, 2, 3), после которых ставится точка. Слово «параграф» или значок параграфа в названии не ставятся. Параграфы имеют порядковые номера в пределах глав, обозначаемые арабскими цифрами (например: 1.1. и 1.2.). Заголовки глав и параграфов в тексте работы должны располагаться по центру, точку в конце названия главы и параграфа не ставят. Не допускается переносить часть слова в заголовке. 4.5. Нумерация таблиц и рисунков может быть сквозной или соотноситься с номером главы и параграфа. Например, если таблица или рисунок включены в текст первого параграфа второй главы, нумерация следующая: Таблица 2.1.1., рис. 2.1.1. Последняя цифра означает порядковый номер таблицы (или рисунка) в данном параграфе. Таблица помещается в качестве следующей страницы после первого упоминания о ней в тексте.

Методические рекомендации по подготовке к решению кейсов.

Кейс-задания - основной элемент метода case-study, который относится к неигровым имитационным активным методам обучения. кейс содержит схематическое словесное описание ситуации, статистические данные. Кейс дает возможность приблизиться к практике, встать на позицию человека, реально принимающего решения.

Кейсы наглядно демонстрируют, как на практике применяется теоретический материал. Метод case-study – инструмент, позволяющий применить теоретические знания к решению практических задач. С помощью этого метода студенты имеют возможность проявить и совершенствовать аналитические и оценочные навыки, научиться работать в

команде, находить наиболее рациональное решение поставленной проблемы.

Учебными целями метода кейсов являются:

- развитие аналитического мышления;
- развитие практических навыков работы с информацией;
- развитие навыков разработки управленческих решений;
- освоение современных управленческих и социально-психологических технологий;
- повышение коммуникативной компетентности;
- развитие навыков конструктивной критики;
- повышение мотивации к обучению и профессиональному развитию.

Кейс-технология как метод обучения и активизации учебного процесса ориентированы на решение следующих задач:

- овладеть навыками и приемами всестороннего анализа ситуаций из сферы профессиональной деятельности;
- отработать умение востребовать дополнительную информацию, необходимую для уточнения исходной ситуации;
- приобрести навыки применения теоретических знаний для решения практических проблем;
- развить навыки принятия решений в ситуации неопределенности;
- приобрести навыки ясного и точного изложения собственной точки зрения в устной или письменной форме;
- выработать умение осуществлять презентацию, то есть убедительно преподносить, обосновывать и защищать свою точку зрения;
- отработать навыки конструктивного критического оценивания точки зрения других;
- научиться самостоятельно принимать решения на основе группового анализа ситуации.

Решение кейса представляет собой продукт самостоятельной индивидуальной или групповой работы студентов. Работа с кейсом осуществляется поэтапно:

Первый этап – знакомство с текстом кейса, изложенной в нем ситуацией, ее особенностями.

Второй этап – выявление фактов, указывающих на проблему(ы), выделение основной проблемы (основных проблем), выделение факторов и персоналий, которые могут реально воздействовать.

Третий этап – выстраивание иерархии проблем (выделение главной и второстепенных), выбор проблемы, которую необходимо будет решить.

Четвертый этап – генерация вариантов решения проблемы. Возможно проведение «мозгового штурма».

Пятый этап – оценка каждого альтернативного решения и анализ последствий принятия того или иного решения.

Шестой этап – принятие окончательного решения по кейсу, например, перечня действий или последовательности действий.

Седьмой этап – презентация индивидуальных или групповых решений и общее обсуждение.

Восьмой этап – подведение итогов в учебной группе под руководством преподавателя.

Ознакомление студентов с текстом кейса и последующий анализ кейса может осуществляться заранее (за несколько дней до его обсуждения) как самостоятельная работа студентов. Обсуждение небольших кейсов может быть включено в учебный процесс, и студенты могут знакомиться с ними непосредственно на занятиях.

Общая схема работы с кейсом на этапе анализа может быть представлена следующим образом: в первую очередь следует выявить проблемы кейса и понять, какие именно из представленных данных важны для решения; войти в ситуационный контекст

кейса, определить, кто его главные действующие лица, отобрать информацию необходимую для анализа, понять, какие трудности могут возникнуть при решении задачи. Максимальная польза из работы над кейсами будет извлечена в том случае, если студенты при предварительном знакомстве с ними будут придерживаться систематического подхода к их анализу, основные шаги которого представлены ниже.

1. Выпишите из соответствующих разделов учебной дисциплины ключевые идеи, для того, чтобы освежить в памяти теоретические концепции и подходы, которые Вам предстоит использовать при анализе кейса.

2. Бегло прочтите кейс, чтобы составить о нем общее представление.

3. Внимательно прочтите вопросы к кейсу и убедитесь в том, что Вы хорошо поняли, что Вас просят сделать.

4. Вновь прочтите текст кейса, внимательно фиксируя все факторы или проблемы, имеющие отношение к поставленным вопросам.

5. Продумайте, какие идеи и концепции соотносятся с проблемами, которые Вам предлагается рассмотреть при работе с кейсом.

Для успешного анализа кейсов следует придерживаться ряда принципов: используйте знания, полученные в процессе лекционного курса; внимательно читайте кейс для ознакомления с имеющейся информацией, не торопитесь с выводами; не смешивайте предположения с фактами;

При проведении письменного анализа кейса помните, что основное требование, предъявляемое к нему, – краткость.

Презентация, или представление результатов анализа кейса, выступает очень важным элементом метода. При этом в case-study используются два вида презентаций: устная (публичная) и письменный отчет-презентация.

Публичная (устная) презентация предполагает представление решений кейса группе.

Устная презентация требует навыков публичного выступления, умения кратко, но четко и полно изложить информацию, убедительно обосновать предлагаемое решение, корректно отвечать на критику и возражения. Одним из преимуществ публичной (устной) презентации является ее гибкость. Выступающий может откликаться на изменения окружающей обстановки, адаптировать свой стиль и материал, чувствуя настроение аудитории.

Письменный отчет-презентация требует проявления таких качеств, как умение подготовить текст, точно и аккуратно составить отчет, не допустить ошибки в расчетах и т.д. Подготовка письменного анализа кейса аналогична подготовке устного, с той разницей, что письменные отчеты-презентации обычно более структурированы и детализированы. Основное правило письменного анализа кейса заключается в том, чтобы избегать простого повторения информации из текста, информация должна быть представлена в переработанном виде. Самым важным при этом является собственный анализ представленного материала, его соответствующая интерпретация и сделанные предложения. Письменный отчет – презентация может сдаваться по истечении некоторого времени после устной презентации, что позволяет более тщательно проанализировать всю информацию, полученную в ходе дискуссии.

Рекомендуемая литература.

Перечень основной литературы:

1. Биополимеры и перспективные материалы на их основе: учебное пособие / А. С. Сироткин, Ю. В. Лисюкова, Т. В. Вдовина, Ю. В. Щербакова. - Казань: КНИТУ, 2017. - 116 с. - ISBN 978-5-7882-2305-6. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/138392> (дата обращения: 09.02.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
2. Кильдеева, Н. Р. Спектральные методы исследования биополимеров: учебное пособие / Н. Р. Кильдеева, Н. Н. Гридина. — Москва: РГУ им. А.Н. Косыгина, 2015.

- 59 с. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/128630> (дата обращения: 09.02.2023). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
3. Основы генетики: учебное пособие / составители Е. В. Кукушкина, И. А. Кукушкин. - 2-е изд. - Комсомольск-на-Амуре, Саратов: Амурский гуманитарно-педагогический государственный университет, Ай Пи Ар Медиа, 2019. - 145 с. - ISBN 978-5-85094-490-2, 978-5-4497-0138-1. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/85823.html>
 4. Нахаева, В.И. Практический курс общей генетики: учебное пособие для студентов биологических специальностей педагогических высших учебных заведений: [16+] / В. И. Нахаева. — 4-е изд., стереотип. — Москва: ФЛИНТА, 2021. — 210 с. — Режим доступа: по подписке.
 5. Генетика: учебное пособие / М. Н. Ситников, З. И. Боготова, М. М. Биттуева [и др.]. - Нальчик: Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова, 2019. - 119 с. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/110223.html>.
 6. Асанов, А. Ю. Основы генетики: учебник для вузов / А.Ю. Асанов, Н.С. Демикова, В.Е. Голимбет. — Москва: Академия, 2012. — 281, [1] с: ил.; 22. — (Высшее профессиональное образование. Психолого-педагогическое образование. Бакалавриат). — Библиогр.: с. 267. — ISBN 978-5-7695-8801-3.

Перечень дополнительной литературы:

1. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 1. Основные понятия, определение пола и смежные вопросы, генетическая рекомбинация: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 408 с. - ISBN 978-5-4488-0792-3, 978-5-4497-0453-5. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. - URL: <https://www.iprbookshop.ru/96019.html>
2. Костерин, О. Э. Основы генетики. В 2 частях. Часть 2. Хромосомные перестройки, полиплоидия и анеуплоидия, мобильные генетические элементы и генетическая трансформация, генетика количественных признаков и популяционная генетика: учебник для СПО / О. Э. Костерин; под редакцией В. К. Шумного. - Саратов, Москва: Профобразование, Ай Пи Ар Медиа, 2020. - 246 с. - ISBN 978-5-4488-0793-0, 978-5-4497-0454-2. - Текст: электронный // Цифровой образовательный ресурс IPR SMART: [сайт]. — URL: <https://www.iprbookshop.ru/96020.html>
3. Рубан, Э. Д. Генетика человека с основами медицинской генетики: учебник / Э. Д. Рубан; отв. ред. Д. В. Волкова. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2020. — 319 с.: ил. — (Среднее медицинское образование). — Режим доступа: по подписке. — URL: <https://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=601619>.
4. Генетика: учебник для вузов / В.И. Иванов, Н.В. Барышникова, Дж.С. Билева [и др.]; под ред. акад. В.И. Иванова. — М.: Академкнига, 2006. — 640 с.: ил. — (Учебник для вузов). — Предм. указ.: с. 604-627. — ISBN 5-94628-146-1.
5. Генетика: учеб. пособие / под ред. А. А. Жученко. — М.: КолосС, 2004. — 480 с. — (Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений). — Библиогр.: в тексте. — Предм. указ.: с. 469-476. — ISBN 5-9532-0069-2.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины

1. <https://polymerbranch.com/3988c7f88ebcb58c6ce932b957b6f332/9632de50197947c6b2680f0a21bf8f10/magazineclause.pdf>
2. <https://cyberleninka.ru/article/n/biopolimery-perspektivnyy-vektor-razvitiya-polimernoy-promyshlennosti>

3. <https://biomolecula.ru/articles/laboratoriia-inzhenerii-biopolimerov-simbioz-dlinoiu-v-desiatiletiia>
4. www.elibrary.ru – электронная научная библиотека
5. medbiol.ru - База знаний биологии и медицины
6. biomolecula.ru - новости о достижениях в современной биологии и медицины
7. <https://biomolecula.ru/themes/gen-inzhenerija>
8. <http://генофонд.рф/>
9. <http://www.sevin.ru/collections/>
10. <http://ugene.net/ru/>
11. <http://biomodelsgroup.ru/projects/>
12. <http://vigg.ru/database/>
13. <http://samurai.bionet.nsc.ru/pages/>
14. <http://groh.ru/imb/>
15. <http://www.bionet.nsc.ru/labs/theorylabmain/ltg.php?f=resources&p=resources>
16. <http://www.bionet.nsc.ru/bioinf/>
17. <http://molbiol.edu.ru/>
18. <http://res.tsu.ru/monograf/smonogr1.htm>
19. http://www.rtcб.iitp.ru/publ_r.htm
20. http://niib_old.sfedu.ru/dat/localized/rus/files/1.pdf
21. <http://germplasm.icbge.org.ua/ru/>
22. <http://forest.akadem.ru/Articles/LSVD/2/art.html>
23. http://chromosome2012.mcb.nsc.ru/chromosome_2012_abstracts.pdf
24. <http://ngsconference.ru/>
25. <http://igc.by/ru/purchase-ru/>
26. http://www.rtcб.iitp.ru/mg_r.htm
27. <https://elementy.ru/catalog/t59/Genetika?page=2>