

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

# **БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ**

Учебно-методическое пособие для вузов

Составители:  
О.А. Сафонова,  
А.В. Макеева,  
Т.Н. Попова

Издательско-полиграфический центр  
Воронежского государственного университета  
2011

## Содержание

Введение.....	6
1. Правила поведения и техника безопасности в биохимической лаборатории .....	7
2. Применение приставок для кратных единиц измерения в международной системе .....	12
3. Основные способы выражения концентрации растворов в биохимии ....	12
3.1. Приготовление растворов кислот заданной концентрации.....	15
4. Измерение рН. Буферные растворы.....	16
4.1. Электроды потенциометрии .....	17
4.2. Буферные растворы .....	20
4.3. Механизм буферного действия .....	21
4.4. Приготовление буферных растворов .....	22
Задание к лабораторной работе «Приготовление буферных растворов с заданными рН и концентрацией» .....	23
5. Спектрофотометрия и ее применение в биологии .....	24
5.1. Закономерности поглощения света веществом .....	24
5.2. Спектральные приборы .....	27
Задание к лабораторной работе «Исследование спектра поглощения нативной сыворотки крови доноров» .....	28
Задание к лабораторной работе «Определение концентрации исследуемого вещества в растворе».....	28
6. Измерение скорости ферментативных реакций .....	29
6.1. Методы количественного определения ферментативной активности .....	32
6.1.1. Спектрофотометрические методы .....	33
Задание к лабораторной работе «Определение активности НАД-малатдегидрогеназы из тканей крыс спектрофотометрическим методом» .....	35
6.1.2. Другие методы количественного определения активности ферментов .....	36
7. Общие правила работы с ферментами.....	38
8. Определение содержания белка .....	41
8.1. Метод Лоури (задание к лабораторной работе).....	41
8.2. Биуретовый метод (задание к лабораторной работе).....	43
8.3. Спектрофотометрический метод.....	44

## Введение

Биологическая химия – это наука о молекулярных основах жизни. Она изучает химический состав организмов, превращение веществ и энергии, которое осуществляется в процессе их жизнедеятельности. В настоящее время биохимия ставит перед собой главную задачу – выяснить, каким образом неживые молекулы, составляющие живую клетку, взаимодействуют друг с другом и поддерживают живое состояние этой клетки. Также весьма важной задачей является изучение молекулярных процессов, лежащих в основе патологий различной этиологии, и методов эффективного лечения последних. Биохимия является базовой, фундаментальной дисциплиной в профессиональной подготовке студентов, обучающихся биологическим и медицинским специальностям, а также фармакологии, фармакотерапии, фармакогнозии, фармацевтической химии и другим профильным дисциплинам.

Важная роль в подготовке специалистов в области физико-химической биологии принадлежит такой дисциплине, как большой практикум, в рамках которой студенты осваивают навыки работы в биохимических и биофизических лабораториях. В частности, одна из задач этой дисциплины – изучение студентами практических методов выделения и очистки белков, а также способов оценки качественного и количественного состава биологических объектов.

Одним из основных разделов биологической химии является энзимология, или наука о ферментах – биологических катализаторах, большинство из которых обладают белковой природой. Знания, получаемые в этой области, имеют как теоретическое, так и практическое значение. Это связано с широким использованием ферментов и других белков в различных отраслях медицины в качестве перспективных средств медикаментозного лечения вследствие их исключительно высокой активности и специфичности. Кроме того, исследования регуляции клеточного обмена веществ на ферментативном уровне имеют фундаментальное значение для понимания механизмов развития патологических процессов и действия биологически активных веществ, в том числе и лекарственных препаратов.

Для исследования свойств ферментов, особенностей их функционирования в клетке, а также практического применения белков необходимо их выделение в высокоочищенном состоянии. В данном пособии рассматриваются основные подходы физико-химической биологии, используемые для определения активности ферментов, их выделения из тканей живых организмов, очистки и исследования каталитических и регуляторных свойств.

Пособие будет полезным для студентов, обучающихся биологическим специальностям, а также для аспирантов и научных работников.

## **1. Правила поведения и техника безопасности в биохимической лаборатории**

Важнейшими условиями эффективной работы в лаборатории являются:

- 1) целесообразное устройство лаборатории, т.е. рациональное размещение рабочих мест и оборудования;
- 2) подбор соответствующих инструментов, посуды и необходимых приборов;
- 3) экономное использование материалов при постановке экспериментов.

Одним из основных требований при проведении экспериментов является соблюдение чистоты. Химическая посуда при работе должна быть прикрыта чистой бумагой или часовым стеклом, чтобы предотвратить попадание пыли или других загрязнителей. Предупреждая оседание аммонийных солей, присутствующих в воздухе, горловины посуды с реактивами рекомендуют закрывать сверху стаканчиками (без носика) так, чтобы их края опирались на склянку. Грязную химическую посуду следует мыть сразу после окончания работы.

При использовании в экспериментах приборов необходимо начинать работу с тщательного изучения их устройства и правил эксплуатации. В лаборатории запрещается оставлять без присмотра работающие приборы и включенные электронагревательные устройства.

Каждый работающий в лаборатории должен иметь халат, предохраняющий тело и одежду.

Для работы с биологическим материалом (кровью доноров или препаратами из крови, мочой, слюной, желудочным соком, гомогенатами тканей), а также с агрессивными или токсичными веществами, способными действовать на кожу (трихлоруксусной кислотой, фенолом, акриламидом, бромистым этидием), необходимо использовать резиновые перчатки.

Экспериментатор должен знать основные свойства применяемых им реактивов, в т.ч. степень их токсичности и способность к образованию взрыво- и огнеопасных смесей с другими реактивами.

По своему назначению реактивы подразделяют на две основные группы: общеупотребительные и специальные. К общеупотребительным относят кислоты (соляная, азотная, серная), щелочи (раствор аммиака, едкие натр и калий), оксиды кальция и бария, некоторые неорганические соли, различные индикаторы. Специальные реактивы применяют для определенных работ. По чистоте реактивы делят на химически чистые (х.ч.), чистые для анализа (ч.д.а.), чистые (ч.). Кроме того, имеются реактивы таких кондиций: технический (техн.), очищенный (оч.), особой чистоты (ос.ч.), высшей очистки (в.оч.) и спектрально чистые (сп.ч.). Для реактивов каждой из этих категорий установлено определенное допустимое содержание примесей.

Растворы реактивов необходимо готовить в том количестве, которое нужно для работы. Перед взятием реактива из банки с ее горла удаляют

пыль или другие загрязнения для предотвращения их попадания в пересыпаемое вещество. Реактивы из банки берут при помощи фарфоровой или стеклянной ложки или шпателя. Наливать или насыпать реактивы следует только над столом. Не следует оставлять открытыми банки с реактивами. Просыпавшийся на стол реактив нельзя высыпать обратно в ту банку, где он хранится. Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой. На всех сосудах с приготовленными реактивами должны быть этикетки с обозначениями (надписями), что хранится, или надписи, сделанные восковым карандашом для стекла. Реактивы, изменяющиеся под действием света, хранят в желтых или темных склянках.

Особую осторожность следует соблюдать при обращении с токсичными, огнеопасными (например, диэтиловый эфир, этиловый или бутиловый спирты, бензол, петролейный эфир) и взрывоопасными (хлорная кислота и ее соли) веществами. С огнеопасными реактивами следует работать вдали от огня и работающих нагревательных приборов.

Для приготовления растворов, споласкивания посуды после мытья используют дистиллированную воду, почти не содержащую примесей неорганических и органических веществ, получаемую путем перегонки водопроводной воды. Однако дистиллированная вода всегда содержит незначительные следы посторонних веществ, попадающих в нее из воздуха в виде пыли или вследствие выщелачивания стекла посуды. Для проведения более точных экспериментов используют бидистиллированную воду. Качество полученной дистиллированной и бидистиллированной воды (в т.ч. находившейся в течение длительного времени в лаборатории) необходимо ежедневно контролировать, определяя значение рН. Для длительного хранения дистиллированной воды рекомендуют закрывать бутылки с водой стеклянными притертыми пробками. Однако в опытах предпочтительнее использовать свежеперегнанную дистиллированную воду.

Используемую в лабораториях химическую посуду (и аппаратуру) подразделяют на посуду общего назначения, специального назначения и мерную. К группе общего назначения относят пробирки, воронки простые и делительные, стаканы, плоскодонные колбы, кристаллизаторы, конические колбы, холодильники и другие. Группа специального назначения используется для одной определенной цели, например, аппарат Киппа, ареометры, круглодонные колбы, прибор Кьельдаля и др. К мерной посуде, применяемой для измерения объема жидкости, относятся мерные цилиндры и мензурки, пипетки, бюретки и мерные колбы.

Необходимо отметить, что при проведении реакций в пробирке реактивы не следует применять в слишком большом количестве (пробирка не должна быть заполнена до краев). Желательно, чтобы пробирка была заполнена на  $1/4$  или  $1/8$  своей емкости. Для введения в пробирку твердого