

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
"ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ"

Кафедра фармакологии и
физиологии

***Белки и нуклеиновые кислоты.
Структура, функции, обмен.***

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по «Общей биологической химии»

(для лабораторных работ)

для студентов инженерно-технологического факультета
по специальности 1-49 01 02 02 «Технология переработки
молока и молочных продуктов» и
1-49 01 02 01 «Технология переработки мяса и мясопродуктов»

Гродно 2010

УДК 577.112
ББК 28.072 Я73
Б-43

Авторы: Л.Б. Заводник, Т.Н. Будько, О.Н. Почебут.

Рецензенты: доцент, кандидат биологических наук О.В. Коноваленко;
доцент, кандидат биологических наук Н.Э. Петушок.

Б-43 **Белки** и нуклеиновые кислоты. Структура, функции, обмен : методич. указания по «Общей биологической химии» / Л.Б. Заводник, Т.Н. Будько, О.Н. Почебут – Гродно : ГГАУ, 2010 – 54 с.

Методические указания по «Общей биологической химии» составлены в соответствии с учебной программой и предназначены для выполнения лабораторных работ по темам «Белки» и «Нуклеиновые кислоты». Рассмотрены принципы определения структуры и физико-химических свойств биологических макромолекул. Пособие предназначено для студентов инженерно-технологического факультета по специальности 1-49 01 02 02 «Технология переработки молока и молочных продуктов» и 1-49 01 02 01 «Технология переработки мяса и мясопродуктов».

Рекомендовано учебно-методической комиссией инженерно-технологического факультета УО «ГГАУ» (Протокол № 6 от 5 февраля 2010 г).

© Л.Б. Заводник, Т.Н. Будько, О.Н. Почебут., 2010
© УО «ГГАУ», 2010

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории

1. Проводите опыты, указанные преподавателем, соблюдая правила безопасности и в халате.
2. Обязательно ознакомьтесь с описанием работы по методическому указанию.
3. Будьте особенно осторожны в обращении с концентрированными растворами кислот, щелочей, огнеопасными и ядовитыми веществами!
4. При работе с раздражающими веществами пользуйтесь вытяжными шкафами.
5. Не пробуйте вещества на вкус, не наклоняйтесь над склянками и реактивами.
6. Не нюхайте вещества полной грудью. Нюхать можно только по указанию преподавателя, осторожно направляя к себе газ или пары веществ рукой.
7. Для опытов берите вещества в количествах, указанных в руководстве или преподавателем.
8. Убирайте свое рабочее место, не оставляйте посуду с остатками веществ. Пролитые или рассыпанные вещества удаляйте по указанию преподавателя.
9. Не оставляйте открытыми склянки и банки с реактивами.
10. Не выбрасывайте и не выливайте в канализацию остатки реактивов.
11. Правильно пользуйтесь нагревательными приборами и строго соблюдайте правила безопасности при нагревании:
 - а) гасите спиртовку, накрывая пламя колпачком;
 - б) отверстие пробирки при нагревании направляйте в сторону от себя и товарищей, не наклоняйтесь над нагреваемыми сосудами;
 - в) в пробирке нагревайте только небольшие количества вещества, жидкость должна занимать не более 1/3 объема пробирки;
 - г) пробирку с веществами слегка прогрейте всю, затем нагревайте в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.

АМИНОКИСЛОТЫ, ПЕПТИДЫ, БЕЛКИ

Белки – высокомолекулярные природные полимеры, состоящие из аминокислотных остатков; являются главной составной частью живых организмов и молекулярной основой процессов жизнедеятельности.

Белки, или протеины (в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие») присутствуют во всех клетках. На их долю у животных приходится около половины сухой массы, у растений – 20-35%. В белках массовая доля углерода в среднем составляет ~ 50%, водорода ~ 7%, кислорода ~ 23%, азота ~ 16%, серы ~ 1-3%. В их составе также встречаются и другие химические элементы.

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

I. Функциональная (по функции, выполняемой в организме)

1. Каталитическая (более 3000 белков – ферменты).
2. Сократительная (актин, миозин и т. д.).
3. Структурная (белки плазматических мембран, коллаген, эластин и др.).
4. Транспортная (транспорт веществ в крови и клетке: гемоглобин, цитохром с, липопротеины и др.).
5. Защитная (антитела, иммуноглобулины).
6. Регуляторная (факторы роста и дифференцировки клеток и др.).
7. Гормональная (гормоны гипоталамуса, гормон роста и др.).
8. Буферная (гемоглобиновый белковый буфер, поддержание рН крови).
9. Резервная или запасная (овальбумин и др.).
10. Токсины (ботулинический, холерный).
11. Антибиотики (неокарциностагин и др.).
12. Рецепторная (родопсин, хеморецепторы и др.).
13. Белки, поддерживающие онкотическое давление в клетках и крови.

14. Энергетическая (в очень малой степени, т.к. продукты гидролиза белка служат источником энергии только в особых условиях, например, при голодании).

II. По форме молекулы

1. Глобулярные или шаровидные (альбумины, глобулины).
2. Фибриллярные или нитевидные (коллаген).

III. По степени сложности молекулы

1. Простые (состоят только из АК).
2. Сложные (в состав белка входит небелковое вещество – простетическая группа).

ФУНКЦИИ ПЕПТИДОВ

Пептиды – это соединения, в состав которых входит несколько остатков аминокислот, связанных пептидными связями. В зависимости от количества остатков аминокислот и молекулярной массы различают низкомолекулярные (от двух до десяти аминокислотных остатков) и высокомолекулярные (более 10, молекулярная масса от 5 000 до 16 000 Д).

1. Регуляторная (пептиды ренин-ангиотензивной системы и др.).
2. Гормоны (окситоцин, инсулин, глюкагон).
3. Антибиотики (пенициллин, цефалоспорины).
4. Токсины (аманитотоксин).
5. Антиоксиданты (глутатион).
6. Нейропептиды (энкефалины, эндорфины — обезболивающий эффект).

Главные составные части белка — *аминокислоты*.

– протеиногенные, которые кодируются генетическим кодом (20);

– непротеиногенные (более 150).

Протеиногенные АК являются α -АК (кроме пролина).

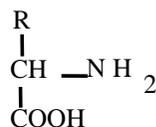
КЛАССИФИКАЦИЯ АК

I. По строению радикала

1. Алифатические (гли, ала, вал, лей, илей).
2. Гидроксиаминокислоты (сер, тре).
3. Дикарбоновые (асп, глу).
4. Амиды дикарбоновых кислот (асн, глн).
5. Серосодержащие (мет, цис).
6. Циклические (фен, тир, три, гис).
7. Диаминомонокарбоновые (лиз, арг).
8. Иминокислота (про).

II. По кислотно-основным свойствам

1. Нейтральные.
2. Кислые.
3. Основные.



общая формула
аминокислот

III. По полярности

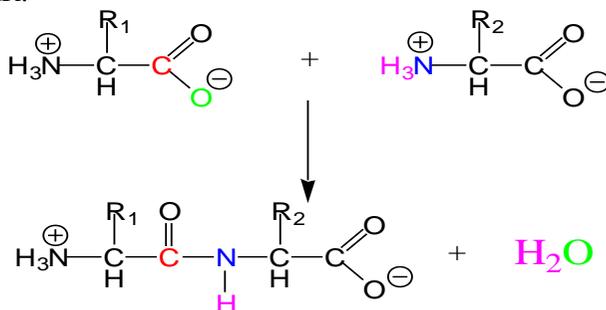
1. Неполярные (ала, вал, лей, мет, про, иле, три, фен).
2. Полярные:
 - а) незаряженные (сер, тре, цис, гли, тир, асн, глн);
 - б) заряженные:
 - отрицательно заряженные (глу, асп);
 - положительно заряженные (лиз, арг, гис).

Нестандартные АК в составе белков:

- γ -карбоксиглутаминовая кислота (протромбин: свертывание крови);
- 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин (белки соединительной ткани: коллаген);
- десмозин (конденсация 4-х молекул лизина: соединительная ткань);
- диiodтирозин (гормоны щитовидной железы).

УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Первичная структура — это последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Эта структура формируется в результате образования *пептидной связи* между остатками АК.



Первичную структуру белка стабилизируют (поддерживают):

- пептидные связи (между АК-остатками);
- дисульфидные связи (между свободными –SH-группами цистеина).

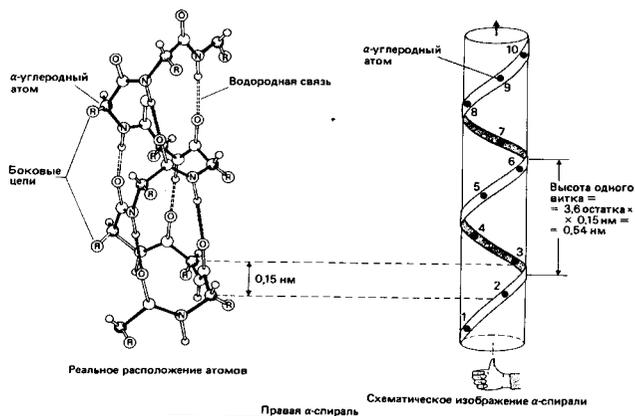
Первичная структура белка несет информацию о его пространственной структуре.

Вторичная структура белка – пространственная ориентация в виде α-спирали или β-структуры.

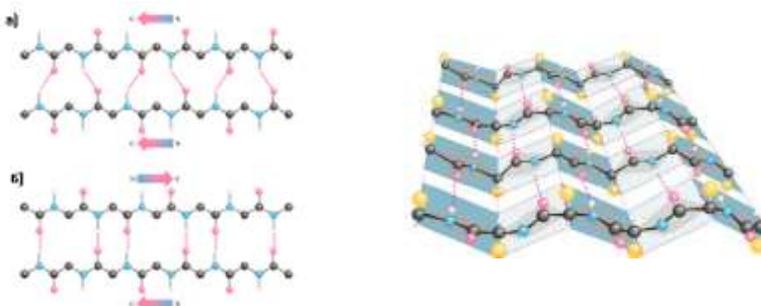
Основные связи, которые стабилизируют вторичную структуру, – *водородные*.

Виды вторичной структуры:

α -спираль (правозакрученная)



β -структура



- а) Параллельная
- б) Антипараллельная

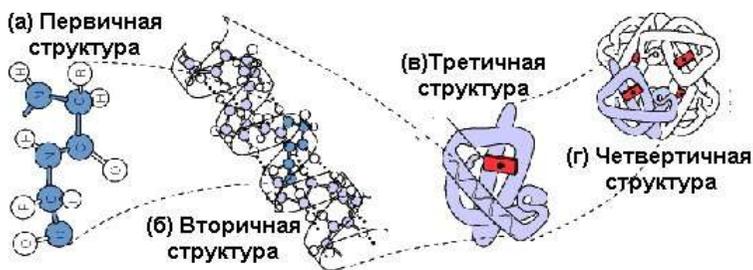
Третичная структура белка – это расположение в пространстве α -спирали или β -структуры.

Поддержанию третичной структуры белка способствуют *гидрофобные* связи, которые образуются внутри молекулы. В

образовании этих связей принимают участие неполярные радикалы аминокислот. Могут также образовываться другие нековалентные связи.

У белка, имеющего третичную структуру, на поверхности молекулы формируется участок, который может присоединять к себе другие молекулы, называемые лигандами.

Четвертичная структура формируется при объединении нескольких полипептидных цепей, имеющих третичную структуру. Образованный таким образом белок обладает новой функцией.



Белки с четвертичной структурой называются олигомерными, а составляющие их индивидуальные полипептидные цепи – протомерами или мономерами. Такие соединения стабилизируются водородными связями и электростатическими взаимодействиями между АК-остатками, расположенными на поверхности протомеров.

Пространственная организация белковой молекулы определяется в основном водородными, ионными связями, ван-дер-ваальсовыми силами, гидрофобными взаимодействиями. Водородные связи, возникающие между пептидными группами, определяют вторичную структуру белка. Формирование третичной и четвертичной структуры осуществляется водородными связями, образующимися между радикалами полярных аминокислот, ионными связями, ван-дер-ваальсовыми силами, гидрофобными взаимодействиями. Дисульфидные связи принимают участие в стабилизации третичной структуры.

СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Многие белки в своем составе, помимо аминокислот, могут содержать и небелковые компоненты. Эти соединения в составе белков называют *простетической группой*. Простетические группы с белком соединяются разными типами связей.

В зависимости от химического состава простетической группы сложные белки можно разделить на несколько классов.

1. Хромопротеины. Это белки, простетическая группа которых имеет окраску. К ним относятся многие белки, содержащие металлы. Например, церулоплазмин – белок, содержащий медь, имеет синюю окраску. Белки, содержащие железо: гемоглобин, миоглобин, цитохромы. Они имеют красную окраску. Присутствие витамина В₂ придает белкам желтый цвет (флавопротеины).

2. Гликопротеины. Это белки, простетическая группа которых содержит углеводы. Углевод соединяется с белковой частью ковалентными связями. В соединении с углеводом участвует ОН-группа аминокислоты серина или треонина. Гликопротеины – это часть белково-углеводных комплексов. Этим белкам принадлежит важная роль в структурной организации клеток и тканей, они выполняют защитные функции. Основная часть внеклеточных белков – это гликопротеины.

3. Липопротеины. Это белки, простетическая группа которых содержит липиды. Они обеспечивают транспорт липидов в крови, являются компонентами биологических мембран. Связи между белковой частью молекулы и липидом – гидрофобные или ионные.

4. Металлопротеины. Это белки, простетическая группа которых представлена металлами. Они транспортируют или участвуют в депонировании металлов (ферритин, трансферрин). Между белком и простетической группой образуются координационные связи.

5. Нуклеопротеины. Простетическая группа у таких белков – нуклеиновая кислота. Различают дезоксирибонуклеопротеины (простетическая группа — ДНК) и рибонуклеопротеины (простетическая группа — РНК). Им принадлежит важная роль в хранении, передаче и реализации генетической информации. Между

белком и молекулой нуклеиновой кислоты образуются ионные связи.

6. Фосфопротеины. Белки, которые содержат в своем составе фосфорную кислоту. Используются для регуляции процессов жизнедеятельности (фосфорилирование / дефосфорилирование). Между белком и остатком фосфорной кислоты формируются сложноэфирные связи.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Аминокислоты, соединяясь пептидной связью, образуют полипептидные цепи. Линейная *последовательность аминокислотных остатков*, соединенных между собой *пептидными связями*, определяет *первичную структуру* белковой молекулы.

ЭТАПЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

I. Выделение белка из смеси в чистом виде (по одному из признаков: размер молекулы, заряд, специфическое сродство связывания). Определение молекулярной массы.

II. Определение N-концевой АК.

III. Определение C-концевой АК.

IV. Определение АК-последовательности белковой цепи.

Выделение белка из биологического материала основано на его физико-химических свойствах. Чаще всего для этих целей используют кислотно-основные свойства белков (амфотерность, заряд молекулы, изоэлектрическое состояние).

От заряда белковых молекул зависит их:

- растворимость (минимальна в ИЗС);
- электрофоретическая подвижность;
- структура и биологическая активность.

При растворении в водной среде на поверхности белковой молекулы *формируется гидратная оболочка*.

Устойчивость белка в растворе зависит от:

- 1) заряда белковой молекулы;
- 2) наличия гидратной оболочки;
- 3) молекулярной массы белка.

Для выделения *нативных белков* (без изменения пространственной структуры) из биологического раствора используют методы:

- высаливание (осаждение солями щелочноземельных металлов: хлорид натрия, сульфат аммония); не нарушается первичная структура белка;
- осаждение (использование водоотнимающих веществ: спирт или ацетон при низких температурах, около -20°C).

При использовании этих методов белки лишаются гидратной оболочки и выпадают в осадок в растворе.

Денатурация — нарушение пространственной структуры белков (первичная структура молекулы сохраняется). Может быть обратимая (структура белка восстанавливается после устранения денатурирующего агента) или необратимая (пространственная структура молекулы не восстанавливается, например, при осаждении белков минеральными концентрированными кислотами, солями тяжелых металлов).

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Отделение белков от низкомолекулярных примесей

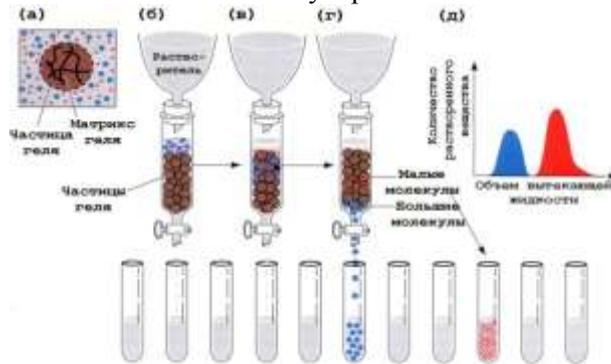
Метод мембранных сит (диализ)

Используют диализную мембрану, которая является полимером и имеет поры определенной величины. Малые молекулы (низкомолекулярные примеси) проходят через поры в мембране, а крупные (белки) задерживаются. Таким образом белки отмываются от примесей.

Разделение белков по молекулярной массе

Гель-хроматография

Хроматографическую колонку заполняют гранулами геля (сефадекса), который имеет поры определенной величины. В колонку вносят смесь белков. Белки, размер которых меньше, чем размер пор сефадекса, задерживаются в колонке, так как «застревают» в порах, а остальные свободно выходят из колонки. Размер белка зависит от его молекулярной массы.



Ультрацентрифугирование

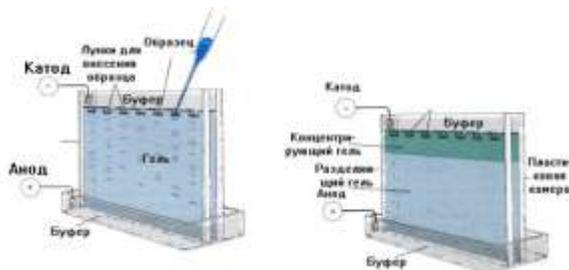
Этот метод основан на различной скорости седиментации (осаждения) белковых молекул в растворах с различным градиентом плотности (сахарозный буфер или хлорид цезия).



Электрофорез

Данный метод основан на различной скорости миграции белков и пептидов в электрическом поле в зависимости от заряда.

Носителями для электрофореза могут служить гели, ацетатцеллюлоза, агар. Разделяемые молекулы движутся в геле в зависимости от размера: те из них, которые имеют большие размеры, будут задерживаться при прохождении через поры геля. Меньшие молекулы будут встречать меньшее сопротивление и, соответственно, двигаться быстрее. В результате, после проведения электрофореза, большие молекулы будут находиться ближе к старту, чем меньшие.



Методом электрофореза можно разделить белки по молекулярной массе. Для этого используют электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na).

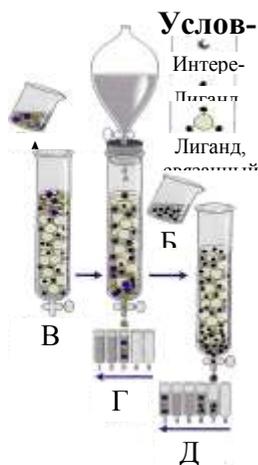
ДДС-Na является амфифильным веществом и содержит заряженную группу и гидрофобную. Белки связываются с ДДС-Na своими гидрофобными радикалами и при этом денатурируют. Таким образом, белки выравниваются по форме и заряду. После этого подвижность белка при электрофорезе зависит только от его молекулярной массы

Выделение индивидуальных белков

Аффинная хроматография

Метод основан на способности белков прочно связываться с различными молекулами нековалентными связями. Используется для выделения и очистки ферментов, иммуноглобулинов, рецепторных белков.

Молекулы веществ, с которыми специфически связываются определенные белки, ковалентно соединяют с частицами инертного вещества. Смесь белков вносят в колонку и искомый белок прочно присоединяется к лиганду. Остальные белки свободно выходят из колонки. Задержанный белок затем можно вымыть из колонки с помощью буферного раствора, содержащего в свободном состоянии лиганд. Этот высокочувствительный метод позволяет выделить в чистом виде очень малые количества белка из клеточного экстракта, содержащего сотни других белков.



Изоэлектрофокусирование

Используется пластина с амфолином – веществом, у которого заранее сформирован градиент pH. Проводят сначала электрофорез в горизонтальном направлении. Белки разделяются в зависимости от заряда (изоэлектрическая точка). Затем обрабатывают пластину раствором ДДС-Na и проводят электрофорез в вертикальном направлении. Белки разделяются в зависимости от молекулярной массы.

Анализ гомологичных белков

Гомологичные белки – белки, которые выполняют одну и ту же функцию, но различаются по первичной структуре (например, локализованы в различных органах или образуются при

патологических состояниях). Например, HbA (содержит Glu) \Rightarrow HbS (содержит Val) при серповидноклеточной анемии.

Метод пептидных карт (отпечатков пальцев), предложенный Ингремом.

Этапы:

- 1) оба анализируемых белка расщепляют на фрагменты (пептиды);
- 2) смесь пептидов каждого белка наносят в виде пятна на угол листа хроматографической бумаги;
- 3) проводят электрофорез в горизонтальном направлении;
- 4) проводят распределительную хроматографию в вертикальном направлении;
- 5) полученные карты окрашивают и сравнивают;
- 6) различающиеся пептидные пятна выделяют и анализируют.

Лабораторная работа № 1

КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ БЕЛКОВ В РАСТВОРАХ

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

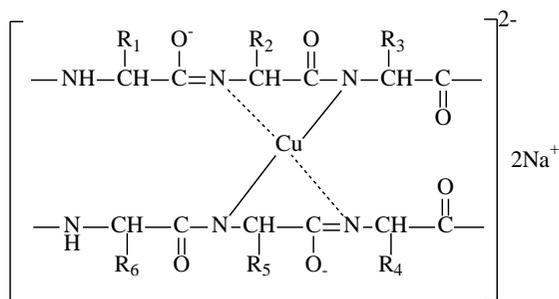
Присутствие белков в биологических объектах или растворах можно определить с помощью цветных реакций, протекание которых обусловлено наличием в белке специфических групп и пептидных связей.

Реактивы: водный раствор яичного белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, растворяют в 15-20-кратном объеме дистиллированной воды, затем раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике; 10%-ный раствор гидроксида натрия; 30%-ный раствор гидроксида натрия; 1%-ный раствор сульфата меди; 1%-ный раствор ацетата свинца; концентрированная азотная кислота; 0,5% раствор нингидрина.

Оборудование: пробирки; водяная баня или спиртовка.

Задание 1. Биуретовая реакция.

В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза – пептиды дают фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание с солями меди. Реакция обязана наличию пептидных связей в белках:



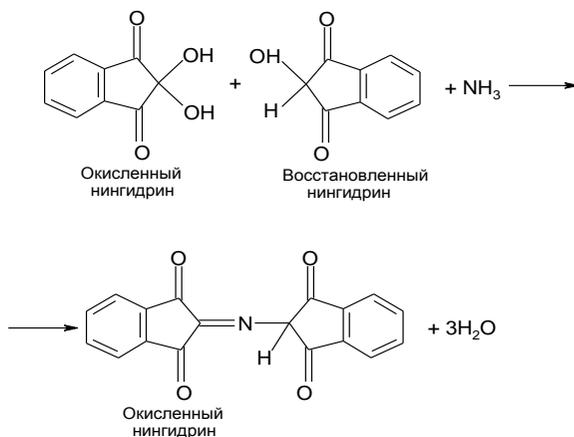
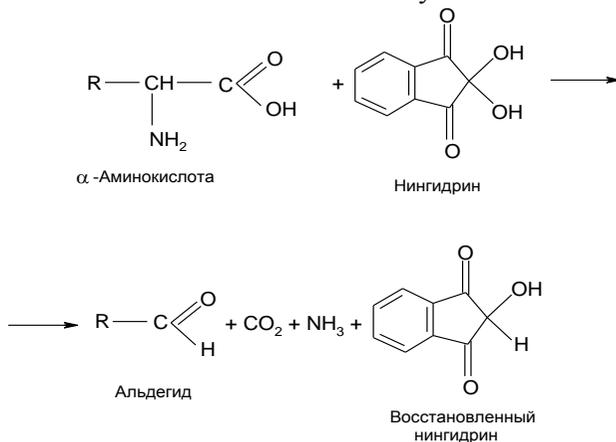
Интенсивность окраски зависит от длины полипептида.

Ход работы:

1. В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка, затем 10 капель 10%-го раствора щелочи.
2. Добавьте 1-2 капли раствора сульфата меди, смесь перемешайте. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Задание 2. Нингидриновая реакция

Реакция характерна для аминогрупп в α -положении и обусловлена наличием α -аминокислот в молекуле белка.



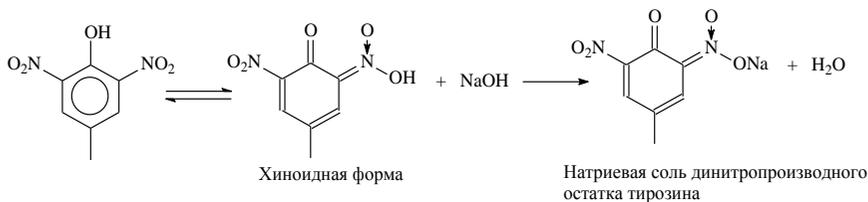
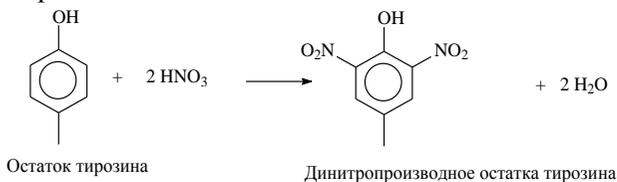
При нагревании белка с водным раствором нингидрина аминокислоты окисляются и распадаются, образуя двуокись углерода, аммиак и соответствующий альдегид. Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и окисленной молекулой нингидрина, образуя соединение фиолетово-синего цвета.

Ход работы.

В пробирку вносят 5 капель 1% раствора яичного белка, добавляют по 3 капли 0,5% раствора нингидрина и нагревают до кипения. Через 2-3 минуты появляется розовое, красное, а затем сине-фиолетовое окрашивание

Задание 3. Ксантопротеиновая реакция.

Реакция характерна для некоторых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), а также для пептидов, их содержащих. При действии азотной кислоты образуется нитросоединение желтого цвета. Далее нитропроизводные могут реагировать со щелочью с образованием натриевой соли, имеющей желто-оранжевое окрашивание:



Ход работы:

Данную работу необходимо выполнять в вытяжном шкафу, соблюдая особую ОСТОРОЖНОСТЬ!

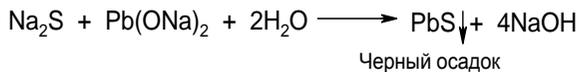
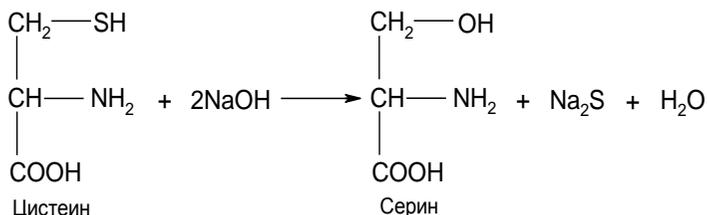
1. В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка и **ОСТОРОЖНО** по стенке прибавьте 3-4 капли концентрированной азотной кислоты.

2. Смесь осторожно нагрейте. Выпадает осадок, который окрашивается в желтый цвет.

3. После охлаждения в пробирку **ОСТОРОЖНО** по стенке прилейте 10 капель 30%-ого раствора NaOH, желтая окраска переходит в оранжевую.

Задание 4. Реакция на серусодержащие аминокислоты (реакция Фоля).

В остатках серусодержащих аминокислот цистеина и цистина сера при щелочном гидролизе отщепляется, образуя сульфиды. Сульфиды, взаимодействуя с ацетатом свинца, образуют осадок сульфида свинца черного или буро-черного цвета.



Ход работы.

1. В пробирке смешайте 5 капель раствора яичного белка, 5 капель 30%-го раствора щелочи и 2 капли раствора ацетата свинца.

2. Смесь осторожно нагрейте на спиртовке до кипения и кипятите. Через некоторое время появляется буровато-черное или черное окрашивание.

Оформление результатов.

Оформите проведенные исследования в виде таблицы.

№ задания	Условия проведения реакции	Наблюдаемое явление	Протекающие реакции	Вывод

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

1. РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Реакции обратимого осаждения белков

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При обратимом осаждении макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе. Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.

Реактивы: раствор яичного белка с добавлением хлорида натрия (белок одного куриного яйца отделяют от желтка и растворяют в 230 см³ дистиллированной воды, к которой прибавляют 100 см³ насыщенного раствора хлорида натрия, раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике); насыщенный раствор сульфата аммония; сульфат аммония, растертый в порошок; 10%-ый раствор гидроксида натрия; 1%-ый раствор сульфата меди.

Оборудование: пробирки; воронка для фильтрования; бумажные фильтры.

Ход работы.

Задание 1. Осаждение белков сульфатом аммония.

1. В пробирку отмерьте 2-3 см³ раствора яичного белка, добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и смесь перемешайте.
2. Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтруйте на бумажном фильтре.
3. К фильтрату добавьте порошок сульфата аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция не растворяется).
4. Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтруйте.
5. Фильтр с осадком альбуминов промойте 5 см³ воды, собирая фильтрат в чистую пробирку.
6. Проведите с фильтратом биуретовую реакцию. Произошло ли растворение альбуминов?

Задание 2. Осаждение белков спиртом.

Органические растворители вызывают осаждение белков вследствие разрушения гидратной оболочки макромолекул.

1. В пробирку налейте 1 см³ раствора яичного белка с добавлением хлорида натрия.
2. По каплям прилейте 4-6 см³ спирта и сильно взболтайте. Через 5-8 мин. выпадает осадок белков.

Задание 3. Проба на проламины.

Испытуемый материал: измельченное зерно, мука Реактивы: раствор этилового спирта (C₂H₅OH) = 70% В пробирку берут 1 г исследуемого материала и 10 см³ раствора этилового спирта. Экстракцию белков ведут при 30-35⁰С, в течение 20 мин при периодическом перемешивании. Через 20 минут надосадочную жидкость отфильтровывают и в части фильтрата обнаруживают белок по биуретовой реакции. Оставшуюся часть фильтрата разбавляют водой в 2 раза. При этом концентрация спирта резко падает и спирторастворимые белки – проламины теряют растворимость. Раствор мутнеет.

2. Реакции необратимого осаждения белков

При необратимом осаждении происходит глубокая денатурация и агрегация белка. Денатурированный белок не способен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, алкалоидных реагентов, детергентов, красителей.

Реактивы: водный раствор яичного белка (раствор готовят, как указано в лабораторной работе № 1); концентрированные серная, соляная и азотная кислоты; 5%-ый раствор ацетата свинца; 2,5%-ый раствор нитрата серебра; 5%-ый раствор сульфата меди.

Задание 1. Осаждение белков минеральными кислотами.

Реакция находит применение для быстрого определения белка в биологических жидкостях, например, моче.

Ход работы:

Данную работу необходимо выполнять в вытяжном шкафу, соблюдая особую ОСТОРОЖНОСТЬ!

1. В три пробирки налейте по 15-20 капель концентрированных кислот: в первую – серной; во вторую – азотной и в третью – соляной.

2. Пробирки наклоните под углом 45° и ОСТОРОЖНО (из пипетки) наслоите по стенке раствор белка. Пробирку держите отверстием от себя. На границе белка и кислоты появляется белое кольцо.

3. Пробирки осторожно встряхните. Осадки растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной кислоте.

Задание 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Белки осаждаются солями меди, свинца, ртути, цинка, серебра и других тяжелых металлов. Свойство белков связывать ионы тяжелых металлов используется в медицине при оказании первой помощи пострадавшим от отравления солями меди, свинца, ртути.

Ход работы.

1. В три пронумерованные пробирки налейте по 5-10 капель раствора белка.

2. В первую пробирку по каплям прибавьте раствор ацетата свинца. Образуется осадок. Добавьте еще несколько капель, осадок должен раствориться в избытке раствора соли.

3. Во вторую пробирку по каплям приливайте раствор нитрата серебра. Образовавшийся осадок в избытке соли не растворяется.

4. В третью пробирку прибавьте раствор сульфата меди до появления осадка. Убедитесь, что осадок растворяется в избытке соли.

Оформление результатов:

Оформите результаты проведенных исследований в виде таблицы.

Осаждающий реагент	Описание осадка	Растворимость осадка в избытке реагента

3. Тепловая денатурация белка.

При нагревании белки денатурируют. На процесс денатурации оказывают сильное влияние рН раствора и добавление электролитов.

Реактивы: водный раствор яичного белка (раствор готовят, как указано в лабораторной работе № 1); 1%-ый раствор уксусной кислоты; 10%-ый раствор уксусной кислоты; 10%-ый раствор гидроксида натрия; насыщенный раствор хлорида натрия.

Оборудование: пробирки, водяная баня или спиртовка.

Ход работы.

1. В пять пронумерованных пробирок налейте по 10 капель раствора яичного белка.

2. Белок в первой пробирке нагрейте до кипения. Раствор мутнеет (разрушаются гидратные оболочки вокруг макромолекул), но осадок не образуется. Мицеллы, образованные макро-

молекулами, сохраняют одноименный заряд, что препятствует их осаждению.

3. К раствору белка во второй пробирке добавьте одну каплю 1%-ого раствора уксусной кислоты и нагрейте до кипения. Осадок белка выпадает быстро. Заряд мицелл нейтрализован и белок близок к изоэлектрической точке.

4. К раствору белка в третьей пробирке прибавьте 1-2 капли 10%-ого раствора уксусной кислоты и нагрейте до кипения. Осадок не образуется, так как мицеллы белка приобрели, присоединяя ионы водорода, положительный заряд, что препятствует их осаждению.

5. В четвертую пробирку добавьте 1-2 капли 10%-ого раствора гидроксида натрия и нагрейте до кипения. Осадок не выпадает. Мицеллы за счет отщепления протонов от карбоксильных групп боковых цепей белка заряжены отрицательно.

6. В пятую пробирку прибавьте 1-2 капель насыщенного раствора хлорида натрия и нагрейте до кипения. Белок выпадает в осадок.

Оформление результатов.

Оформите результаты исследования, заполнив таблицу и кратко записав механизм денатурирующего действия исследуемого фактора в виде вывода.

№ пробирки	Добавляемый электролит	Наблюдаемый эффект денатурации	Вывод

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ЖЕЛАТИНЫ

В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы. Молекулы белка с одинаковым количеством положительных и отрицательных зарядов легко выпадают в осадок. Значение pH, соответствующее изоэлектрической точке, является характер-

ным для каждого белка. Выпадение белка в осадок можно ускорить добавлением водоотнимающих веществ, например, этилового спирта.

Желатина (желатин) – полидисперсная смесь полипептидов (молекулярная масса – 50-70 тыс. Д), образуемая из коллагена.

Реактивы: 0,5%-ый раствор желатины; 0,1 М раствор уксусной кислоты; 0,1 М раствор ацетата натрия; 96%-ый этиловый спирт.

Оборудование: пробирки; мерные пипетки.

Ход работы.

1. В пять пронумерованных пробирок прилейте растворы уксусной кислоты и ацетата натрия в количествах, указанных в табл.

2. После чего в каждую пробирку добавьте по 1 см³ раствора желатины и хорошо перемешайте.

3. В каждую пробирку прибавьте по 4 см³ этилового спирта и снова перемешайте.

4. Через 5-10 мин. просмотрите все пробирки и оцените степень мутности полученных смесей. рН наиболее мутной смеси соответствует изоэлектрической точке желатины.

Оформление результатов.

Результаты опыта оформите в виде таблицы. Определите изоэлектрическую точку желатины.

№ пробирки	Состав буферной смеси, см ³		рН смеси	0,5%-ый раствор желатины, см ³	Этиловый спирт, см ³	Степень мутности (по 5 балльной шкале)
	0,1 М CH ₃ COOH	0,1 М CH ₃ COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	0,2	1,8	5,7	1	4	

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Определение свойств клейковины

Под клейковиной понимают белковый комплекс, образующийся при отмывании теста от крахмала и обладающий упругими и эластичными свойствами.

Клейковина, отмытая из пшеничного теста, представляет собой сильно гидратированный гель, состоящий в основном из белков, но содержащий кроме него углеводы, липиды и минеральные вещества. Содержание компонентов клейковины зависит от сорта муки, ее подготовки к замесу, продолжительности отмывания и различных других факторов. Сумма белков в клейковине составляет 75-99%, представленных главным образом, глиадином (до 45%) и глютелином (до 42%). Значение клейковины заключается в том, что она формирует тесто. При замешивании муки с водой в процессе приготовления теста отдельные частицы клейковины, набухая, слипаются друг с другом и образуют непрерывную фазу гидратированного белка, в результате чего и образуется компактная, упругая масса теста. Углекислый газ, выделяемый дрожжами при брожении теста, растягивает клейковину, т.е. разрыхляет эту массу, увеличивая ее объем, придает ей мелкопористую структуру, которая закрепляется при выпечке, образуя характерную пористую структуру хлебного мякиша. Качество выпекаемого хлеба во многом зависит от свойств клейковины.

Задание № 1. Определение количества сырой клейковины зерна пшеницы.

Метод изложен в ГОСТ 13586.1-68 «Зерно. Методы определения количества и качества клейковины пшеницы».

25 г размолотого зерна взвешивают на технических весах с точностью до 0,1 г. Навеску переносят в фарфоровую ступку или чашечку и заливают 13 см³ водопроводной воды. Пестиком или шпателем замешивают тесто, пока оно не станет однородным. Приставшие к пестику или ступке частицы присоединяют к куску теста и хорошо приминают его руками. Скатанное в шарик тесто кладут в ступку или чашечку, закрывают крышкой (стеклом) и оставляют на 20 минут для набухания клейковины. Затем

начинают отмывание клейковины под слабой струёй воды с температурой 18-20⁰С над густым шелковым или капроновым ситом. Сначала отмывают осторожно, чтобы вместе с крахмалом и оболочками не отрывались кусочки клейковины, а когда большая часть крахмала и оболочек будет отмыта – более энергично. Оторвавшиеся кусочки клейковины тщательно собирают с сита и присоединяют к общей массе клейковины.

Допускается отмывать клейковину в тазу или чашке. В таз наливают не менее 2 л воды, опускают тесто в воду и отмывают крахмал и частицы оболочек зерна, разминая тесто руками. Когда в воде накапливается крахмал и частицы оболочек, воду меняют, процеживая ее через шелковое или капроновое сито. При выделении клейковины из пшеницы пониженного качества (пораженной клопом-черепашкой, морозобойной, проросшей и т.п.) ее отмывают медленно и осторожно, вначале в тазу. Отмывают до тех пор, пока оболочки не будут полностью отмыты и вода, стекающая при отжимании клейковины, не будет почти прозрачной (без мути).

Клейковина, которая не отмывается, характеризуется как "не отмываемая". Отмытую клейковину отжимают между ладонями, вытирая их время от времени сухим полотенцем, при этом клейковину несколько раз выворачивают и снова отжимают между ладонями, пока она не начнет слегка прилипать к рукам. Отжатую клейковину взвешивают, затем еще раз промывают 2-3 минуты, вновь отжимают и взвешивают на технических весах. Если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,1 г. то отмывание клейковины считают законченным. Содержание сырой клейковины выражают в процентах к навеске измельченного зерна (шрота). При контрольных и арбитражных анализах расхождения при определении количества сырой клейковины не должны превышать $\pm 2\%$.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

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

Широкое распространение в настоящее время получил так называемый «зональный электрофорез» – электрофорез на твердом носителе (на бумажных полосах, агаре, крахмале, акриламиде), пропитанном буферным раствором с нужным значением рН. Положение белков на бумаге или геле определяют путем фиксации и последующего окрашивания их тем или иным красителем (обычно бромфеноловым синим, амидовым черным или кумасси синим). Количество белка в каждой фракции можно ориентировочно определять по интенсивности окраски связанного красителя. Такое определение не дает строго количественного соотношения белковых фракций, так как количество красителя, связываемого различными белками, неодинаково.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА БУМАГЕ

Разделение анализируемой смеси происходит на определенных сортах хроматографической бумаги, пропитанной буферным раствором, в приборах для электрофореза.

Белки разделяют при напряжении до 500 В.

Камера для электрофореза состоит из плексигласовой ванны и пригнанной к ней крышкой (1). В ванне имеются 2 электродных отсека (2), каждый из которых разделен продольной перегородкой (3) на два отделения, сообщающиеся между собой. Во внутренние отделения отсеков опускают электроды, а во

внешние – концы бумажных полос (4), основную часть которых располагают на горизонтальной пластинке с шипами (5), находящейся в центральной части камеры. Между горизонтальной пластинкой и наружным отделением электродных отсеков имеются палочки (6), через которые перекидываются бумажные полоски и которые служат для их поддерживания. Под верхней крышкой камеры находится сделанная из плексигласа пластинка с большими круглыми отверстиями (7), на которую сверху кладутся смоченные в дистиллированной воде, сложенные в 4-5 раз листы фильтровальной бумаги. Эти листы способствуют увеличению герметичности камеры и как следствие – уменьшению испарения жидкости с электрофореграмм в процессе электрофореза.

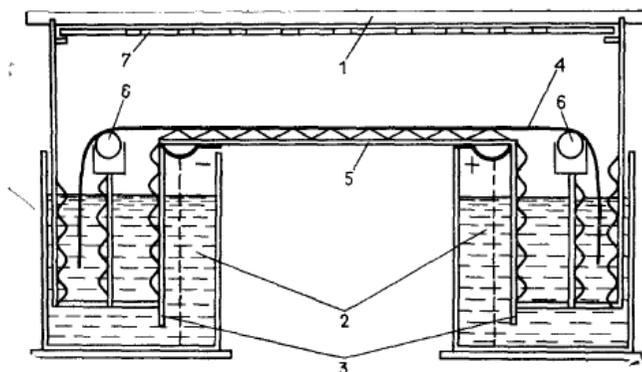


Схема прибора для низковольтного электрофореза

Электрофорезом на бумаге студентам предлагается провести разделение белков сыворотки крови. Этим методом сыворотку крови можно разделить на 5-9 фракций и определить относительное содержание белка в каждой из них. Разделение проводят в буферном растворе (рН 8,6-8,9) при градиенте потенциала 3-5 В/см (120-350 В для полос длиной 40-45 см) при комнатной температуре. Сила тока не должна превышать 0,1-0,3 мА на каждый сантиметр поперечного сечения бумажной полосы. Увеличение силы тока более чем в 2 раза недопустимо, так как при этом

происходит чрезмерное нагревание, значительное увеличение испарения и в конечном итоге – прогорание бумаги

Реактивы.

1. Буферный раствор. Можно использовать:

а) веронал-мединаловый буфер (рН 8,6): в 300 мл дистиллированной воды растворяют 10,32 г мединала (натриевая соль веронала), добавляют 1,84 г веронала, нагревают при помешивании на водяной бане до растворения и доводят водой до 1 л;

б) веронал-ацетатный буфер (рН 8,6): в 300 мл дистиллированной воды растворяют 4,3 г веронала, 0,95 г едкого натра и 3,24 г уксуснокислого натрия. К раствору приливают 30 мл 0,1 М раствора HCl и доводят водой до 1 л;

в) трис-буфер (рН 8,9): в 1 л дистиллированной воды растворяют 60,5 г триса, 6 г этилендиаминтетрауксусной и 4,6 г борной кислоты.

2. Растворы для окраски электрофореграмм:

а) кислый сине-черный краситель (аналогичный амидовому черному 10 Б) – 0,2 г в смеси: уксусная кислота (ледяная) – 100 мл + метиловый спирт – 900 мл;

б) бромфеноловый синий – 0,5 г, сулема – 10 г, уксусная кислота (ледяная) – 20 мл, дистиллированная вода – 980 мл;

в) бромфеноловый синий – 0,1 г, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 50 г, уксусная кислота (ледяная) 50 мл, дистиллированная вода – 900 мл.

3. Растворы для отмывания электрофореграмм от несвязавшейся с белком краски и закрепления красителя на белке:

а) уксусная кислота – 2%-й раствор;

б) уксуснокислый натрий – 2%-й раствор, приготовленный на 10%-м растворе уксусной кислоты.

4. Растворы для элюции окрашенных продуктов с электрофореграмм:

а) для извлечения бромфенолового синего – 0,01 М раствор NaOH;

б) для извлечения кислого сине-черного красителя – 0,1 М раствор NaOH.

Оборудование: пробирки; кюветы, спектрофотометр, прибор для электрофореза, бумага хроматографическая: FN4, FN5, ватман 3, ватман 3ММ и др.

Получение сыворотки крови. 2-3 мл крови набирают в сухую центрифужную пробирку и оставляют на 1/2-1 ч. Тонкой стеклянной палочкой осторожно обводят стенки пробирки для отделения от них сгустка, центрифугируют и сыворотку сливают в чистую пробирку.

Подготовка камеры. Отсеки для электродов наполняют буферным раствором до одинакового уровня (во избежание перетекания буфера), примерно по 800 мл в каждый отсек. Во внутренние части электродных отсеков погружают электроды. На листе хроматографической бумаги (18x45 см) (при использовании тонких сортов бумаги образцы лучше наносить на отдельные полоски шириной 4-5 см) на расстоянии 15 см от одного из его узких сторон простым мягким карандашом (графит препятствует растеканию жидкости) очерчивают места для нанесения проб. Они представляют собой прямоугольники (2 x 0,3 см), большие стороны которых располагают перпендикулярно длине бумажной полосы. Расстояние между стартовыми зонами и краями электрофореграммы – 2 см. Электрофореграмму пропитывают буфером, в котором будет проходить электрофорез. Для этого ее протягивают через кювету с буферным раствором. Концы бумажных полос (6-8 см) не смачивают. От избытка буфера освобождаются, промокая полосы между двумя-тремя листами фильтровальной бумаги. Влажную электрофореграмму помещают в камеру на центральную горизонтальную пластинку (5), а концы опускают в наружные отделения электродных отсеков. Прибор плотно закрывают крышкой, под которой находятся смоченные водой листы фильтровальной бумаги.

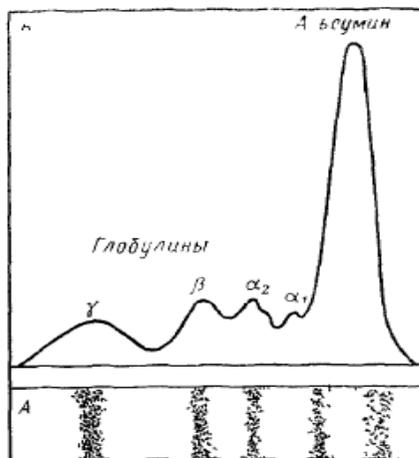
Проведение электрофореза. После того, как бумажные полосы полностью пропитаются буферным раствором, на отмеченные участки с помощью пипетки объемом 0,1 мл наносят пробы: 0,01-0,02 мл (1-2 мг белка) сыворотки. Камеру закрывают крышкой и включают ток. Длительность электрофореза составляет 22-24 ч при напряжении 200-300 В

Фиксация и окраска электрофореграмм. По окончании электрофореза выключают ток и тотчас вынимают электрофореграммы из прибора. Их располагают на специальной подставке и подсушивают на воздухе под тягой, затем – в сушильном шкафу при 105 °С в течение 20 мин для фиксации белков на бумаге, после чего помещают в эмалированную кювету, заливают красителем и оставляют на 2-3 ч и более. Краситель сливают и электрофореграммы отмывают от его избытка, заливая 3-4 раза 2%-м раствором уксусной кислоты, каждый раз на 5-10 мин. Участки бумаги, не содержащие белка, должны быть полностью освобождены от красителя. Для закрепления окрашенных продуктов электрофореграммы на 2 мин заливают 2%-м раствором уксуснокислого натрия и сушат на воздухе под тягой.

Определение соотношения отдельных фракций белка. При рН 8,6 белки сыворотки крови заряжены отрицательно и перемещаются в электрическом поле к аноду. Быстрее всего к аноду движется фракция, альбуминов, затем идут α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины (смотри рисунок). Участки бумажных лент, на которых проявились пятна белков, делят поперечными линиями простым карандашом на полоски шириной в 3-5 мм и разрезают по этим линиям. Каждую полоску измельчают и помещают в отдельную пронумерованную пробирку, заливают 3 мл 0,01 М раствора NaOH, оставляют на час для извлечения краски из бумаги, а затем находят для каждого раствора значение оптической плотности на фотоколориметре (спектрофотометре) при 612 нм.

Параллельно обрабатывают контрольную пробу. Для нее вырезают полоску из неокрашенных участков электрофореграммы.

На основании полученных данных строят кривую распределения окрашенных продуктов на электрофореграмме. На оси абсцисс отмечают номера пробирок, на оси ординат – соответствующее значение оптической плотности (см. рисунок). Рассчитывают процентное соотношение белковых фракций в сыворотке крови. Для этого вычерченную кривую делят по минимумам на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям.



Электрофореграмма сыворотки крови человека
и кривая распределения белковых фракций

Величина площади каждого участка пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по весу (вес участков бумаги пропорционален их площади), всю площадь принимают за 100%. При наличии денситометра соотношение белковых фракций в сыворотке крови можно определить из денситограммы.

Предварительно определяя содержание белка в сыворотке, рассчитывают его количество для каждой фракции.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Принцип метода: метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина

в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10-100 мкг белка в пробе). На развитие окраски влияет большое количество веществ: компоненты буферных систем (трис-буфер в концентрации 0,2 мМ, глицилглицин), восстановители (цистеин, дитиотреитол в концентрации 0,01-0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (трипон X100 в концентрации 0,1-0,2% вызывает выпадение осадка), серноокислый аммоний в концентрации 0,15%, сахара в концентрации 10% и др. В связи с этим при построении калибровочного графика для определения белка по методу Лоури в растворитель для стандартного белка необходимо включать все компоненты, содержащиеся в анализируемых пробах. В некоторых случаях целесообразно предварительное осаждение белков из растворов, например трихлоруксусной кислотой, с последующим растворением их в щелочных растворах, или очистка белковых растворов от низкомолекулярных компонентов путем диализа или гель-фильтрации на сефадексе G-25.

Интенсивность окраски комплекса, которая пропорциональна количеству белка в исследуемой пробе, измеряется спектрофотометрически.

Для исключения случайных ошибок, которые могут возникнуть в процессе измерения, рекомендуется не ограничиваться одним измерением (готовят 2 ряда пробирок)

При определении концентрации вещества в растворе следует соблюдать следующую последовательность в работе:

а) построение калибровочной кривой для данного вещества;

б) измерение оптической плотности исследуемого раствора и определение концентрации вещества в растворе по калибровочной кривой.

Реактивы:

Реактив № 1: 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 н. растворе NaOH .

Реактив № 2: 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном цитрате натрия.

Реактив № 3 готовится непосредственно перед работой: 15 мл реактива I + 0,3 мл реактива № 2.

Реактив № 4: Реактив Фолина-Чокальтеу: Реактив Фолина-Чокальтеу: 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристаллизованный) и 2,5 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу на 200-250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной HCl (х. ч.). Колбу присоединяют к обратному холодильнику (на шлифе), ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г Li_2SO_4 , 5 мл воды и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят водой с таким расчетом, что бы получился 1 н раствор кислоты (т. е. приблизительно вдвое). Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н. щелочью в присутствии фенолфталеина. Реактив может храниться в темной склянке длительное время.

Реактив № 5: стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг в 1 мл раствора.

Реактив № 6: раствор белка концентрации X.

Оборудование: пробирки; кюветы, спектрофотометр.

Ход работы.

Используя стандартный раствор белка и дистиллированную воду в 4 пробирках готовят растворы белка различной концентрации. Пятая проба не содержит белка и служит контролем на реактивы. В шестую пробирку помещают 0,4 мл р-ра белка неизвестной концентрации-X (см. таблицу).

Во все пробирки добавляем по 2 мл реактива № 3, смесь тщательно перемешивают. Через 10 мин добавляют 0,2 мл реактива № 4 Фолина-Чокальтеу. Реакционную смесь перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

№ пробы	Концентрация белка, мг/мл	объем стандартного раствора белка, мл	объем дистиллированной воды, мл	общий объем исследуемой пробы, мл
1	0,063	0,1	0,3	0,4
2	0,120	0,2	0,2	0,4
3	0,183	0,3	0,1	0,4
4	0,250	0,4	0	0,4
5(К)	0	0	0,4	0,4
6(Х)	х	0,4(мг х)	0	0,4

Интенсивность развившейся окраски измеряют спектрофотометрически (при длине волны 750 или 500 нм) Построение калибровочной кривой производят следующим образом. Измеряют оптические плотности каждого из этих растворов и строят график (калибровочную кривую), откладывая по горизонтальной оси (ось абсцисс) известные концентрации, а по вертикальной оси (ось ординат) – соответствующие им значения оптической плотности.

Пользуясь калибровочной кривой, определяют неизвестную концентрацию белка в исследуемом растворе, соответствующую измеренному значению оптической плотности.

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

Спектрофотометрический метод

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

Определению белка данным методом мешает присутствие нуклеиновых кислот и нуклеотидов.

Реактивы: растворы сывороточного альбумина, яичного альбумина концентрация белка 1 мг/мл.

Оборудование: пробирки; кюветы, спектрофотометр.

Ход работы.

Измеряя оптическую плотность раствора при 260 нм (для учета поглощения соединений нуклеотидной природы) и 280 нм (в качестве кюветы сравнения используют кювету с дистиллированной водой), содержание белка рассчитывают с помощью номограммы: экспериментально полученные величины оптической плотности при 260 и 280 нм находят в соответствующих столбцах номограммы и соединяют их прямой линией; точка пересечения этой прямой со шкалой, на которой дана концентрация белка, определяет содержание белка в исследуемом растворе.

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

Содержание белка = $1,45 * \lambda_{280} - 0,74 * \lambda_{260}$ (мг/мл).

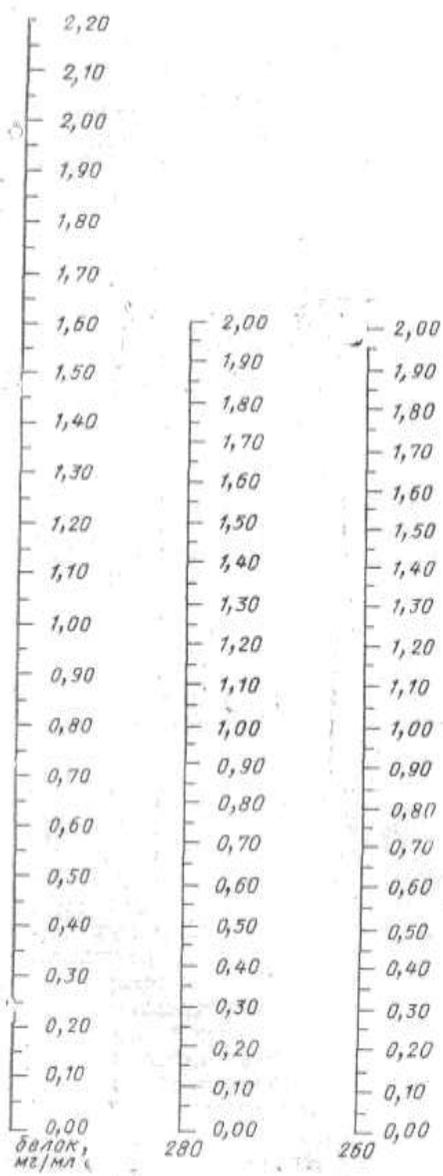


Рис. 6. Номограмма для определения белка

Лабораторная работа № 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Цель работы: ознакомиться с фотометрическим методом определения сульфгидрильных групп белков с помощью реактива Элмана.

Важная роль SH-групп белков в различных биохимических и физиологических процессах обусловлена их высокой реакционной способностью и многообразием химических превращений, в которые они вступают (ацилирование, окисление, алкилирование, образование меркаптидов, полумеркапталей, водородных связей и т. д.).

Для определения количества SH-групп в белках и пептидах наиболее широкое распространение получили следующие методы: амперометрическое титрование азотнокислым серебром, титрование п-хлор-меркурибензоатом (п-ХМБ) (метод Бойера) и определение при помощи 5,5'-дитиобис (2-нитробензоата) (ДТНБ) – реагента Элмана.

Принцип метода: в основе метода лежит реакция тиолди-сульфидного обмена в ходе которой освобождается анион 2-нитро-5-тиобензоата, обладающий поглощением при 412 нм. Коэффициент молярной экстинкции 2-нитро-5-тиобензоата зависит от pH. Обычно реакцию проводят при щелочных значениях pH (pH 8,0-9,0). При этом принимают $\epsilon_{412}=14000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Описываемый метод высокочувствителен и строго специфичен и может использоваться для определения количества сульфгидрильных групп в низкомолекулярных тиолах, нативных и денатурированных белках.

Реактивы.

1. Фосфатный (или трис-HCl) буфер – 10 мМ раствор, pH 8,0.
2. Исследуемый белок – 30-70 мкМ (по SH-группам) раствор в 10 мМ фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 1 мМ ЭДТА.

3. ДТНБ – 10 мМ раствор в 10 мМ фосфатном буфере, рН 8,0.

Оборудование: пробирки, кюветы, спектрофотометр, гомогенизатор, центрифуга с охлаждением.

Ход работы.

В кювету спектрофотометра вносят раствор белка и добавляют 5-10-кратный молярный избыток ДТНБ над сульфгидрильными группами. Полученную смесь перемешивают и через 5-10 мин измеряют оптическую плотность при 412 нм. Спустя 30 мин проводят повторное измерение оптической плотности, используя в качестве контроля раствор, содержащий равное количество ДТНБ, но не содержащий белка или низкомолекулярного тиола. Обычно реакция протекает очень быстро и максимальная оптическая плотность достигается через 5-10 мин после начала реакции. Описанное определение количества сульфгидрильных групп можно проводить в присутствии денатурирующих белки агентов (6 М гуанидинхлорид или 8 М мочевины). В этих условиях происходит полная денатурация белка и удается определить суммарное количество сульфгидрильных групп, приходящихся на моль белка. Зная, что в ходе реакции модификация одной сульфгидрильной группы сопровождается освобождением одного аниона 2-нитро-5-тио-бензоата, можно, определив оптическую плотность при 412 нм и зная коэффициент молярной экстинкции 2-нитро-5-тиобензоата, определить концентрацию сульфгидрильных групп в анализируемой инкубационной среде.

Если сульфгидрильные группы анализируемого белка высоко реакционноспособны и легко подвергаются окислению, их определение можно проводить в присутствии восстановителей (дитиотреитола, меркаптоэтанола). В этом случае к раствору белка, содержащему восстановители, добавляют ДТНБ так, чтобы конечная концентрация реагента в 5-10 раз превышала суммарную концентрацию тиолов в инкубационной среде. После окончания реакции смесь подвергают гельфильтрации на колонке с сефадексом G-50 или биогелем Р-10 и отделяют белок от смеси низкомолекулярных соединений. К раствору белка, сульфгидрильные группы которого модифицированы ДТНБ, добавляют 3-5-кратный молярный избыток дитиотреитола. Кон-

центрацию освобождающегося аниона 2-нитро-5-тиобензоата определяют по поглощению при 412 нм.

Контрольные вопросы

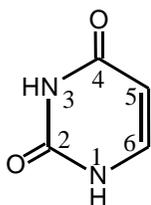
1. Биологическая роль белков.
2. Структура белков.
3. Силы, связывающие белки.
4. Азотистый баланс, его виды.
5. Где и при участии, каких ферментов перевариваются белки?
6. Гниение белков в кишечнике и пути обезвреживания токсических продуктов.
7. Каковы пути превращения аминокислот в тканях?
8. Типы дезаминирования.
9. Трансаминирование и его биологическая роль?
10. Декарбоксилирование аминокислот и роль биогенных аминов в организме животных.
11. Токсичность аммиака и пути его нейтрализации.
12. Биосинтез мочевины.
13. Что такое гликогенные и кетогенные аминокислоты?
14. Нарушения обмена белков в организме?

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

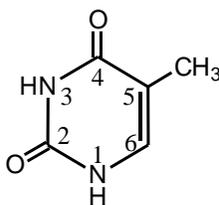
Нуклеиновые кислоты – важнейшие биополимеры с относительной молекулярной массой, достигающей 5×10^9 . Они содержатся во всех без исключения живых организмах и являются не только хранителем и источником генетической информации, но и выполняют ряд других жизненно важных функций. Нуклеиновые кислоты являются полимерами, мономерными звеньями которых являются *нуклеотиды*.

Строение и номенклатура

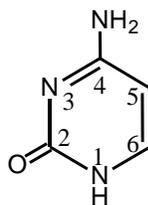
В *нуклеиновых кислотах* встречаются, в основном, пять нуклеиновых оснований, три пиримидиновых – урацил, тимин и цитозин и два пуриновых – аденин и гуанин).



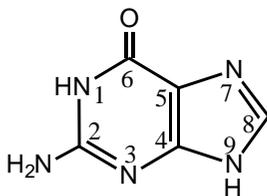
Урацил
Ura



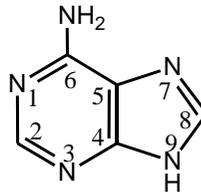
Тимин
Thy



Цитозин
Cyt



Гуанин
Gua



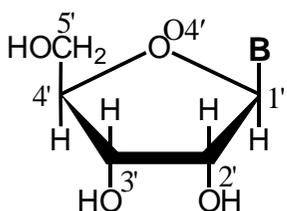
Аденин
Ade

Строение нуклеиновых оснований

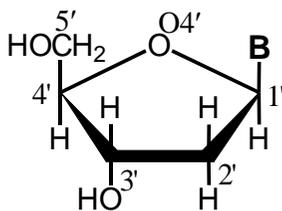
Существует два различных типа нуклеиновых кислот – *дезоксирибонуклеиновые кислоты* (ДНК) и *рибонуклеиновые кислоты* (РНК). ДНК представляет собой генетический материал большинства организмов. В клетках прокариот, кроме основной

хромосомной ДНК, часто встречаются внехромосомные ДНК – плазмиды. В эукариотических клетках основная масса ДНК расположена в клеточном ядре, где она связана с белками в хромосомах. Клетки эукариот содержат ДНК также в митохондриях и хлоропластах.

Нуклеозиды представляют собой гликозиды, в которых либо D-рибофураноза (в рибонуклеозидах), либо 2-дезоксид-рибофураноза (в 2'-дезоксирибонуклеозидах) связана гликозидной связью с атомом N1 пиримидиновых или атомом N9 пуриновых оснований.

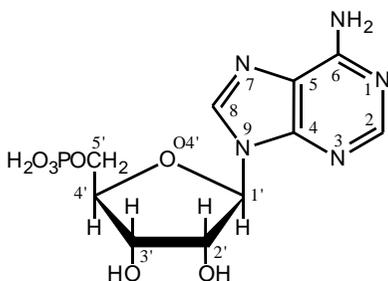


Рибонуклеозиды

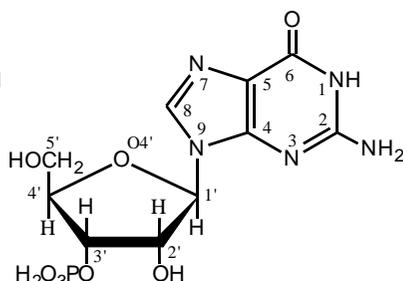


2'-Дезоксирибонуклеозиды

Рибонуклеозиды входят в состав рибонуклеиновых кислот (РНК), а 2'-дезоксирибонуклеозиды – в состав дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК).



Аденозин-5'-фосфат
5'-AMP



Гуанозин-3'-фосфат
3'-GMP

Строение некоторых мононуклеотидов. Перед названием ставят цифру, указывающую место присоединения фосфорного остатка

Молекулы ДНК – самые крупные биологические молекулы. Молекула ДНК *E.coli* состоит примерно из 4000000 пар нуклеотидов, ее относительная масса равна 26000000000, а длина – 1,4 мм, что в 700 раз превышает размеры ее клетки. Молекулы ДНК эукариот могут достигать еще больших размеров, их длина может составлять несколько см, а относительная масса 10^{10} - 10^{11} . Чтобы записать нуклеотидную последовательность ДНК человека, потребуется около 1000000 страниц.

Что же касается РНК, то по выполняемым ими функциям различают:

а) информационные РНК (иРНК) – в них записана информация о первичной структуре белка; б) рибосомные РНК (рРНК) – входят в состав рибосом; в) транспортные РНК (тРНК) – обеспечивают доставку аминокислот к месту синтеза белка. В качестве генетического материала РНК входят в состав ряда вирусов. Например, вирусы, вызывающие такие опасные заболевания, как грипп и СПИД, являются РНК-содержащими.



Нуклеиновым кислотам присущи три важнейшие функции: хранение, передача и реализация генетической информации. Кроме этих, они выполняют и другие функции, например, участвуют в катализе некоторых химических реакций, осуществляют регуляцию реализации генетической информации, выполняют структурные функции и др. Роль хранителя генетической информации у большинства организмов (эукариот, прокариот, некоторых вирусов) выполняют двухцепочечные ДНК. Только у

некоторых вирусов хранителем генетической информации являются одноцепочечные ДНК или одноцепочечные, а также двухцепочечные РНК. Генетическая информация записана в *генах*. Ген по своей природе является участком нуклеиновой кислоты. В них закодирована первичная структура белков. Гены могут также нести информацию о структуре некоторых типов РНК, например, тРНК и рРНК.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ

Реактивы: дрожжи пекарские, прессованные; 1%-ный раствор гидроксида натрия; ацетат натрия; речной песок, тщательно промытый и прокаленный.

Оборудование: ступка с пестиком; воронка для фильтрования, химические стаканы; стеклянная палочка.

Ход работы.

1. К 6 г пекарских дрожжей добавьте 2 см³ воды, немного песка и полученную смесь разотрите в ступке с 1%-ым раствором гидроксида натрия. Раствор щелочи добавляйте небольшими порциями (по 2-3 см³), всего расходуйте около 25 см³. Массу дрожжей растирайте около 15-20 мин до получения гомогенной массы.
2. Содержимое ступки профильтруйте через складчатый фильтр и перелейте в стакан.
3. Затем в стакан добавьте 5 г ацетата натрия и, перемешивая стеклянной палочкой, растворите его.
4. По стенке стакана осторожно наслоите 25 мл этанола. Медленно круговыми движениями перемешайте жидкости. Образуются крупные хлопья нуклеопротеинов, которые постепенно осаждаются на дно стакана.
5. Отделите осадок нуклеопротеинов фильтрацией на бумажном фильтре или декантацией. Полученные нуклеопротеины сохраните для следующего опыта.

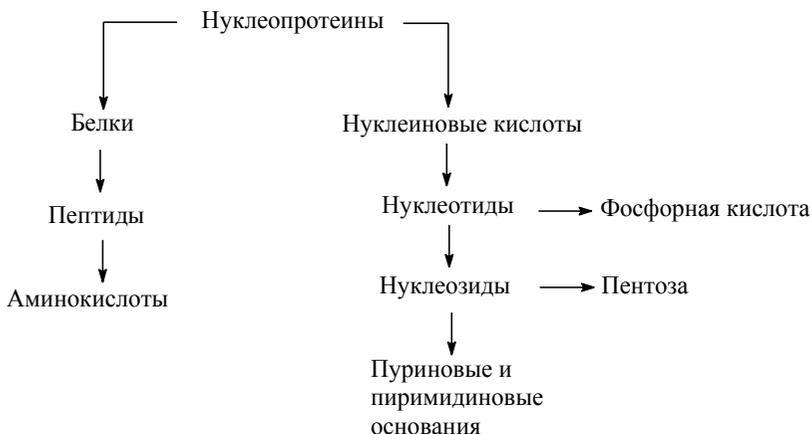
Оформление результатов.
Опишите ход выполнения работы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

При выполнении данной работы следует соблюдать особую ОСТОРОЖНОСТЬ!

Гидролиз нуклеопротеинов протекает в кислой среде по нижеприведенной схеме.



Реактивы: осадок нуклеопротеинов, полученный в предыдущей работе; 5%-ый раствор серной кислоты; концентрированная серная кислота; 10%-ый раствор гидроксида натрия; 20-25%-ый раствор аммиака; 1%-ый раствор сульфата меди; 1%-ый спиртовой раствор тимола; 1%-ый раствор нитрата серебра; молибденовый реактив (3,75 г молибдата аммония растворяют в 50 см³ воды и добавляют 50 см³ 32%-ного раствора азотной кислоты (плотностью 1,200 г/см³). Полное растворение молибдата аммония происходит при добавлении кислоты).

Оборудование: круглодонная колба с обратным холодильником; электрическая плитка; воронка для фильтрования; индикаторная бумага; бумажный фильтр.

Ход работы.

Задание 1. Гидролиз нуклеопротеинов.

1. Осадок нуклеопротеинов, полученный в предыдущей работе, растворите в 25 см³ 5%-ого раствора серной кислоты и перенесите в круглодонную колбу.

2. Колбу закройте пробкой с обратным холодильником. Реакционную смесь нагрейте на электрической плитке до кипения и кипятите в течение 1,5 ч.

3. Смесь охладите и профильтруйте через бумажный фильтр. С фильтратом проделайте реакции нижеследующих заданий.

Задание 2. Обнаружение полипептидов.

1. К 2 см³ фильтрата прилейте 2 см³ 10%-ого раствора щелочи и 2 капли раствора сульфата меди. Образуется характерное для полипептидов окрашивание.

Задание 3. Обнаружение пуриновых оснований.

1. К 5 каплям 1%-ного раствора нитрата серебра приливайте концентрированный раствор аммиака до растворения образовавшегося вначале осадка.

2. В другую пробирку влейте 2 см³ фильтрата (задание 1) и приливайте к нему концентрированный раствор аммиака до щелочной по индикаторной бумаге реакции.

3. Во вторую пробирку влейте содержимое первой пробирки. Через несколько минут выпадают хлопья солей пуриновых оснований.

Задание 4. Обнаружение пентоз.

1. К 1 см³ фильтрата добавьте 2-3 капли 1%-ого раствора тимола и по стенке пробирки **ОСТОРОЖНО** наслоите 1 см³ концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет.

Задание 5. Обнаружение фосфорной кислоты.

1. К 1 см³ фильтрата прилейте равный объем молибденового реактива.

2. Содержимое пробирки нагрейте до кипения и кипятите в течение 2-3 минут. Появляется желтое окрашивание, обуслов-

ленной образованием комплексной соли. При стоянии выпадает желтый осадок.

Оформление результатов.

Опишите ход выполнения работы, опишите компоненты входящие в состав нуклеопротеинов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

1) Запишите формулы нуклеотидов ГТФ, УДФ, дАМФ, дТДФ, дЦТФ.

а) в составе нуклеотидов обведите карандашом пуриновые азотистые основания;

б) подчеркните нуклеотиды, содержащие рибозу, одной чертой, а нуклеотиды, содержащие дезоксирибозу – двумя чертами.

2) Напишите формулу тринуклеотида А-Ц-Г.

а) укажите фосфодиэфирные связи;

б) отметьте 5'- и 3'-концы.

3) Дан фрагмент одной из цепей ДНК:

Г-Ц-Т-А-А-Т-Ц-Г-Ц-Т-А-Г.

а) запишите нуклеотидную последовательность второй комплементарной цепи;

б) укажите 5'- и 3'-концы в цепях ДНК.

4) Фрагмент иРНК имеет следующую нуклеотидную последовательность:

5' А-Ц-У-А-Ц-Ц-А-Ц-А-А-Ц-Г-У-Г-А 3'

а) определите, сколько аминокислот закодировано в данном фрагменте;

б) пользуясь таблицей генетического кода, определите закодированную аминокислотную последовательность;

с) по фрагменту иРНК установите первичную структуру обеих цепей ДНК, отметьте транскрибируемую цепь, укажите 5'- и 3'-концы в цепях ДНК.

5) Пептид имеет следующую структуру:

фен-ала-арг-гли-тре-сер

а) может ли несколько иРНК, отличающихся друг от друга первичной структурой, кодировать данный пептид или нет?

б) запишите две различные последовательности иРНК, кодирующие данный пептид, укажите 5'- и 3'-концы в иРНК.

$\left. \begin{array}{l} \text{УУУ} \\ \text{УУЦ} \\ \text{УУА} \\ \text{УУГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Фен} \\ \text{Лей} \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{УЦУ} \\ \text{УЦЦ} \\ \text{УЦА} \\ \text{УЦГ} \end{array} \right\} \text{Сер}$	$\left. \begin{array}{l} \text{УАУ} \\ \text{УАЦ} \\ \text{УАА} \\ \text{УАГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Тир} \\ \text{Терм}^1 \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{УГУ} \\ \text{УГЦ} \\ \text{УГА} \\ \text{УГГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Цис} \\ \text{Терм}^1 \\ \text{Три} \end{array}$
$\left. \begin{array}{l} \text{ЦУУ} \\ \text{ЦУЦ} \\ \text{ЦУА} \\ \text{ЦУГ} \end{array} \right\} \text{Лей}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ЦЦУ} \\ \text{ЦЦЦ} \\ \text{ЦЦА} \\ \text{ЦЦГ} \end{array} \right\} \text{Про}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ЦАУ} \\ \text{ЦАЦ} \\ \text{ЦАА} \\ \text{ЦАГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Гис} \\ \text{Глн} \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ЦГУ} \\ \text{ЦГЦ} \\ \text{ЦГА} \\ \text{ЦГГ} \end{array} \right\} \text{Арг}$
$\left. \begin{array}{l} \text{АУУ} \\ \text{АУЦ} \\ \text{АУА} \\ \text{АУГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Иле} \\ \text{Мет}^+ \\ \text{+Иниц}^2 \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{АЦУ} \\ \text{АЦЦ} \\ \text{АЦА} \\ \text{АЦГ} \end{array} \right\} \text{Тре}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ААУ} \\ \text{ААЦ} \\ \text{ААА} \\ \text{ААГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Асн} \\ \text{Лиз} \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{АГУ} \\ \text{АГЦ} \\ \text{АГА} \\ \text{АГГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Сер} \\ \text{Арг} \end{array}$
$\left. \begin{array}{l} \text{ГУУ} \\ \text{ГУЦ} \\ \text{ГУА} \\ \text{ГУГ} \end{array} \right\} \text{Вал}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ГЦУ} \\ \text{ГЦЦ} \\ \text{ГЦА} \\ \text{ГЦГ} \end{array} \right\} \text{Ала}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ГАУ} \\ \text{ГАЦ} \\ \text{ГАА} \\ \text{ГАГ} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Асп} \\ \text{Глу} \end{array}$	$\left. \begin{array}{l} \text{ГГУ} \\ \text{ГГЦ} \\ \text{ГГА} \\ \text{ГГГ} \end{array} \right\} \text{Гли}$

Терм.¹ - терминирующий кодон

Иниц.² - иницирующий кодон

Контрольные вопросы

1. Биологическая роль нуклеиновых кислот.
2. Структура нуклеиновых кислот.
3. Силы, связывающие нуклеиновых кислот.
4. Виды нуклеиновых кислот.
5. Синтез белка в клетке?
6. Передача наследственной информации потомству?

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Биохимия животных / Под ред. А.В.Чечеткина. – М.:Высш. шк., 1982.-511 с.
2. Берсзов Т.Т., Коровкии Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1990. – 528с.
3. Кучеренко Н.Е. и др. Биохимия: Учебник Высшая школа. – 1988. – 432с.
4. Кноре Д.Г., Мызина С.Д., «Биологическая химия» – М.: Высшая школа – 2000. – С. 15-155.
5. Грачева И.М., Криватова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – Изд. третье, перераб. и дополн. – М.: Изд. «Элевар». – 2000. – С. 10-106.

Дополнительная

1. Бохинский С. Современные воззрения в биохимии. – М.: Мир, 1988. 544 с.
2. Строев Е.А. Биологическая химия. – М.: Высш. шк., 1986. – 479 с.
3. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. - М.: Медицина, 1991. – 528 с.
4. Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высшая школа. – 1986. – 499 с.
5. Ленеджер А. – Биохимия: перев. с англ. – М.: Мир. – 1985. – 1055с.
6. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. – М.: Легкая и пищевая промышленность. – 1984. – 211с.
7. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Высшая школа. – 1993. – 483с.
8. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир. – 1990. – 548с.
9. Периодические издания (1998-2006 гг.): журналы «Хранение и переработка сельхозсырья», «Биотехнология», «Прикладная биотехнология», «Биохимия и микробиология».
10. Кононский А. И. Биохимия животных. – Киев: Вища шк., 1984. – 415с.

11. Кислухина О., Кудулас И – Биотехнологические основы переработки растительного сырья. – Каунас. – «Технология». – 1997.

ОГЛАВЛЕНИЕ

		Стр
1	Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	3
2	Раздел 1. Аминокислоты, пептиды, белки: классификация, функции, строение	4
3	Исследование структуры белков и пептидов	11
4	Лабораторная работа № 1. Качественное обнаружение белков в растворах	17
5	Лабораторная работа № 2. Физико-химические свойства белков	21
6	Лабораторная работа № 3. Определение свойств клейковины	27
7	Лабораторная работа № 4. Электрофоретическое разделение белков	29
8	Лабораторная работа № 5. Количественное определение содержания белков метолом Лоури	34
9	Лабораторная работа № 6. Определение содержания сульфгидрильных групп белков и пептидов	40
10	Раздел 2. Нуклеиновые кислоты	43
11	Лабораторная работа № 1. Выделение нуклеопротеидов из дрожжей	46
12	Лабораторная работа № 2. Гидролиз нуклеопротеидов	47
13	Практическое задание	49
14	Литература	51

Учебное издание

Заводник Лев Борисович
Будько Тамара Николаевна
Почебут Оксана Николаевна

**БЕЛКИ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ.
СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ, ОБМЕН.**

Методические указания для лабораторных работ

Компьютерная верстка: Л.Б. Заводник, Р.Н. Лях

Подписано в печать 05.03.2010.
Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Печать Riso. Усл. печ. л. 3,14. Уч.-изд.л. 3,28.
Тираж 50 экз. Заказ №2188

Учреждение образования
«Гродненский государственный аграрный университет»
Л.И. №02330/0548516 от 16.06.2009.
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.

Отпечатано на технике издательско-полиграфического отдела
Учреждения образования «Гродненский государственный
аграрный университет».
230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28.